



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**“SÍNTESIS DE ÉSTERES HALOGENADOS DE PREGNADIENO
CON UN GRUPO METILO EN C-16”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. F. B. ROSA ARELY ROJAS ARENAS



TUTOR: Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff

AÑO: 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Gustavo García de la Mora

Vocal: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Secretario: Dra. Marisa Cabeza Salinas

Primer Suplente: Dr. Benjamín Ortiz Mendoza

Segundo Suplente: Dr. René Miranda Ruvalcaba

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio L-125, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio 006, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza Salinas.

Asesor: Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff

Sustentante: QFB Rosa Arely Rojas Arenas

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Eugene Bratoeff por las enseñanzas compartidas a lo largo de este proyecto.
- A la Dra. Elenita Ramírez López por ser parte importante de mi formación académica y personal, pero sobre todo por su gran amistad.
- A la Dra. Marisa Cabeza Salinas por su invaluable apoyo para la realización de las pruebas biológicas.
- Al M. en C. Víctor Pérez Ornelas por la ayuda desinteresada brindada a lo largo de mi estancia en el laboratorio y por su amistad.
- Al personal académico de la USAI por su apoyo para la realización de los espectros de UV, IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y EMIE.
- Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.
- A la DGAPA por el apoyo financiero para el proyecto IN208505.
- Al H. Jurado por sus comentarios hacia este trabajo que ayudaron a enriquecer el contenido del mismo.
- A la UNAM por todo lo que me ha dado.

A todos mis amigos, gracias por su incomparable amistad!

A mi familia, gracias por su apoyo, comprensión y cariño!

A María, gracias por estar siempre a mi lado!

ÍNDICE

	Página
Resumen	I
Abstract	II
Introducción	1
1. ANTECEDENTES	
1.1 Andrógenos.....	3
1.1.1 Mecanismo de acción de andrógenos.....	5
1.2 Enfermedades prostáticas.....	5
1.2.1 Hiperplasia prostática benigna (HPB).....	6
1.2.2 Diagnóstico y tratamiento para la HPB.....	7
1.2.3 Cáncer de próstata.....	7
1.2.4 Diagnóstico y tratamiento para el cáncer de próstata.....	8
1.3 Antiandrógenos.....	9
1.4 Enzima 5 α -reductasa.....	10
1.5 Receptor androgénico.....	12
2. CONSIDERACIONES PARA LA SÍNTESIS DE NUEVOS ESTEROIDES	
2.1 Relación estructura-actividad biológica (REA).....	14
2.1.1 Derivados del androstano.....	14
2.1.2 Derivados del pregnano.....	14
2.2 Estructuras químicas de los nuevos esteroides.....	17
2.2.1 Elección del sustituyente en C-17.....	17
2.2.2 Reemplazo biosostérico.....	18
2.2.3 Importancia de los halógenos en la relación estructura-actividad biológica	
2.2.3.1 Efectos electrónicos.....	19
2.2.3.2 Efectos hidrofóbicos.....	19
2.2.3.3 Efectos estéricos.....	20
2.2.3.4 Efectos de halogenación obstructiva.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
5.1 Parte Química.....	24
5.1.1 Instrumentación	
5.1.2 Síntesis y caracterización de los nuevos esteroides.....	25
5.1.3 3 β -Hidroxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (2).....	26
5.1.4 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3).....	27
5.1.5 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (4).....	28

5.1.6	3 β , 7 α -Dihidroxi-16 β -metil-20-etilendioxi-5-pregнено (5).....	29
5.1.7	3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona (6).....	30
5.1.8	3 β ,17 α -dihidroxi-16 β -metil 4,6-pregnadien-3,20-diona (7).....	31
5.1.9	17 α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]-16 β -metil 4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).....	32
5.1.10	17 α -[(4-Clorofenil) acetoxi]-16 β -metil 4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).....	34
5.1.11	17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil 4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)...	36
5.1.12	17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil 4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).....	38
5.2	Parte biológica.....	40
5.2.1	Material biológico	
5.2.2	Sustancias y equipos	
5.2.3	Ensayo <i>in vitro</i> con la enzima 5 α -reductasa.....	40
5.2.4	Ensayo de unión a receptores androgénicos.....	41
5.2.5	Ensayo <i>in vivo</i> con los compuestos 8a - 8d.....	43
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1	Parte Química.....	43
6.2	Evaluación Biológica.....	55
6.2.1	Ensayo <i>in vitro</i> con la enzima 5 α -reductasa.....	55
6.2.2	Ensayo de unión a receptores androgénicos.....	55
6.2.3	Ensayo <i>in vivo</i> con los compuestos 8a - 8d.....	57
7.	CONCLUSIONES	63
8.	REFERENCIAS	64
9.	ESPECTROSCOPIA	69

RESUMEN

En este trabajo de investigación se describe la síntesis y evaluación farmacológica de cuatro nuevos derivados de la pregnadiona: 17α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8a**), 17α -[(4-Clorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**), 17α -[(4-Bromofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**) y 17α -[(Difenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**). La estructura química de cada una de estas moléculas se elucidó a partir de los datos de sus espectros de IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y espectrometría de masas. Los compuestos preparados en este estudio fueron sometidos a pruebas de actividad *in vitro* frente a la enzima 5α -reductasa humana (isoforma 2), una prueba *in vivo* con hámsteres castrados y un ensayo de unión a receptores androgénicos.

De los cuatro compuestos evaluados, el derivado **8d** presentó actividad inhibitoria en la prueba *in vitro* con la enzima 5α -reductasa (isoforma 2) del orden micromolar ($\text{IC}_{50}=3.16\ \mu\text{M}$), sin embargo fue menos potente que la finasterida ($\text{IC}_{50}=8.5\ \text{nM}$), uno de los fármacos de elección para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata. Los resultados arrojados en la prueba *in vivo* con hámsteres para este mismo compuesto, indican que no hubo un efecto positivo sobre el tamaño de la próstata, sugiriendo que algún parámetro farmacocinético (absorción, distribución, metabolismo y excreción) influyó en el comportamiento biológico del esteroide.

La relación estructura-actividad biológica revela una clara influencia de las propiedades electrónicas, estéricas e hidrofóbicas del sustituyente en posición C- 17α para generar una buena actividad inhibitoria. En cuanto al ensayo de unión al receptor androgénico, los cuatro derivados evaluados no presentaron afinidad por el receptor por lo que sus actividades como antagonistas son nulas.

ABSTRACT

This work describes the synthesis and pharmacological evaluation of four new pregnadiene derivatives: 17α -[(4-Fluorophenyl) acetoxy]- 16β -methyl-4,6-pregnadiene-3,20-dione (**8a**), 17α -[(4-Chlorophenyl) acetoxy]- 16β -methyl-4,6-pregnadiene-3,20-dione (**8b**), 17α -[(4-Bromophenyl) acetoxy]- 16β -methyl-4,6-pregnadiene-3,20-dione (**8c**) and 17α -[(2-Diphenyl) acetoxy]- 16β -methyl-4,6-pregnadiene-3,20-dione (**8d**). The structure of these compounds was determined by IR, NMR- ^1H , NMR- ^{13}C and mass spectrometry. These compounds were evaluated *in vitro* as 5α reductase inhibitors (isoform 2), *in vivo* on gonadectomized adult male hamsters as well as antagonist for the androgen receptor.

Compound **8d** showed a higher inhibitory activity in the test *in vitro* as **8a**, **8b**, and **8c**. This compound exhibited an IC_{50} value of $3.16\ \mu\text{M}$ as compared to the commercially available finasteride which showed an IC_{50} value of $8.5\ \text{nM}$ thus indicating that this steroidal derivative is more effective as 5α -reductase inhibitor for the treatment of hyperplasia prostatic benign and prostate cancer. Unfortunately compound **8d** didn't show any antiandrogenic activity *in vivo*.

The structure activity relationship reveals that the electronics, steric and hydrophobic substituent properties at C- 17α are essential for the antiandrogenic activity. Compounds **8a**, **8b**, **8c** and **8d**, didn't show any antagonist activity when they were evaluated on the androgen receptor.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuestro país y el aumento de la esperanza de vida han traído consigo el envejecimiento de la población y el concurrente incremento de las enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas destacan por su frecuencia los tumores malignos, que desde 1989 ocupan en México el segundo lugar como causa de muerte. Entre los tumores malignos que afectan a la población mexicana se encuentran el cáncer de pulmón, el cáncer de colón y el cáncer de próstata, ¹ siendo este último una de las neoplasias más frecuentes en los hombres y cuyo riesgo de padecerlo se incrementa conforme aumenta la edad.

En México, durante la última década (1990 a 1999) la tendencia de la mortalidad ha sido ascendente, habiéndose incrementado hasta en un 34.4%; tan sólo en 1999 las neoplasias ocuparon el segundo lugar en la tabla de mortalidad general y el cáncer de próstata apareció como la segunda neoplasia más frecuente en el hombre en edad post-productiva.¹ La prevalencia de esta enfermedad en la población no se conoce con exactitud, pero se trata de un tumor que requiere de una detección oportuna para impedir que se disemine a otras partes del cuerpo y que con el tiempo cause la muerte.

El cáncer de próstata al igual que la hiperplasia prostática benigna (HPB, un tumor de tipo benigno) tienen la peculiaridad de ser padecimientos hormonodependientes, es decir, que su desarrollo y patogenia es dependiente de la producción excesiva de andrógenos, en especial de la dihidrotestosterona, el andrógeno más potente.

Debido a lo anterior, la prostatectomía (eliminación de la glándula prostática) y la orquiectomía (extirpación de testículos) fueron los primeros métodos quirúrgicos empleados para tratar de erradicar esta enfermedad, sin embargo los efectos adversos y psicológicos que presentaban sobre los pacientes, impulsó el desarrollo de nuevos fármacos que mediante distintos mecanismos de acción farmacológicos, fueron destinados a impedir las acciones biológicas de la dihidrotestosterona.

En un principio el uso de agonistas y/o antagonistas de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) vino a reemplazar la práctica quirúrgica disminuyendo los efectos psicológicos sobre los pacientes; sin embargo el prolongado tiempo de tratamiento con esta clase de fármacos (4 a 6 meses) acentúa sus efectos adversos tales como hipogonadismo sintomático, bochornos, alteraciones del metabolismo de lípidos, impotencia y desarrollo de osteoporosis.²

Asimismo, se han empleado antagonistas del receptor androgénico como la bicalutamida (Casodex) y aunque la impotencia aparece como uno de los efectos adversos, sin duda la ginecomastia representa el factor principal que limita su uso a periodos cortos, lo que ocasiona que el tratamiento no sea suficiente para revertir el daño.

Más adelante surgen como alternativa terapéutica los inhibidores de la 5α -reductasa, la enzima responsable de la biosíntesis de dihidrotestosterona en el organismo. Desde el punto de vista farmacológico, el desarrollo de este tipo de inhibidores resulta muy atractivo ya que sólo se suprimen las acciones androgénicas mediadas por la dihidrotestosterona sin afectar las funciones biológicas de la testosterona aportando una mayor selectividad de acción lo que conlleva a la reducción de efectos colaterales. Dentro de esta clase de fármacos se encuentran la finasterida (Proscar, Merck) y recientemente la dutasterida (Avodart, Glaxo), ambos representan los fármacos de elección para el tratamiento de cáncer de próstata e HPB. No obstante, se ha informado que la eficacia de la finasterida no es uniforme en todos los pacientes tratados,³ ya que entre un 30 y 40 % de éstos no presenta disminución en los niveles circulantes de dihidrotestosterona con la consecuente falta de mejoría en los síntomas, en tanto que los efectos colaterales de la dutasterida afectan la actividad sexual del paciente⁴ (impotencia, problemas de eyaculación, pérdida de la libido) repercutiendo en la calidad de vida del mismo.

Considerando el aumento en la prevalencia de estos padecimientos causados por la producción excesiva de andrógenos y las desventajas de los fármacos actualmente disponibles en el mercado, es indispensable la búsqueda de nuevas moléculas que posean más ventajas de las ya conocidas para su uso en la terapia de enfermedades androgeno-dependientes.

Con la intención de contribuir a la solución de esta problemática, mediante la obtención de información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiandrogénica, en este trabajo de tesis se presenta la síntesis de cuatro nuevos derivados de la pregnadiona y su evaluación biológica como inhibidores de la enzima 5α -reductasa (isotipo 2) y como antagonistas del receptor de andrógenos.

1. ANTECEDENTES

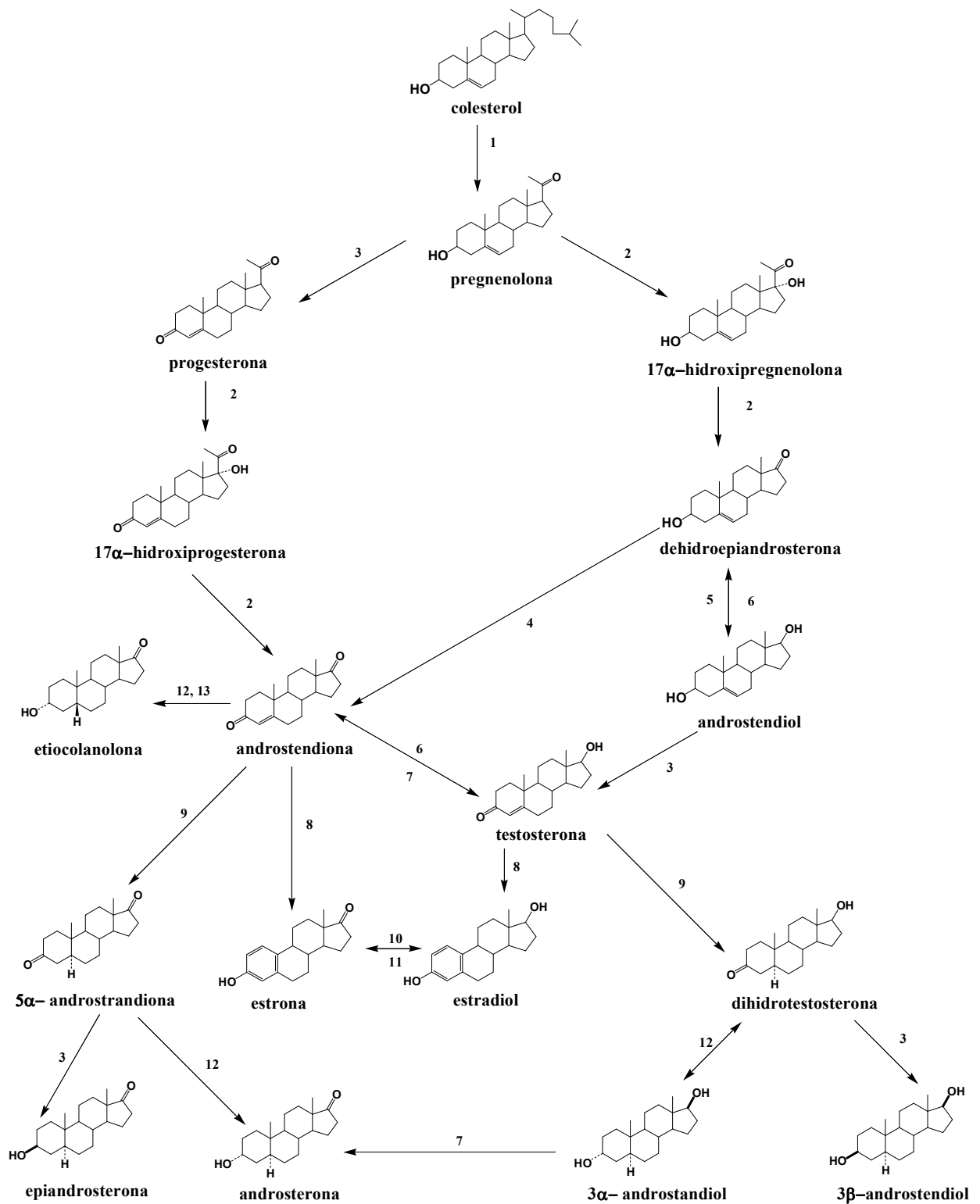
1.1 ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas esteroidales derivadas del androstano (núcleo de 19 átomos de carbono) que regulan un amplio espectro de funciones tales como la diferenciación, desarrollo y crecimiento de los órganos reproductivos masculinos así como el mantenimiento de las características sexuales secundarias. Los dos andrógenos más importantes son la testosterona y su metabolito reducido la dihidrotestosterona (DHT). La principal fuente de testosterona es el testículo el cual sintetiza aproximadamente el 90% mientras que la corteza adrenal produce el 10% restante.⁵

La testosterona, al igual que otros esteroides, se forma a partir del colesterol por dos vías principales como se ilustra en el **Figura 1**. Una vía que pasa por la progesterona, característica de las gónadas, y otra a través de la dehidroepiandrosterona⁶ predominante de la corteza suprarrenal. Por su parte, la dihidrotestosterona se forma a partir de la reducción del doble enlace (C- 4) de la testosterona. Este proceso es catalizado por la enzima 5α -reductasa en presencia del cofactor NADPH (nicotinamida adenin-dinucleotido-fosfato) en su forma reducida.

El papel fisiológico de ambos andrógenos es totalmente diferente y está relacionado con las distintas etapas de la vida del varón. La testosterona, el principal andrógeno en plasma, realiza funciones importantes tales como alargamiento del pene, transformación de los conductos de Wolf, conductos deferentes y vesículas seminales, incremento de la masa muscular (efecto anabólico), regulación del proceso de espermatogénesis, engrosamiento de las cuerdas vocales, desarrollo de la libido y conducta sexual masculina. En cambio la dihidrotestosterona, el andrógeno más potente, es esencial para eventos biológicos tales como la diferenciación sexual durante la etapa fetal, formación de los genitales externos, incremento del vello facial y corporal, desarrollo y crecimiento de la próstata.⁷

La regulación de la síntesis de andrógenos es a nivel de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH ó LHRH) producida por el hipotálamo, la cual a su vez estimula la producción de la hormona luteinizante (LH) a nivel de la adenohipófisis. La LH ejerce su acción a nivel de las células de Leydig en los testículos para finalmente producir testosterona.⁸ De manera distinta a la esteroidogénesis testicular, la producción de andrógenos en la corteza adrenal está bajo control de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH).⁹



- | | |
|---------------------------------------|----------------------|
| 1 20α-hidroxilasa
20,22-liasa | 7 17β-HSD 2,9,10,11 |
| 2 17α-hidroxilasa/17,20-liasa (CYP17) | 8 Aromatasa (CYP 19) |
| 3 3β- HSD 1 | 9 5α-reductasa 1 y 2 |
| 4 3β-HSD 2 | 10 17β-HSD 1,7 |
| 5 17β-HSD 2,4 | 11 17β-2,4,8 |
| 6 17β-HSD 1,5 | 12 3β-HSD 3 |
| | 13 5α-reductasa |

Figura 1. Biosíntesis y metabolismo de andrógenos en testículo y corteza adrenal.

1.1.1 Mecanismo de acción de andrógenos

Una vez que la testosterona ha sido producida por las células de Leydig sale del testículo a la circulación general y se une a proteínas específicas (globulina fijadora de hormonas sexuales ó albúmina) lo que provoca que su biodisponibilidad se reduzca ya que en la mayoría de las células blanco para andrógenos, solo la fracción libre (no unida) del esteroide es capaz de penetrar al tejido blanco.¹⁰

Sin embargo, se ha estimado que entre el 2 y 3% del total de la hormona existe en su forma libre y es así como puede transportarse mediante difusión pasiva al interior de la célula y actuar de las siguientes maneras:

- sin ser metabolizada, la testosterona se une directamente a un receptor androgénico intracelular o
- la testosterona es reducida por el cofactor NADPH mediante la catálisis enzimática de la 5α -reductasa a 5α -dihidrotestosterona; este metabolito se une con mayor afinidad al mismo receptor intracelular amplificándose el efecto androgénico.

En cualquier caso los complejos testosterona-receptor ó dihidrotestosterona-receptor son transferidos al núcleo de la célula para unirse a secuencias del DNA altamente específicas que se conocen como elementos de respuesta hormonal (HRE). La unión del complejo hormona-receptor a los HRE es en forma homodimérica y cada monómero reconoce a secuencias específicas de seis nucleótidos.¹¹ La fijación de dichos complejos hormonales puede tanto estimular como suprimir la activación de genes específicos adyacentes a los HRE aumentando la transcripción (síntesis de RNA mensajero) y en consecuencia, la expresión de proteínas que modulan la función celular. Finalmente, la acción androgénica es inactivada metabólicamente ya sea de manera primaria en el tejido blanco o posteriormente en el hígado.¹²

El catabolismo de la testosterona comprende la oxidación del grupo 17β -hidroxi, la 5β -reducción del anillo A esteroidal y la reducción del grupo ceto en C-3 para dar origen a la etiocolanolona¹³ o de modo alternativo, la testosterona también se puede aromatizar hacia estradiol por acción catalítica de la aromatasa⁸ (**Figura 1**). De cualquier modo estos alcoholes se conjugan con ácido glucurónico o sulfatos mediante enzimas hepáticas (glucuronosil transferasa y sulfotransferasa respectivamente) originando derivados más hidrosolubles para ser eliminados por la orina o heces fecales. En cambio, la DHT experimenta una 3-ceto reducción para dar origen al 3α -androstano y posteriormente una 17β -oxidación para formar la androsterona, un 17-ceto-esteroide. Estos 3α -alcoholes también son excretados como O-glucurónidos ó sales de sulfato de manera similar como en la testosterona (**Figura 1**).

1.2 ENFERMEDADES PROSTÁTICAS

La producción excesiva de dihidrotestosterona esta asociada con patologías en uno de sus principales órganos blanco, la próstata; ésta glándula se encuentra ubicada justo por debajo de la vejiga y su función junto con las vesículas seminales y los testículos es la formación de semen. Este órgano masculino es el que con mayor frecuencia padece procesos benignos o malignos de los cuales se hablará a continuación.

1.2.1 Hiperplasia prostática benigna (HPB)

La hiperplasia prostática es un tumor de tipo benigno que se presenta comúnmente en varones y cuya incidencia es dependiente de la edad. La etiología de esta neoplasia está relacionada básicamente con 2 factores: los niveles intraprostáticos de dihidrotestosterona y el envejecimiento^{14, 15} aunque también se ha descrito que la influencia de otros factores tales como una dieta alta en grasas, alto consumo de alcohol, la ingesta diaria de carne y factores genéticos coadyuvan a la aparición de este padecimiento.¹⁶

Desde un punto de vista anatómico, la próstata está compuesta de elementos de estroma y epitelio (**Figura 2**) y cada uno de éstos puede dar origen a nódulos hiperplásicos en la zona próxima a la uretra reemplazando al tejido normal y comprimiendo la uretra; esto provoca obstrucción del flujo urinario, alargamiento de la próstata¹⁷ y contracción del músculo prostático y uretral en respuesta al estímulo de los nervios simpáticos.¹⁷ Debido a esta obstrucción, los síntomas característicos son dificultad en la micción (pujar para orinar), disminución de la fuerza y cantidad del flujo urinario, nicturia, interrupciones involuntarias del chorro urinario y sensación de vaciado incompleto de la vejiga.

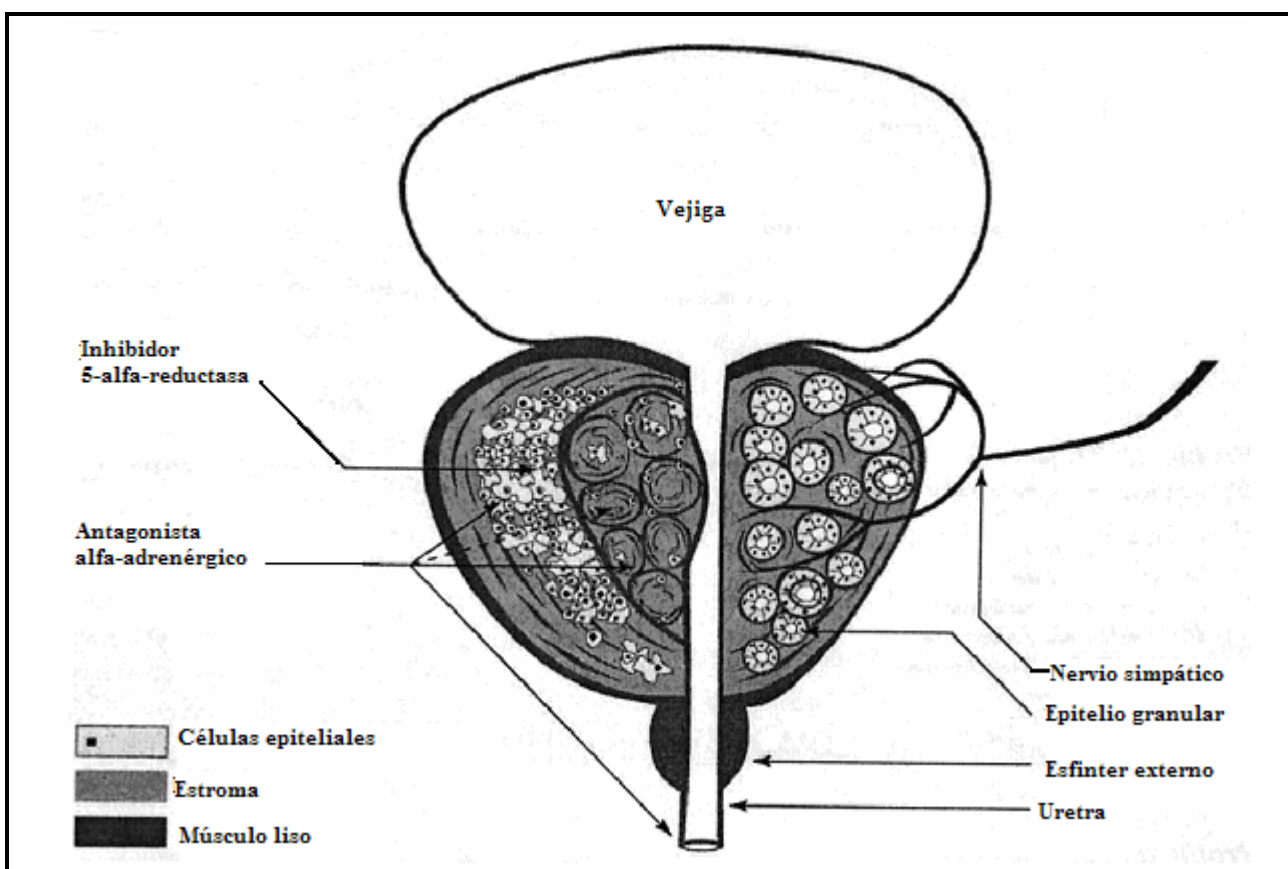


Figura 2. Tejido prostático normal (derecha) e hipertrófico (izquierda).

1.2.2 Diagnóstico y tratamiento para la HPB

Para el diagnóstico de esta enfermedad, en todos los pacientes se efectúa una exploración física de la próstata, una exploración digital del recto, medición del flujo urinario, un examen general de orina para excluir alguna posible infección del tracto urinario o hematuria, la medición de la creatinina sérica para evaluar algún daño renal¹⁵ y en algunos casos se recomienda la medición del antígeno específico prostático (PSA, por sus siglas en inglés).

Las opciones terapéuticas para el tratamiento de la HPB abarcan la prostatectomía (extirpación de la próstata), el uso solo o combinado de antagonistas α_1 -adrenérgicos e inhibidores de la enzima 5α -reductasa, la fitoterapia e inhibidores de la fosfodiesterasa.¹⁷

La finasterida y la dutasterida, inhibidores de la enzima 5α -reductasa tipo II y dual (tipo I y II), respectivamente, representan los fármacos de primera elección para el tratamiento de este padecimiento (**Figura 3**). En la mayoría de los pacientes ambos fármacos provocan la disminución de los niveles de dihidrotestosterona intraprostática con la consecuente disminución del tamaño de la próstata y mejoría de los síntomas. Los antagonistas α_1 -adrenérgicos también suelen utilizarse en combinación con los anteriores. Entre los más utilizados se encuentran las siguientes quinazolininas: prazosina, doxazosina, bunazosina y alfuzosina; andoramina (indolamina) y tamsulosina (sulfamoilfenetilamina) (**Figura 4**). La acción de estos compuestos es a través de la disminución de la contracción del músculo liso uretral y prostático facilitando el flujo urinario lo que conduce a la disminución de los síntomas.

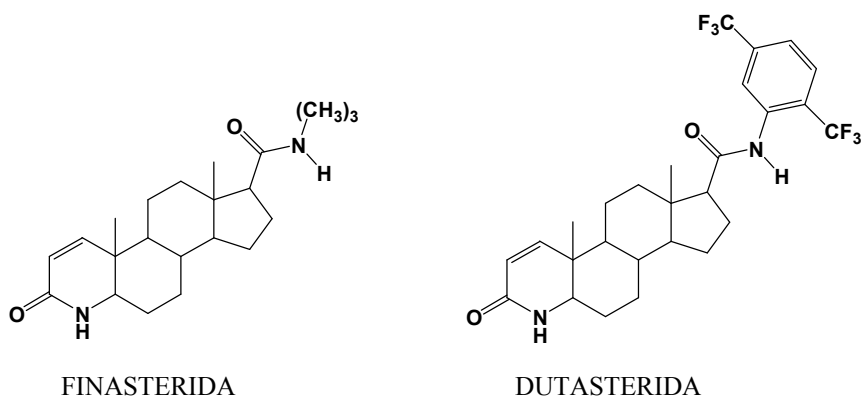


Figura 3. Fármacos utilizados para el tratamiento de la HPB.

1.2.3 Cáncer de próstata

La palabra cáncer se utiliza para agrupar aproximadamente 200 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de células, situación que es transmitida a las células hijas, y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y alteración de la función celular.¹⁸

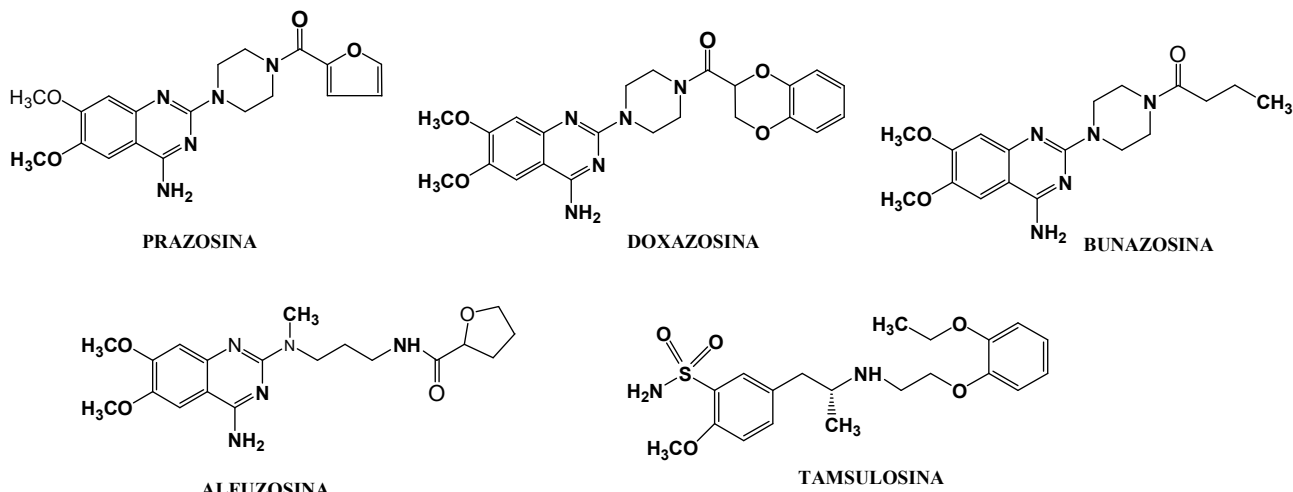


Figura 4. Antagonistas α_1 -adrenérgicos.

El cáncer de próstata es un tumor de tipo maligno en el que las células del tejido prostático presentan un crecimiento anormal y descontrolado que perturba la función celular; a diferencia de un estado benigno, estas células son capaces de emigrar del sitio donde se producen, vía sistema linfático o sanguíneo, e invadir otros tejidos de distintas partes del cuerpo (metástasis) dando origen a tumores que con el tiempo empiezan a destrozarse órganos vitales provocando la muerte. Entre los factores asociados con el desarrollo de cáncer de próstata se encuentran:

- La estimulación permanente de andrógenos, en especial de la dihidrotestosterona.¹⁹
- Edad (50 años en adelante).¹⁵
- Raza, ya que los varones afro-americanos tienen mayor riesgo de presentar cáncer de próstata que los blancos.⁹
- Consumo elevado de grasa en la dieta y en particular de carne roja.^{20,21}
- Factores genéticos.^{22,23}
- Tabaquismo.²⁴

Por otra parte, la mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en etapa temprana son asintomáticos y con frecuencia la presencia de síntomas sugiere avance local o enfermedad metastásica. Debido al crecimiento local del tumor hacia la zona próxima de la uretra, se produce la obstrucción del flujo urinario de tal manera que los síntomas son similares a los que se presentan en la HPB.

1.2.4 Diagnóstico y tratamiento para el cáncer de próstata

El diagnóstico de esta neoplasia es mediante exploración física, exploración digital del recto, medición del antígeno específico prostático (PSA) y en última instancia, biopsia prostática en serie. El PSA es una glucoproteína producida por las células epiteliales prostáticas independientemente de que sean normales o malignas; debido a esto anteriormente surgió un debate en cuanto a que si era un buen indicador de la actividad tumoral, sin embargo, actualmente la medición del antígeno en forma libre y unido a proteínas plasmáticas proporciona un diagnóstico más específico y confiable.

Una relación de PSA libre/PSA total $< 0.2^{15}$ (ó $< 20\%$) alerta la existencia de un cáncer en la glándula prostática. ($PSA_{total} = PSA_{libre} + PSA_{unido}$; en individuos sanos el PSA se encuentra en un rango de 4 y 10 ng/mL).¹⁵

El tratamiento de esta enfermedad se basa en el grado y etapa del tumor, la esperanza de vida del paciente, la habilidad de cada terapia para asegurar la supervivencia libre de enfermedad y la morbilidad concomitante. Para un tumor confinado a la glándula prostática, en los estadios T1 (tumor microscópico) o T2 (tumor detectable a la palpación) se dispone de varios métodos como la prostatectomía radical, la radioterapia local (radiación externa), criocirugía, orquiectomía bilateral (extirpación de testículos), tratamientos con láser como el ILC (Intertitial Laser Coagulation) y terapia hormonal.⁹ Dentro de la terapia hormonal se encuentran distintas clases de fármacos como los agonistas y antagonistas de GnRH, inhibidores de la enzima 5α -reductasa y antagonistas de receptor androgénico. Si el cáncer se encuentra en estadio T3 (rebasa los límites de la próstata e invade las estructuras adyacentes a ésta) o T4 (el tumor se extiende a tejidos y órganos más lejanos), la radioterapia y la hormonoterapia²⁰ combinada constituyen el tratamiento adecuado aunque las posibilidades de éxito suelen ser mucho más bajas, ya que el tumor se muestra resistente a la radioterapia y al tratamiento farmacológico.

1.3 ANTIANDRÓGENOS

Debido a que las patologías asociadas con la DHT son dependientes de la producción excesiva de ésta, los antiandrógenos surgen como una alternativa terapéutica debido a que su acción farmacológica está dirigida ya sea al bloqueo de la síntesis del esteroide o al impedimento de sus acciones biológicas en los órganos blanco. De aquí la importancia del desarrollo de esta clase de fármacos para el tratamiento no sólo de cáncer de próstata e HPB sino también de hirsutismo (crecimiento excesivo de vello facial en las mujeres), alopecia androgenética y acné.

Los distintos niveles por los que se lleva a cabo la supresión de la acción hormonal (**Figura 5**) son los siguientes:

- a) A nivel del hipotálamo
 - Agonistas de LHRH
 - Antagonistas de LHRH
- b) A nivel de la hipófisis (pituitaria)
 - Agonistas de estrógenos
- c) A nivel de la biosíntesis del esteroide
 - Inhibidores de la enzima 17α -hidroxilasa/ $17,20$ -liasa (CYP 17)^{25,26}
 - Inhibidores de la enzima 3β -hidroxi- Δ^5 -esteroid-deshidrogenasa/ 3 -ceto- Δ^5 -esteroid-isomerasa (3β -HSD tipo 1)²⁷
 - Inhibidores de la enzima 5α -reductasa (tipo 1 y 2)
- d) A nivel del receptor androgénico
 - Antagonistas esteroidales y no esteroidales

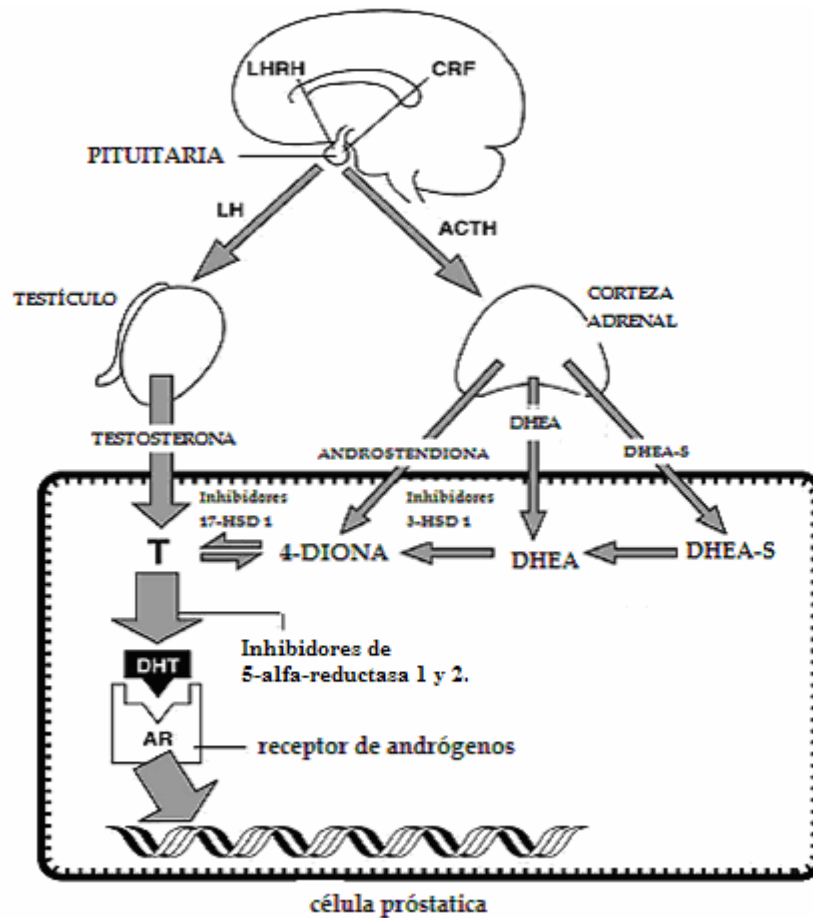


Figura 5. Blancos farmacológicos para la supresión de la actividad androgénica.

1.4 ENZIMA 5 α -REDUCTASA

La enzima 5 α -reductasa humana es un sistema de dos isoenzimas: 5 α -reductasa tipo 1 (5 α -R1) y 5 α -reductasa tipo 2 (5 α -R2), ambas catalizan la reducción estereoselectiva de testosterona a dihidrotestosterona utilizando como cofactor NADPH (fosfato de nicotinamida adenin-dinucleótido) en su forma reducida (Figura 6).

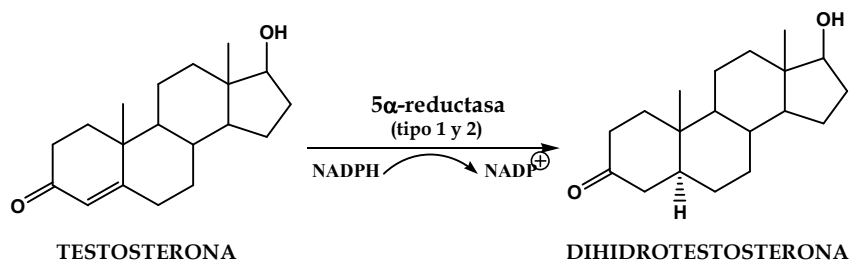


Figura 6. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa.

La isoenzima tipo 1 (5α -R1) es predominante en hígado, en glándulas sebáceas, cuero cabelludo, en el cerebro²⁸ y en bajas cantidades en la próstata, mientras que la isoenzima 5α -reductasa tipo 2 (5α -R2) se encuentra principalmente en la próstata, piel genital y vesículas seminales.²⁸ La homología entre las dos isoenzimas es pobre (aproximadamente el 50%), por lo que sus parámetros bioquímicos y cinéticos son diferentes como se observa en la **Tabla 1**. Cabe hacer notar que el sustrato natural, la testosterona, tiene mayor afinidad por la isoenzima tipo 2; mientras que la afinidad por la isoenzima tipo 1 es considerablemente más baja.

Tabla 1. Comparación de la 5α -R1 y 5α -R2 humanas

	5α -reductasa 1	5α -reductasa 2
pH óptimo	6.5-7.5	5.5
localización del gen	cromosoma 5	cromosoma 2
Km (para testosterona)	7.7 μ M	0.3 μ M
Ki (para finasterida)	300 nM	3 a 5 nM
Homología de secuencia	aproximadamente 50%	

El mecanismo propuesto^{29,30} para la reducción irreversible de testosterona a dihidrotestosterona mediante la catálisis de la enzima 5α -reductasa, involucra la formación de un complejo binario (A) entre la enzima y el cofactor NADPH seguido por la formación de un complejo ternario (B) con el sustrato (testosterona). La activación del sistema enona mediante una interacción fuerte con un residuo electrofílico E^+ (E^+ =protón, grupo cargado positivamente, donador de protones) presente en el sitio activo de la enzima genera un carbocatión con carga deslocalizada (C) el cual es reducido selectivamente en C-5 sobre la cara α por la transferencia de un hidruro proveniente del NADPH (hidrógeno pro-S) dando origen a un enolato intermediario (D). Este enolato en C-3-C-4, mediante tautomerismo ceto-enólico, propicia la salida de dihidrotestosterona generando nuevamente al complejo binario NADP⁺ - enzima (F), finalmente la liberación de NADP⁺ deja a la enzima libre para entrar a un nuevo ciclo catalítico (**Figura 7**). De acuerdo con el mecanismo de reducción propuesto, se han diseñado dos clases de inhibidores, los de tipo esteroidal y no esteroidal. Algunos ejemplos descritos en la literatura se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Tipos de Inhibidores de la enzima 5α -reductasa

Esteroidales	No esterooidales
4-Azaesteroides ^{28,31}	Benzo[f]quinolinonas ³⁵
6-Azaesteroides ³²	Benzo[c]quinolinonas ^{36,37}
10-Azaesteroides ³⁰	Benzo[c]quinolizin-3-onas ³⁸
Acidos androsten carboxílicos ^{33,34}	Acidos tricíclicos ^{39,40}
	Bifenilos mono y polisustituidos ^{41,42}

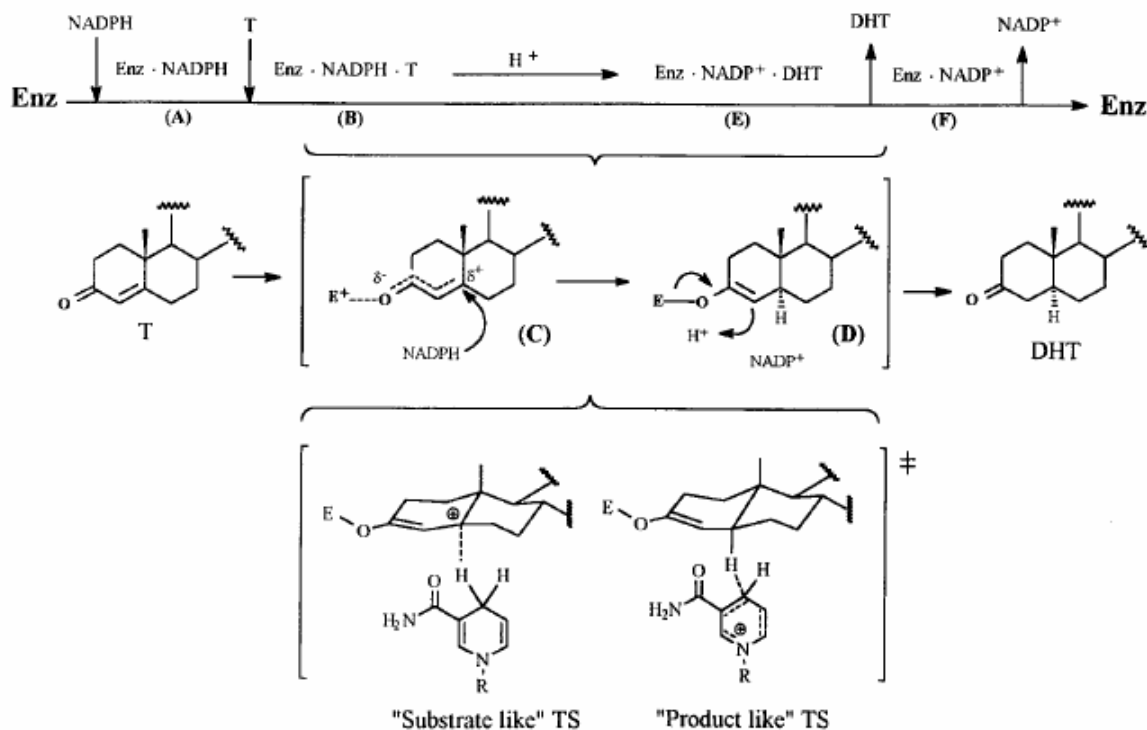


Figura 7. Mecanismo de reducción de testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa.

1.2 RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Los efectos de la testosterona y dihidrotestosterona están mediados a través del receptor de andrógenos. Este receptor de origen proteico es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que incluye a los receptores de estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y progestinas entre otros.

Este receptor está compuesto de 4 dominios funcionales: un dominio NH₂-terminal (555 aminoácidos) que estructuralmente comprende aproximadamente la mitad de la proteína indispensable para la activación transcripcional, un dominio de unión a DNA (70 aminoácidos) el cual contiene una secuencia de ocho residuos de cisteínas coordinadas con 2 iones Zn²⁺ comúnmente conocido como "dedos de zinc". Estas estructuras son esenciales para la unión a elementos de respuesta hormonal (HRE) en el DNA y para estabilizar la interacción DNA-receptor;⁴³ un dominio adyacente al DNA conocido como región "Hinge" que participa en la dimerización del receptor y que dirige a éste al núcleo celular.⁴⁴ El cuarto dominio estructural es el de unión al ligando carboxilo terminal (253 aminoácidos) cuya actividad transcripcional es dependiente de la unión con el ligando (andrógenos). La función de este dominio es importante ya que previene la actividad del receptor sin ligando.

En contraste con los inhibidores de la 5 α -reductasa, los antagonistas del receptor androgénico bloquean la unión con el receptor para la testosterona como para la dihidrotestosterona resultando en una supresión menos selectiva del efecto androgénico.

Al igual que con los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, existen dos tipos de antagonistas del receptor andr3gico, los de tipo esteroideo y no esteroideo. En la **Tabla 3** se muestran algunos ejemplos de f3rmacos utilizados a nivel cl3nico.

Tabla 3. Tipos de antagonistas del receptor androg3nico

Esteroidales	No esterooidales
Acetato de ciproterona Mefepristona	Bicalutamida Flutamida Nilutamida

2. CONSIDERACIONES PARA LA SÍNTESIS DE NUEVOS ESTEROIDES

2.1 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA (REA)

Sobre la base de que la dihidrotestosterona es el andrógeno responsable de varias de las enfermedades endócrinas anteriormente descritas, es claro que la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa en el órgano blanco (próstata y piel) representa un excelente blanco farmacológico, ya que de esta manera sólo se bloquea la formación de la dihidrotestosterona sin afectar las funciones biológicas de la testosterona.

Debido a las diferencias en afinidad química de la testosterona con respecto a las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2, los requerimientos estructurales para inhibir la actividad de cualquiera de ellas no son necesariamente los mismos. La siguiente información recabada está enfocada a la inhibición de la isoenzima 5α -R2, aunque en algunos casos también es aplicable a la isoenzima 5α -R1.

2.1.1 Derivados del androstano

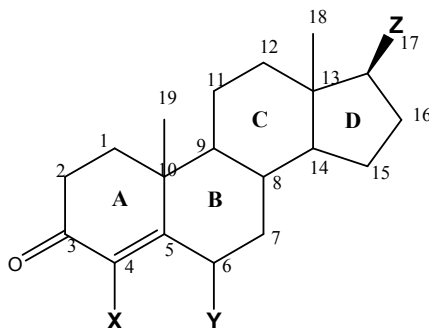
Una gran cantidad de inhibidores han sido diseñados modificando la estructura de la testosterona, el sustrato natural de la enzima. Sin embargo, resulta trascendental la separación de sus efectos inhibitorios vs. sus efectos andrógenicos, virilizantes y anabólicos.

En la **Tabla 4** se resumen algunas correlaciones encontradas entre la estructura esteroidea y su actividad como inhibidor.

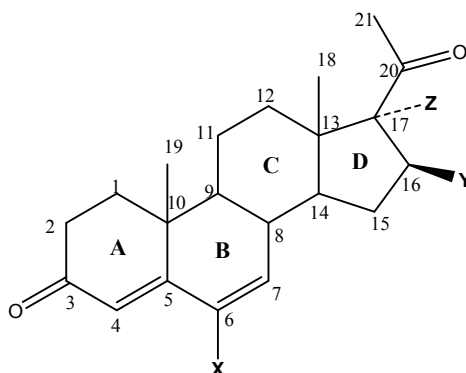
2.2.2 Derivados del pregnano

Otro tipo de inhibidores han sido diseñados en base a la estructura de la progesterona,⁴⁵ ya que esta hormona actúa de manera competitiva con la testosterona por la unión a la enzima 5α -reductasa ($K_m = 1110$ nM para la testosterona vs. $K_i = 700$ nM para la progesterona).⁴⁶

Sin embargo, debido a su actividad como progestágeno es necesario separar su actividad como inhibidor selectivo. En la **Tabla 5** se resumen las correlaciones encontradas entre la estructura de la progesterona y la actividad inhibitoria para la isoenzima 5α -R2.

Tabla 4. Relación estructura-actividad biológica para derivados del androstano


Sitio de cambio	Modificación estructural	Comentarios
C-3 y C-4	Cetona α,β insaturada	El sistema conjugado es un requerimiento esencial para la actividad inhibitoria (5α -R1 y 5α -R2). ^{47,48}
C-1, C-2	Adición de un doble enlace	Disminuye ligeramente la actividad inhibitoria los inhibidores con esta característica estructural se reportan como irreversibles. ⁴⁹
C-4, C-6 y C-10	Reemplazo isostérico de $-\text{CH}_2$ por $-\text{NH}-$ y $-\text{O}-$	Sólo la introducción de nitrógeno potencia la actividad inhibitoria (5α -R1 y 5α -R2). ⁵⁰
C-4	X = metilo, etilo, Cl, Br	Sólo los grupos menos voluminosos mantienen la actividad inhibitoria (5α -R1 y 5α -R2). ^{50,51}
C-6	Y= metilo, etilo, propilo, butilo, $-\text{CH}(\text{Me})_2$	Cualquier sustituyente disminuye la actividad por posible impedimento estérico (5α -R2). ⁵²
C-7	Introducción de un grupo en orientación β (metilo, etilo, propilo)	A medida que aumenta la longitud de la cadena disminuye la actividad inhibitoria (5α -R1). ⁵³ El efecto sobre 5α -R2 no se encuentra reportado.
C-17	Z=CONHR ₁ , CONR ₂ , R ₁ NCOH, R ₁ NCOR ₂	Grupos voluminosos y lipofílicos contribuyen favorablemente a la actividad (5α -R1 y 5α -R2). ⁵⁴⁻⁵⁷

Tabla 5. Relación estructura-actividad biológica para derivados del pregnano


Sitio de cambio	Modificación estructural	Comentarios
C-3, C-4	3-oxo-4-en	El sistema conjugado es esencial para la actividad inhibitoria. ⁵²
C-3, C-4 y C-6	Expansión de la conjugación 4,6-dien-3-ona	Contribuye notablemente a la actividad inhibitoria. ⁵⁸
C-6	X = Cl, Br	El derivado bromado presenta mayor actividad que su análogo clorado ambos comparables con la finasterida. ⁵⁹
C-16	Y = Metilo, Fenilo	La alquilación separa la actividad progestacional. ⁶⁰
C-17	Z = OCOR	Un grupo voluminoso en esta orientación también favorece la actividad inhibitoria. ⁶¹

2.2 ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS NUEVOS ESTEROIDES

El diseño y síntesis de los nuevos esteroides se basó en la información establecida para la relación estructura actividad biológica de los derivados de androstano y pregnano respectivamente, por lo que se mantuvo al grupo farmacofórico 4,6-dien-3-ona y se introdujo un grupo fenilacetoxi en C-17 α sustituido en posición *para* del anillo aromático por distintos halógenos. Los compuestos sintetizados en este trabajo de investigación se ilustran en la **Figura 8**.

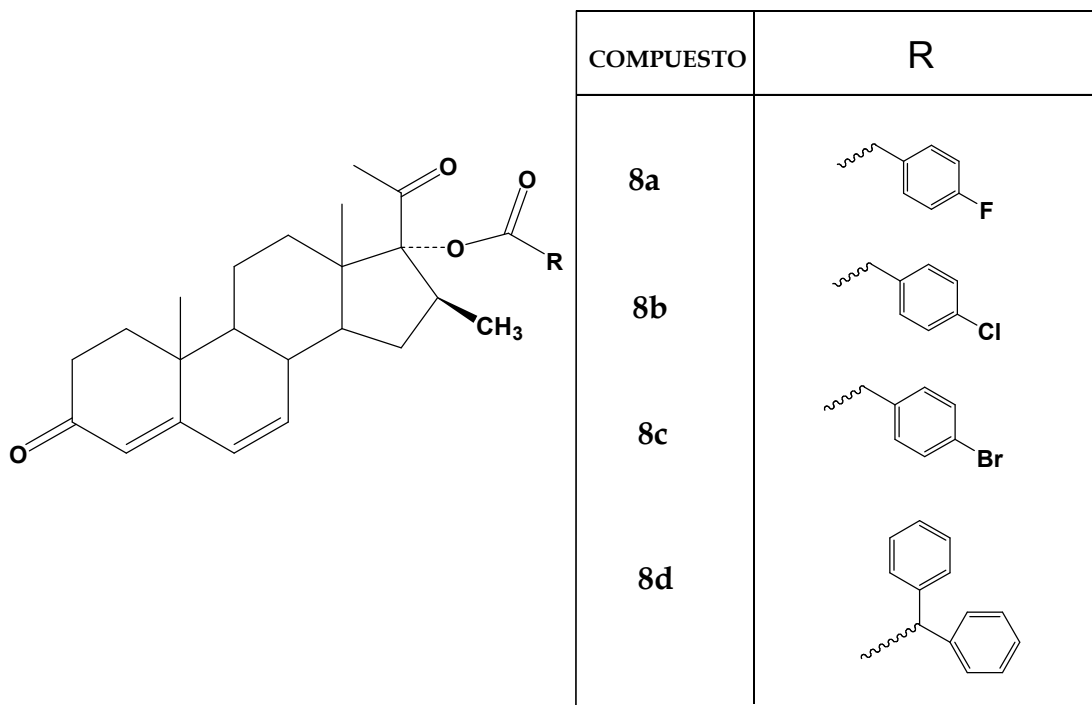


Figura 8. Estructuras químicas de los nuevos esteroides.

A continuación se explica con más detalle las razones para la elección de los sustituyentes en los compuestos mostrados en la **Figura 8**.

2.2.1 Elección del sustituyente en posición C-17

Se ha informado que la naturaleza del sustituyente en posición 17 le confiere dos características fundamentales a la molécula: selectividad y potencia.⁵⁵

La selectividad implica que el compuesto sólo "reaccione" con la enzima blanco y no con otras moléculas biológicas presentes en el organismo, mientras que una mayor potencia propicia a que una menor cantidad del fármaco sea requerida para obtener la respuesta farmacológica deseada. Previamente se habían sintetizado y evaluado derivados alquílicos en esta posición (acetoiloxi, propoiloiloxi, butiroiloiloxi etc.) cuya actividad inhibitoria fue moderada.⁶¹ Para este trabajo de investigación se decidió recurrir a la transformación de cadena a anillo⁶² como una de las estrategias ampliamente utilizadas en el campo de la Química Farmacéutica para la optimización farmacodinámica de compuestos bioactivos.

La aplicación de la transformación de cadena a anillo, en este caso de un grupo alquílico por un anillo de tipo aromático (pudiendo ser también un carbociclo) usualmente induce restricción conformacional en la molécula. Asimismo, se consideró la introducción de un conector (linker) $-CH_2-$ entre el esqueleto esteroidal y el grupo aril monosustituido que le confiere ya sea una rotación más libre al grupo arilo (derivados **8a-8c**, **Figura 8**) o una rotación un poco más restringida (derivado **8d**, **Figura 8**) que pudiese influir para adoptar una conformación biológicamente activa.

Debido a que en el organismo la progesterona y análogos de ésta experimentan la degradación metabólica de la cadena lateral ⁶³ (**Figura 9**), la protección de ésta fue otro aspecto a considerar. Desde el punto de vista estérico, se ha observado que la presencia de un grupo voluminoso en C-17, además de influir en las características anteriormente descritas, coadyuva a la protección de la cadena lateral confiriendo resistencia metabólica a la molécula.⁶⁴

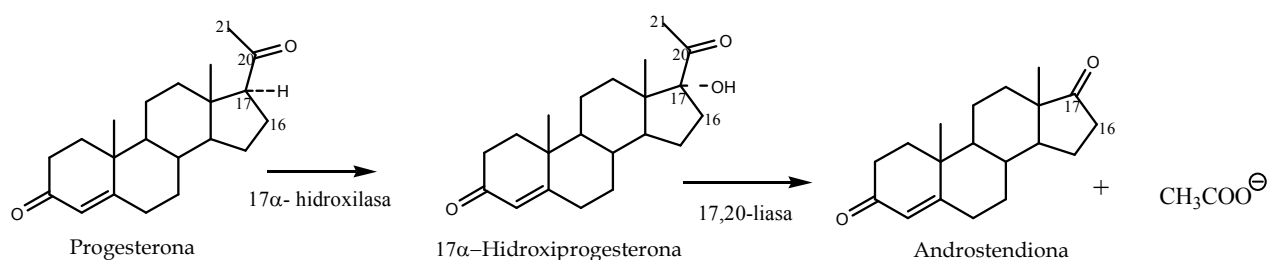


Figura 9. Metabolismo de la progesterona.

2.2.2 Reemplazo biosostérico

La sustitución isostérica es otra de las herramientas utilizadas para el diseño de fármacos. Mediante esta metodología uno o varios de los siguientes parámetros puede ser modificado: tamaño, distribución electrónica, solubilidad en lípidos, solubilidad en agua, pKa, reactividad química, toxicidad y formación de puentes de hidrógeno.⁶⁵

El fenómeno por el cual dos compuestos de estructuras relacionadas presentan propiedades biológicas semejantes se llama biososterismo.⁶⁵ Un biosótero no clásico es aquel que aunque no posee el mismo número de átomos y tampoco presenta propiedades químicas ó físicas semejantes si producen una respuesta biológica equiparable. Bajo el concepto anterior, el reemplazo del átomo de hidrógeno por el átomo de fluor constituye un ejemplo de biososterismo no clásico; ambos pueden sustituirse en los análogos reemplazando uno por otro y manteniendo la actividad biológica. En la **Tabla 6** se muestran otros ejemplos citados en la literatura.^{66, 67}

2.2.3 Importancia de los halógenos en la relación estructura-actividad biológica

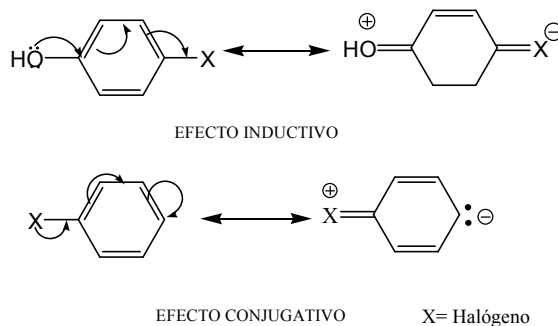
El efecto de los halógenos en anillos aromáticos aporta 4 características principales^{68,69} : efectos electrónicos, efectos hidrofóbicos, efectos estéricos y de halogenación obstructiva.

Tabla 6. Biosósteros no clásicos

<ul style="list-style-type: none"> Grupo Carbonilo 				
<ul style="list-style-type: none"> Grupo Hidroxilo 				
—OH	—NHCOR	—NHSO ₂ R	—CH ₂ OH	—NHCN
<ul style="list-style-type: none"> Halógenos 				
X	CF ₃	CN	N(CN) ₂	C(CN) ₃

2.2.3.1 Efectos electrónicos

Los efectos electrónicos ejercidos por los halógenos son de dos tipos: inductivo (-I), debido a su electronegatividad, y conjugativo (+R) como consecuencia de sus 3 pares de electrones libres (Figura 10).


Figura 10. Efectos electrónicos de los halógenos.

En el efecto inductivo, la resonancia entre los pares de electrones no compartidos del grupo -OH y el grupo X no es posible cuando X=Fluor ya que éste átomo carece de orbitales tipo *d*.

2.2.3.2 Efectos hidrofóbicos

Es reconocido que dentro de los factores que influyen en el comportamiento biológico de un fármaco, sus propiedades fisicoquímicas ocupan un lugar preponderante. Una de estas propiedades es la liposolubilidad, la cual es indispensable para que el compuesto atraviese la membrana celular (compuesta de fosfolípidos) y alcance su sitio de acción a concentraciones terapéuticas efectivas.

Dicho carácter lipofílico está expresado por el coeficiente de partición (P)⁷⁰ e indica la relación entre la solubilidad de un compuesto en la fase orgánica (n-octanol) y la fase acuosa:

$$P = \frac{[\text{fase orgánica}]}{[\text{fase acuosa}]}$$

De acuerdo con lo anterior, la inserción de un átomo de halógeno en la molécula le imparte características hidrofóbicas que aumentan su solubilidad en lípidos y por lo tanto mejoran la absorción del compuesto.

2.2.3.3 Efectos estéricos

Otro aspecto a considerar es que en muchos derivados halogenados, el efecto biológico del compuesto es resultado del efecto estérico que ejerce el halógeno.⁷⁰ Si se compara el radio atómico de los halógenos (**Tabla 7**) la sustitución de alguno de ellos por hidrógeno, podría imponer ciertas conformaciones a la molécula lo cual se reflejaría en el desempeño biológico.

Los tres efectos de halogenación anteriormente mencionados, se pueden resumir de manera cuantitativa en los siguientes parámetros: π que representa la contribución lipofílica (Log P), σ indica el carácter electrónico (electroatractor) y la refractividad molar (MR) que se relaciona con el efecto estérico (**Tabla 8**).

Tabla 7. Radio atómico de hidrógeno y halógenos

Átomo	Radio atómico (Å°)
Hidrógeno	0.29
Flúor	0.64
Cloro	0.99
Bromo	1.14
Iodo	1.33

Tabla 8. Constantes para halógenos*

Átomo	π	σ	MR
H	0.00	0.00	1.03
F	0.14	0.06	0.92
Cl	0.71	0.23	6.03
Br	0.86	0.23	8.88
I	1.12	0.18	13.94

*tomado de Wermuth C.G. The practice of Medicinal Chemistry 2^a edition, Academic Press 2003, Cap.19, pág. 307.

2.2.3.4 Efectos de Halogenación Obstrucciona

En general el proceso metabólico que experimentan los anillos aromáticos en el organismo comprenden la hidroxilación (reacción de fase 1) y posteriormente la conjugación con ácido glucurónico (reacción de fase 2) para formar el correspondiente glucurónido. La presencia de un halógeno en la posición *para* en el anillo aromático previene este proceso (halogenación obstrucciona). Lo anterior es ilustrado en la **Figura 11**.

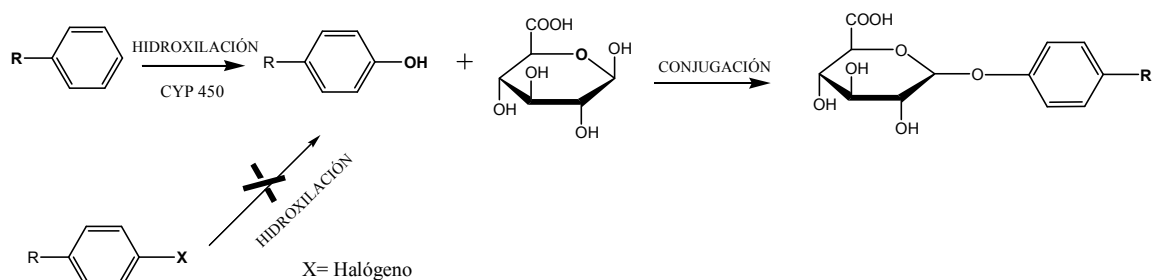


Figura 11. Halogenación obstrucciona.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al creciente aumento en la prevalencia del cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna, ambos causados por una excesiva producción de dihidrotestosterona, afectando a hombres en edad post-productiva y considerando las desventajas de los fármacos disponibles en el mercado para el tratamiento de estos padecimientos (eficacia heterogénea, actividad sexual afectada, entre otros), es de mayor importancia el desarrollo de nuevos compuestos como inhibidores de la enzima 5α -reductasa (tipo 2 o dual). Ante esto, es indispensable continuar la investigación en este campo por lo que el presente trabajo de investigación puede aportar una serie de compuestos con capacidad inhibitoria, o bien servir de base a proyectos futuros que permitan establecer una relación estructura-actividad antiandrogénica cuantitativa. Sobre la base de las consideraciones presentadas resulta evidente que mediante el diseño y la síntesis de nuevas entidades químicas, así como de su evaluación biológica, será posible conocer más sobre el efecto inhibitorio y el mecanismo por el cual ejercen su acción biológica. Con esta información posteriormente se podrán diseñar nuevas moléculas más efectivas y menos tóxicas para su uso en la farmacoterapia.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Si se considera que la posición 17 del núcleo esteroidal es fundamental para la selectividad y potencia inhibitoria de la molécula, entonces se espera que mediante la introducción de un grupo fenilacetoxi en C-17 α sustituido en posición *para* por diferentes halógenos (F, Cl, Br) en los derivados 16 β -metil-5,6-pregnadien-3,20-diona, se definirán los requerimientos estructurales electrónicos y estéricos que son determinantes para el perfil antiandrogénico de estos derivados.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y evaluar cuatro nuevos derivados de 16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona con diferentes características del sustituyente en C-17 los cuales al ser evaluados frente a la enzima 5 α -reductasa (tipo 2) pudieran brindar información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad inhibitoria y contribuir así al desarrollo de compuestos con utilidad terapéutica.

4.3 OBJETIVOS PARTICULARES

4.3.1 Sintetizar los derivados 17 α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8a**), 17 α -[(4-Clorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**), 17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**) y 17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**).

4.3.2 Determinar las propiedades físicas (R_f, punto de fusión) y caracterizar a los compuestos finales e intermediarios empleando técnicas espectroscópicas (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y EMIE).

4.3.3 Determinar el potencial inhibitorio de los compuestos sintetizados (**8a-8d**) mediante dos modelos biológicos:

- evaluación *in vitro* frente a la enzima 5 α -reductasa en tejido prostático humano
- evaluación *in vivo* en hámsteres castrados

4.3.4 Determinar la actividad antagonista de los compuestos preparados mediante un ensayo de unión a receptores androgénicos.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental esta compuesto de dos partes: la química en la que se describe la metodología empleada para sintetizar los compuestos diseñados (**8a-8d**) que se realizó en el laboratorio L-125 del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, y la biológica que describe la técnica seguida para la evaluación de los compuestos sintetizados realizada en el Laboratorio de Hormonas (G-006) del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM (Campus Xochimilco) a cargo de la Dra. Marisa Cabeza Salinas.

5.1 PARTE QUÍMICA

5.1.1 Instrumentación

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo (I.R.) se obtuvieron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier marca Perkin Elmer modelo FT-IR-1605 utilizándose la técnica de película; para indicar la intensidad de las bandas se emplearon las siguientes abreviaturas, S (fuerte), M (media), W (débil); las bandas se indican en cm^{-1} .

Los espectros de absorción en el U.V. se registraron en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Hitachi modelo 200, utilizando como disolvente metanol.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Hidrógeno y Carbono-13 se determinaron en un equipo Varian modelo VRX-300 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, las muestras se disolvieron en CDCl_3 y DMSO-d_6 ; al respecto los desplazamientos están dados en ppm.

Los análisis por espectrometría de masas se realizaron en un espectrómetro modelo HD 5985-D por introducción directa utilizando la técnica de impacto electrónico (EMIE).

El avance de las reacciones y pureza de los productos obtenidos se determinaron por cromatografía en capa fina (ccf). La visualización de los compuestos orgánicos se realizó con una lámpara de luz UV ($\lambda=254 \text{ nm}$) y una disolución de CoCl_2 al 2% en H_2SO_4 2N.

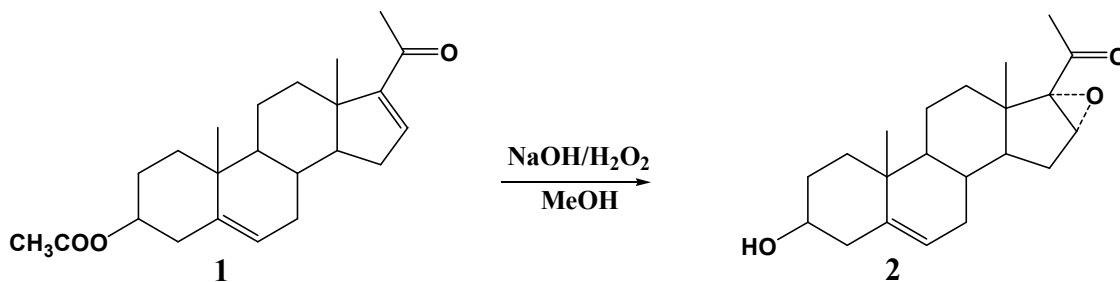
Para la elución de las placas cromatográficas se emplearon los siguientes sistemas:

Sistema	Composición	Proporción
I	hexano-acetato de etilo	7:3 1 elución
Ia	hexano-acetato de etilo	7:3 2 eluciones

5.1.2 Síntesis y caracterización de los nuevos esteroides

La síntesis de los compuestos **8a-8d** se llevó a cabo mediante la ruta sintética ilustrada en la Figura 12.

5.1.3 3 β -Hidroxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (**2**)



En un matraz de bola de 100 mL se disolvió 1 g (2.81 mmol) de la materia prima **1** en 50 mL de metanol empleando calentamiento moderado, enseguida se adicionaron 2 mL de NaOH 4 N (8 mmol) y 4 mL de H₂O₂ al 30 % v/v (33.3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h.

Al término de la reacción, el exceso de disolvente se eliminó por destilación a presión reducida en el rotaevaporador. Finalmente, el contenido del matraz se vertió en hielo en donde el producto precipitó y se filtró, realizándose lavados con agua destilada (3 x 50 mL) hasta pH neutro. Se obtuvieron 823 mg (88.9 % de rendimiento crudo) del compuesto **2**. Una pequeña parte se recrystalizó de metanol obteniéndose cristales blancos con punto de fusión de 192-194° C y R_f= 0.50 (sistema I).

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

IR (espectro 6) ν cm⁻¹: 3348.64 (M, -OH en C-3), 2937.97 (S, -CH₃, CH₂ saturado), 1692.21 (S, C=O de C-20), 1637.05 (W, C=C de C-5) y 857.89 (W, C-O-C del epóxido en C-16-C-17).

RMN-¹H (espectro 7) δ ppm: 1.02 (s, 3H, H-18), 1.05 (s, 3H, H-19), 2.03 (s, 3H, H-21), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.68 (s, 1H, H-16) y 5.32 (d, 1H, H-5, J= 4 Hz).

RMN-¹³C (espectro 8 y 9) δ ppm: 15.16 (C-18), 19.29 (C-19), 25.96 (C-21), 60.51 (C-16), 71.61 (C-3), 71.09 (C-17), 121.40 (C-6), 141.50 (C-5) y 205.30 (C-20).

EMIE (espectro 10) m/z (% de abundancia relativa): 330 (92) M⁺, 312 (55) [M - H₂O]⁺ y 297 (35) [M - H₂O, - CH₃]⁺.

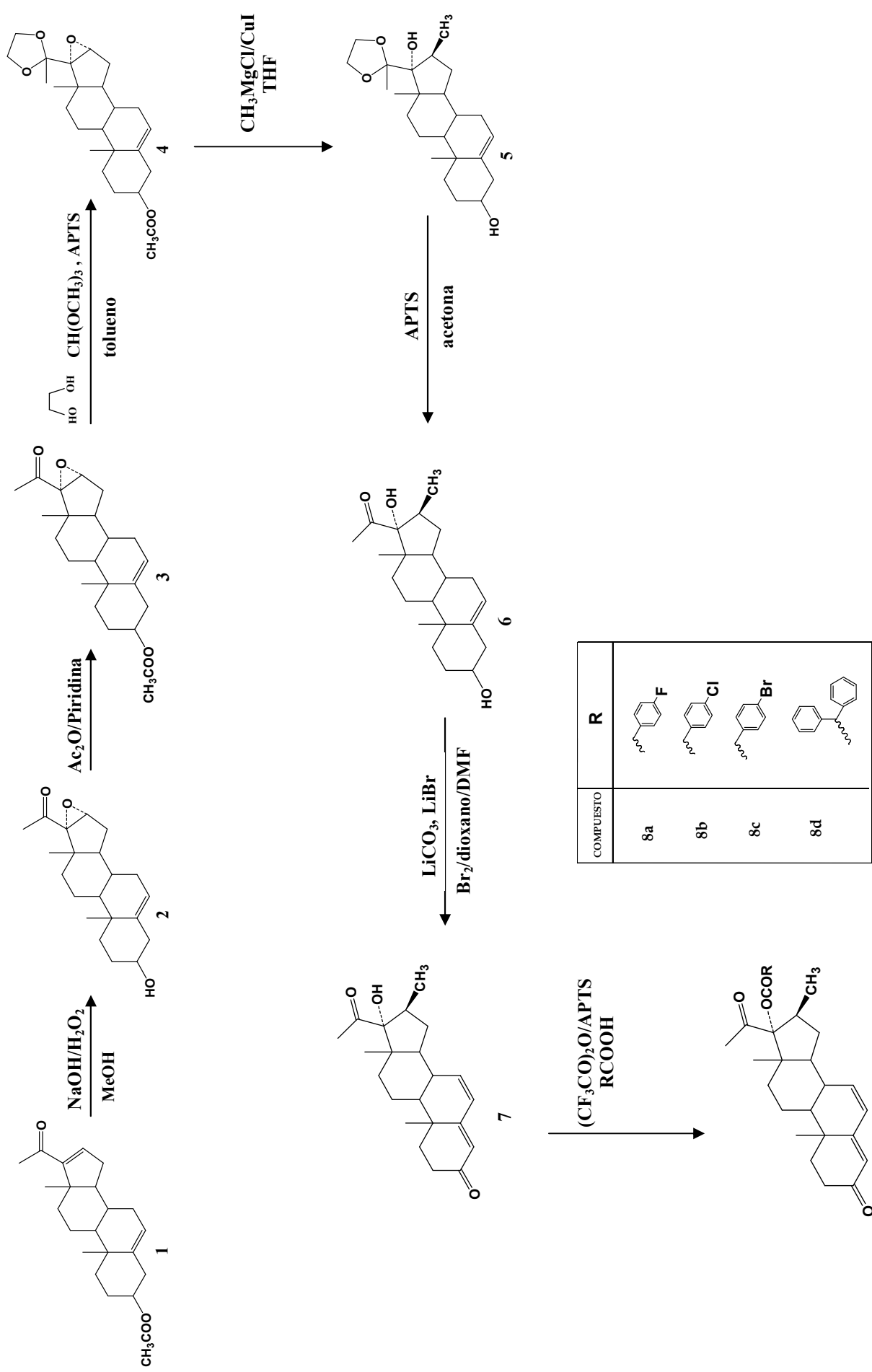
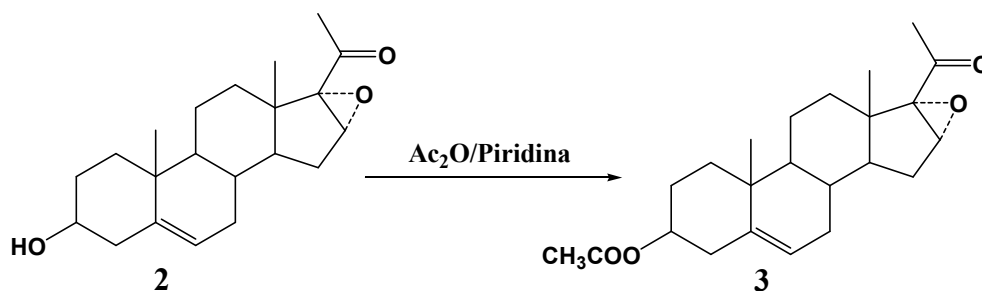


Figura 12. Esquema de síntesis para los compuestos 8a-8d.

5.1.4 3 β -Acetoxi-16 α ,7 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3)



En un matraz de bola de 25 mL se disolvió 1 g (3.03 mmol) del compuesto **2** en 5 mL de piridina anhidra enseguida se adicionaron 10 mL de anhídrido acético (106 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Al término de la reacción, el contenido del matraz se vertió en una mezcla hielo-agua en la cual el producto precipitó y se filtró al vacío. Se efectuaron lavados con agua (3 x 100 mL) para eliminar los residuos de ácido acético originado como subproducto de la reacción. Se obtuvieron 1.1 g del compuesto **3** (98.5 % de rendimiento crudo). Una pequeña parte se recrystalizó de metanol obteniéndose agujas blancas con punto de fusión de 158-160 °C y $R_f = 0.55$ (sistema I).

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

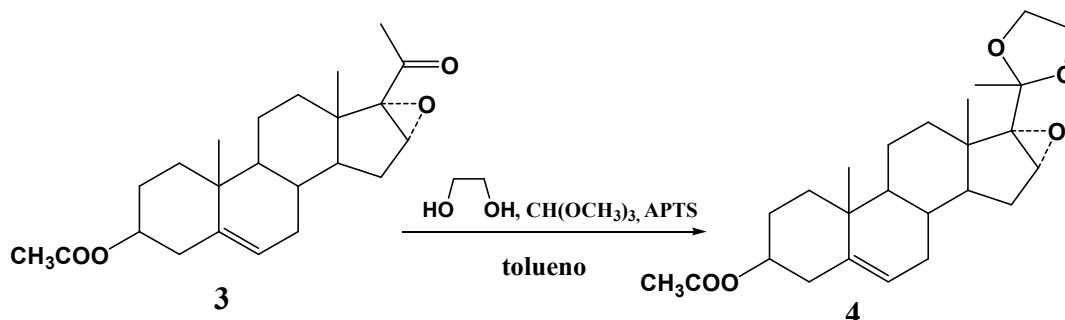
IR (espectro 11) ν cm^{-1} : 2942.72 (M, -CH₃, -CH₂), 1731.81 (S, C=O del grupo acetoxi), 1697.96 (S, C=O en C-20), 1244.98 (S, C-O del grupo acetoxi), 1031.98 (M, C-O del grupo acetoxi) y 851.75 (W, C-O del epóxido en C-16-C-17).

RMN-¹H (espectro 12) δ ppm: 1.02 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19), 2.00 (s, 6H, H-21 y -CH₃ del grupo acetoxi en C-3), 3.67 (s, 1H, H-16), 4.56 (m, 1H, H-3) y 5.34 (d, 1H, H-5, $J = 5$ Hz).

RMN-¹³C (espectro 13 y 14) δ ppm: 19.00 (C-19), 21.16 (C-19), 21.16 (C-21), 25.70 (-CH₃ del grupo acetoxi en C-3), 60.21 (C-16), 70.67 (C-17), 73.49 (C-3), 121.71 (C-6), 139.76 (C-5), 170.12 (C=O del grupo acetoxi) y 204.57 (C-20).

EMIE (espectro 15) m/z (% de abundancia relativa): 372 (0.03) M^+ , 312 (100) $[M - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$ y 269 (30) $[M - \text{CH}_3\text{COOH}, - \text{CH}_3\text{CO}]^+$.

5.1.5 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregnen-20-ona (4)



En un matraz de bola de 25 mL se colocó 1 g del compuesto **3** (2.69 mmol) y se disolvió con 5 mL de tolueno, enseguida se adicionaron 3.2 mL de etilenglicol (53 mmol), 4 mL de ortoformiato de trimetil (45 mmol) y 0.020 g de ácido *para*-tolensulfónico (1.13 mmol), este último se secó previamente en la estufa a 50 ° C por 20 min. La mezcla reaccionante se mantuvo en agitación durante 10 h a temperatura ambiente. Una vez que se verificó la ausencia de materia prima por ccf se adicionaron 100 mg de acetato de sodio y la mezcla se agitó por espacio de 20 min. Transcurrido este tiempo, el sólido formado se separó por filtración y se secó al vacío. Posteriormente, se realizaron extracciones con cloroformo a las aguas del filtrado (3 x 50 mL), enseguida se reunieron los extractos, se lavaron con agua hasta pH neutro y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Una vez evaporado el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador, se observó un sólido amarillento que correspondió al producto **4**. Ambos sólidos obtenidos se recrystalizaron de acetato de etilo obteniéndose 0.979 g de cristales blancos (87.6 % de rendimiento total) con punto de fusión de 196-198 °C y R_f = 0.49 (sistema I).


Datos espectroscópicos y espectrométricos:

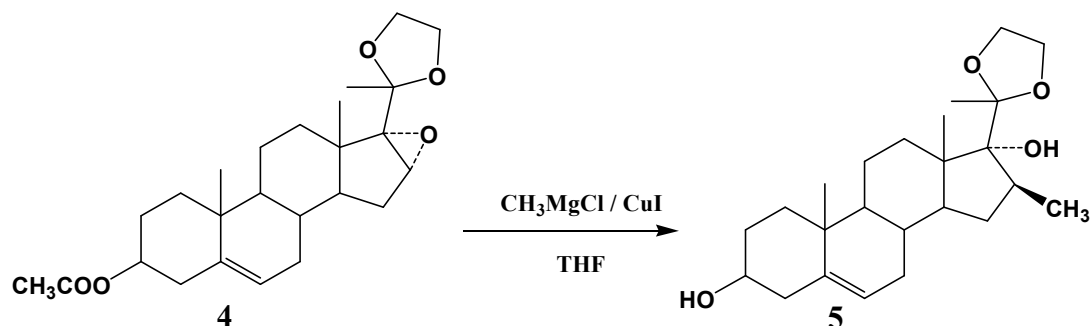
IR (espectro 16) ν cm⁻¹: 2940.63 (M, -CH₃, -CH₂), 1718.99 (S, C=O del grupo acetoxi), 1247.85 (S, C-O del grupo acetoxi), 1033.80 (M, C-O del grupo acetoxi) y 950.16 (W, C-O-C del grupo etilendioxi en C-20).

RMN-¹H (espectro 17) δ ppm: 0.99 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19), 1.43 (s, 3H, H-21), 2.02 (s, 3H, -CH₃ del grupo acetoxi), 2.31 (m, 2H, H-2), 3.37 (s, 3H, H-16), 3.93 (m, 4H del grupo etilendioxi en C-20), 4.56 (m, 1H, H-3) y 5.36 (d, 1H, H-6, J = 7 Hz).

RMN-¹³C (espectro 18 y 19) δ ppm: 15.49 (C-18), 19.01 (C-19), 21.19 (C-21), 23.49 (-CH₃ del grupo acetoxi), 64.40 (C-1' etilendioxi), 64.88 (C-2' etilendioxi), 59.30 (C-16), 70.49 (C-17), 73.57 (C-3), 122.99 (C-6), 108.95 (C-20), 139.63 (C-5) y 170.15 (C=O del grupo acetoxi).

EMIE (espectro 20) m/z (% de abundancia relativa): 416 (5) M⁺, 401 (5) [M - CH₃]⁺, 356 (30) [M -

CH₃COOH]⁺ y 87 (100) []⁺.

5.1.6 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -metil-5-pregнено (5)

En un matraz de dos bocas de 25 mL, provisto de agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, se colocaron 600 mg de compuesto **4** (1.44 mmol) y 180 mg de yoduro de cobre (CuI, mmol) como catalizador. Posteriormente se agregó 12.5 mL de una solución de cloruro de metil magnesio (CH₃MgCl) 2M en THF. La mezcla se mantuvo a reflujo por 24 h bajo atmósfera de nitrógeno y agitación constante.




Al término de la reacción el contenido del matraz se vertió lentamente en 15 mL de una solución saturada de cloruro de amonio enfriada a 0 °C, después se agregaron 50 mL de cloroformo formándose dos fases. Con un embudo de separación, se extrajo la fase cloroformica, se lavó con solución saturada de cloruro de amonio (2 x 20 mL) y con agua (3 x 20 mL) hasta pH neutro, finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro, se decantó la sal y se concentró el disolvente quedando un sólido de color amarillo que se recrystalizó de metanol. Se obtuvieron 0.380 g (67.6 % de rendimiento total) de cristales blancos con punto de fusión 162-163 °C y una sola mancha por cromatografía en capa fina con R_f = 0.28 (sistema Ia).

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

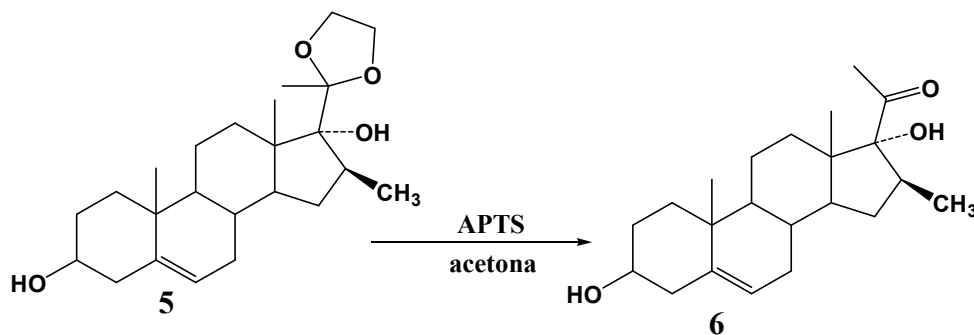
IR (espectro 21) ν cm⁻¹: 3449.58 (S, -OH en C-3 y C-17), 2936.43 (S, -CH₃, -CH₂), 1638.82 (W, C=C en C-5-C-6) y 1044.27 (M, C-O-C de etilendioxi en C-20).

RMN-¹H (espectro 22) δ ppm: 0.89 (s, 3H, H-18), 1.00 (s, 3H, H-19), 1.17 (d, 3H, -CH₃ en C-16 β J= 5.4 Hz), 1.39 (s, 3H, H-21), 2.25 (m, 2H, H-2), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.98 (m, 4H de etilendioxi en C-20) y 5.34 (d, 1H, H-6, J= 3 Hz).

RMN-¹³C (espectro 23 y 24) δ ppm: 15.04 (-CH₃ en C-16 β), 19.36 (C-18), 21.29 (C-19), 21.84 (C-21), 63.31 (C-1' de etilendioxi en C-20), 63.40 (C-2' de etilendioxi), 71.70 (C-3), 87.12 (C-17), 121.71 (C-6), 114.11 (C-20) y 140.58 (C-5).

EMIE (espectro 25) m/z (% de abundancia relativa): 390 (2) M⁺, 285 (20) [M - , - H₂O]⁺, 267 (16) [M - , - 2H₂O]⁺ y 87 (100) []⁺.

5.1.7 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona (6)



En un matraz de bola de 50 mL se colocaron 600 mg de **5** (1.54 mmol) y se disolvieron con 21 mL de acetona, enseguida se adicionaron 300 mg de ácido *para*-toluensulfónico (APTS, 16.95 mmol), éste último se secó previamente en la estufa a 50 °C por 20 min. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente.

Cuando se verificó la conversión total de materia prima por cromatografía en capa fina, el contenido del matraz se vertió en una mezcla hielo-agua y se agitó por espacio de 15 min; el precipitado formado se separó por filtración al vacío y se lavó con agua destilada (2 x 50 mL) hasta pH neutro. Se obtuvieron 0.513 g (96.3 % de rendimiento crudo) del compuesto **6**. Una pequeña muestra se recrystalizó de metanol obteniéndose un sólido blanco con punto de fusión de 230-232 °C y Rf= 0.44 (sistema Ia).

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

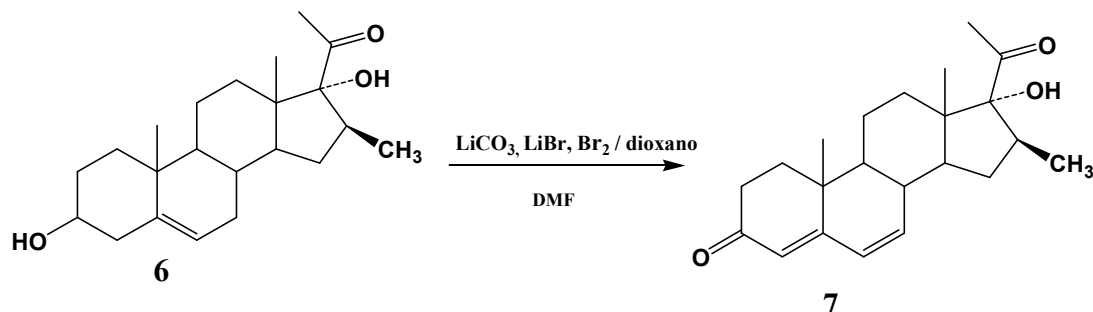
IR (espectro 26) ν cm⁻¹ : 3334.43 (S, -OH en C-3 y C-17), 2028.46 (S, -CH₃, -CH₂), 1689.36 (S, C=O en C-20) y 1453.7 (W, C=C en C-5-C-6).

RMN-¹H (espectro 27) δ ppm: 0.737 (s, 3H, H-18), 0.937 (s, 3H, H-19), 1.022 (d, 3H, -CH₃ en C-16 β , J= 5.5 Hz), 2.1 (s, 3H, H-21), 3.27 (m, 1H, H-3) y 5.31 (d, 1H, H-6, J= 2.8 Hz).

RMN-¹³C (espectro 28 y 29) δ ppm: 15.02 (-CH₃ en C-16 β), 19.11 (C-18), 19.97 (C-19), 29.53 (C-21), 69.93 (C-3), 88.54 (C-17), 120.33 (C-6), 141.19 (C-5) y 210.92 (C-20).

EMIE (espectro 30) m/z (% de abundancia relativa): 346 (80) M⁺, 303 (55) [M - CH₃CO]⁺, 285 (100) [M - CH₃CO, - H₂O]⁺ y 267 (80) [M - CH₃CO, - 2 H₂O]⁺.

5.1.8 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (7)



En una matraz de bola de dos bocas de 20 mL, provisto de agitador magnético, termómetro y refrigerante en posición de reflujo, se colocaron 500 mg de **6** (1.445 mmol), 1.5 g de carbonato de litio (20.30 mmol), 1 g de bromuro de litio (11.51 mmol) y 7 mL de dimetilformamida (DMF).

Por otra parte se preparó una solución de bromo (Br_2 , 0.35 g 2.19 mmol) en 3 mL de dioxano seco, ésta se incorporó gota a gota y con agitación constante a la suspensión. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 2 h a una temperatura de 70 °C. Al comprobarse la ausencia de materia prima por ccf la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, después las sales presentes en el fondo del matraz se separaron por filtración al vacío y se lavaron con DMF. Al filtrado se le agregaron 50 mL de una solución de bisulfito de sodio (NaHSO_3 0.5 g/100 mL H_2O) y bicarbonato de sodio (NaHCO_3 0.5 g/100 mL H_2O) para eliminar los residuos de bromo en el medio de reacción. Una vez que se enfrió la solución anterior, se observó la formación de un precipitado amarillo el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua (2 x 20 mL) y se secó a temperatura ambiente. El sólido se recrystalizó de una mezcla hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v obteniéndose 0.373 g del compuesto **7** (75.6 % de rendimiento total) con un punto de fusión de 212-215 °C y $R_f = 0.34$ (sistema Ia).

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

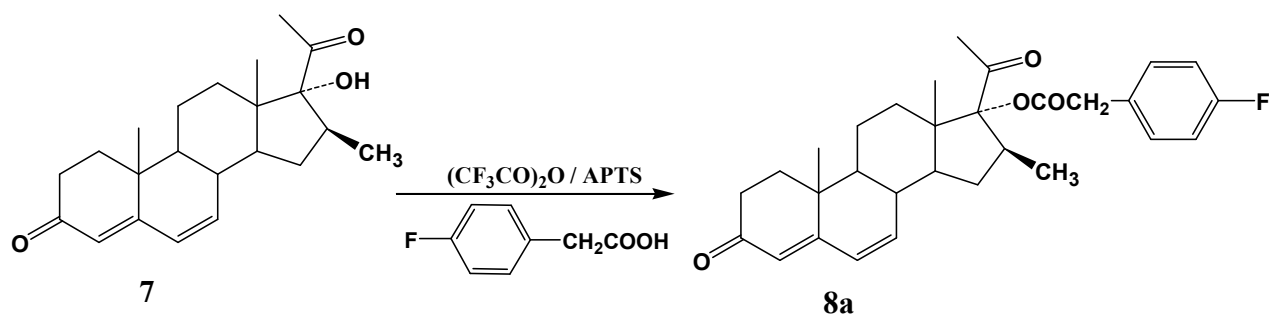
UV (espectro 31) $\lambda_{\text{máx}}$: 284.64 nm $\epsilon = 58208$ (Coeficiente de extinción molar)

IR (espectro 32) $\nu \text{ cm}^{-1}$: 3411.20 (S, -OH en C-17), 2928.9 (S, -CH₃, -CH₂), 1697.05 (S, C=O en C-20), 1664.96 (M, C=O en C-3) y 1617.51 (W, en C-4, C-6).

RMN-¹H (espectro 33) $\delta \text{ ppm}$: 0.99 (s, 3H, H-18), 1.12 (s, 3H, H-19), 1.21 (d, 3H, -CH₃ en C-16 β , $J = 6 \text{ Hz}$), 2.27 (s, 3H, H-21), 2.57 (m, 2H, H-2), 5.68 (s, 1H, H-7) y 6.13 (s, 2H, H-4 y H-6).

RMN-¹³C (espectro 34 y 35) $\delta \text{ ppm}$: 15.49 (-CH₃ en C-16 β), 16.33 (C-18), 19.90 (C-19), 30.15 (C-21), 36.89 (C-16), 31.33 (C-2), 90.12 (C-17), 123.72 (C-4), 128.06 (C-6), 140.82 (C-7), 163.63 (C-5), 199.64 (C=O en C-3) y 210.65 (C=O en C-20).

EMIE (espectro 36) m/z (% de abundancia relativa): 342 (100) M^+ , 324 (20) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ y 281 (90) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}]^+$.

5.1.9 17 α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)

En un matraz de bola de 5 mL se colocaron 147mg de ácido *para*-fluorofenilacético (0.954 mmol), se disolvieron con 0.14 mL de anhídrido trifluoroacético $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, 0.21 g, 0.987 mmol) y se agregaron 11 mg de ácido *para*-toluensulfónico (APTS, 0.62 mmol), este último se secó previamente en la estufa a 50 °C por 20 min. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 100 mg del compuesto 7 (0.292 mmol) y 0.5 mL de cloroformo seco; nuevamente la mezcla se agitó durante 2 h más. Al comprobarse la conversión total de materia prima por ccf la mezcla de reacción se vertió lentamente en 20 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , 8.8 g/100 mL de H_2O) y se agregaron 30 mL de cloroformo. Con un embudo de separación se extrajo la fase clorofórmica y se efectuaron 2 extracciones más (2 x 30 mL). Los extractos se reunieron y se lavaron con agua (3 x 20 mL) hasta pH neutro, posteriormente, se secaron con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se concentró a presión reducida en el rotaevaporador.

Se obtuvo un residuo de color amarillo se purificó por placas preparativas utilizando como medios de elución hexano-acetato de etilo 7:3 y 8:2 % v/v. En la placa se marcó y raspó la zona correspondiente al compuesto 8a. Este se extrajo de la sílice con 400 mL de cloroformo bajo calentamiento suave y agitación constante por 2 h. El compuesto 8a se obtuvo en forma de cristales con punto de fusión de 208-210 °C, una sola mancha por ccf con $R_f=0.45$ (sistema Ia). El rendimiento total fue de 47.9 % (66.95 mg).

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

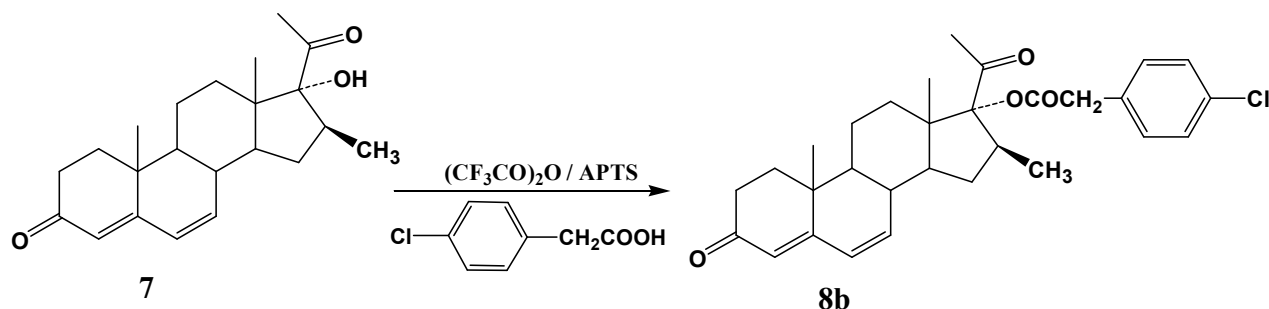
UV (espectro 37) $\lambda_{1\text{máx.}}=233.60$ nm $\epsilon_1=60689$ $\lambda_{2\text{máx.}}=277.01$ nm $\epsilon_2=15706$

IR (espectro 38) ν cm^{-1} : 2948.63 (M, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$), 1732.37 (S, $\text{C}=\text{O}$ en C-17), 1714.22 (M, $\text{C}=\text{O}$ en C-20), 1618.28 (M, $\text{C}=\text{C}$ en C-4, C-6 y aromático), 1662.86 (S, $\text{C}=\text{O}$ conjugado en C-3), 1264 (M, C-F) 1220 (S, C-O de éster en C-17) y 873.3 y 800.06 (W, aromático *para*-disustituido)

RMN ^1H (espectro 39) δ ppm: 0.75 (s, 3H, H-18), 1.11 (s, 3H, H-19), 1.36 (d, 3H, $-\text{CH}_3$ en C-16 β $J=5.7$ Hz), 1.83 (s, 3H, H-21), 2.55 (m, 2H, H-2), 3.64 (s, 2H, H-2'), 5.72 (s, 1H, H-4), 6.06 (d, 1H, H-6 $J=7$ Hz), 6.14 (dd, 1H, H-7 $J_1=7$ Hz, $J_2=1.6$ Hz), 7.01 (m, 2H, H-5' y H-7' aromáticos) y 7.25 (m, 2H, H-4' y H-8' aromáticos).

RMN- ^{13}C (espectro 40 y 41) δ ppm: 14.87 ($-\text{CH}_3$ en C-16 β), 16.31 (C-18), 19.70 (C-19), 28.13 (C-21), 34.55 (C-2), 41.15 (C-2'), 37.12 (C-16), 95.79 (C-17), 115.48 (C-5'), 115.76 (C-7'), 128.94 (C-3'), 123.98 (C-4), 128.27 (C-6), 130.88 (C-4'), 130.99 (C-8'), 140.05 (C-7), 163.10 (C-6'), 160.51 (C-5), 171.10 (C=O de éster C-1'), 199.40 (C=O en C-3) y 203.87 (C=O en C-20).

EMIE (espectro 42) m/z (% de abundancia relativa): 478 (2) M^+ , 435 (3) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}]^+$, 341 (5) $[\text{M} - \text{COCH}_2\text{PhF}]^+$, 323 (10) $[\text{M} - \text{COCH}_2\text{PhF}, - \text{H}_2\text{O}]^+$, 281 (80) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}, - \text{HO}_2\text{CCH}_2\text{PhF}]^+$ y 109 (100) $[\text{CH}_2\text{PhF}]^+$.

5.1.10 17 α -[(4-Clorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)

En un matraz de bola de 5 mL se mezclaron 176.9 mg de ácido 4-clorofenilacético (1.03 mmol), 0.14 mL de anhídrido trifluoroacético (0.21 g, 0.987 mmol) y 11 mg de ácido *para*-toluensulfónico (0.62 mmol), este último se secó previamente en la estufa a 50 °C por 20 min. La mezcla reaccionante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionaron 100 mg del compuesto **7** (0.292 mmol) y 0.5 mL de cloroformo seco. De nuevo esta mezcla se agitó por espacio de 2 h. Cuando se verificó la conversión total de materia prima, la mezcla se vertió lentamente en 20 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 8.8 g/100 mL H₂O) y se adicionaron 30 mL de cloroformo formándose dos fases. Con un embudo de separación se extrajo la fase cloroformica y se efectuaron dos extracciones más. Los extractos se reunieron y se lavaron con agua hasta pH neutro (3 x 20 mL), posteriormente, se trataron con sulfato de sodio anhidro para después separar la sal por filtración y concentrar el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador.

Se obtuvo un residuo oleoso de color amarillo el cual se purificó por placas preparativas utilizando como medios de elución hexano-acetato de etilo 7:3 y 8:2 % v/v. En la placa se marcó y raspó la zona correspondiente al compuesto **8b**. Este se extrajo del gel de sílice con 400 mL de cloroformo bajo calentamiento suave y agitación constante durante 2 h. Finalmente, se obtuvieron 77 mg del compuesto **8b** (53.3 % de rendimiento total) en forma de cristales con punto de fusión de 223-224 °C, una sola mancha por ccf con R_f= 0.43 (sistema Ia).

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

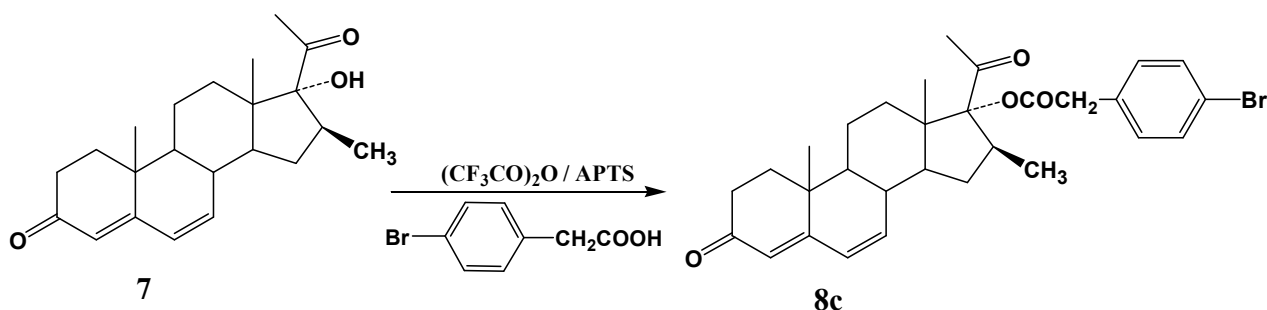
UV (espectro 43) $\lambda_{1\text{m}\acute{\text{a}}\text{x.}}$ =219.85 nm ϵ_1 =53908 $\lambda_{2\text{m}\acute{\text{a}}\text{x.}}$ =284.47 nm ϵ_2 =52090

IR (espectro 44) ν cm^{-1} : 2929.46 (S, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$), 1727.25 (S, $\text{C}=\text{O}$ del éster en C-17), 1660.88 (M, $\text{C}=\text{O}$ en C-3 y C-20), 1615.56 (M, $\text{C}=\text{C}$ conjugado C-4, C-6 y aromático), 1223.39 (W, $\text{C}-\text{O}$ de éster en C-17), 1088.6 (M, $\text{C}-\text{Cl}$), 807.44 y 759.15 (W, aromático *para*-disustituido).

RMN- ^1H (espectro 45) δ ppm: 0.75 (s, 3H, H-18), 1.11 (s, 3H, H-19), 1.35 (d, 3H, $-\text{CH}_3$ en C-16 β , $J=6$ Hz), 2.17 (s, 3H, H-21), 2.55 (m, 2H, H-2), 3.65 (s, 2H, H-2'), 5.72 (s, 1H, H-4), 6.09 (d, 1H, H-6, $J=8$ Hz), 6.15 (dd, 1H, H-7, $J_1=8$ Hz, $J_2=1.6$ Hz), 7.20 (m, 2H, H-4' y H-8') y 7.28 (m, 2H, H-5' y H-7').

RMN- ^{13}C (espectro 46 y 47) δ ppm: 14.84 ($-\text{CH}_3$ en C-16 β), 16.31 (C-18), 19.69 (C-19), 28.17 (C-21), 34.52 (C-2), 41.32 (C-2'), 37.09 (C-16), 95.87 (C-17), 123.98 (C-4), 128.28 (C-6), 128.87 (C-5' y C-7'), 130.71 (C-4' y C-8'), 131.65 (C-3'), 133.41 (C-6'), 139.99 (C-7), 163.10 (C-5), 170.77 ($\text{C}=\text{O}$ de éster), 199.39 ($\text{C}=\text{O}$ en C-3) y 203.81 ($\text{C}=\text{O}$ en C-20).

EMIE (espectro 48) m/z (% de abundancia relativa): 494 (3) M^+ , 496 (1) $[\text{M}+2]^+$, 451 (3) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}]^+$, 341 (3) $[\text{M} - \text{COCH}_2\text{PhCl}]^+$, 323 (12) $[\text{M} - \text{COCH}_2\text{PhCl} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 281 (100) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO} - \text{HO}_2\text{CCH}_2\text{PhCl}]^+$, 125 (40) $[\text{CH}_2\text{Ph}^{35}\text{Cl}]^+$ y 127 (13) $[\text{CH}_2\text{Ph}^{37}\text{Cl}]^+$.

5.1.11 17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)

En un matraz de bola de 5 mL se mezclaron 223 mg de ácido *para*-bromofenilacético (5 mmol), 0.14 mL de anhídrido trifluoroacético (0.21 g, 0.987 mmol) y 11 mg de ácido *para* toluensulfónico (0.62 mmol); este último se secó en la estufa a 50 °C por 20 min. La mezcla anterior se agitó durante un período de 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 100 mg del esteroide 7 (0.292 mmol) y 0.5 mL de cloroformo seco; nuevamente la mezcla se mantuvo en agitación por espacio de 2 h más. Cuando se verificó la conversión total de materia prima por ccf, la mezcla se vertió lentamente en 20 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , 8.8 g/100 mL de H_2O) y se agregaron 30 mL de cloroformo formándose dos fases. Con un embudo de separación se extrajo la fase orgánica y se realizaron dos extracciones más (2 x 30 mL). Los extractos se reunieron y se lavaron con agua hasta pH neutro; en seguida se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por destilación a presión reducida en el rotaevaporador. Se obtuvo un residuo oleoso de color café claro el cual se purificó por placas preparativas empleando como sistemas de elución hexano-acetato de etilo 7:3 y 8:2 % v/v.

En la placa se marcó y raspó la zona correspondiente al compuesto 8c, éste se extrajo del gel de sílice con 400 mL de cloroformo bajo calentamiento suave y agitación constante durante 2 h. Finalmente, se obtuvieron 86.04 mg del compuesto 8c (54.7 % de rendimiento total) en forma de cristales, un solo producto por ccf con $R_f=0.40$ (sistema Ia) y punto de fusión de 220-222 °C.

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

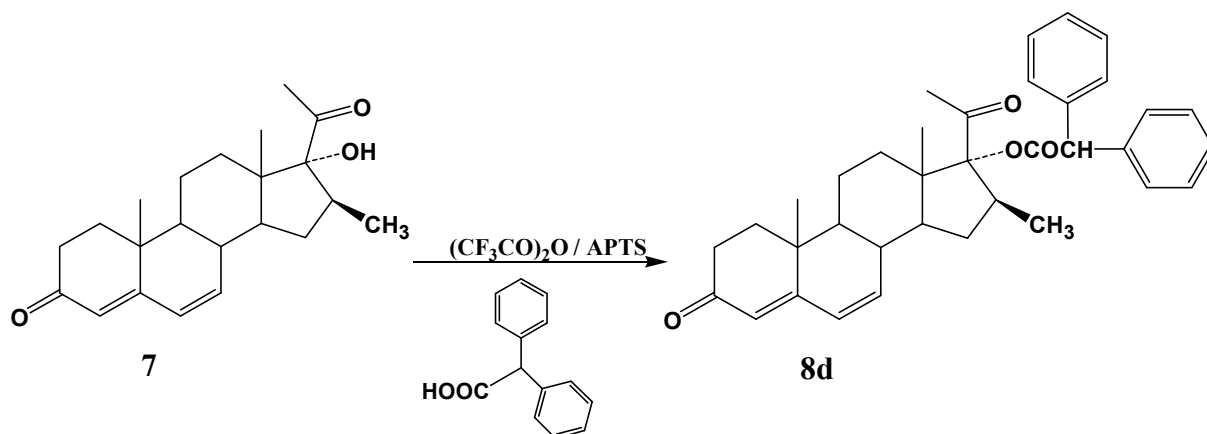
UV (espectro 49) $\lambda_{1\text{ máx.}}=221.18\text{ nm}$ $\epsilon_1=29712$ $\lambda_{2\text{ máx.}}=280.96\text{ nm}$ $\epsilon_2=51377$

IR (espectro 50) ν cm^{-1} : 2945.68 (S, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$), 1796.92 (S, $\text{C}=\text{O}$ del éster en C-17), 1659.63 (S, $\text{C}=\text{O}$ de C-20), 1616.24 (M, $\text{C}=\text{O}$ conjugado en C-3), 1583.24 (W, $\text{C}=\text{C}$ en C-4, C-6 y aromático), 1222.37 (M, $\text{C}-\text{O}$ de éster en C-17), 1116.89 (M, $\text{C}-\text{Br}$ aromático), 875.84 y 803.49 (W, aromático *para*-disustituido).

RMN- ^1H (espectro 51) δ ppm: 0.77 (s, 3H, H-18), 1.13 (s, 3H, H-19), 1.35 (d, 3H, $-\text{CH}_3$ en C-16 β , $J=6.3$ Hz), 1.88 (s, 3H, H-21), 2.38 (m, 2H, H-2), 3.71 (s, 2H, H-2'), 5.75 (s, 1H, H-4), 6.10 (d, 1H, H-6, $J=8$ Hz), 6.19 (dd, 1H, H-7, $J_1=8$ Hz $J_2=1$ Hz), 7.18 (d, 2H, H-4' y H-8', $J=10.5$ Hz) y 7.49 (d, 2H, H-5' y H-7' $J=10.5$ Hz).

RMN- ^{13}C (espectro 52 y espectro 53) δ ppm: 14.85 ($-\text{CH}_3$ en C-16 β), 16.32 (C-18), 19.70 (C-19), 28.19 (C-21), 34.51 (C-2), 41.41 (C-2'), 37.01 (C-16), 95.87 (C-17), 121.49 (C-6'), 124.01 (C-4), 128.31 (C-6), 131.08 (C-5' y C-7'), 131.84 (C-4' y C-8'), 132.17 (C-3'), 139.99 (C-7), 163.09 (C-5), 170.67 ($\text{C}=\text{O}$ de éster C-1'), 199.43 ($\text{C}=\text{O}$ en C-3) y 203.84 ($\text{C}=\text{O}$ en C-20).

EMIE (espectro 54) m/z (% de abundancia relativa): 538 (0.6) M^+ , 540 (0.59) $[\text{M} + 2]^+$, 495 (0.8) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}]^+$, 323 (35) $[\text{M} - \text{COCH}_2\text{PhBr} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 281 (100) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO} - \text{HO}_2\text{CCH}_2\text{PhBr}]^+$, 169 (92) $[\text{CH}_2\text{Ph}^{79}\text{Br}]^+$ y 171 (89) $[\text{CH}_2\text{Ph}^{81}\text{Br}]^+$.

5.1.12 17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)

En un matraz de bola de 5 mL se colocaron 220 mg de ácido 2,2-difenilacético (5 mmol), se disolvieron con 0.15 mL de anhídrido trifluoroacético (0.22 g, 1.06 mmol) y se adicionaron 11 mg de ácido *para*-toluensulfónico (0.62 mmol), éste último se secó previamente en la estufa a 50 °C por 20 min. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo se adicionaron 100 mg del compuesto 7 (0.292 mmol) y 0.5 mL de cloroformo seco. Nuevamente la mezcla reaccionante se mantuvo en agitación hasta el consumo total de la materia prima (2 h). Posteriormente, dicha mezcla se vertió lentamente en 20 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 8.8 g/100 mL H₂O) y se agregaron 30 mL de cloroformo. Con un embudo de separación se extrajo la fase cloroformica y se efectuaron 2 extracciones más (2 x 30 mL). Los extractos se reunieron y se lavaron con agua hasta pH neutro; en seguida se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por destilación a presión reducida en el rotaevaporador. Se obtuvo un residuo oleoso de color café oscuro con olor agradable el cual se purificó por placas preparativas empleando como sistemas de elución hexano-acetato de etilo 7:3, 8:2 y 9:1 % v/v.

En la placa se marcó y raspó la zona correspondiente al compuesto 8d. Este se extrajo de la sílice con 400 mL de cloroformo bajo calentamiento suave y agitación constante durante 2 h. Finalmente, se obtuvieron 65.97 mg (42.1% de rendimiento total) de cristales blancos, un solo producto por ccf con R_f= 0.45 (sistema Ia) y punto de fusión 172-174 °C.

Datos espectroscópicos y espectrométricos:

UV (espectro 55) $\lambda_{1\text{ máx.}}$: 282.36 nm ϵ = 52682 (Coeficiente de extinción molar)

IR (espectro 56) ν cm^{-1} : 2946.66 (M, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$), 1724.11 (S, $\text{C}=\text{O}$ de éster en C-17), 1660.32 (S, $\text{C}=\text{O}$ en C-20), 1616.73 (M, $\text{C}=\text{O}$ conjugado en C-3), 1583.78 (W, $\text{C}=\text{C}$ conjugado en C-4, C-6 y aromático), 1226.10 (M, $\text{C}-\text{O}$ de éster en C-17), 752.14 y 700.53 (W, $\text{C}-\text{H}$ aromático monosustituido).

RMN- ^1H (espectro 57) δ : 0.73 (s, 3H, H-18), 1.09 (s, 3H, H-19), 1.37 (d, 3H, $-\text{CH}_3$ en C-16 β , $J=6.5$ Hz), 1.81 (s, 3H, H-21), 2.54 (m, 2H, H-2), 4.11 (c, 1H, H-2', $J=3.2$ Hz), 5.71 (s, 1H, H-4), 6.07 (d, 1H, H-6, $J=5.6$ Hz), 6.13 (dd, 1H, H-7, $J_1=5.6$ Hz, $J_2=1.2$ Hz) y 7.2-7.4 ppm (m, 10 H, H-4'-H-8' y H-10'-H-14').

RMN- ^{13}C (espectro 58 y 59) δ : 14.82 ($-\text{CH}_3$ en C-16 β), 16.30 (C-18), 19.88 (C-19), 28.28 (C-21), 34.54 (C-2), 37.10 (C-16), 57.32 (C-2'), 96.06 (C-17), 123.88 (C-4), 127.51 (C-6' y C-12'), 127.58 (C-4', C-5', C-7', C-8', C-10', C-11', C-13', C-14'), 128.15 (C-6), 137.68 (C-3' y C-9'), 140.22 (C-7), 163.25 (C-5), 171.92 ($\text{C}=\text{O}$ de éster C-1'), 199.50 ($\text{C}=\text{O}$ en C-3) y 204.09 ppm ($\text{C}=\text{O}$ en C-20).

EMIE (espectro 60) m/z (% de abundancia relativa): 536 (1) M^+ , 493 (0.5) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}]^+$, 341 (3) $[\text{M} - \text{COCH}(\text{Ph})_2]^+$, 323 (5) $[\text{M} - \text{COCH}(\text{Ph})_2, - \text{H}_2\text{O}]^+$, 281 (18) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}, - \text{HO}_2\text{CCH}(\text{Ph})_2]^+$ y 167 (100) $[\text{CH}(\text{Ph})_2]^+$.

5.1 PARTE BIOLÓGICA

5.2.1 Material biológico

28 Hámsteres machos de la cepa dorada con peso promedio entre 200 y 250 g.

Tejido de próstata humana de cadáver conservado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ proporcionado por el Dr. Avissai Alcántara del Departamento de Patología del Hospital General de México.

5.2.2 Sustancias y Equipos

testosterona [H^3] actividad específica 85-105 Ci/mmol suministrado por NEN Life Science Products, Inc (Boston, MA).

Mibolerona [H^3] actividad específica 70-87 Ci/mmol suministrado por NEN Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA).

Ultracentrífuga Beckman modelo Optima L-70K.

Centrífuga marca Beckman modelo Allegra 6R.

Analizador de Centelleo Packard modelo Tri-Carb 2100 TR.

Placas cromatográficas de sílica gel 60G F₂₅₄ en soporte de aluminio (20 x 20 cms, Merck).

5.2.3 Ensayo *in vitro* con la enzima 5 α -reductasa

- Para cada uno de los nuevos derivados (**8a-8d**) se prepararon una serie de tubos en los cuales se colocaron cantidades crecientes del compuesto a probar ($10^{-11}\text{ M} - 10^{-5}\text{ M}$) disuelto en metanol + testosterona [H^3] a una concentración final de 2 nM.
- Se incluyeron tubos controles a los que sólo se les adicionó testosterona [H^3] a una concentración final de 2 nM.
- Los tubos se colocaron en baño maría y atmósfera de nitrógeno hasta evaporar totalmente el disolvente.
- Enseguida se añadieron 720 μL de buffer de fosfatos (40 mM) pH=6.5, 80 μL de fracción microsomal de próstata de cadáver humano, que contenían 134 μg de proteína, determinada por el método de Bradford.⁷¹ Dicha fracción microsomal contiene predominantemente a la isoforma 2 de la enzima 5 α -reductasa. Más tarde se agregaron 100 μL de DTT (1 mM) y 100 μL de NADPH (2 mM) con los que se dió inicio a la reacción.
- Los tubos se agitaron en un vórtex y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h.
- Al término de la incubación se agregó 1 mL de diclorometano para detener la reacción. Nuevamente los tubos se agitaron en un vórtex por 1 min.
- Se extrajo la fase orgánica en la cual se encontraba la DHT [H^3]. Se realizaron 3 extracciones más y una vez reunidos los extractos, el disolvente se evaporó en baño maría hasta sequedad.

- El extracto de cada tubo se disolvió en 6 gotas de metanol y se aplicó gota a gota en una placa cromatográfica para separar la DHT [H^3] formada; el procedimiento se repitió 5 veces. En cada extremo de la placa se aplicaron estándares de testosterona, dihidrotestosterona y una mezcla de ambas. La placa se eluyó 3 veces en un sistema de elución cloroformo - acetona= 9:1 v/v.
- Para la visualización de los estándares de testosterona y dihidrotestosterona, las placas se observaron bajo luz UV ($\lambda= 254$ nm) y posteriormente se revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 8%.
- Se marcó y cortó la zona correspondiente a la DHT [H^3] ($R_f=0.64$) después los pedazos de sílice se colocaron en viales en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold (Packard). Finalmente, se leyó la radiactividad producida por la DHT [H^3] en el analizador de centelleo. La actividad de la enzima se calculó en base a los controles que se incubaron en presencia únicamente de T [H^3].

5.2.4 Ensayo de unión a receptores androgénicos

5.2.4.1 Curva de saturación de los sitios del receptor

Con la finalidad de conocer la unión máxima de mibolerona [H^3] al receptor de andrógenos se realizó el siguiente ensayo:

- Se prepararon cuatro series de tubos denominados como CT de cuentas totales, CD de carbón-dextrán, UT de unión total que contenía cantidades crecientes de mibolerona [H^3] (0.25, 0.5, 0.75 y 1 nM) disueltas en metanol y la última serie UNE de unión no específica que contenía cantidades crecientes de mibolerona [H^3] (0.25, 0.5, 0.75 y 1 nM) disueltas en metanol más 100 veces una concentración de mibolerona no radiactiva.
- Los tubos se colocaron en baño maría hasta evaporar el disolvente.
- A los tubos de la serie CT y CD se les adicionaron volúmenes de 1 mL y 0.5 mL respectivamente de buffer TEMD pH=8 (Tris HCl 40 mM, EDTA 3mM, molibdato de sodio 20 mM, glicerol al 10% con ditioneitol DTT 1mM); a los tubos UT y UNE se les adicionaron 300 μ L del mismo buffer mas 200 μ L de citosol de próstata de rata conteniendo 4.14 mg de proteína.
- Los tubos se incubaron por 18 h a 4 °C. Al término de la incubación, a los tubos UT y UNE se les adicionaron 0.27 mL de una solución saturada de sulfato de amonio (concentración final de la solución 35 %) y se incubaron a 4 °C en el refrigerador.
- Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 3700 rpm durante 1.5 h. El precipitado formado se separó y resuspendió en 0.5 mL de una solución de TEMD pH=8 y se agitó vigorosamente.
- A la suspensión anterior se le agregó 0.5 mL de carbón dextrán, los tubos se agitaron e incubaron a 4 °C por 40 min y posteriormente se centrifugaron a 3700 rpm durante 5 min.

- De cada tubo se tomaron 200 μL de sobrenadante y se colocaron en un vial en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold para finalmente leer la radiactividad producida por el complejo miboleron-receptor en el analizador de centelleo.
- En el caso de los tubos CT y CD se tomó una alícuota de 200 μL y se realizó el mismo procedimiento descrito en el punto anterior.

5.2.4.2 Análisis por competencia con el receptor de andrógenos

- Una vez conocida la cantidad de miboleron $[\text{H}^3]$ necesaria para unirse al total de receptores ($B_{\text{máx}}$), se preparó una serie de tubos que contenían 1.5 nM de miboleron $[\text{H}^3]$ más cantidades crecientes de miboleron no radiactiva (10^{-9} - 10^{-7} M) o los compuestos **8a-8d**. A estos tubos se les agregó 300 μL de solución amortiguadora TEMD más 200 μL de citosol.
- Los tubos se incubaron por 18 h a 4°C . Al término de la incubación, a los tubos se les adicionaron 0.27 mL de una solución saturada de sulfato de amonio (concentración final de la solución 35 %) y se incubaron a 4°C en el refrigerador.
- Trascurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 3700 rpm durante 1.5 h. El precipitado formado se separó y se resuspendió en 0.5 mL de una solución de TEDM pH=8 y se agitó vigorosamente.
- A la suspensión anterior se le agregó 0.5 mL de carbón dextrán, los tubos se agitaron e incubaron a 4°C por 40 min y posteriormente se centrifugaron a 3700 rpm durante 5 min.
- De cada tubo se tomaron 200 μL de sobrenadante y se colocaron en un vial en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold para finalmente leer la radiactividad producida por el complejo miboleron $[\text{H}^3]$ -receptor en el analizador de centelleo.

5.2.5 Ensayo *in vivo* con los compuestos 8a-8d

- Se castraron un grupo de 28 animales 1 mes antes del experimento y se mantuvieron en condiciones de bioterio con agua y comida *ad libitum*.
- Los animales se separaron en forma aleatoria en 7 grupos con 4 animales cada uno.
- Los tres primeros grupos se mantuvieron como controles; al primero de ellos se le aplicaron inyecciones subcutáneas diarias solamente con el vehículo (aceite de sésamo) durante 6 días.
- Al segundo grupo control se le aplicaron inyecciones subcutáneas diarias con 200 μg de testosterona en 200 μL de aceite de sésamo durante 6 días.
- Al tercer grupo se le aplicaron inyecciones subcutáneas diarias con 200 μg de testosterona en 200 μL de aceite de sésamo + 200 μg de finasterida en 200 μL de aceite de sésamo durante 6 días.
- Los grupos experimentales (4, 5, 6 y 7) se trataron con 200 μg de testosterona en 200 μL de aceite de sésamo + 400 μg de los nuevos compuestos **8a- 8d** disueltos en aceite de sésamo durante 6 días.
- Terminado los tratamientos, los animales se sacrificaron con CO_2 y se hizo la disección de la próstata y las vesículas seminales.
- Finalmente se pesaron los órganos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PARTE QUÍMICA

Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos para los compuestos intermediarios y finales (**8a-8d**) (**Figura 12**) se muestran en la **Tabla 9**.

Como etapa previa a la síntesis de los esteroides **8a-8d** (**Figura 12**) se caracterizó a la materia prima **1** Acetato de 16-dehidropregnenolona (**3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona**) por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

El análisis por UV (espectro 1) indicó la presencia del sistema conjugado 16-en-20-ona (cetona α,β -insaturada) de la molécula el cual registró un máximo de absorción a 238.21 nm con valor de $\epsilon=58046$ (Coeficiente de extinción molar).

En su espectro de IR (espectro 2) se observaron las bandas intensas correspondientes al carbonilo conjugado en C-20 en 1667.87 cm^{-1} y a mayor frecuencia en 1731.06 cm^{-1} para el carbonilo del grupo acetoxi en C-3; la vibración correspondiente al doble enlace en C-16-C-17 apareció en 1587.69 cm^{-1} .

En el espectro de RMN- ^1H (espectro 3) las señales simples en 0.92, 1.06, 2.04 y 2.26 ppm, que integraron para tres hidrógenos cada una, fueron asignadas a los grupos metilo en C-18, C-19, C-21 y al metilo del grupo acetoxi en C-3. El multiplete centrado en 4.60 ppm correspondió al protón *alfa* en la posición C-3. El doblete en 5.39 ppm que integró para un hidrógeno fue asignado al protón vinílico en C-6, en tanto que la señal registrada a campo más bajo en 6.71 ppm correspondió al protón vinílico en C-16, éste último electrónicamente más desprotegido debido a la conjugación del doble enlace con el carbonilo en C-20.

Por comparación de los espectros de RMN- ^{13}C normal y modalidad DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) (espectro 4 y 5), las señales registradas en 15.68, 19.19, 21.41 y 27.12 ppm fueron asignadas a C-18, C-19, C-21 y al metilo del grupo acetoxi en C-3 respectivamente. El desplazamiento registrado en 73.84 ppm se asignó a C-3 que se encuentra unido al átomo de oxígeno del grupo acetoxi. En la zona de carbonos vinílicos se presentaron las señales para C-6 (121 ppm), C-5 (140.23 ppm), C-16 (144.39 ppm) y C-17 (155.32 ppm). Finalmente en la zona de carbonilos se pudieron apreciar las señales para el carbonilo del grupo acetoxi en 170.52 ppm y para el carbonilo de la cetona en 196.81 ppm.

Como primer paso de la síntesis planteada en la **Figura 12** se efectuó una reacción de epoxidación estereoespecífica sobre la doble ligadura α,β -insaturada. El carácter conjugado del alqueno permite una adición nucleofílica tipo Michael del anión hidropéroxido (H-OO^-) formado *in situ* durante la reacción sobre la doble ligadura C-16-C-17. La presencia de los metilos angulares en C-18, C-19 y la cadena lateral en C-17 del esteroide propicia que el ataque nucleofílico se lleve a cabo por la cara *alfa* de la molécula (menos impedida estericamente que la β) obteniendo predominantemente el isómero *alfa*.^{72,73}

Tabla 9. Propiedades físicas y rendimientos obtenidos para los compuestos intermediarios y finales

Compuesto	Fórmula Condensada	Peso molecular g/mol	Rendimiento %	Estado físico	Rf (sistema)	Punto de fusión °C
1	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	356	-----	Cristales blancos	0.50 (I)	170-172
2	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330	88.9	Cristales blancos	0.18 (I)	192-194
3	C ₂₃ H ₃₂ O ₄	372	98.5	Cristales blancos	0.55 (I)	158-160
4	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	416	87.6	Cristales blancos	0.49 (I)	196-198
5	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	67.6	Cristales blancos	0.28 (Ia)	162-163
6	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	346	96.3	Sólido blanco	0.44 (Ia)	230-232
7	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	342	75.6	Sólido blanco	0.34 (Ia)	212-215
8a	C ₃₀ H ₃₅ O ₄ F	478	47.9	Cristales blancos	0.45 (Ia)	208-210
8b	C ₃₀ H ₃₅ O ₄ Cl	494	53.3	Cristales blancos	0.43 (Ia)	223-224
8c	C ₃₀ H ₃₅ O ₄ Br	538	54.7	Cristales blancos	0.35 (Ia)	220-222
8d	C ₃₆ H ₄₀ O ₄	536	42.1	Cristales blancos	0.45 (Ia)	172-174

La elucidación estructural de esta sustancia, **3 β -Hidroxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona 2**, se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. En el espectro de IR (espectro 6) se apreció una banda en 857.89 cm⁻¹ correspondiente al alargamiento C-O-C del epóxido en C-16-C-17. Dada las condiciones básicas del medio de reacción, el grupo acetoxi en C-3 se hidrolizó generando el alcohol por lo que apareció una banda en 3348.64 cm⁻¹ correspondiente a la vibración del grupo -OH.

En la resonancia magnética protónica (espectro 7), además de los singuletes para los protones H-18 (1.022 ppm), H-19 (1.05 ppm) y H-21 (2.03 ppm), se presentó otra señal simple en 3.68 ppm asignado al protón con orientación β en C-16; en la zona de protones vinílicos se registró sólo un doblete (J= 3.8 Hz) originado por el protón H-6 acoplado al protón de C-7.

En los espectros de RMN-¹³C y DEPT (espectro 8 y 9) se mantienen las señales producidas por los metilos angulares C-18 (15.16 ppm) y C-19 (19.29 ppm) así como para el metilo en C-21 adyacente a la cetona (25.96 ppm). Aparecen las señales de los carbonos pertenecientes al anillo de oxirano en 60.51 ppm para C-16 y en 71.01 ppm para C-17 (carbono cuaternario). Asimismo, se registraron las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 a 141.40 y 121.40 ppm, respectivamente. Finalmente el carbonilo de la cetona en C-20 apareció a 205.3 ppm.

Mediante espectrometría de masas (espectro 10) se pudo observar el pico correspondiente a la masa molecular esperada para el compuesto **2** a 330 m/z (90 % de abundancia relativa). A partir de esta señal y por la pérdida de una molécula de agua (deshidratación del alcohol en C-3) se generó el pico en 312 m/z. Otro fragmento originado a partir del ion molecular fue el que se observó a 297 m/z por la pérdida de agua y de [CH₃]⁺.

El siguiente paso en la ruta de síntesis fue la acetilación del alcohol en C-3. Experimentalmente se había observado que el derivado acetilado presentaba una mayor solubilidad en tetrahidrofurano (THF) que su respectivo alcohol libre por lo que decidió nuevamente acetilar la posición C-3; de esta manera al presentar una mayor solubilidad el derivado **3** se conseguiría un mayor rendimiento en la posterior reacción de Grignard para la apertura del oxirano.

Para la reacción de acetilación se recurrió al método convencional en el que se emplea anhídrido acético y piridina; esta reacción transcurre mediante la formación de la especie electrófila acetilpiridinio⁷⁴ quien actúa como agente acetilante. El compuesto **3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona 3** se obtuvo con un alto rendimiento (98.5 %) y con una pureza bastante aceptable para someterlo a la siguiente reacción.

De acuerdo con la espectroscopia de IR (espectro 11) se registraron las absorciones correspondientes al carbonilo del grupo acetoxi en 1731.81 cm⁻¹ y a la cetona en C-20 a 1697.96 cm⁻¹. Otras bandas detectadas a 1244.98 y 1031.98 cm⁻¹ correspondientes al alargamiento C-O característico del grupo éster confirman la presencia del grupo acetoxi en C-3. La ausencia de la absorción en 3348 cm⁻¹ (-OH) también corrobora la acetilación efectuada.

En RMN-¹H (espectro 12), a diferencia del compuesto **2**, se observó una señal simple a 2.00 ppm que integró para 6 protones, la cual fue asignada al metilo del grupo acetoxi y al metilo en C-21 adyacente a la cetona. El protón H-3 se ubicó a 4.56 ppm desplazado a campo más bajo con respecto al compuesto anterior (**2**) ya que se trata de la base de un éster. Otras señales que se conservan en el espectro son las correspondientes a H-16 en 3.67 ppm, H-5 en 5.31 ppm, H-18 y H-19 en 1.02 y 1.03 ppm, respectivamente.

En cuanto a la RMN-¹³C (espectro 13 y 14) en la zona de carbonilos apareció una señal más a 170.12 ppm correspondiente al carbonilo del grupo acetoxi; mediante la modalidad DEPT en la región de metilos se observaron 4 señales asignadas a C-18 (14.92 ppm), C-19 (19.00 ppm), C-21 (21.16 ppm) y una más atribuida al metilo del grupo acetoxi en 25.70 ppm.

Por espectrometría de masas (espectro 15) se pudo confirmar el peso molecular del compuesto **3**, al apreciarse un ión molecular a 372 m/z. A partir de esta señal, se registraron los fragmentos ubicados a 312 (pico base) y 269 m/z los cuales se generaron por la pérdida de [CH₃COOH]⁺ y [CH₃CO]⁺, respectivamente.

Para la síntesis del compuesto **3β-Acetoxi-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено 4** se planteó la protección de la cetona (C-20) mediante la reacción con un alcohol para formar el correspondiente cetal cíclico.^{75,76} Lo anterior resulta esencial ya que el reactivo de Grignard utilizado en la siguiente reacción es capaz de atacar al grupo carbonilo, un centro electrofílico.

Para la protección del grupo carbonilo fue necesario además del etilenglicol y el catalizador (ácido *para*-toluensulfónico), la presencia de un agente deshidratante como el ortoformiato de trimetilo. Este último resultó imprescindible ya que al producirse agua en la reacción y por la reversibilidad de la misma, la incorporación de este reactivo favorece que el equilibrio de la reacción se desplace hacia la formación del producto (principio de Le Chatelier) y por lo tanto aumente el rendimiento.

En cuanto a la elucidación estructural del derivado etilendioxi, su espectro de IR (espectro 16), mostró una sola banda intensa a 1718.99 cm⁻¹ perteneciente a la vibración C=O del grupo acetoxi en C-3; la banda para el carbonilo de la cetona en C-20 no fue observada. También fue posible apreciar una banda en 950.16 cm⁻¹ característica para la vibración C-O-C del grupo etilendioxi en C-20.

La RMN-¹H (espectro 17) corroboró la estructura propuesta para el compuesto **4** al registrarse un multiplete centrado en 3.93 ppm equivalente a cuatro hidrógenos el cual es atribuido a los 4 protones de los metilenos del grupo etilendioxi en C-20; nuevamente se distinguieron cuatro señales simples asignados a H-18 (0.99 ppm), H-19 (1.03 ppm), H-21 (1.43 ppm) y al metilo del grupo acetoxi (2.02 ppm). Los desplazamientos químicos para H-16, H-3 y H-5 se mantuvieron en el espectro y no mostraron cambios sustanciales con respecto al compuesto anterior (**3**).

Mediante espectroscopia de RMN-¹³C (espectro 18 y 19) se logró visualizar dos señales más originadas por los dos metilenos del grupo etilendioxi en C-20 (64.40 y 64.88 ppm), otra señal a campo más alto asignada al carbono cuaternario C-20 unido a dos átomos de oxígeno a 108.95 ppm.

En la zona de carbonilos sólo se observó el desplazamiento químico correspondiente al carbonilo del grupo acetoxi en C-3.

En el análisis espectrométrico (espectro 20), el ión molecular ubicado a 416 m/z constató el peso molecular del compuesto **4**. El pico base se detectó a 87 m/z y correspondió al catión

generado por la ruptura de la entidad etilendioxi $[\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{O})-\text{O}]^+$. Otros fragmentos registrados a partir del ión molecular aparecieron en 401 y 356 m/z originados por la pérdida de $[\text{CH}_3]^+$ y de $[\text{CH}_3\text{COOH}]^+$, respectivamente.

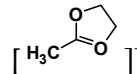
Una vez protegida la cetona en C-20, se realizó la apertura del anillo oxirano con cloruro de metil magnesio (CH_3MgCl) y yoduro de cobre como catalizador.^{77, 78} Con esta reacción se logró introducir un átomo de carbono más (metilo en C-16) y al mismo tiempo generar un grupo hidroxilo (-OH) indispensable para realizar la posterior reacción de esterificación. Debido a que esta reacción transcurre mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$) la configuración del metilo en C-16 es de tipo *beta* mientras que la orientación del alcohol generado en C-17 es de tipo *alfa*. Para la preparación de este compuesto se logró disminuir el tiempo de reacción descrito en la literatura⁷⁸ de un reflujo de 5 días a tan sólo un reflujo suave de 24 h sin cambios significativos sobre el rendimiento.

La caracterización espectroscópica por IR del compuesto **3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-20-etilendioxi-5-pregneno 5** (espectro 21) mostró una banda ancha e intensa en 3449.58 cm^{-1} correspondiente a la vibración del grupo -OH en C-3 y C-17, asumiendo con ello la apertura del epóxido y la hidrólisis del grupo acetoxi en C-3. Además, se observó otra banda débil en 1638.82 cm^{-1} asignada a la vibración C=C en C-5-C-6.

En lo que concierne a la RMN-¹H (espectro 22) se observó, además de las tres señales simples para los protones H-18 (0.89 ppm), H-19 (1.00 ppm) y H-21 (1.39 ppm), un doblete a 1.17 ppm asignado al metilo en C-16 β que indicó un acoplamiento con el protón H-16 α de ese mismo carbono a través de una $J=5.4$ Hz. El multiplete registrado a 3.52 ppm que integró para 1 hidrógeno fue asignado al protón *alfa* en C-3. Otra señal múltiple que permaneció en el espectro fue en 3.98 ppm asignado a los cuatro protones de los dos metilenos pertenecientes al grupo etilendioxi en C-20. Finalmente, se observó una señal más en 5.34 ppm perteneciente al protón vinílico H-6 acoplado a los protones de C-7.

Por su parte, la RMN-¹³C (espectro 23 y 24) también confirmó la estructura química propuesta para el derivado **5**, ya que además de registrarse los desplazamientos químicos para C-18 (19.36 ppm), C-19 (21.29 ppm) y C-21 (21.84 ppm), aparecen varios desplazamientos más, uno a 15.04 ppm asignado al metilo en C-16 β , otro a 71.70 ppm correspondiente al C-3 unido al grupo -OH y uno más en 87.12 ppm perteneciente a C-17 (carbono cuaternario) base del alcohol. Los desplazamientos ubicados a 63.31 y 63.45 ppm fueron asignados a los metilenos del grupo etilendioxi, en tanto que las señales de C-5 y C-6 aparecieron en 140.58 y 121.71 ppm, respectivamente.

El análisis por espectrometría de masas (espectro 25) permitió observar el ión molecular a 390 m/z que concuerda con el peso molecular del derivado **5**.

El pico base para este compuesto (87 m/z) se obtuvo por la ruptura del grupo etilendioxi  de manera similar al compuesto 4.

Una vez que se introdujo el metilo en C-16 β y formado el alcohol en C-17 α , se procedió a regenerar al grupo carbonilo en C-20 mediante una reacción de hidrólisis catalizada en medio ácido.⁷⁸ La desprotección del carbonilo se llevó a cabo a temperatura ambiente cuidando el tiempo de reacción y la concentración de ácido empleado con la finalidad de evitar alguna posible reacción de eliminación del alcohol cuaternario en C-17 α lo cual repercutiría en el rendimiento de la reacción. No obstante, el producto **3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona 6** fue obtenido con un 96.3 % de rendimiento y pureza bastante aceptable para someterlo a la siguiente reacción de oxidación.

La transformación química de la molécula se manifestó con una absorción en el IR (espectro 26) a 1689.36 cm⁻¹ para el carbonilo regenerado en C-20, adicionalmente se observó otra banda en 3341.43 cm⁻¹ originada por el alargamiento -OH en C-3 y C-17.

El espectro de RMN-¹H (espectro 27) confirmó la hidrólisis del cetal, ya que desaparece la señal múltiple en 3.98 ppm correspondiente a los dos metilenos del grupo etilendioxi; se mantuvieron las señales correspondientes a H-18 (0.737 ppm), H-19 (0.937 ppm), metilo en C-16 β (1.02 ppm) y H-21 (2.10 ppm). Otros desplazamientos químicos que se apreciaron fueron a 3.27 ppm que integró para 1 hidrógeno asignado al protón H-3 y en 5.31 ppm un doblete asignado al protón vinílico H-6.

La RMN-¹³C (espectro 28 y 29) también concuerda con la estructura química esperada para el derivado 6 ya que en la zona de carbonilos se apreció la señal para el carbonilo regenerado de la cetona en 210.92 ppm. Los desplazamientos ubicados a 15.02, 19.11, 19.97 y 29.53 ppm se asignaron al metilo en C-16 β , C-18, C-19 y C-21, respectivamente. En tanto que las señales para los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecieron a 141.19 y 120.33 ppm. La señal de C-3 unido al grupo -OH se registró en 69.93 ppm, mientras que la señal para C-17 (carbono cuaternario) se apreció en 88.54 ppm.

En el análisis espectrométrico (espectro 30) se observó un ión molecular a 346 m/z que confirmó el peso molecular del esteroide. A partir de esta señal se presentó la ruptura de la entidad [CH₃CO]⁺ originando el pico en 303 m/z; éste último fragmento experimentó la deshidratación del alcohol (pérdida de una molécula de H₂O) para generar el pico base del espectro ubicado en 285 m/z.

Para la síntesis del compuesto **3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 7** se contempló la formación del sistema conjugado 4,6-dien-3-ona (grupo farmacofórico); esto se logró mediante una reacción poco convencional que emplea bromo como agente oxidante y una base a través de un mecanismo de bromación-deshidrobromación.^{79,80} La cantidad de bromo adicionada, así como la temperatura a la cual se efectuó la reacción, fueron dos parámetros que fueron monitoreados durante el transcurso de la misma. De esta manera se logró reducir la cantidad de bromo reportada en la literatura⁸⁰, evitando así la bromación del metilo (C-21) adyacente a la cetona y aumentando el rendimiento de la reacción hasta en un 75.6 %.

Por espectroscopia de UV (espectro 31) se registró un máximo de absorción a 284.64 nm con valor de $\epsilon = 58208$ adjudicado a la formación del sistema conjugado (cetona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada) en la molécula.

Por espectrofotometría de IR (espectro 32) se pudo asumir la presencia del grupo carbonilo conjugado en C-3 mediante una banda en 1664.96 cm^{-1} , asimismo, la vibración $-\text{OH}$ en 3411.20 cm^{-1} indicó la presencia del alcohol en C-17 mientras que la banda de intensidad moderada en 1617.51 cm^{-1} fue asignada al dieno conjugado C-4-C-6.

La RMN- ^1H (espectro 33) corroboró la presencia de la entidad 4,6-dien-3-ona ya que en la zona de protones vinílicos aparecieron las señales para H-7 a 5.68 ppm y a 6.13 ppm para H-4 y H-6. La multiplicidad de estas señales (singuletes) indica que no existe acoplamiento entre estos protones. Se distinguieron las señales simples que integraron para tres hidrógenos cada uno asignadas al metilo en C-16 β (1.21 ppm), H-18 (0.99 ppm), H-19 (1.12 ppm) y H-21 (2.27 ppm).

En cuanto a la RMN- ^{13}C (espectro 34 y 35) se registraron las señales para los carbonos vinílicos C-4 a 123.72 ppm, C-5 a 163.63 ppm, C-6 a 128.06 ppm y C-7 a 140.82 ppm. La señal del carbonilo conjugado se registró a 199.64 ppm mientras que la señal para la cetona en C-20 se ubicó a 210.65 ppm.

Mediante la técnica de espectrometría de masas (espectro 36) se corroboró la estructura química del compuesto **7** al observarse el ión molecular a 342 m/z, el cual también representa el pico base del espectro. Otro fragmento característico se registró en 324 m/z producido por la pérdida de agua (deshidratación del alcohol en C-17 α).

Con la finalidad de aumentar el volumen estérico en la posición 17 del esteroide así como conferir distintas características conformacionales a la molécula, el compuesto **7** fue esterificado con distintos ácidos empleando como catalizador ácido *para*-toluensulfónico en presencia de anhídrido trifluoroacético.⁸¹ El mecanismo propuesto para esta reacción de esterificación es la formación de un anhídrido mixto entre el anhídrido trifluoroacético y el ácido correspondiente, el cual posteriormente es atacado por el oxígeno del alcohol esteroide (C-17 α) originando así los nuevos ésteres **8a-8d** (Figura 12).

Las consideraciones más relevantes derivadas del estudio de la información proporcionada por los espectros de IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y EMIE (espectrometría de masas por impacto electrónico) se presentan a continuación.

Para el derivado **17 α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 8a** se presentaron 2 máximos de absorción (espectro 37) uno a 233.60 nm ($\epsilon = 60689$) y otro a 277.01 nm ($\epsilon = 15706$).

En el espectro de IR (espectro 38) aparecieron las bandas correspondientes al grupo carbonilo del éster en 1732.37 cm^{-1} y en 1618.28 cm^{-1} la señal característica para el dieno conjugado en C-4-C-6 desapareciendo la señal en 3411.20 cm^{-1} (alargamiento $-\text{OH}$) confirmando con ello la presencia del grupo éster en la molécula. Otras bandas observadas fueron a 1714.22 cm^{-1} asignada a la cetona en C-20, a 873.34 y 800 cm^{-1} características de un aromático *para*-disustituido y a 1264 cm^{-1} la vibración C-F.

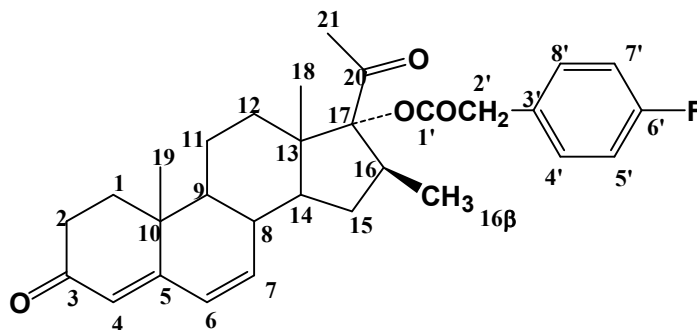


Figura 13. Estructura química enumerada del derivado 8a.

Para el análisis de la Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C) se consideró la numeración presentada en la **Figura 13**.

La RMN- ^1H (espectro 39) confirmó la presencia del éster al registrar un singulete a 3.64 ppm que integró para dos hidrógenos asignado a los protones H-2', asimismo en la zona de protones aromáticos se registraron dos señales una a 7.01 ppm asignado a los protones H-5' y H-7' y otra a campo más bajo en 7.25 ppm asignada a los protones H-4' y H-8'. El desplazamiento químico de estos protones aromáticos se vió influenciado por el átomo de fluor; siendo los protones H-4' y H-8' electrónicamente más desprotegidos. Otras señales que se mostraron fueron las correspondientes a los protones vinílicos H-4 (singulete) en 5.72 ppm, H-6 en 6.06 ppm (doblete) que muestra acoplamiento con el protón H-7 y en 6.14 ppm H-7 (doble de dobles) que se acopla con el protón H-6 y H-8. Nuevamente se observaron los desplazamientos químicos para los protones H-18 (0.75 ppm), H-19 (1.11 ppm), H-21 (1.83 ppm) y la señal dobleteada para el metilo en C-16 β (1.36 ppm).

Con respecto a la RMN- ^{13}C (espectro 40 y 41) se apreciaron nuevas señales a 41.15 ppm para el C-2', a 171.10 ppm perteneciente al carbonilo del éster (C-1') y en las zona de carbonos aromáticos las señales para C-5' y C-7' a 115.48 y 115.76 ppm; C-4' y C-8' a 138.88 y 130.99 ppm; C-3' (carbono ipso) a 128.94 ppm y para C-6' (carbono ipso, C-F) a 163.10 ppm. Los desplazamientos para los carbonos vinílicos C-4, C-5, C-6 y C-7 se registraron en 123.98, 160.51, 128.27 y 140.05 ppm, respectivamente. La señal correspondiente al carbonilo conjugado en C-3 apareció en 199.40 ppm y la señal de la cetona en C-20 se observó a 203.87 ppm. Finalmente, las señales para C-18, C-19, C-21 y metilo en C-16 β se apreciaron a 16.31, 19.70, 28.13 y 14.87 ppm, respectivamente.

Para este derivado, la espectrometría de masas por impacto electrónico (espectro 42) registró un ión molecular a 478 m/z lo que corrobora la estructura química propuesta. A partir del ión molecular y por la pérdida de la metilcetona $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$ se originó el pico ubicado en 435 m/z. Otro patrón de fragmentación característico para dicho éster es la ruptura de la entidad $[\text{COCH}_2\text{PhF}]^+$ para generar la señal detectada en 341 m/z, y a partir de éste último fragmento ocurre la pérdida de una molécula de agua (18 unidades) y forma el pico ubicado a 323 m/z. Otra señal abundante es la que se ubicó a 281 m/z formada por la ruptura de $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$ y $[\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{PhF}]^+$ a partir del ión molecular. Finalmente, el pico base correspondió a la señal en 109 m/z debido al catión bencílico fluorado $[\text{CH}_2\text{PhF}]^+$.

Para el derivado **17 α -(4-Clorofenil) acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 8b** la conjugación 4,6-dien-3-ona de la molécula se verificó por espectroscopia de UV (espectro 43) registrándose un máximo de absorción a 284.47 nm ($\epsilon=52090$) para la entidad 4,6-dien-3-ona y otro a 219.85 nm ($\epsilon=53908$) para el anillo aromático.

Mediante espectroscopia de IR (espectro 44) se pudieron observar las absorciones correspondientes al carbonilo del éster en 1727.25 cm^{-1} , al carbonilo conjugado en C-3 y carbonilo de la cetona en C-20 a 1660.88 cm^{-1} . Con la banda de alargamiento C-O en 1223.39 cm^{-1} se confirmó la presencia del grupo éster en C-17 α . La banda de intensidad media en 1615.56 cm^{-1} denotó las vibraciones de alargamiento C=C del dieno conjugado y del anillo aromático. Las bandas situadas a 807.44 y 759.15 cm^{-1} indicaron el patrón *para*-disustituido del anillo aromático, mientras que la absorción registrada en 1088.6 cm^{-1} fue atribuida a la vibración C-Cl del anillo aromático.

Para el análisis por Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C) se consideró la numeración presentada en la **Figura 14**.

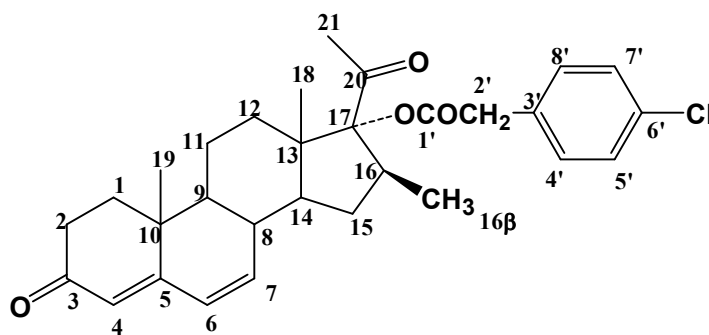


Figura 14. Estructura química enumerada del derivado **8b**.

En RMN- ^1H (espectro 45) se corroboró la introducción del grupo éster en la molécula al distinguirse una señal simple a 3.65 ppm asignada a los protones H-2' y en la zona de protones aromáticos se apreciaron dos conjuntos de señales múltiples asignadas a H-4' y H-8' (7.20 ppm) y a H-5' y H-7' (7.78 ppm). Cabe hacer notar que estas últimas señales se vieron menos influenciadas que la señales correspondientes para los mismos protones en el análogo **8a**, debido a la diferencia de tamaño y electronegatividad del halógeno en C-6' (F vs. Cl). Asimismo, se siguen observando las señales para los protones vinílicos H-4 (5.72 ppm), H-6 (doblete, 6.01 ppm) acoplado al protón H-7 ($J=8\text{ Hz}$) y H-7 (doble de dobles, 6.16 ppm) acoplado tanto al protón vinílico H-6 como al protón metínico H-8. De igual manera se aprecian los tres singuletes correspondientes a H-18 (0.75 ppm), H-19 (1.11 ppm) y H-21 (2.17 ppm) así como el doblete atribuido al metilo en C-16 β (1.35 ppm).

Con lo referente a la RMN- ^{13}C y DEPT (espectro 46 y 47) también confirmó la estructura propuesta para el derivado **8b** al mostrar las señales para C-2' a 41.32 ppm, las señales de los carbonos aromáticos C-5' y C-7' a 128.87 ppm; C-4' y C-8' a 130.71 ppm; C-3' (carbono ipso) a 131.65 ppm y para C-6' (carbono ipso, C-Cl) a 133.41 ppm.

Además de las señales para el carbonilo conjugado en C-3 (199.39 ppm) y la cetona en C-20 (203.81 ppm), apareció una nueva señal correspondiente al carbonilo del éster a 170.77 ppm. Otras señales asignadas fueron a 123.98, 128.28, 139.99 y 163.10 ppm para los carbonos vinílicos C-4, C-6, C-7 y C-5, respectivamente. Por último, las señales de los metilos angulares C-18, C-19, C-21 así como del metilo en C-16 β no mostraron cambio sustancial con respecto al derivado anterior (**8a**).

En lo que concierne a la espectrometría de masas, el derivado **8b** (espectro 48) mostró un ión molecular a 494 m/z concordante con el peso molecular del compuesto; el pico $[M + 2]^+$ a 496 m/z es indicativo de la presencia de un átomo de cloro en la molécula. A partir del ión molecular, la ruptura de la entidad $[\text{COCH}_2\text{PhCl}]^+$ generó la señal ubicada a 341 m/z, y éste último fragmento una vez que experimentó la pérdida de una molécula de agua (18 unidades) formó el pico en 323 m/z. Adicionalmente, se registraron dos señales más provenientes del ión molecular, una de ellas apareció a 451 m/z originada por la ruptura alfa de la metilcetona $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, mientras que la otra señal situada a 281 correspondió a la ruptura de $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$ y $[\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{PhCl}]^+$. Finalmente, otros fragmentos observados son los que se ubicaron a 125 y 127 m/z correspondientes a los cationes bencílicos clorados $[\text{CH}_2\text{Ph}^{35}\text{Cl}]^+$ y $[\text{CH}_2\text{Ph}^{37}\text{Cl}]^+$, éste último originado por la contribución isotópica del $^{37}\text{Cloro}$ (32%).

Para el análogo **17 α -(4-Bromofenil) acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 8c** el sistema conjugado 4,6-dien-3-ona del núcleo esteroidal se manifestó con una absorción en el UV (espectro 49) a 280.96 nm ($\epsilon=51337$) mientras que el cromóforo perteneciente al anillo aromático tuvo un máximo de absorción a 221.18 nm ($\epsilon=29712$).

Su espectro de IR (espectro 50) presentó una banda intensa en 1726.92 cm^{-1} asignada al carbonilo del éster en C-17 α . Con la banda de alargamiento C-O en 122.37 cm^{-1} se confirmó la presencia del grupo funcional éster en la estructura química. Otras bandas características fueron las que se situaron a 1616.24 cm^{-1} atribuido al C=O conjugado en C-3 y a menor frecuencia la banda para la cetona en C-20 en 1659.63 cm^{-1} . La absorción detectada a 1583.24 cm^{-1} denotó la presencia de vibraciones de alargamiento C=C del dieno conjugado C-4-C-6; las bandas en 875.84 y 803.49 cm^{-1} indicaron el patrón de *para*-disustitución en el núcleo aromático.

Para el análisis por Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C) se consideró la numeración presentada en la **Figura 15**.

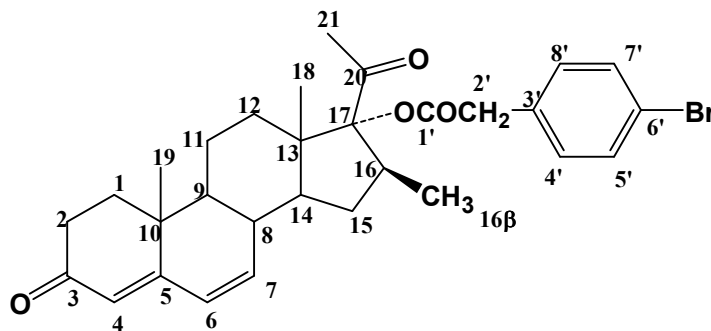


Figura 15. Estructura química enumerada para el derivado **8c**.

La estructura química propuesta para el derivado **8c** (Figura 15) concuerda con su espectro de resonancia magnética protónica (espectro 51) al mostrar un singulete a 3.71 ppm que integró para dos hidrógenos asignada a H-2'; también aparecieron las señales pertenecientes a los protones aromáticos a 7.18 ppm la señal doble para H-4'-H-8' y a 7.49 ppm la señal doble para H-5'-H-7'. Nuevamente los desplazamientos químicos de los protones aromáticos se ven influenciados por el tamaño y electronegatividad del halógeno en C-6' (carbono ipso), en este caso los protones H-5' y H-7' que se encuentran adyacentes al átomo de bromo están electrónicamente más desprotegidos en comparación con los protones H-4' y H-8'. Adicionalmente, se distinguieron las señales para los protones vinílicos H-4 (singulete) a 5.75 ppm; H-6 (doblete) a 6.10 ppm y para H-7 (doble de dobles) a 6.19 ppm. Para este último desplazamiento químico, la constante $J=8$ Hz indica un acoplamiento con el protón vecino H-6 mientras que la constante $J=1$ Hz indica un acoplamiento más débil con el protón metínico H-8.

La esterificación del alcohol en C-17 α también fue verificado por RMN-¹³C (espectro 52 y 53) al registrarse las señales a 41.41 ppm (C-2'), 131.05 ppm (C-5' y C-7'), 131.84 ppm (C-4' y C-8'), 132.17 ppm (C-3', carbono ipso), 121.49 ppm (C-6' carbono ipso, C-Br) y 170.67 ppm (carbonilo del éster) confirmando la estructura esperada. En la zona de carbonos vinílicos se mantiene las señales para los tres metinos C-4 a 124.01 ppm, C-6 a 128.31 ppm y C-7 a 139.99 ppm. En la zona de carbonos cuaternarios se conservan las señales para el carbonilo conjugado en C-3 a 199.43 ppm y para la cetona en C-20 a 203.84 ppm. Finalmente, las señales para los metilos C-18, C-19, C-21 y el metilo en C-16 β se mantienen prácticamente invariables con respecto al derivado **8b**.

El análisis por espectrometría de masas (espectro 54) mostró un ión molecular a 538 m/z que corrobora el peso molecular de la molécula esteroideal así como otro pico de igual intensidad a 540 m/z $[M+2]^+$ que representa la contribución isotópica del ⁸¹Br (98.9 %), confirmando con ello la presencia de éste halógeno en la molécula. El pico base del espectro se ubicó a 281 m/z originado por la ruptura de la entidad $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$ y $[\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{PhBr}]^+$ a partir del ión molecular. Otros fragmentos observados fueron los correspondientes a los cationes bencílicos bromados $[\text{CH}_2\text{Ph}^{79}\text{Br}]^+$ y $[\text{CH}_2\text{Ph}^{81}\text{Br}]^+$ en 169 m/z y 171 m/z, respectivamente.

En el caso del derivado **17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 8d** su análisis en la región UV (espectro 55) detectó un máximo de absorción a 283.36 nm ($\epsilon=52682$).

Su espectro de IR (espectro 56) mostró las bandas características para el grupo funcional éster a 1724.11 cm^{-1} (C=O en C-17 α) y a 1226.10 cm^{-1} (alargamiento C-O del éster) con lo que se asumió la presencia de dicho grupo. Otras bandas asignables fueron las que se situaron a 1583.78 cm^{-1} para el alargamiento C=C del dieno conjugado y de los dos anillos aromáticos del éster; a 1616.73 cm^{-1} para el carbonilo conjugado en C-3; a 1660.32 cm^{-1} para la cetona en C-20 y finalmente a 752.14 y 700.53 cm^{-1} que indicaron el patrón de monosustitución del núcleo aromático.

Para el análisis por Resonancia Magnética Nuclear (¹H y ¹³C) se consideró la numeración presentada en la Figura 16.

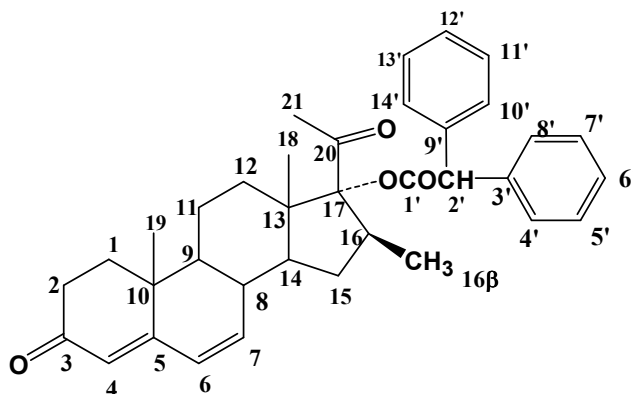


Figura 16. Estructura química enumerada para el derivado 8d.

En la RMN-¹H (espectro 57) el cuadruplete centrado en 4.11 ppm que integró para un hidrógeno es debido al protón H-2'; a diferencia de los tres derivados anteriores (**8a**, **8b** y **8c**), este protón no sólo está desplazado a campo más bajo por la influencia de los dos grupos fenilo, sino que también muestra acoplamiento con los protones aromáticos. El conjunto de señales situadas en 7.2-7.4 ppm que integraron para 10 hidrógenos fueron asignadas a los protones aromáticos del éster difenílico. Los protones vinílicos aparecen a 5.71 ppm para H-4 (singulete), a 6.07 ppm para H-6 el cual se conserva como doblete y a 6.13 ppm para H-7 cuya multiplicidad como doble de dobles indica el acoplamiento con H-6 ($J=5.6$ Hz) y con H-8 ($J=1.2$ Hz). Por último, las señales para los protones H-18 y H-19 se ubicaron a 0.73 y 1.09 ppm en tanto que las señales de H-21 y el metilo en C-16 β se apreciaron a 1.81 y 1.37 ppm.

De acuerdo con la RMN-¹³C y el DEPT (espectro 58 y 59) en la zona de metinos (-CH-) se observaron nuevas señales que se adjudicaron a C-2' en 57.32 ppm, C-6' y C-12' en 127.51 ppm y C-4', C-5', C-7', C-8', C-10', C-11', C-13' y C-14' en 127.58 ppm. El desplazamiento químico para C-3' y C-9' (carbonos tipo ipso) se ubicó a 137.68 ppm. Las señales para los carbonos vinílicos aparecieron a 123.88 ppm (C-4), 128.15 ppm (C-6), 140.22 ppm (C-7) y 163.25 ppm (C-5), en tanto que a campo más bajo se registraron las señales de los carbonos cuaternarios a 176.92 ppm para el carbonilo del éster (C-1'), a 199.50 ppm para el carbonilo conjugado en C-3 y a 204.09 ppm para el carbonilo de la cetona en C-20. Las señales para los metilos C-18, C-19, C-21 y el metilo del éster permanecen prácticamente constantes con respecto al derivado anterior (**8c**).

El análisis espectrométrico (espectro 60) mostró un ión molecular a 536 m/z que confirma la estructura química propuesta para el derivado **8d**. El pico base se ubicó a 167 m/z y correspondió al catión difenílico $[\text{CH}(\text{Ph})_2]^+$. Otros fragmentos característicos aparecieron a 341 m/z, por la ruptura de $[\text{COCH}(\text{Ph})_2]^+$, a 323 m/z por la pérdida de $[\text{COCH}(\text{Ph})_2]^+$ y agua, y a 281 m/z atribuido a la escisión de la entidad $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$ y $[\text{HO}_2\text{CCH}(\text{Ph})_2]^+$, provenientes todos ellos del ión molecular.

6.2 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

6.2.1 Ensayo *in vitro* con la enzima 5 α -reductasa

En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos para la inhibición de la enzima 5 α -reductasa por los nuevos compuestos **8a-8d** (**Figura 12**).

Tabla 10. Ensayo *in vitro* con la enzima 5 α -reductasa

Compuesto	IC ₅₀
finasterida	8.5 nM
8a	NI
8b	NI
8c	NI
8d	3.16 μ M

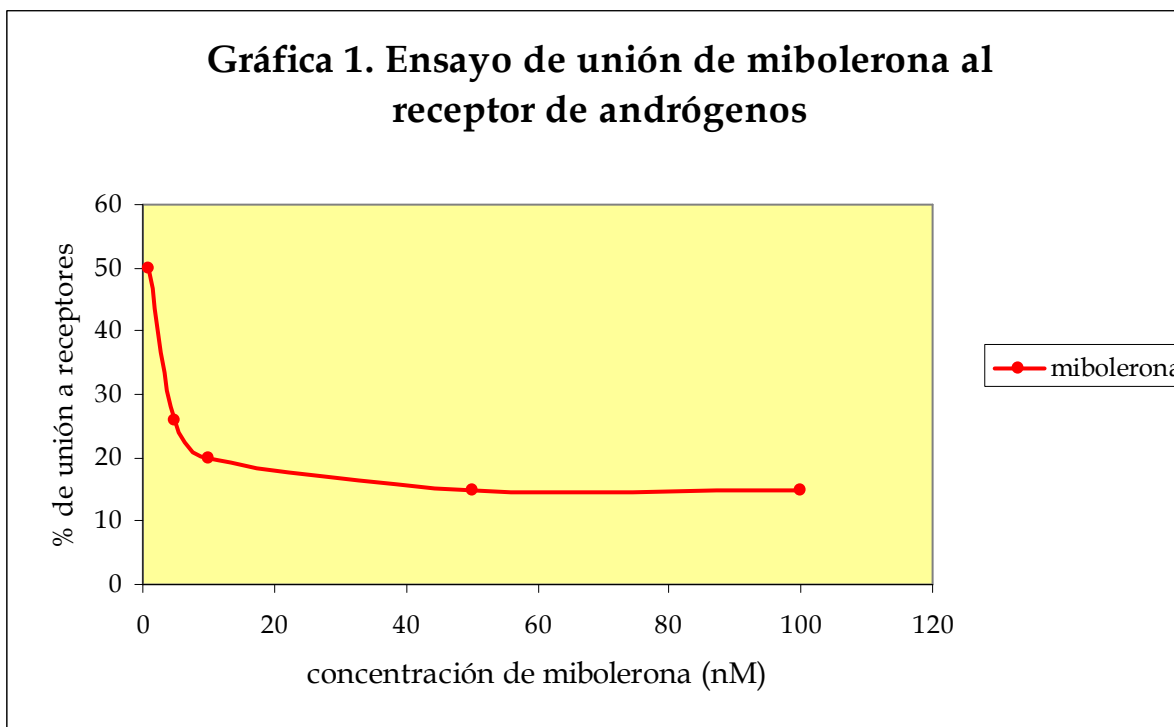
NI= no presentó inhibición

Los resultados del ensayo *in vitro* indican que el derivado **17 α -[(Difenil) acetoiloxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 8d** inhibe moderadamente a la enzima 5 α -reductasa, sin embargo el valor de IC₅₀ obtenido (concentración del esteroide a la cual se inhibe el 50 % de la actividad enzimática) es relativamente alto en comparación con el valor obtenido para la finasterida (**Figura 3**); los compuestos **8a**, **8b** y **8c** no presentaron actividad alguna sobre dicha enzima a las concentraciones probadas.

6.2.2 Ensayo de unión a receptores androgénicos

6.2.2.1 Curva de saturación de los sitios del receptor

Los resultados para la unión máxima de mibolerona [H^3] al receptor de andrógenos se muestran en la **Gráfica 1**. Para esta ensayo se mantuvo constante la concentración de mibolerona [H^3] y se aumentó gradualmente la concentración de mibolerona (no radiactiva) cuantificándose sólo la radiactividad generada por la unión del complejo mibolerona [H^3]-receptor androgénico.



El comportamiento observado en la **Gráfica 1** indica que conforme aumenta la concentración de mibolerona no radiactiva, el porcentaje de mibolerona [H^3] unida al receptor disminuye; tal efecto es debido a que una menor concentración de esta última provoca que su probabilidad de ocupar los sitios del receptor sea menor. La constante de unión (K_d) calculada fue de 0.75 nM mientras que la cantidad de mibolerona [H^3] necesaria para unirse al total de receptores ($B_{máx}$) es de 7 fmol/mg de proteína.

6.2.2.2 Análisis por competencia con el receptor de andrógenos

Los resultados del análisis por competencia de los compuestos **8a-8d** (**Figura 12**) y la mibolerona por los sitios de unión al receptor androgénico se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Ensayo de unión a receptores

Compuesto	IC_{50}
mibolerona	1 nM
8a	NA
8b	NA
8c	NA
8d	NA

NA= no presentó afinidad por el receptor

El valor de IC_{50} (concentración del esteroide que ocupa el 50 % de los sitios del receptor de andrógenos) obtenido para la mibolerona indica que se une de manera efectiva al receptor, ya que necesita una concentración muy baja para ocupar el 50 % de los sitios del receptor presente en la fracción citosólica lo que confirma el carácter agonista de este compuesto.

Por otra parte de acuerdo con el ensayo efectuado, los compuestos **8a-8d** no mostraron un comportamiento similar al que se presenta en la **Gráfica 1**, es decir, el porcentaje de mibolerona [H^3] unida al receptor no disminuyó cuando se aumentó gradualmente la concentración del compuesto a probar. Esto implica que ninguno de los compuestos probados fue capaz de competir con la mibolerona por los sitios de unión al receptor, por lo que no presentaron la afinidad química necesaria para reemplazar a este agonista del receptor.

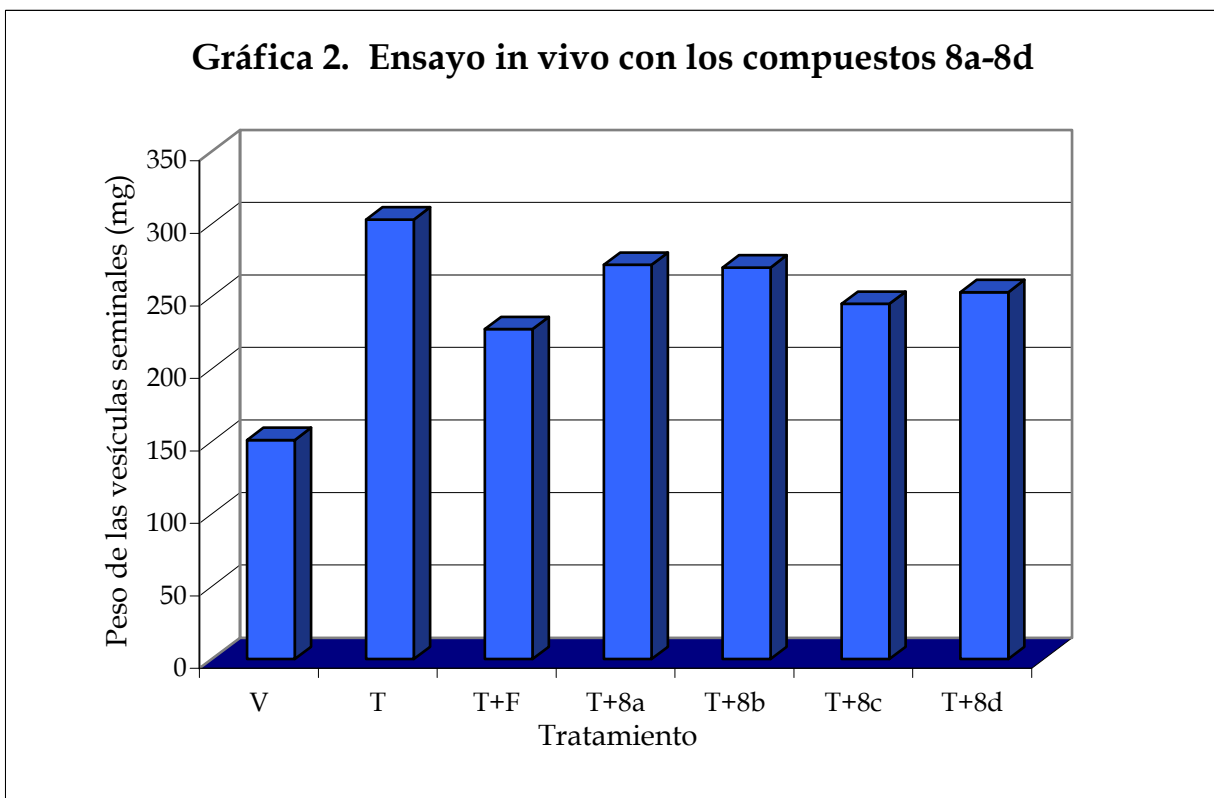
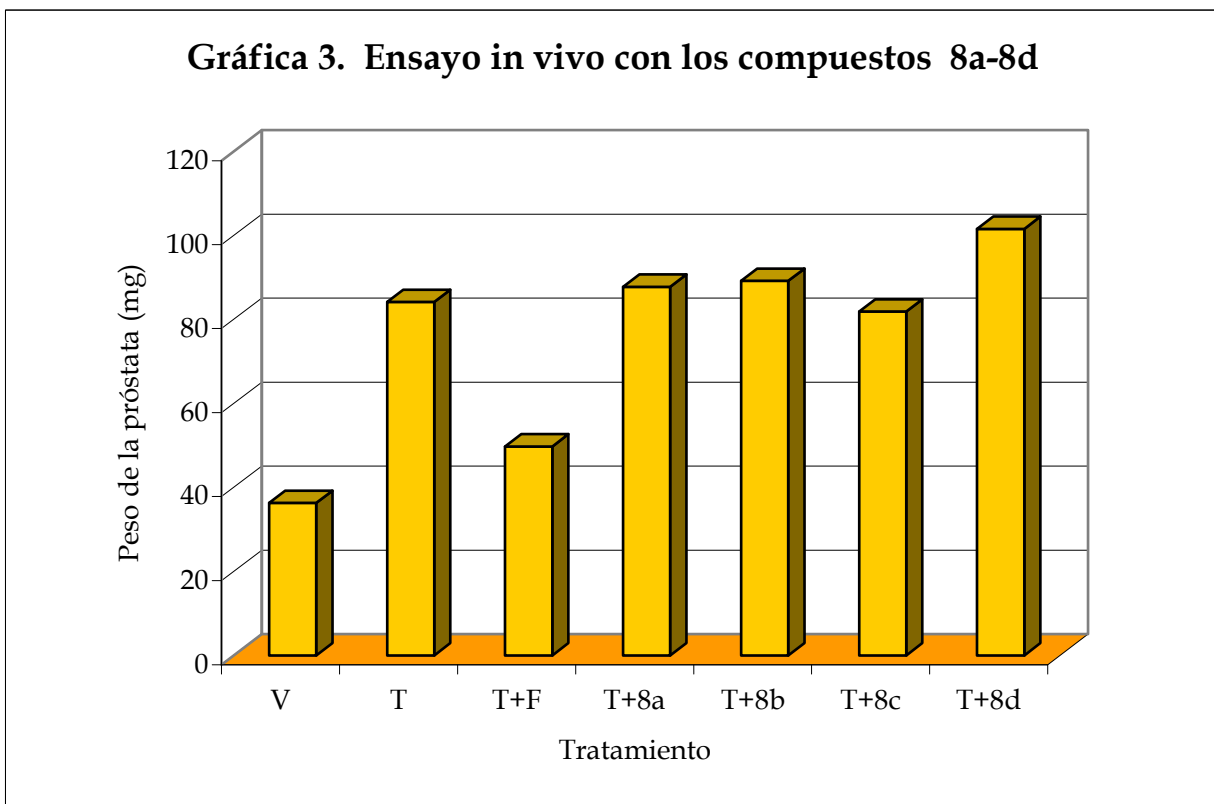
6.2.3 Ensayo *in vivo* con los compuestos 8a-8d

Los resultados del experimento *in vivo* con los derivados **8a-8d** se muestran en la **Tabla 12** y en las **Gráficas 2 y 3**.

De acuerdo con las **Gráficas 2 y 3** se puede observar que cuando se administró testosterona (T) de manera exógena a los animales castrados el peso de la próstata y vesículas seminales se reestableció, es decir, el peso de éstos aumentaron con respecto al peso del grupo tratado solamente con el vehículo (V) (aceite de sésamo); cuando se administró de manera conjunta testosterona + finasterida (T+F) (inhibidor selectivo de la 5α -reductasa tipo 2) el peso de la próstata disminuyó hasta la mitad aproximadamente; y cuando se administró conjuntamente testosterona + cada uno de los compuestos a probar (**8a-8d**) no se observaron cambios significativos en la disminución del peso de la próstata ni en el de las vesículas seminales.

Tabla 12. Ensayo *in vivo* con los compuestos **8a-8d**

Tratamiento	peso de las vesículas seminales (mg)	peso de la próstata (mg)
Vehículo (V)	151.1 ± 35.5	36.3 ± 9.6
Testosterona (T)	303.1 ± 41.9	84.2 ± 12.4
T + Finasterida	227.5 ± 52.0	49.8 ± 16.5
T + 8a	271.9 ± 22.5	87.8 ± 11.3
T + 8b	270.0 ± 39.4	89.2 ± 14.8
T + 8c	245.0 ± 70.0	81.9 ± 9.5
T + 8d	253.0 ± 47.6	101.6 ± 11.0

Gráfica 2. Ensayo in vivo con los compuestos 8a-8d**Gráfica 3. Ensayo in vivo con los compuestos 8a-8d**

De todas las pruebas biológicas realizadas resalta el hecho de que el compuesto **8d** haya presentado actividad inhibitoria *in vitro* pero sin ningún efecto positivo sobre el tamaño de la próstata y vesículas seminales en el ensayo *in vivo* por lo que este aspecto será discutido más adelante.

El mecanismo propuesto para la inactivación de la enzima 5 α -reductasa por el compuesto **8d** es mediante el ataque de algún grupo nucleofílico Nu⁻ de la enzima (-OH residuo de serina, SH residuo de cisteína, -NH₂ residuo de lisina) que pudiese estar en su sitio activo, al doble enlace conjugado del esteroide (C-4 ó C-6) en una adición tipo Michael para formar un aducto irreversible⁸² como se ilustra en la **Figura 17**.

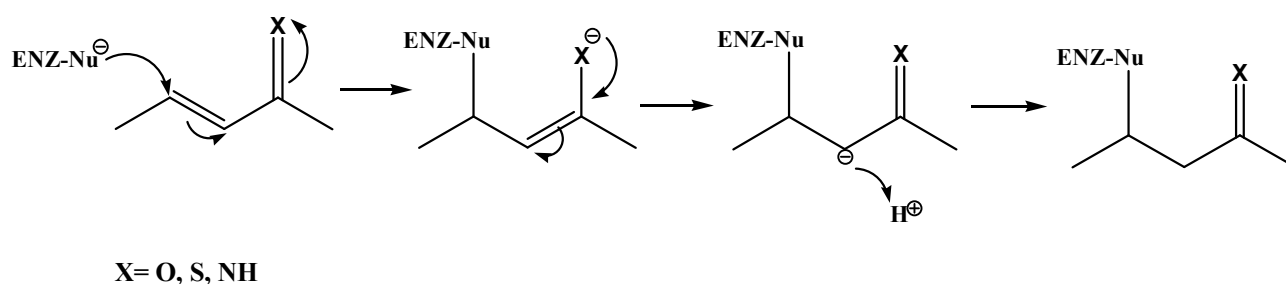


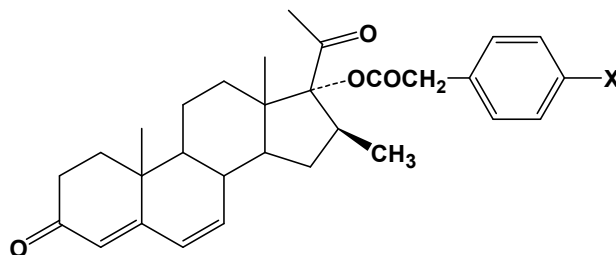
Figura 17. Mecanismo propuesto para la inhibición de la enzima 5 α -reductasa.

Considerando lo anterior y los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* e *in vivo* para la enzima 5 α -reductasa, es claro que además del grupo farmacofórico (4,6-dien-3-ona), el papel del sustituyente en C-17 es clave no sólo para potenciar el efecto inhibitorio de la molécula sino también para coadyuvar a que la molécula alcance su sitio de acción.

Para establecer el efecto los halógenos sobre la actividad inhibitoria de los derivados evaluados, se recurrió a los datos obtenidos para el análogo **M** (sustituido con hidrógeno) anteriormente sintetizado y cuyo valor de IC₅₀ se muestra en la **Tabla 13**.

De acuerdo a la **Tabla 13**, el reemplazo bioisotérico del átomo de hidrógeno por el átomo de flúor en el anillo aromático conlleva a la pérdida total de la actividad biológica, por lo que este cambio no cumplió con el cometido de optimización farmacodinámica. En este caso en particular y sólo para la actividad biológica evaluada el bioisosterismo entre el hidrógeno y el flúor no se presenta.

Por otra parte, independientemente de la inserción un sustituyente de voluminosidad pequeña (flúor), mediana (cloro) o mayor (bromo) en el anillo aromático, la actividad es totalmente nula sugiriendo que esta parte de la molécula es sensible a las variaciones en el tamaño del sustituyente y que repercuten de manera notable sobre el desempeño biológico.

Tabla 13. Influencia del átomo de halógeno sobre la inhibición de la enzima 5 α -reductasa (isoforma 2)

X	Compuesto	IC ₅₀ (nM)
H	M	1.2
F	8a	NI
Cl	8b	NI
Br	8c	NI

NI= no presentó inhibición

Tomando como referencia al análogo **M** (sustituido con hidrógeno) y considerando el carácter electroatractor de los halógenos reflejado en sus respectivos valores de σ (**Tabla 8**), posiblemente éste constituya otro parámetro que influya sobre el comportamiento biológico de los compuestos evaluados. De hecho, independientemente del átomo de halógeno en cuestión (F, Cl, Br) no se observó en ningún caso capacidad suficiente para inhibir el 50% de la actividad enzimática.

Con respecto a la actividad mostrada por el derivado **8d** en el ensayo *in vitro* para la enzima 5 α -reductasa, además del grupo farmacofórico (4,6-dien-3-ona) la actividad puede ser atribuida a la restricción de la conformación del éster difenilico en C-17 α . Posiblemente esta restricción de la rotación permite exclusivamente un cierto tipo de conformación necesaria para interactuar con la enzima en alguna cavidad hidrofóbica (pockets) ubicado en el sitio activo. Sin embargo, esta actividad mostrada *in vitro* no se ve reflejada en la disminución del tamaño de la próstata en el ensayo *in vivo*.

Bajo la premisa de que la eficacia en la actividad biológica depende en muchas ocasiones de una liberación eficiente del compuesto en su sitio de acción, dando lugar con esto a la respuesta terapéutica con un mínimo de efectos colaterales, las propiedades fisicoquímicas de la molécula aparecen como un factor preponderante que influye en el transporte de la misma, sobre todo para aquellos compuestos que son administrados en un lugar distante a su sitio de acción.^{83, 84}

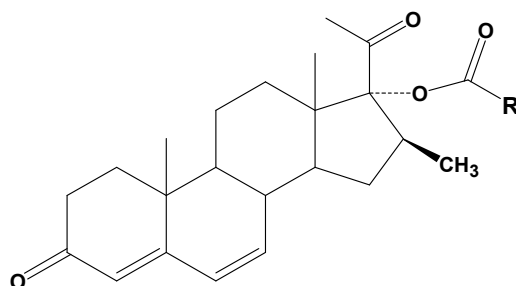
En este sentido, la diferencia de actividades encontrada para el derivado **8d**, puede ser atribuido a sus características fisicoquímicas (solubilidad acuosa, liposolubilidad) mismas que afectan algún parámetro farmacocinético y que finalmente repercute en la eficacia de la respuesta antiandrogénica. Si bien el sustituyente en C-17 debe presentar características conformacionales e hidrofóbicas adecuadas para interactuar con la enzima, también resulta importante el impacto que tenga este sustituyente sobre las propiedades fisicoquímicas de la molécula como tal.

En lo que concierne al ensayo de unión a receptores, los 4 compuestos evaluados (**8a-8d**) no mostraron afinidad por el receptor de andrógenos, no obstante la información obtenida será de utilidad para establecer a futuro una relación estructura-actividad biológica cuantitativa.

Dado que la capacidad inhibitoria de los compuestos se realizó frente a la isoforma 2 de la enzima 5 α -reductasa, sería interesante evaluar estos mismos derivados frente a la isoforma tipo 1, ya que como se mencionó anteriormente los requerimientos estructurales para inactivar ambas isoenzimas no son los mismos. Siendo así se podría generar nueva información para una adecuada actividad inhibitoria dual y de esta manera diseñar inhibidores duales que, en teoría podrían disminuir aún más los niveles de dihidrotestosterona consiguiendo así un tratamiento clínico más efectivo para la HPB y el cáncer de próstata ya que a menudo la cantidad residual de dihidrotestosterona en la próstata es debido a la presencia de la isoenzima tipo 1.

Desde otro punto de vista, la localización histológica de la isoforma tipo 1 (piel) puede ser utilizada estratégicamente para el diseño de inhibidores selectivos con la posibilidad de reducir sólo los niveles de dihidrotestosterona local sin afectar la actividad de la isoforma 2 (localizada principalmente en la próstata) constituyendo así otro acercamiento para el tratamiento de los desórdenes de la piel tales como acné, hirsutismo y alopecia androgenética.

A manera de resumen, las modificaciones estructurales realizadas al núcleo de la pregnadiona en este trabajo de investigación y su efecto sobre la actividad inhibitoria se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Modificaciones estructurales realizadas al núcleo de la pregnadiona

Sitio de cambio	Modificación estructural	Comentarios
R		El reemplazo de H por F, Cl o Br provoca la pérdida total de la actividad inhibitoria.
		La restricción conformacional del sustituyente coadyuva a la actividad inhibitoria.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este estudio permitieron comprobar la hipótesis de trabajo ya que existe una clara influencia de las propiedades electrónicas y estéricas del sustituyente en la posición C-17 α sobre la potencia inhibitoria.
- Además de las propiedades electrónicas y estéricas del sustituyente en la posición C-17 α , el efecto hidrofóbico es otro de los parámetros que afectan el desempeño biológico, ya que su impacto directo sobre las propiedades fisicoquímicas de la molécula permiten que ésta alcance su sitio de acción y genere la respuesta farmacológica deseada.
- Se sintetizaron y caracterizaron cuatro sustancias novedosas:
17 α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **8a**
17 α -[(4-Clorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **8b**
17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **8c**
17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **8d**
- El derivado 17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **8d** presentó actividad moderada como inhibidor frente a la enzima 5 α -reductasa tipo 2 (ensayo *in vitro*) con un valor de IC₅₀= 3.16 μ M.
- La restricción conformacional del sustituyente en C-17 α coadyuva a potenciar la actividad inhibitoria del compuesto **8d**.
- La relación estructura-actividad biológica indica que cambios en la voluminosidad del sustituyente en el anillo aromático (C-17 α) provocan la pérdida total de la actividad. El efecto electroatractor del sustituyente es otro parámetro que también podría contribuir a la ausencia de actividad biológica.
- Los compuestos **8a**, **8b**, **8c** y **8d** no presentaron actividad antagonista frente al receptor de andrógenos.
- Los compuestos preparados en este estudio, generan nueva información acerca de los requerimientos estructurales que son determinantes para que los derivados de la pregnadiona presenten propiedades antiandrogénicas. Lo anterior puede ser de utilidad para el desarrollo de agentes medicinales novedosos con posible uso en la terapéutica de trastornos andrógeno-dependientes.

8. REFERENCIAS

1. Programa de acción: cáncer de próstata. Subsecretaría de Prevención y Protección de la Salud. Secretaría de Salud 1ª edición, **2001**.
2. Tammela T. Endocrine treatment of prostate cancer. *Journal Steroid. Biochem. & Mol. Biol.* **2004**, 92, 287-295.
3. Uygur M. C., Gur E., Arik A. I., Altug U., Erol D. Erectile dysfunction following treatments of benign prostatic hyperplasia: a prospective study. *Andrología*, **1998**, 30, 5-10.
4. Djavan B., Milani S., Fong Y. K. Dutasteride: a novel dual inhibitor of 5-alpha-reductase for benign prostatic hyperplasia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2005**, 6, 311-317.
5. Handratta V.D., Vasaitis T. S., Njar V.C.O., Gediya L.K., Kataria R., Chopra P., Farquhar R., Newman D. and Brodie M.H. Novel C-17-Heteroaryl Steroidal CYP 17 Inhibitors / Antiandrogens: Synthesis, *in vitro* biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in the LAPC4 human prostate cancer xenograft model. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2972-2984.
6. Newsholme A.R., Leech A.R. *Bioquímica médica*. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana **1986**, Cap. 20.
7. Bratoeff E., Ramírez E., Murrillo E., Flores G. and Cabeza M. Steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **1999**, 6, 1107-1123.
8. Goodman G.A., Gilman L. S. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª edición, Vol 2, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, **1996**.
9. Taplin M. E., Ho S. M. The endocrinology of prostate cancer. *The Journal Clin. Endocrinol & Metabolism* **2001**, 86, 3467-3477.
10. Hiipakka R.A., Liao S. Molecular mechanism of androgen action. *Trends. Endocrinol. & Metab.* **1998**, 9, 317-324.
11. Debes J. D., Tindall D. J. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Letters.* **2002**, 187, 1-7.
12. Platz E A, Giovannucci E. The epidemiology of sex steroid hormones and their signaling and metabolic pathways in the etiology of prostate cancer. *Journal Steroid. Biochem. & Mol. Biol.* **2004**, 92, 237-253.
13. Yen S., Jaffe R. *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 3ª edición, Ed. Panamericana España, **1993**.
14. Mc Conell J. D., Stoner E. 5 α -reductase inhibitors. *Advanced in Protein Chemistry.* **2001**, 56, 143-180.
15. Tanagho E. A., Mc Aninch J. W. *Urología General de Smith*, 12ª edición, Ed. Manual Moderno, **2001**, Cap. 23, pág. 399-406.
16. Thorpe A., Neal D. Benign prostatic hyperplasia. *The Lancet*, **2003**, 361, 1359-1367.
17. Hieble J. P. Therapeutics strategies for benign prostatic hypertrophy, *Drug Discovery Today: Therapeutics Strategies*, **2004**, 1, 243-248.
18. Donald J. A. *Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery Vol 1: Drug Discovery*, 6ª edición, John Wiley & Sons, Inc. **2003**.
19. Ryan C. J., Small E. J. Androgen-independent prostate cancer: target evolution and disease dynamics. *Drug discovery Today: Disease Mechanism.* **2004**, 1, 223-228.

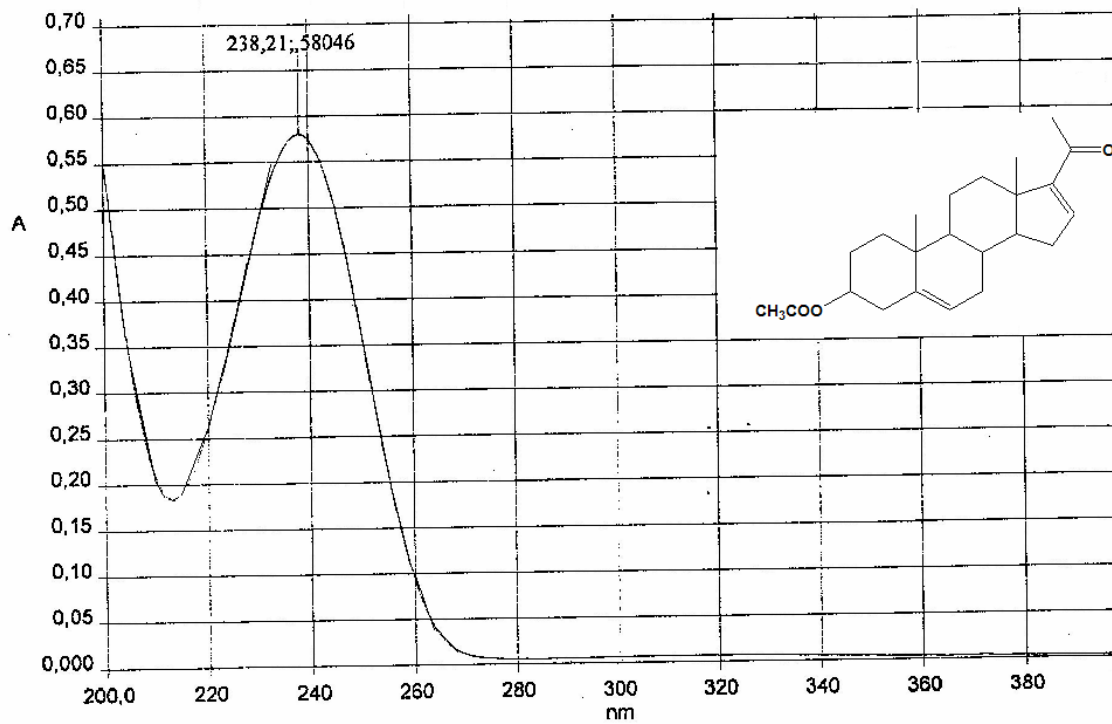
20. Garnick M. B., Fair W. R. El cancer de próstata. *Investigación y Ciencia*, **1999**, 7-16.
21. Brawley O. W., Parnes H. Prostate cancer prevention trial in the USA. *European Journal of Cancer*, **2000**, 36, 1312-1315.
22. Santos A.F., Huang H., Tindall D.J. The androgen receptor: a potential target for therapy of prostate cancer. *Steroids*, **2004**, 69, 79-85.
23. Culig Z., Comuzzi B., Steiner H., Bartsch G., Hobisch A. Expression and function of androgen receptor co activators in prostate cancer. *Journal Steroid. Biochem. & Mol. Biol.* **2004**, 92, 265-271.
24. Mishina T., Watanabe H., Araki H., Nakao M. Epidemiological study of prostatic cancer by matched-pair analysis. *Prostate*, **1985**, 6, 423-436.
25. Njar V. C. O., Brodie A. M. H. Inhibitors of 17 α -Hydroxylase/17-20 lyase (CYP 17): Potential agents for the treatment prostate cancer. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, 5, 163-180.
26. Small E.J., Baron A.D., Fippin L., Apodaca D. Ketoconazole retains activity in advanced prostate cancer patients with progression despite flutamide withdrawal. *J. Urol.* **1997**, 157, 1204-1207.
27. Cooke G. M. Differential effects of trilostane and cyanoketone on the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase reactions in androgen and 16-androstene biosynthetic pathways in the pig testis. *Journal Steroid. Biochem. & Mol. Biol.* **1996**, 58, 95-101.
28. Occhiato E. G., Guarna A., Danza G., Serio M. Selective non steroidal inhibitors of 5 α -reductase type 1. *Journal Steroid. Biochem. & Mol. Biol.* **2004**, 88, 1-16.
29. Bull H. G., García-Calvo M., Andersson S., Baginsky W. F., Chan H. K., *et al.* Mechanism based-inhibition of human steroid 5 α -reductase by finasteride: enzyme catalized formation of NADP-Dyhidrofinasteride, a potent bisubstrate analogs inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2359-2365.
30. Guarna A., Belle C., Machetti F., Occhiato E. and Payne A. H. 19-Nor-10-azasteroids: a novel class of inhibitors of human steroid 5 α -reductases 1 and 2. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1112-1119.
31. Grisenti P., Magui A., Olgiati V., Manzocchi A., Ferraboshi P., Villani V., Pucciariello R., Celotti F. Substrate interaction with 5 α -reductase enzyme: influence of 17 β -chain chirality in the mechanism action of 4-azasteroids inhibitors. *Steroids*, **2001**, 66, 803-810.
32. Bakken G. A., Jurs P. C. QSAR for 6-azasteroids as inhibitors of human type 1 5 alpha-reductase: prediction of binding affinity and selectivity relative to 3-BHSD. *Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41, 1255-65.
33. Holt D. A., Levy M. A., Heaslip J. I., Brandt M., Lan-Hargest H. and Metcalf B. W. Inhibition of steroid 5 alpha reductase by unsaturated 3-carboxysteroids. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 943-950.
34. Holt D. A., Levy M. A., Ladd D. L., Oh H. J., Erb J. M., Heaslip J. I., Brandt M., Metcalf B. W. Steroidal A ring aryl carboxylic acid: a new class of steroid 5 α -reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 937-942.
35. Jones C. D., Audia J. E., Lawhorn D. E., Mc Quaid L. A., Neubauer B. L., Dike A. J., Pennington D. A. and Toomey D. E. Non steroidal inhibitors of human type 1 steroid 5-alpha reductase. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 421-423.
36. Wikel J. H., Bemis K. J., Audia J. E., Mc Quaid L. A., Jones C. D., Hirsch K. R., *et al.* QSAR study of benzoquinolinones as inhibitors of human type 1 5 α -reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1157-1162.
37. Guarna A., Machetti F., Occhiato E. G., Scarpi D., Comerci A., Danza G., Mancina R., Serio M. Benzo[c]quinolizin-3-ones: a novel class of potent and selective non steroidal inhibitors of human steroid 5 α -reductase 1. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3718-3735.

38. Ferrali A., Menchi G., Occhiato E., Danza G., Mancina R., Serio M. Synthesis and activity of substituted benzo[c]quinolizin-3-ones as dual inhibitors of human 5α -reductase 1 and 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 145-148.
39. Abell A.D., Brandt M., Levy M. A., Holt D. A. A comparison of steroidal and non steroidal inhibitors of human steroid 5α -reductase: new tricycles aryl acid inhibitors of the type 1 isozyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 481-484.
40. Igarashi S., Inami H., Hara H., Fujii M., Koutoku H., Oritani H. A novel class of inhibitors for human steroids 5-alpha reductase: synthesis and biological evaluation of indole derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, 48, 382-388.
41. Lesuisse D., Gourvest J. F., Albert E., Doucet B., Hartmann C., Lefrancois J. M., Tessier S., Teutsh G. Byphenyls as surrogates of the steroidal backbone. Part 2: Discovery of novel family of non steroidal 5α -reductase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1713-1716.
42. Picard F., Schulz T., Hartmann R. W. 5-phenyl substituted 1-methyl-2-piridones and 4'-substituted biphenyl-4-carboxylic acids. Synthesis and evaluation as inhibitors of steroid 5α -reductase type 1 and 2. *Bioorg. & Med. Chem.* **2002**, 10, 437-448.
43. Linja M. J., Visakorpi T. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *Journal Steroid. Biochem. & Mol. Biol.* **2004**, 92, 25-264.
44. Heinlein C. A., Chang C. Androgen receptor (AR) Coregulators: an overview. *Endocrine Reviews*, **2002**, 23, 175-200.
45. Hartmann R. W., Hector M., Haidar S., Ehmer P. B., Reichert W., Jose J. Synthesis and evaluation of novel steroidal oxime inhibitors of P450 17 (17α -Hydroxylase/C-17-20 lyase) and 5α -reductase types 1 and 2. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4266-4277.
46. Li X., Singh S. M., Côté J., Laplante S., Veilleux R., Labrie F. The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxo-steroids 5α -oxidoreductase. *Steroids*, **1995**, 60, 430-441.
47. Li X., Singh S.M., Côté J., Laplante S., Veilleux R., Labrie F. Synthesis and *in vitro* evaluation substituted N-(1,1-dimethyl)-3-oxo-4-androstene-17 β -carboxamides as reductase inhibitors and antiandrogens. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1456-1461.
48. Guarna A., Occhiato E., Machetti F. 19-Nor-10-azasteroids, a new class of steroid 5α -reductase inhibitors. X-ray structure, molecular modeling, conformational analysis of 19 Nor-10-azasteroids and comparison with 4-azasteroids and 6-azasteroids. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3466-3477.
49. Rasmusson G. H., Reynolds G. F., Steinberg N. G., Walton E., Patel G. F., Liang T., and Cascieri M. A., *et al.* Azasteroids: structure activity relationships for inhibition of 5α -reductase and androgen receptor binding. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 2298-2315.
50. Kurup A., Garg R., Hansch C. Comparative QSAR analysis of 5α -reductase inhibitors. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 909-924.
51. Rasmusson G. H., Reynolds G. F., Utne T., Jobson R. B., Primka R. L., Berman C., Brooks J. R. Azasteroids an inhibitors of rat prostatic 5α -reductase, *J. Med. Chem.* **1984**, 27,1690-1701.
52. Frye S.V., Haffner C. D., Maloney P. R., Mook R. A., Dorsey G. F. Jr., Hiner R. N., Cribbs C. M., Wheeler T. M., Ray J. A., *et al.* 6-azasteroids: structure-activity relationships for the inhibition of type 1 and 2 human 5α -reductase and human adrenal 3β -hidroxi- Δ^5 -steroid dehydrogenase/3-keto- Δ^5 -steroid isomerase. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2352-2360.
53. Bakshi R.K., Patel G. F., Rasmusson G. H., Baginsky W. F., Cimis G., Ellsworth K., Chang B., Bull H., Tolman R. L., Harris G.S. 4,7 β - Dimethyl-4-azacholestan-3-one (MK-386) and related 4-azasteroids as selective inhibitors of human type 1 5α -reductase. *J. Med Chem* **1994**, 37, 3871-3874.

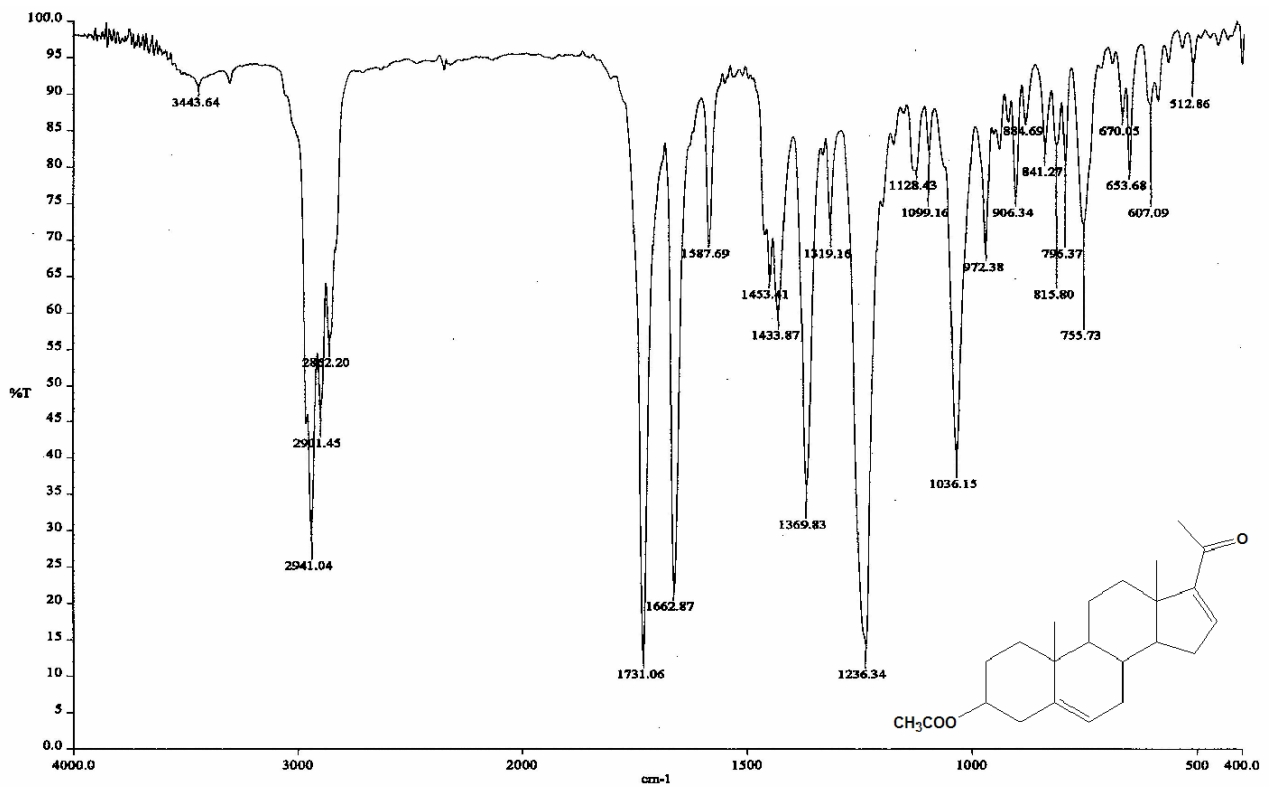
54. Frye S. V., Haffner C. D., Maloney P. R., Mook R. A., Dorsey G. F. Jr., *et al.* 6-azasteroids: potent dual inhibitors of human type 1 and 2 steroid 5 α -reductase. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 4313-4315.
55. Li X., Singh S., Labrie F. Synthesis and *in vitro* activity of 17 β -(N-alkyl/arylformamido) and 17 β -[(N-alkyl/aryl) alkyl/aryl amide]-4-methyl-4-aza-3-oxa-5 α -androst-3-ones as inhibitors of human 5 α -reductase and antagonist of the androgen receptor. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1158-1173.
56. Bakshi R. K., Rasmusson G. H., Patel G. F., Mosley R. T., Chang B., Harris G. S., Tolman R. L. 4-aza-3-oxo-5 α -androst-1-ene-17 β -N-aryl-carboxamides as dual inhibitors of human type 1 and type 2 steroid 5 α -reductase. Dramatic effect of N-aryl substituents on type 1 and type 2 5 α -reductase inhibitory potency. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3189-3192.
57. Frye S. V. Haffner C.V., Maloney P. R., Hiner R. N., Dorsey G. F Jr., Noe R. A., Unwalla R. J., Batchelor K. W., Bramson H. N., Stuart J. D., *et al.* Structure-activity relationships for inhibition of type 1 and 2 human 5 α -reductase and human adrenal 3 β -hidroxi- Δ^5 -steroid dehydrogenase/3-keto- Δ^5 -steroid isomerase by 6-azaandrost-4-en-3-ones. Optimization of the C-17 substituent. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2621-2627.
58. Ramírez López E. Síntesis de 17-alfa-aciloloxi derivados del pregnano con un sustituyente en C-16 β como antiandrógenos. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, **2002**.
59. Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Heuze I., Bratoeff E., Flores G. and Ramírez E. Androgenic and antiandrogenic effects of progesterone derivatives with different halogen as substituent of the C-6 position. *Steroids*, **1999**, 64, 413-421.
60. Shapiro E., Legatt T., Weber L., Steinberg M., Watnick A., Coniglio C. T., Charney W., Oliveto E. P. 16-alkylated progesterones. *J. Med. Chem.* **1962**, 5, 975-988.
61. Ramírez E., Cabeza M., Heuze I., Gutierrez E., Bratoeff E., Membrillo M. and Lira A. Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 15-20.
62. Olesen P.H. The use of biososteric groups in lead optimization. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2001**, 4, 471-478.
63. Deghenghi R., Revesz C., Gaudry R. New synthesis and structure-activity relationships in the 17-alkylated progesterone series. *J. Med. Chem.* **1963**, 6, 301-304.
64. Valencia Islas N. Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración β en C-16 como antiandrógenos potenciales para el tratamiento de cáncer de próstata. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, **1997**.
65. Chen X., Wang W. The use of bioisosteric groups in led optimization. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2003**, 38, 333-345.
66. Patani G. A., Lavole E. J. Biososterism: a rational approach in drug design. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147-3176.
67. Burger A. Isosterism and biososterism in drug design. *Prog. Drug Res.* **1991**, 37, 287.
68. Korolkovas A. Essentials of molecular pharmacology: background for drug design. John Wiley & Sons Inc, **1970**, Cap 4, pág. 66.
69. Wermuth C.G. The Practice of Medicinal Chemistry, 2^a edition, Academic Press **2003**. Cap. 19, pág. 301.
70. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P, J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, 23, 3-25.

71. Bradford M. A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Annal. Biochem.* **1986**, 72, 248-254.
72. Cabeza M., Bratoeff E., Flores E., Ramírez E., Calleros J., Montes D., Quiroz A. and Heuze I. 5α -reductase and antiandrogenic activities of novel steroids in hamster seminal vesicles. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 1447-1452.
73. Dauben J., Bjarte L. Preparation of ethylenedioxy derivatives of ketosteroids by exchange dioxonalation. An improved synthesis of testosterone from Δ^4 -androstene 3, 17-dione. *J. Amer. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1359-1369.
74. Russell E. The acetilpiridinium ion intermediate in pyridine catalyzed hydrolysis and acyl transfer reacions of acetic anhydride. *J. Amer. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5432-5442.
75. Glatz B. R., Helmchen G. A total synthesis and structural aspects of racemes 8-oxigenated tetracyclines. *J. Amer. Chem. Soc.* **1979**, 101, 2171-2181.
76. Bratoeff E., Herrera H., Ramírez E., Solórzano K., Murillo E., Quiroz A. and Cabeza M. Antiandrogenic effect of 16-substituted, non-substituted and D-homopregnane derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 48(9), 1249-1255.
77. Cabeza M., Heuze I., Bratoeff E., Ramírez E., Lira A. New progesterone esters as 5α -reductase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 1081-1084.
78. Bratoeff E., Cabeza M., Ramírez E., Quiroz A. and Heuze I. Synthesis and pharmacological evaluation of new steroidal 5α -reductase inhibitors. *Proc. West. Pharmacol.* **2002**, 45, 187-190.
79. Shapiro E. L., Weber L., Harris H., Miskowicz C., Neri R., Herzog H. L. Synthesis and biological activity of esters of 6-dehydro-16-methylene-17 α -hydroxiprogesteroes. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 716-720.
80. Cabeza M., Heuze I., Bratoeff E., Ramírez E., Martínez R. Evaluation of new pregnane derivatives as 5α -reductase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 525-530.
81. Flores E., Bratoeff E., Cabeza M., Ramírez E., Quiroz A., Heuze I. Steroid 5α -reductase inhibitors. *Mini Rev in Med. Chem.* **2003**, 3, 225-237.
82. Gareth T. *Medicinal Chemistry: an introduction*, John Wiley & Sons, Inc. **2000**.
83. Silverman R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. 2nd edition, Elsevier Academic Press, **2002**.
84. Dennis A. Smith, Han van Waterbeemd. *Pharmacokinetics and metabolism in drug design. Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, V. 13, Ed. Wiley-VCH, **2001**.

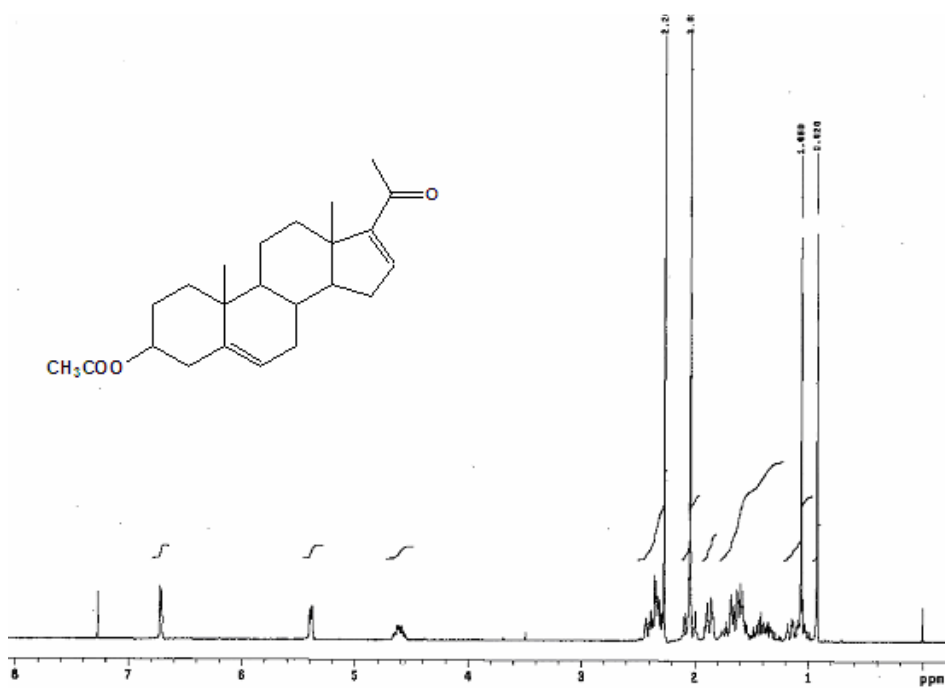
ESPECTROSCOPIA



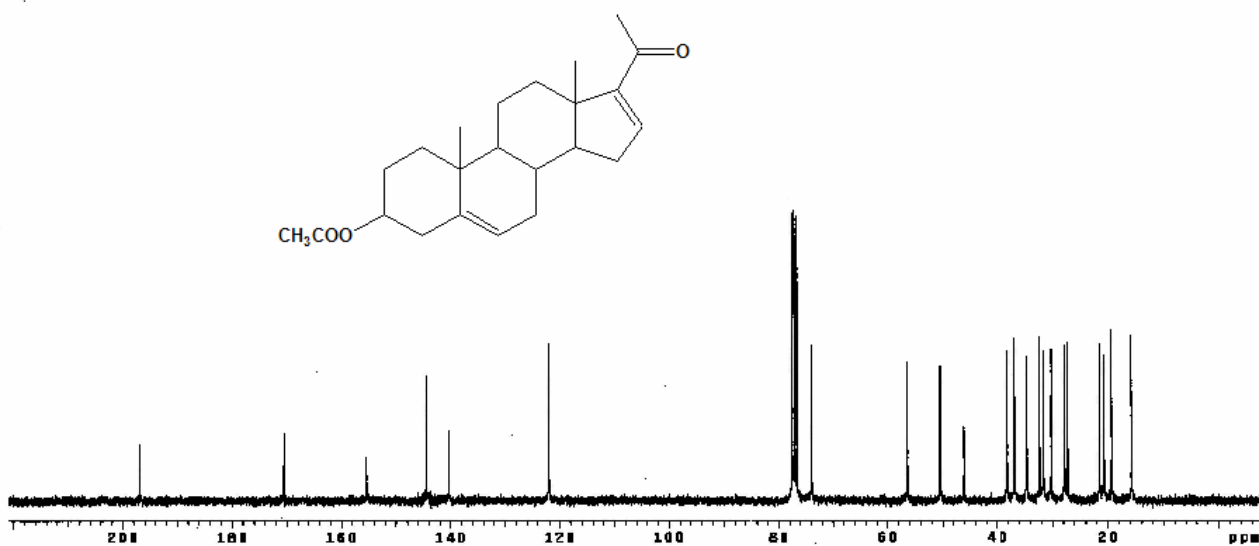
Espectro 1. Ultravioleta del compuesto Acetato de 16-dehidropregnenolona (1).



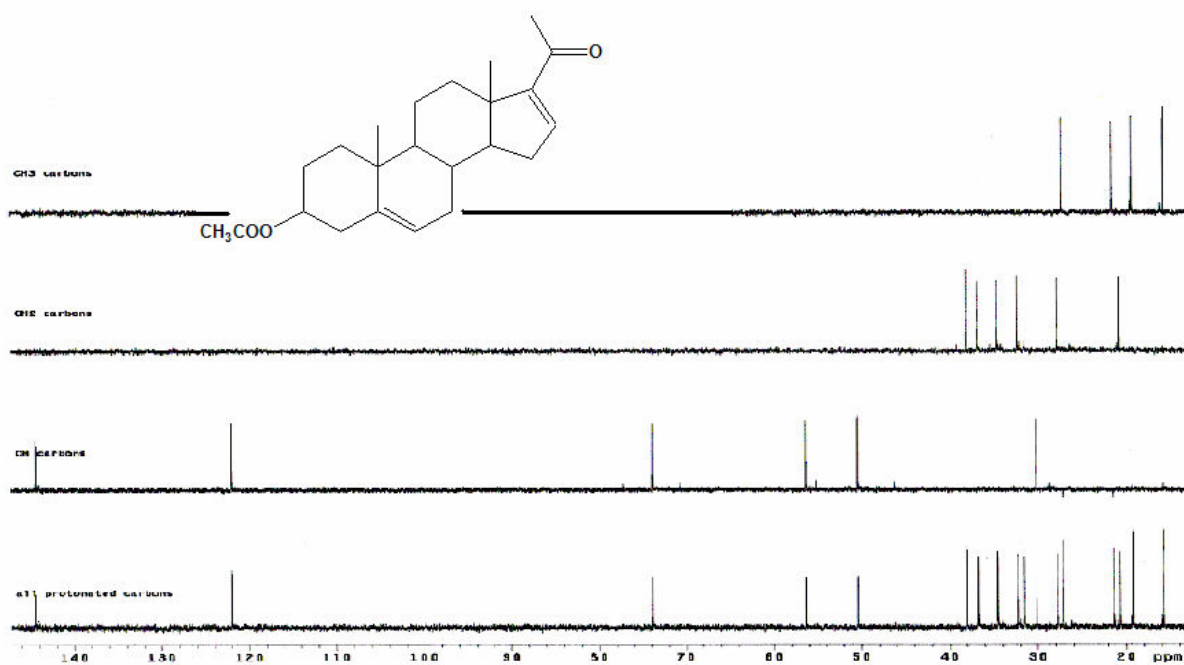
Espectro 2. Infrarrojo (película) del compuesto Acetato de 16-dehidropregnenolona (1).



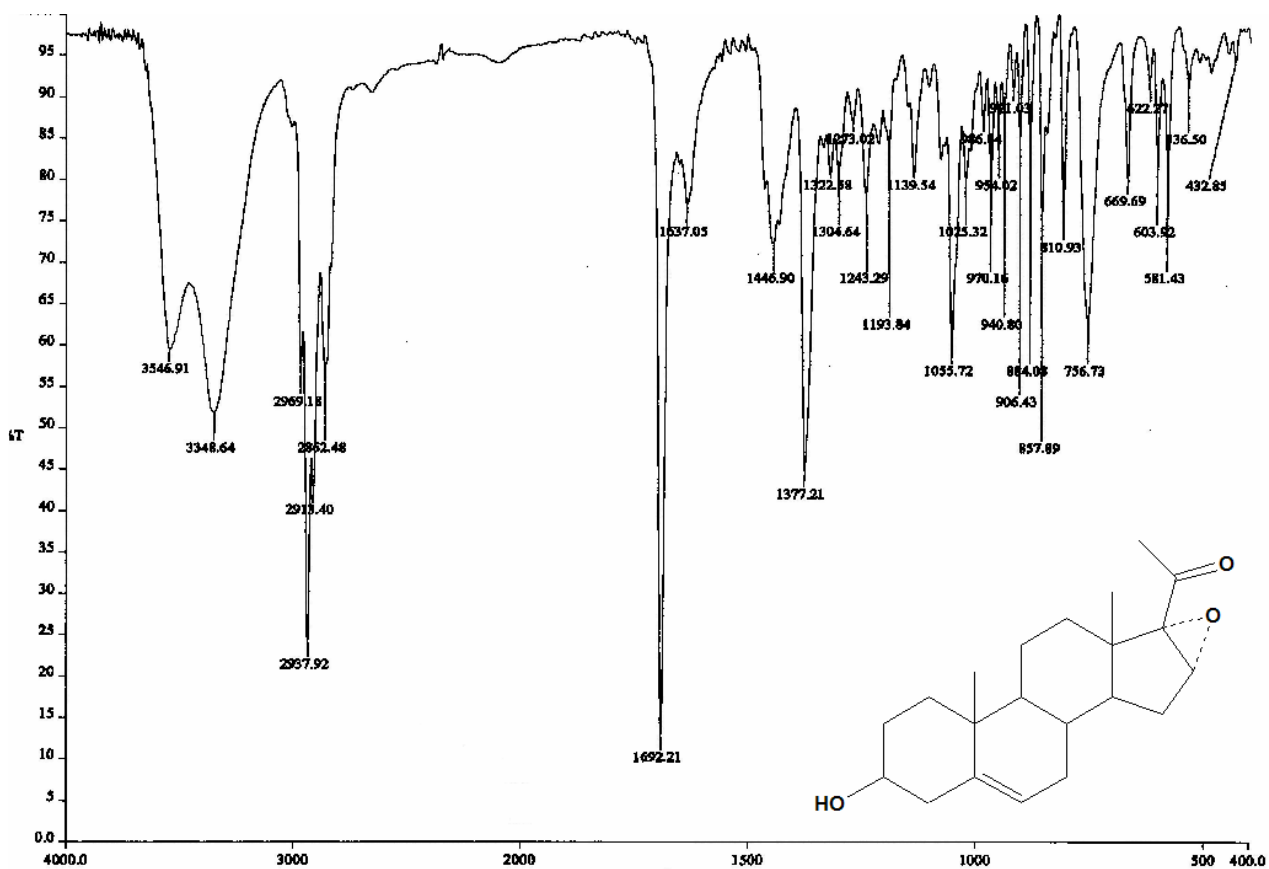
Espectro 3. RMN- ^1H del compuesto Acetato de 16-dehidropregnenolona (1).



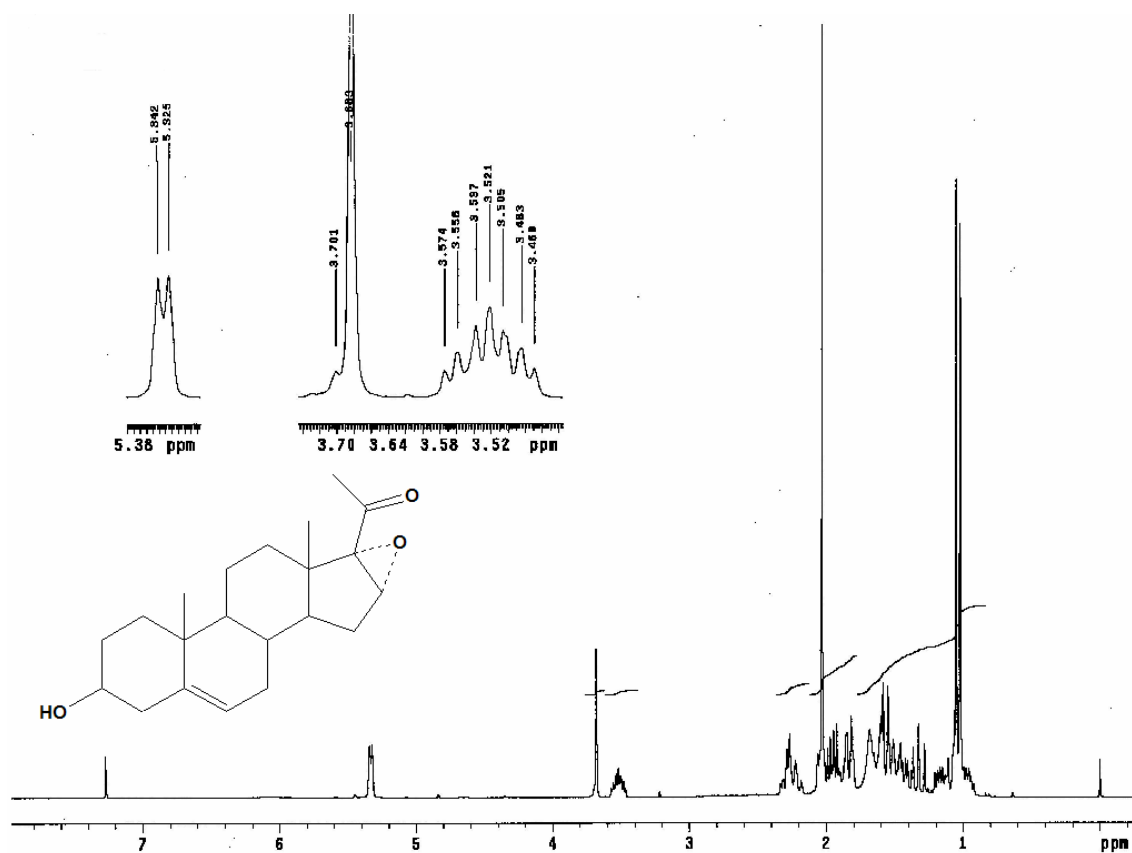
Espectro 4. RMN- ^{13}C del compuesto Acetato de 16-dehidropregnenolona (1).



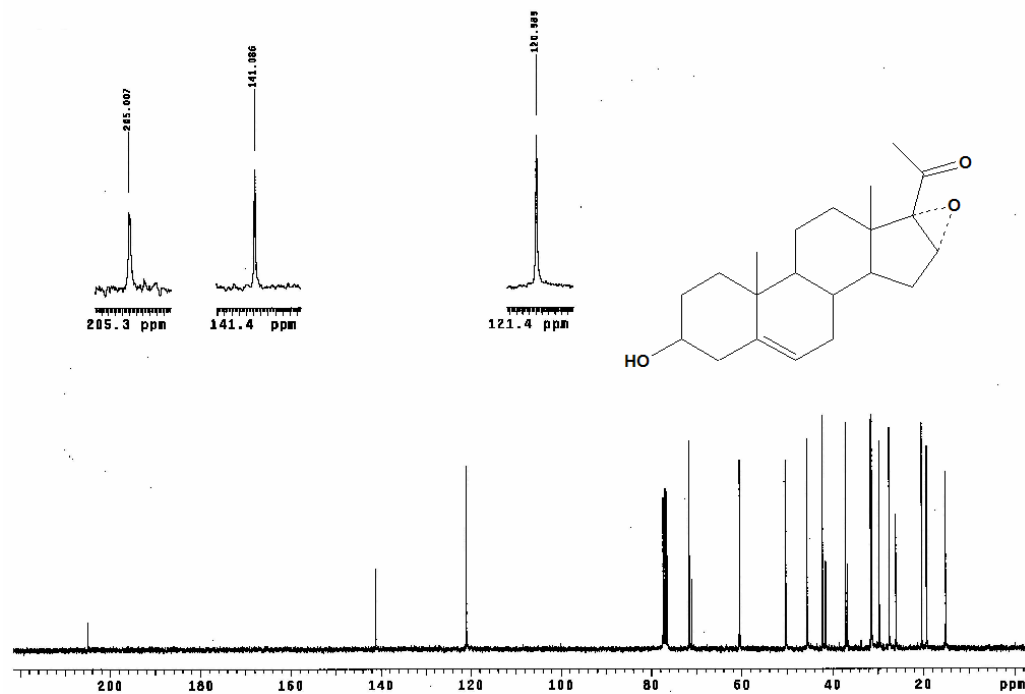
Espectro 5. DEPT del compuesto Acetato de 16-dehidropregnenolona (1).



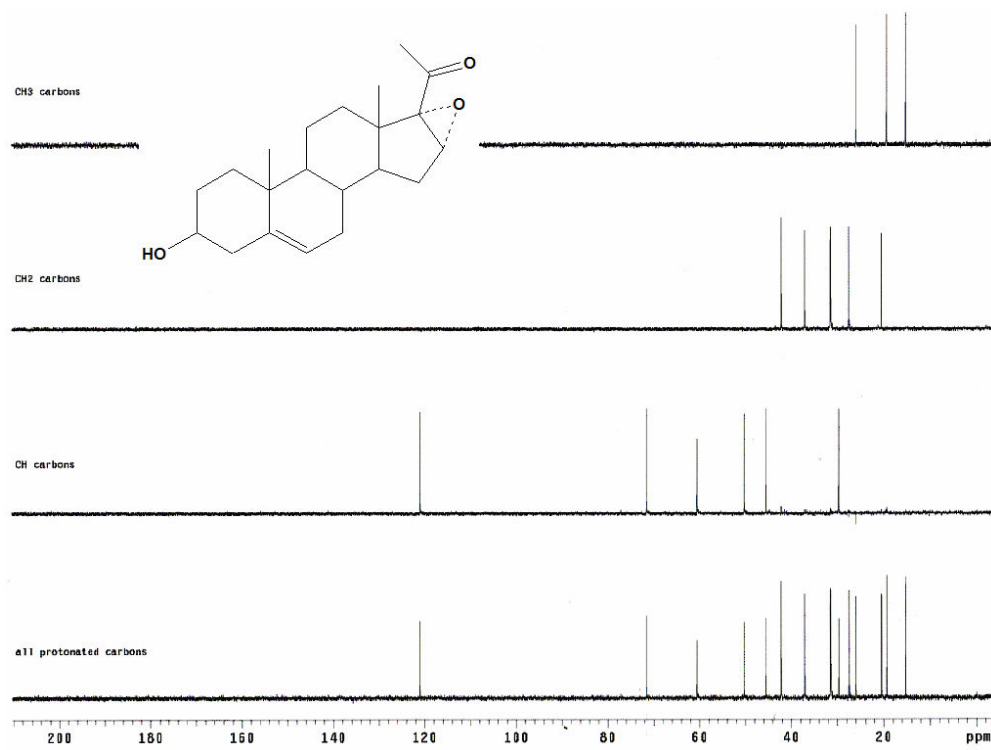
Espectro 6. Infrarrojo (película) del compuesto 3β-Hidroxi-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (2).



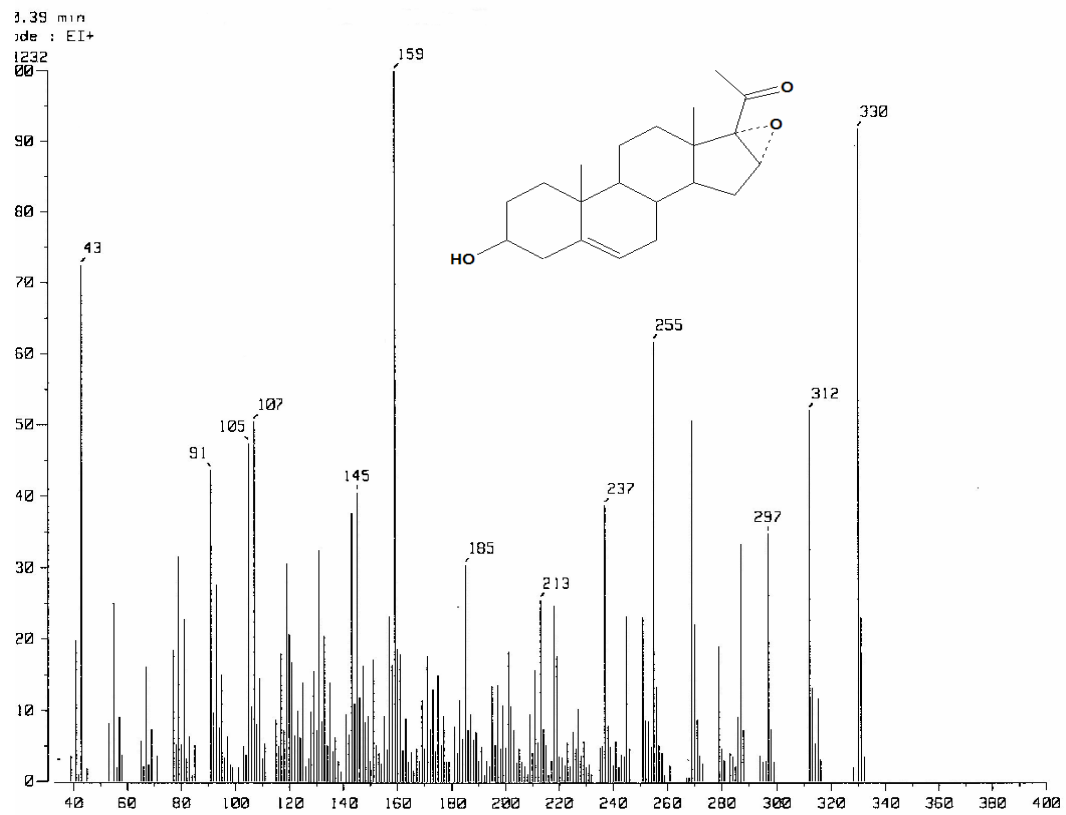
Espectro 7. RMN- ^1H del compuesto 3β -Hidroxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (2).



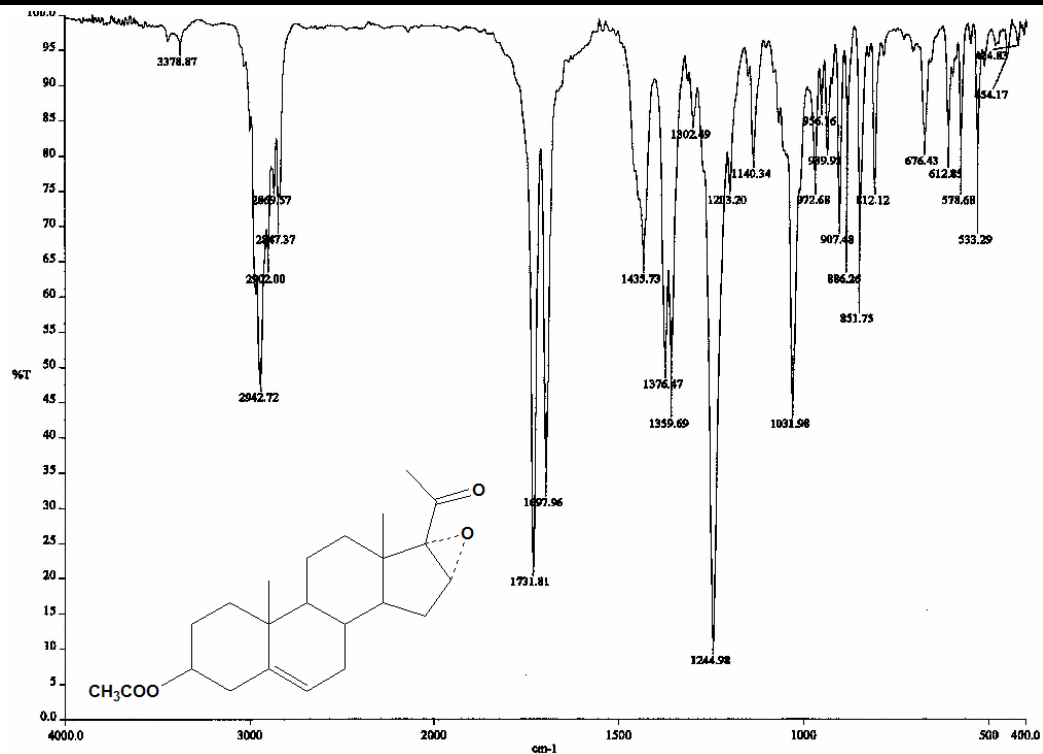
Espectro 8. RMN- ^{13}C del compuesto 3β -Hidroxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (2).



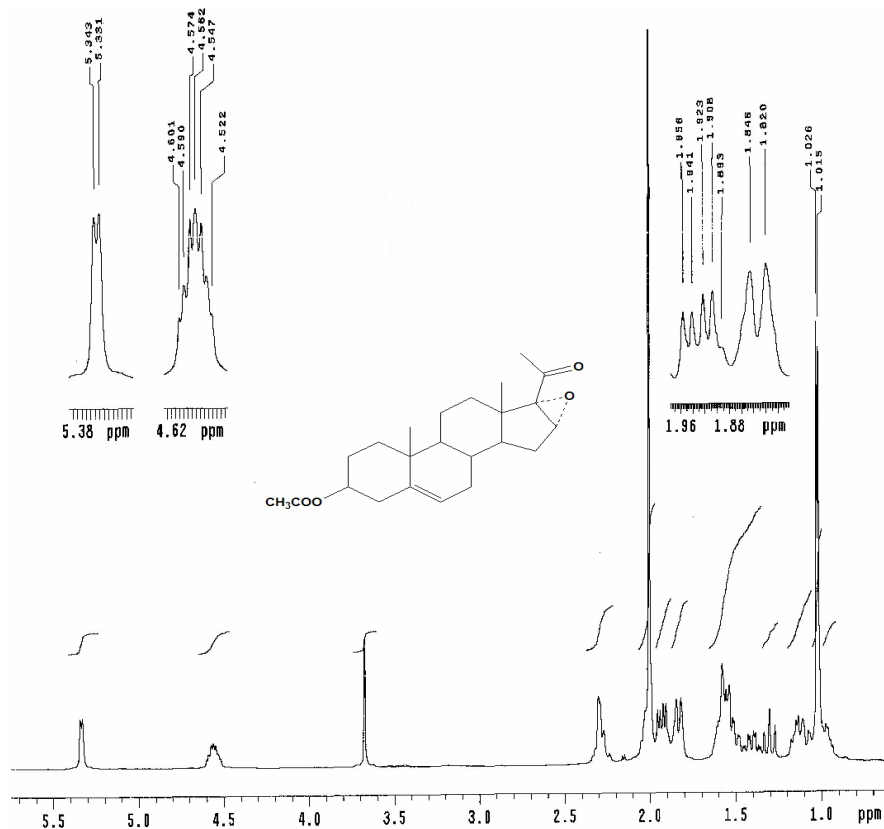
Espectro 9. DEPT del compuesto 3β-Hidroxi-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (2).



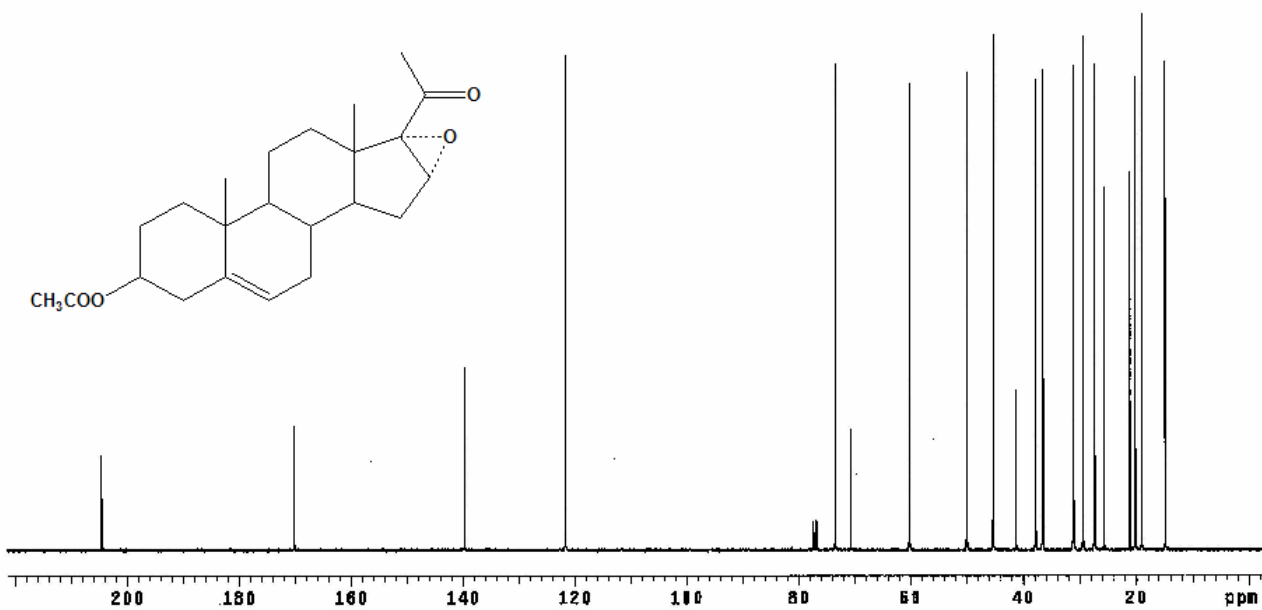
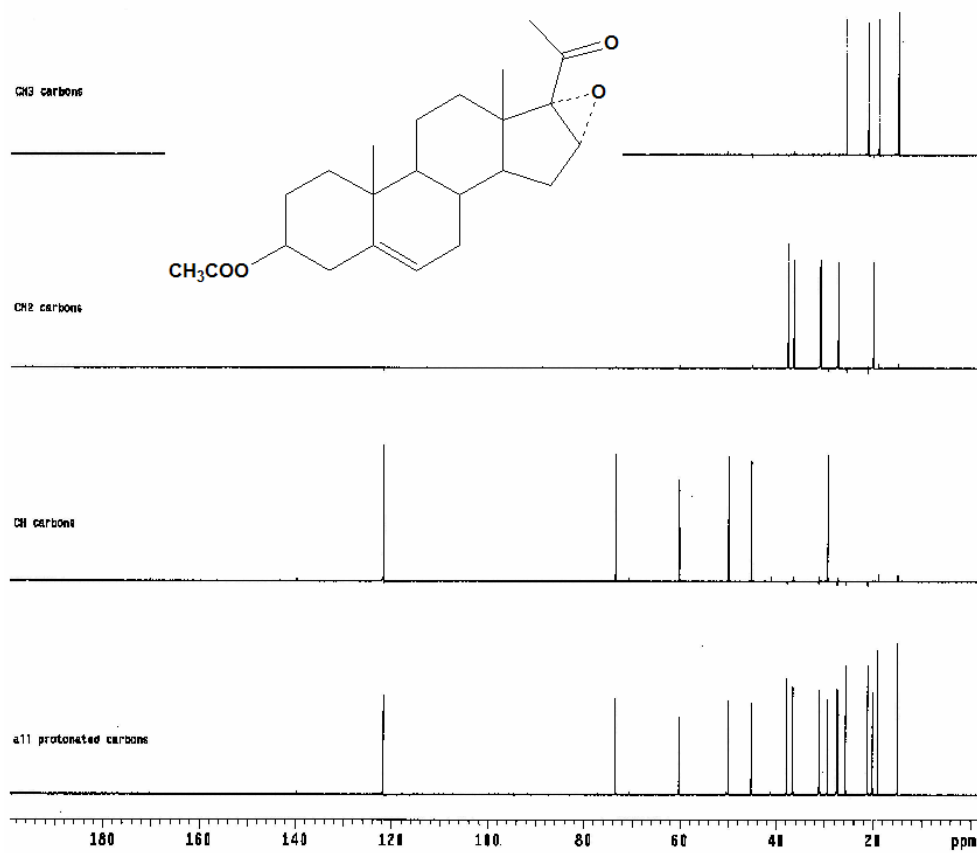
Espectro 10. EMIE del compuesto 3β-Hidroxi-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (2).

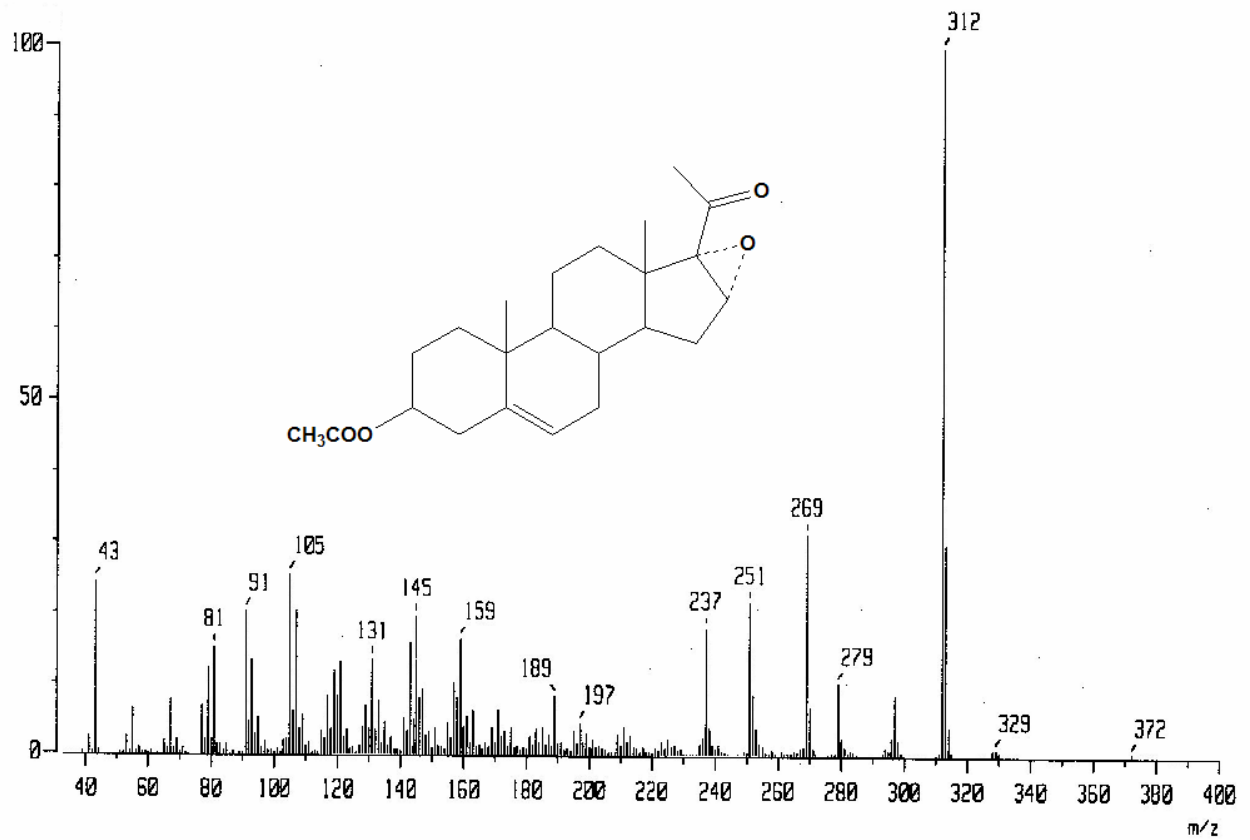


Espectro 11. Infrarrojo (película) del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (3).

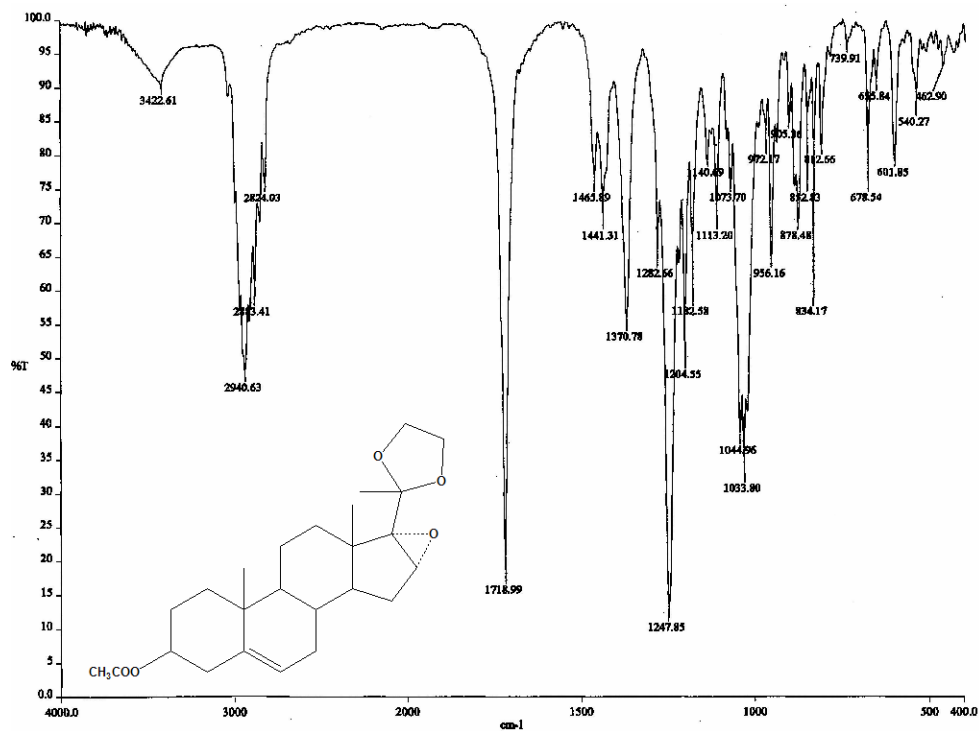


Espectro 12. RMN-¹H del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (3).

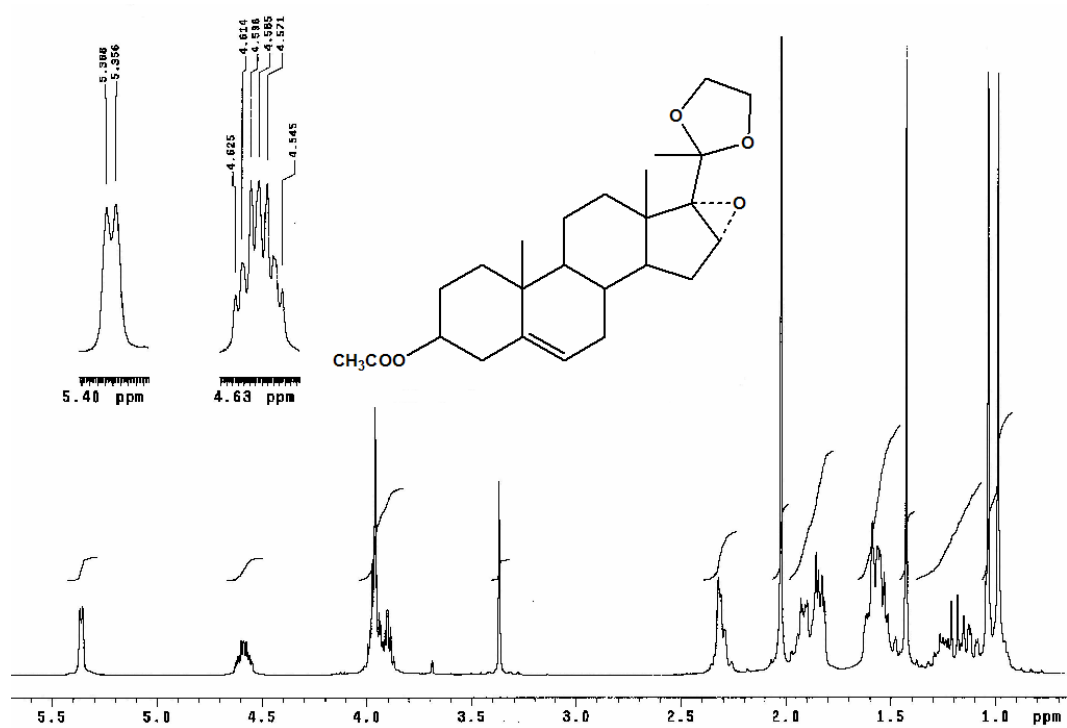
Espectro 13. RMN- ^{13}C del compuesto 3β -Acetoxy- $16\alpha,17\alpha$ -epoxy-5-pregnen-20-ona (3).Espectro 14. DEPT del compuesto 3β -Acetoxy- $16\alpha,17\alpha$ -epoxy-5-pregnen-20-ona (3).



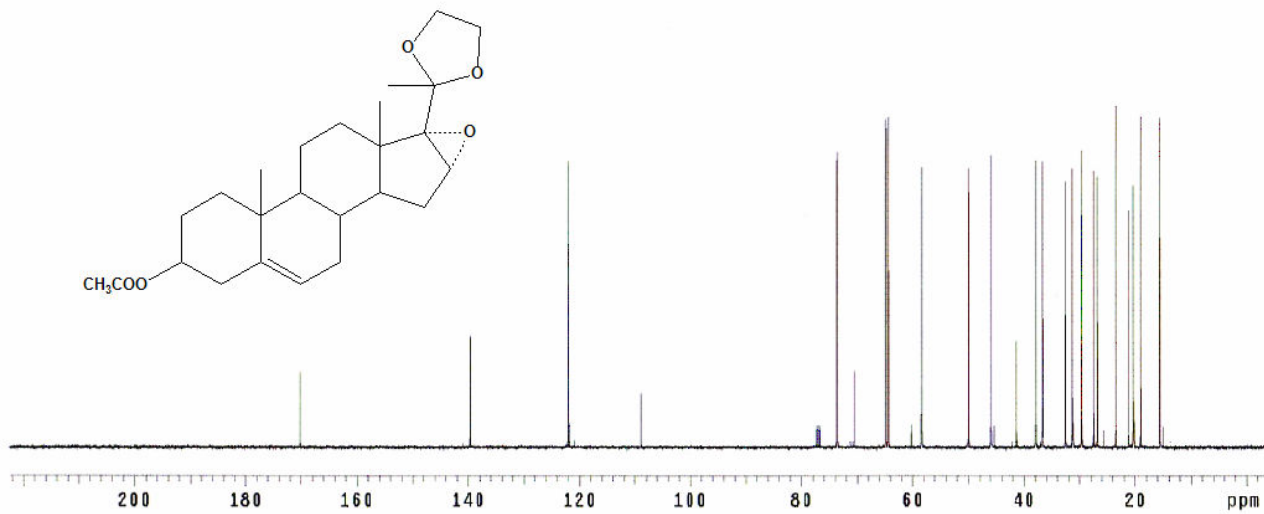
Espectro 15. EMIE del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (3).



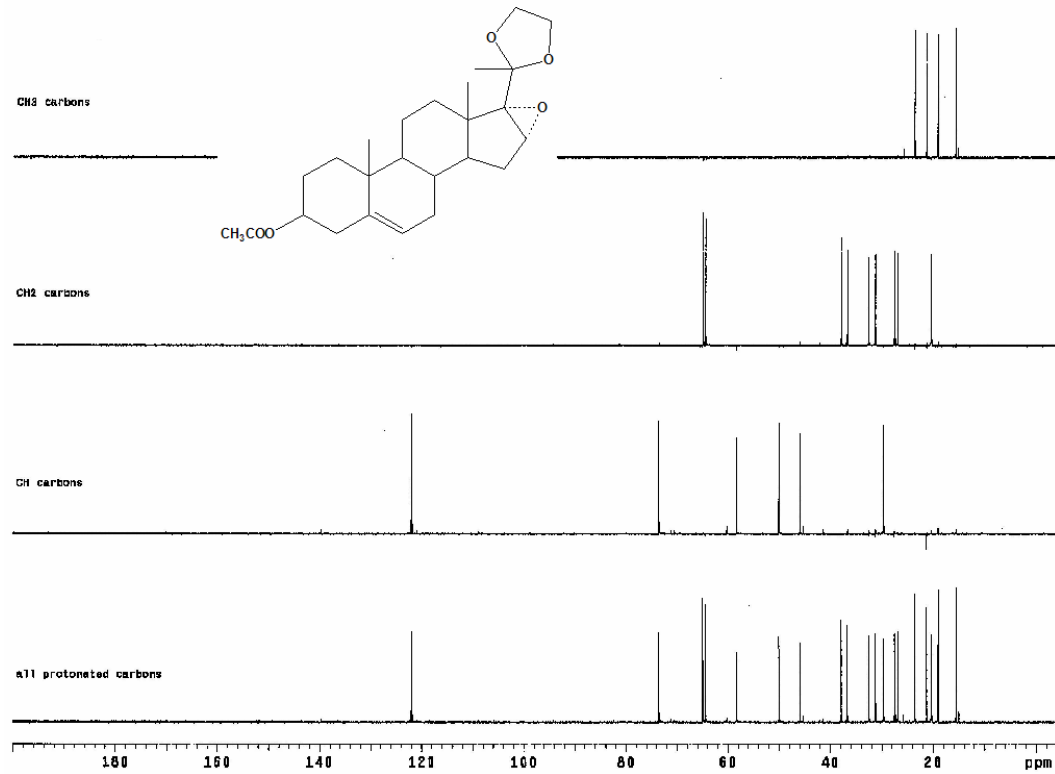
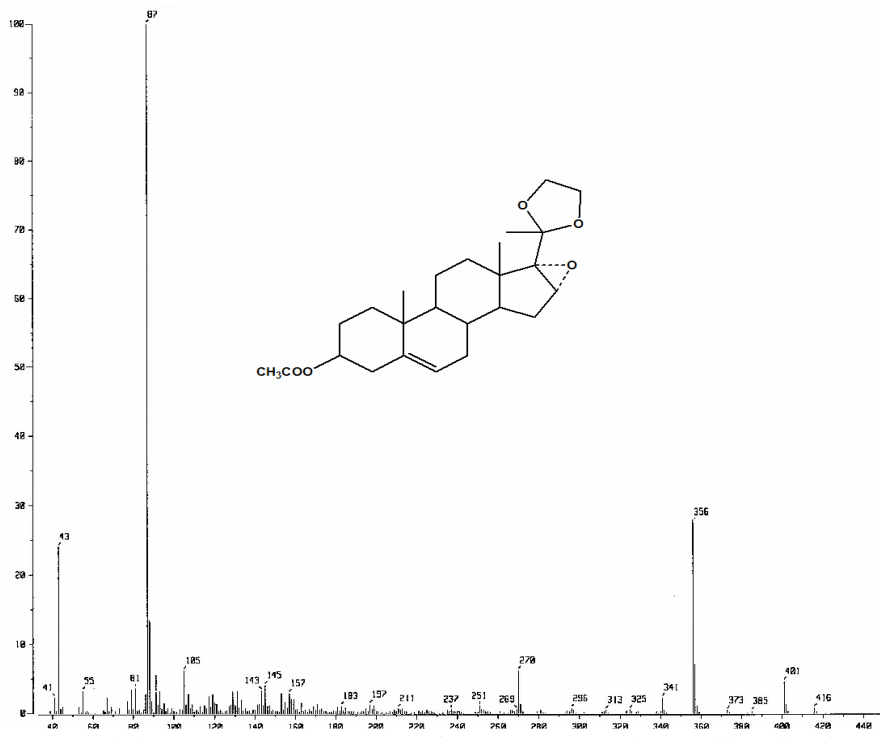
Espectro 16. IR (película) del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (4).

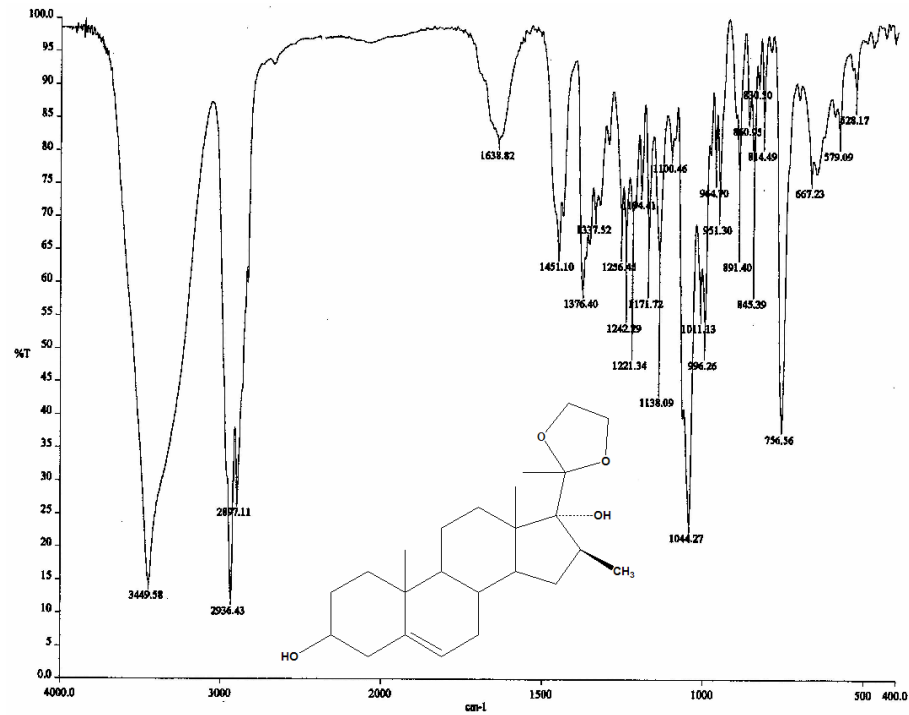


Espectro 17. RMN-¹H del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (4).

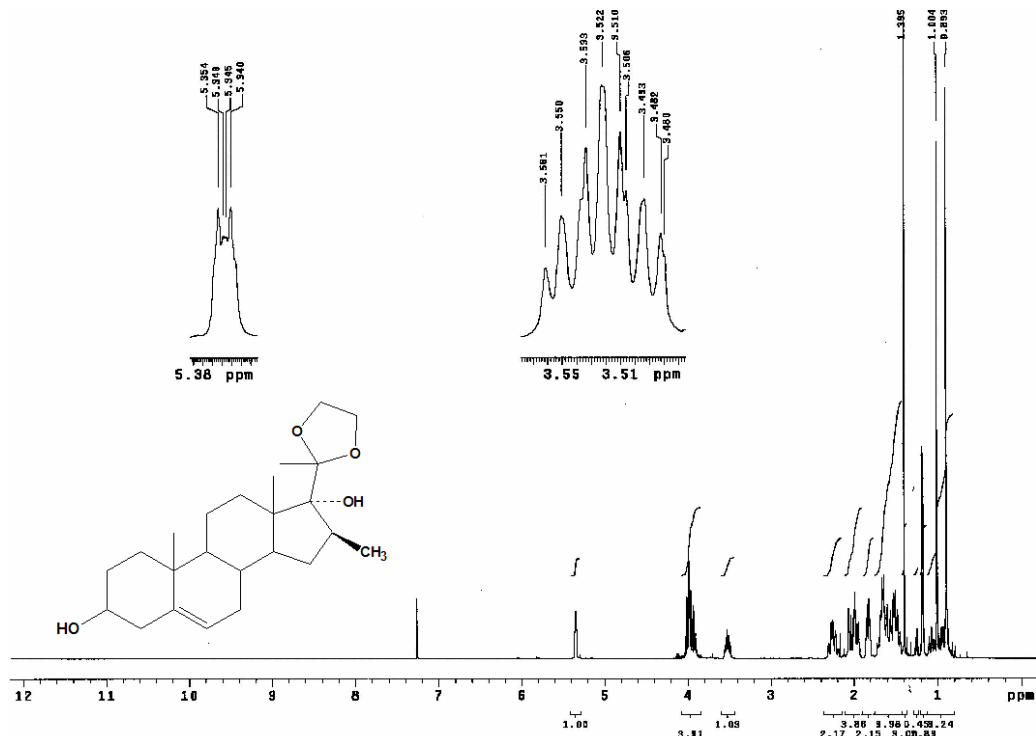


Espectro 18. RMN-¹³C del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (4).

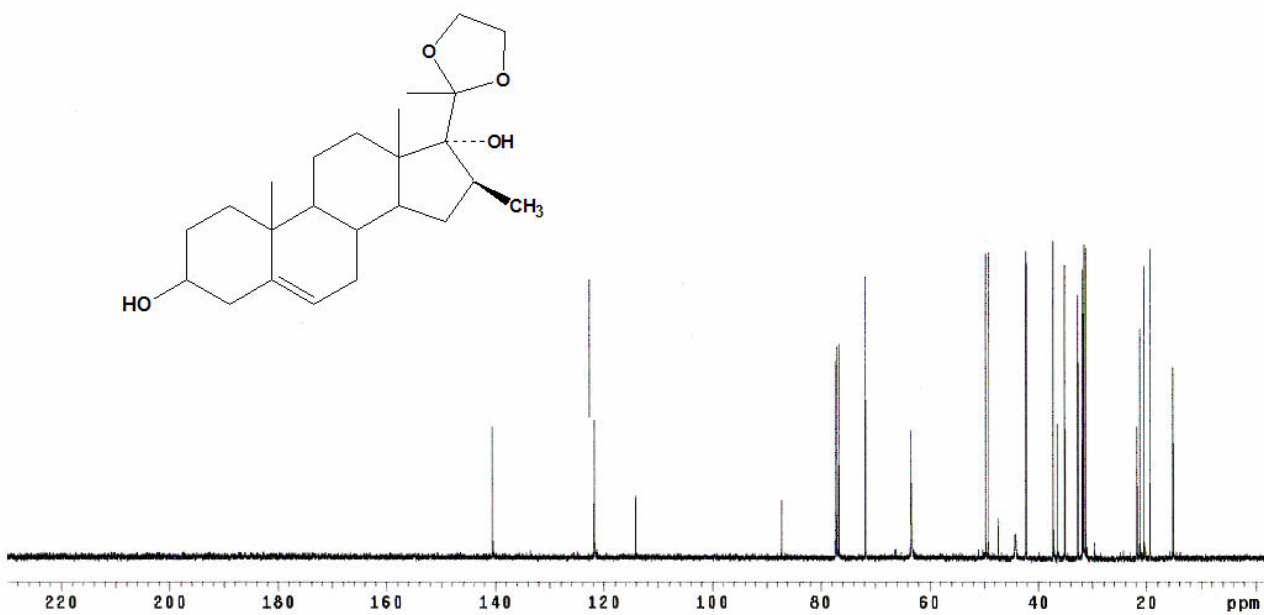
Espectro 19. DEPT del compuesto 3β -Acetoxy- $16\alpha,17\alpha$ -epoxy-20-etilendioxi-5-pregнено (4).Espectro 20. EMIE del compuesto 3β -Acetoxy- $16\alpha,17\alpha$ -epoxy-20-etilendioxi-5-pregнено (4).



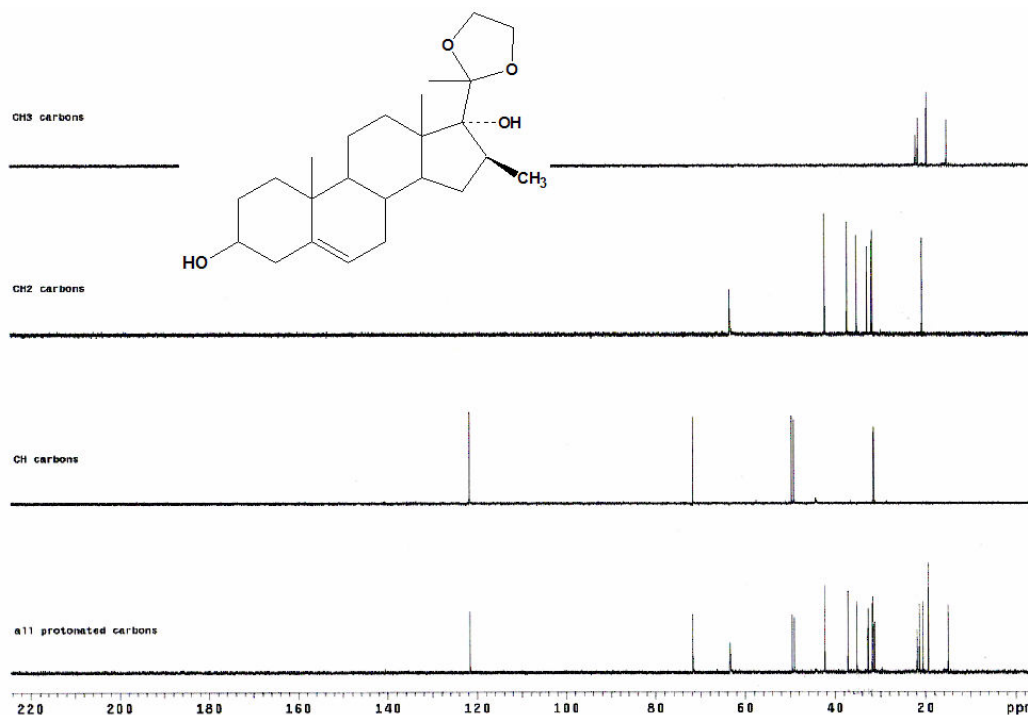
Espectro 21. Infrarrojo (película) 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-20-etilendioxi-5-pregнено (5).



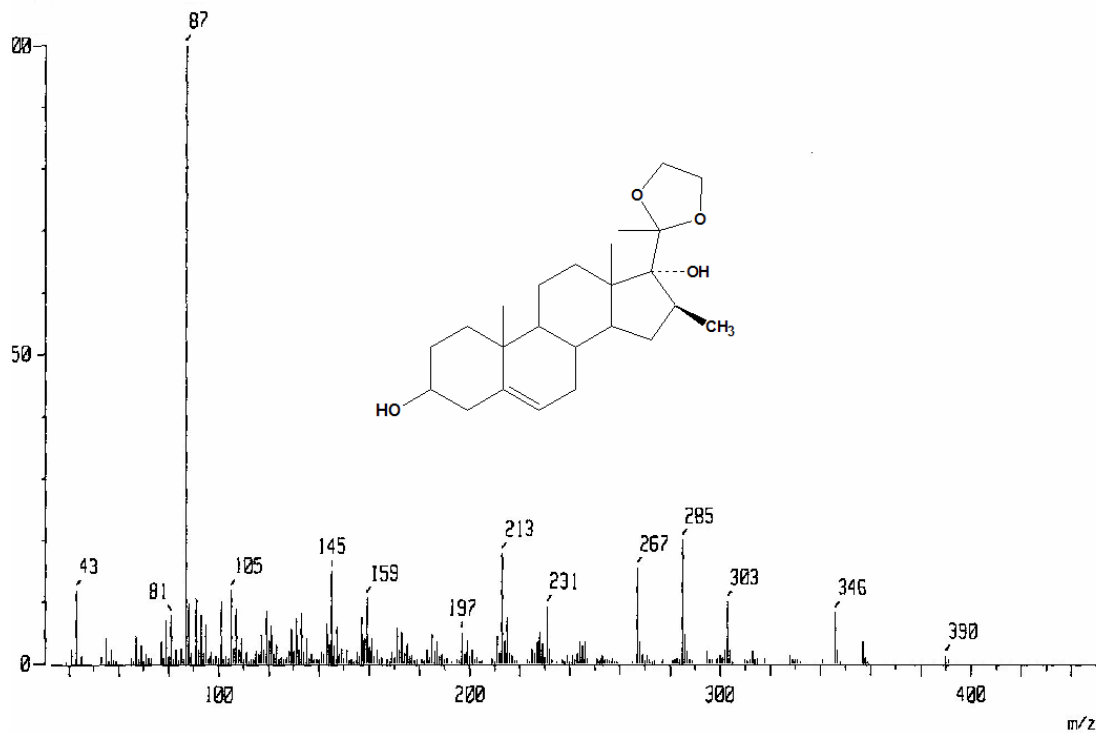
Espectro 22. RMN-1H del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-20-etilendioxi-5-pregнено (5).



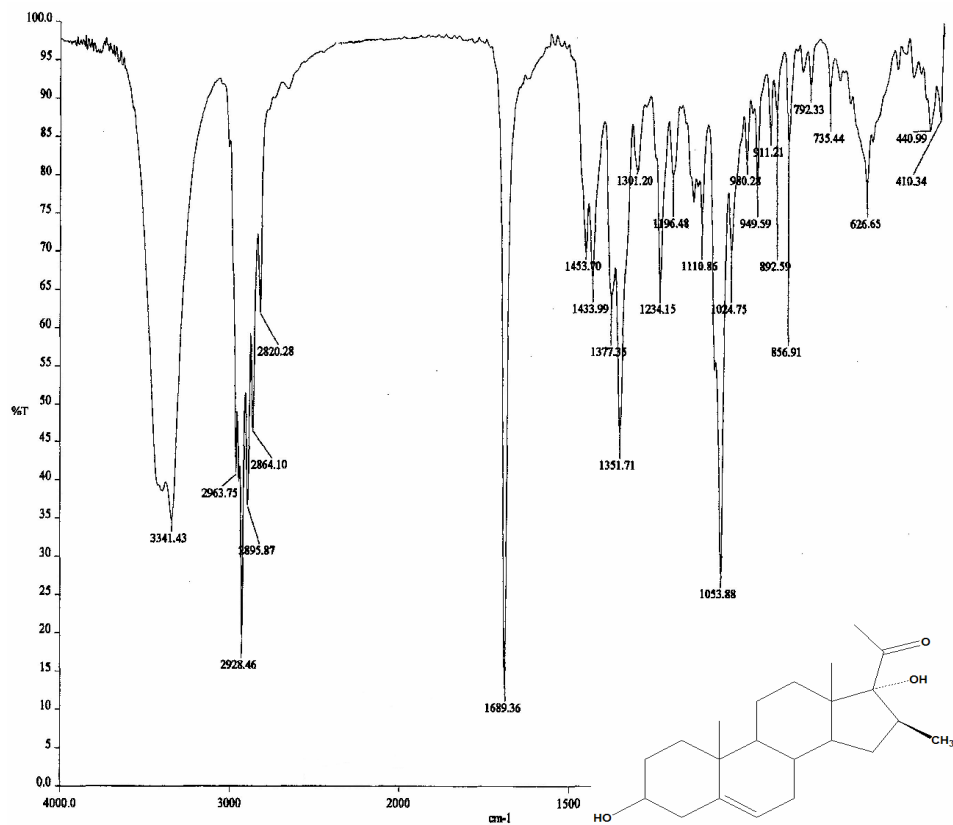
Espectro 23. RMN-¹³C del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-20-etilendioxi-5-pregнено (5).



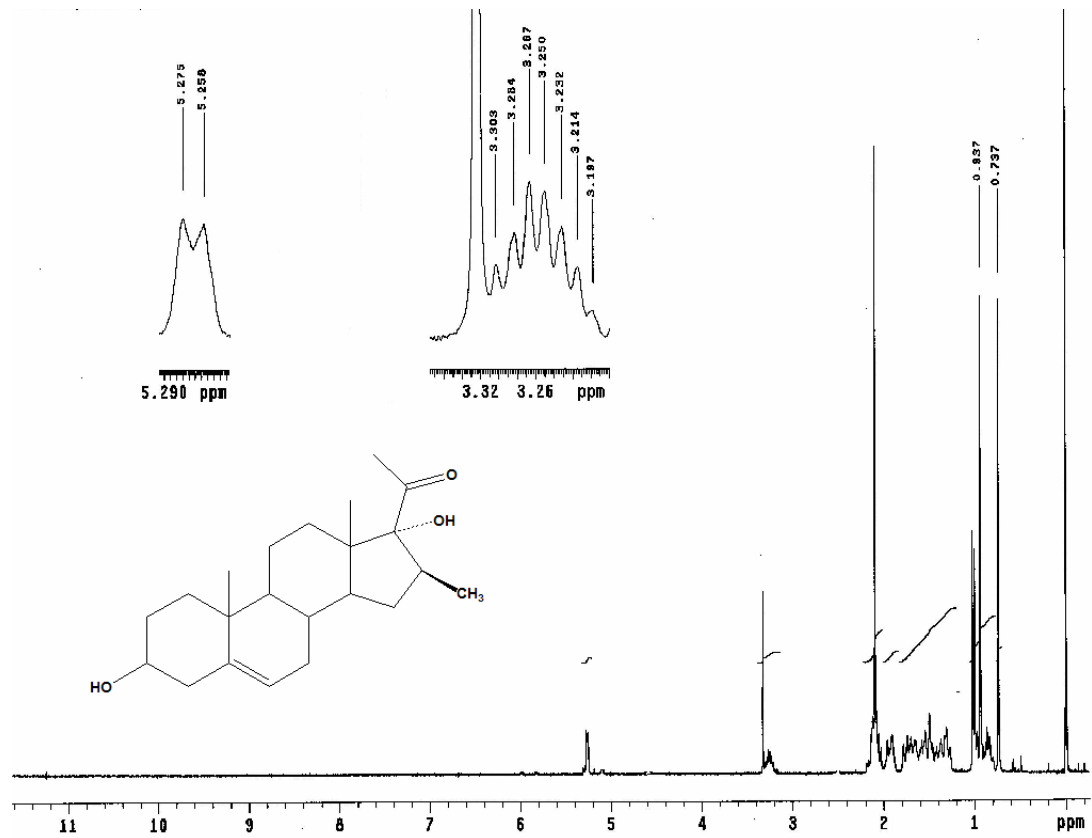
Espectro 24. DEPT del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-20-etilendioxi-5-pregнено (5).



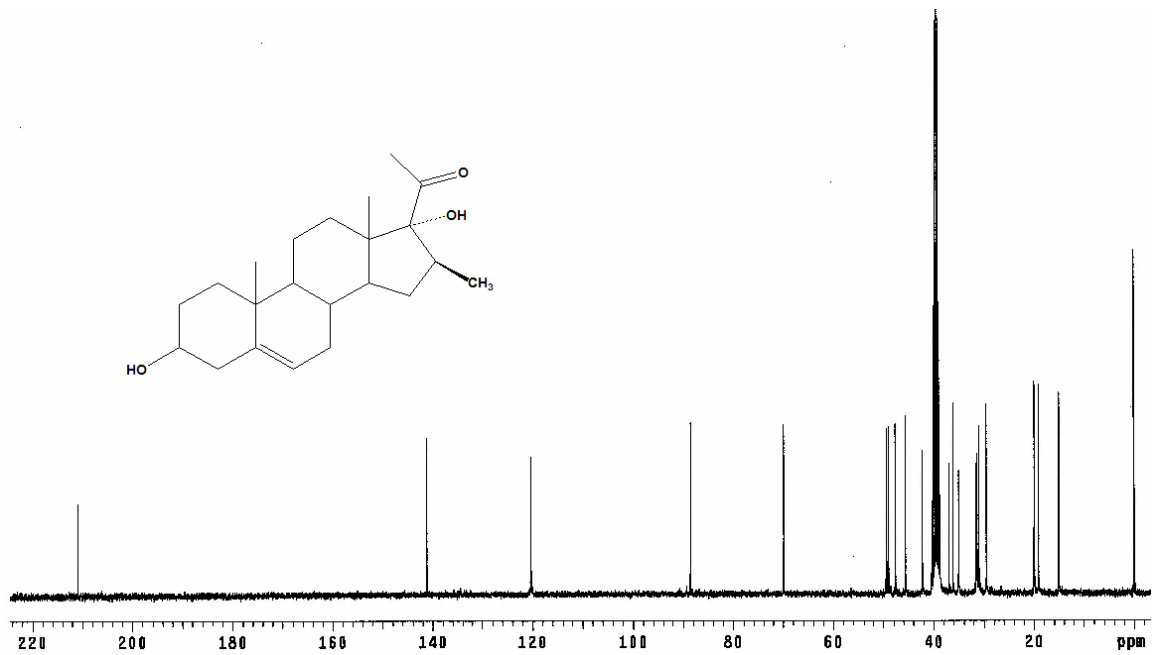
Espectro 25. EMIE del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi-16 β -metil-20-etilendioxi-5-pregno (5).



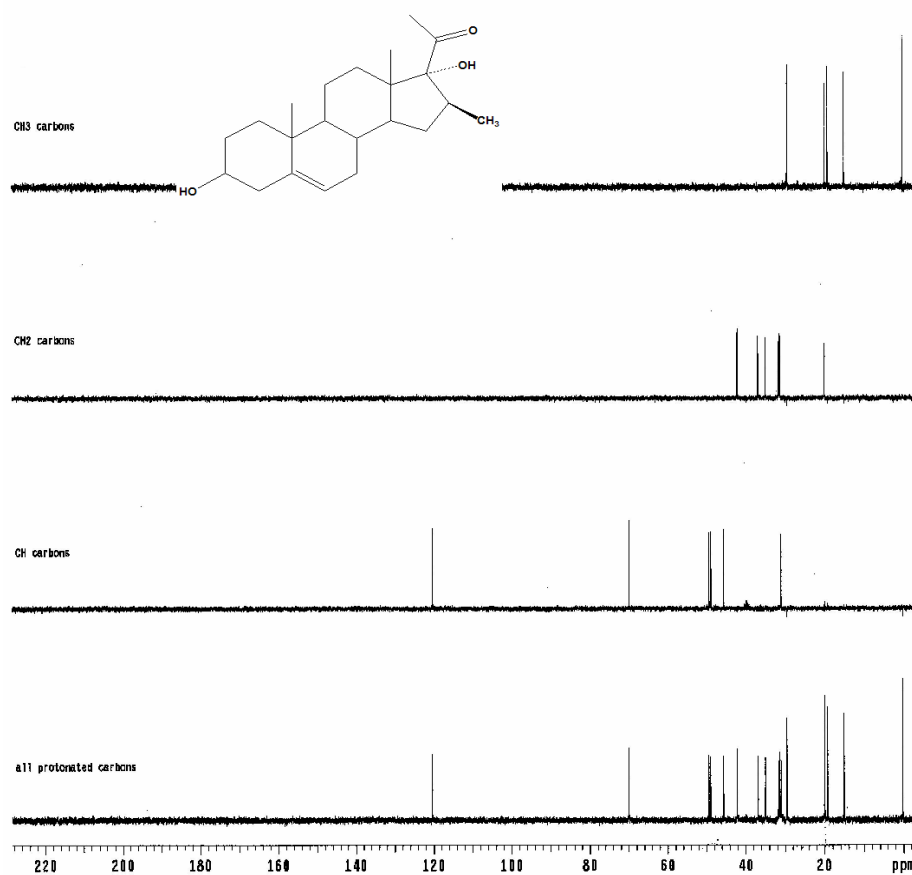
Espectro 26. Infrarrojo (película) del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona (6).



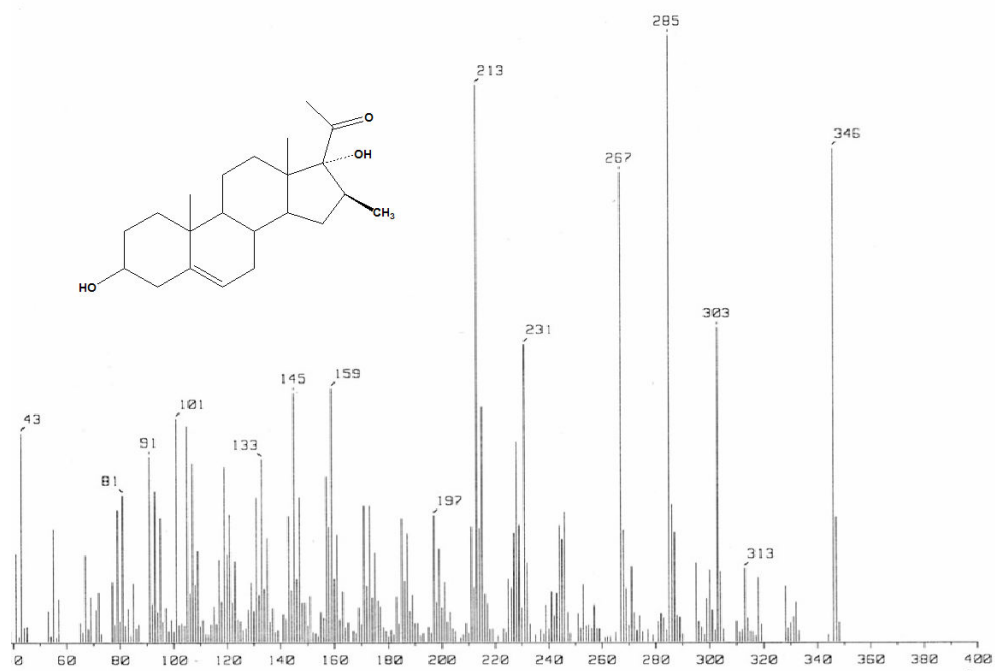
Espectro 27. RMN-¹H del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi- 16β -metil-5-pregnen-20-ona (6).



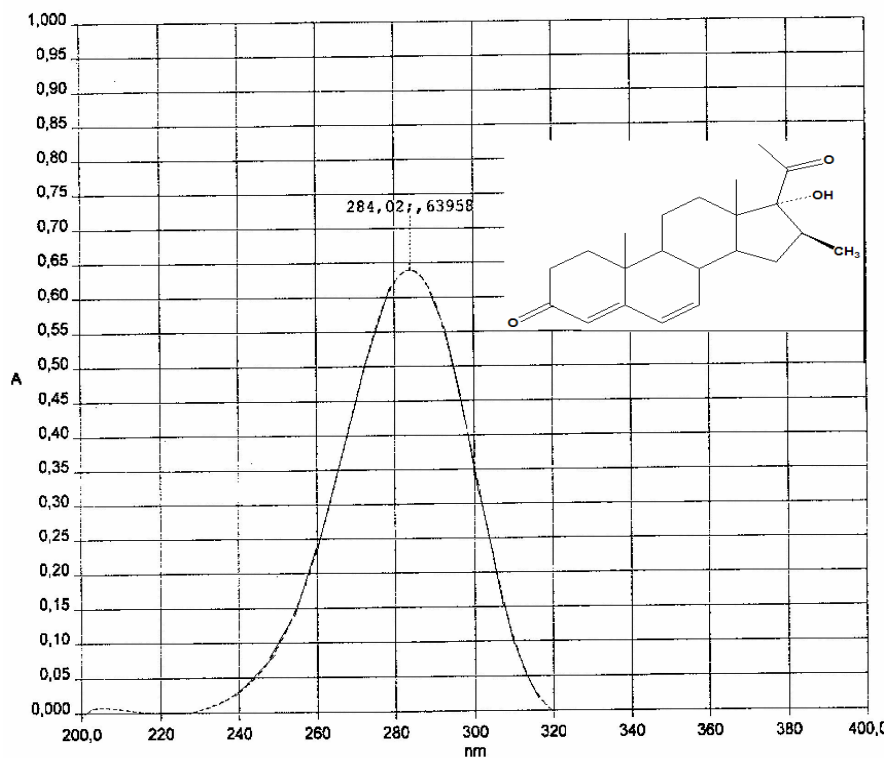
Espectro 28. RMN-¹³C del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi- 16β -metil-5-pregnen-20-ona (6).



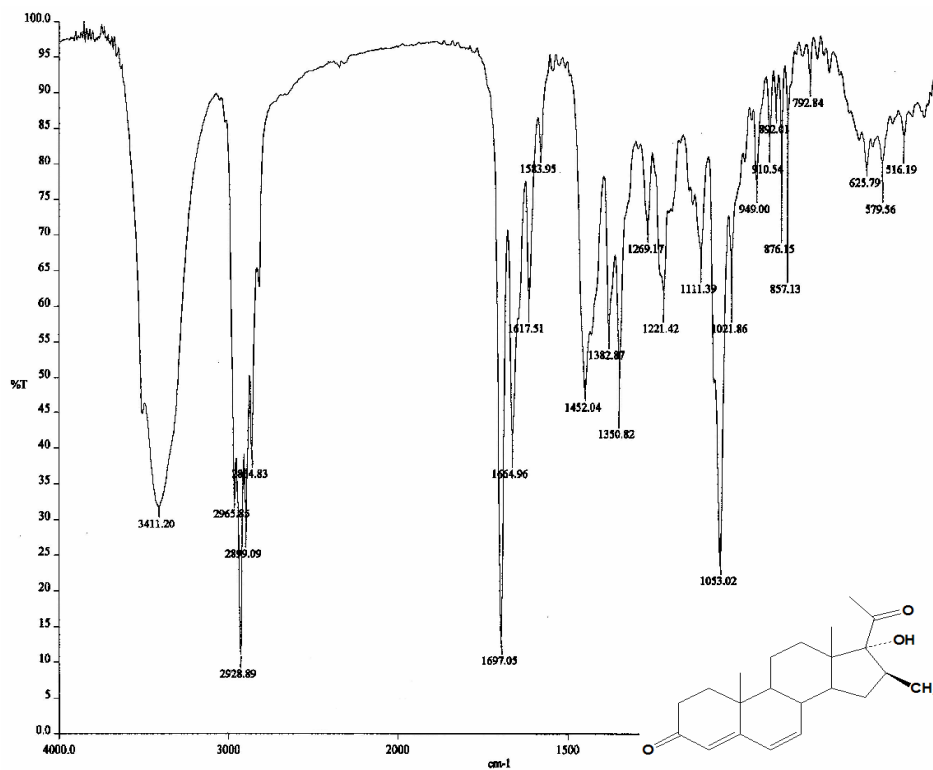
Espectro 29. DEPT del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-5-pregnen-20-ona (6).



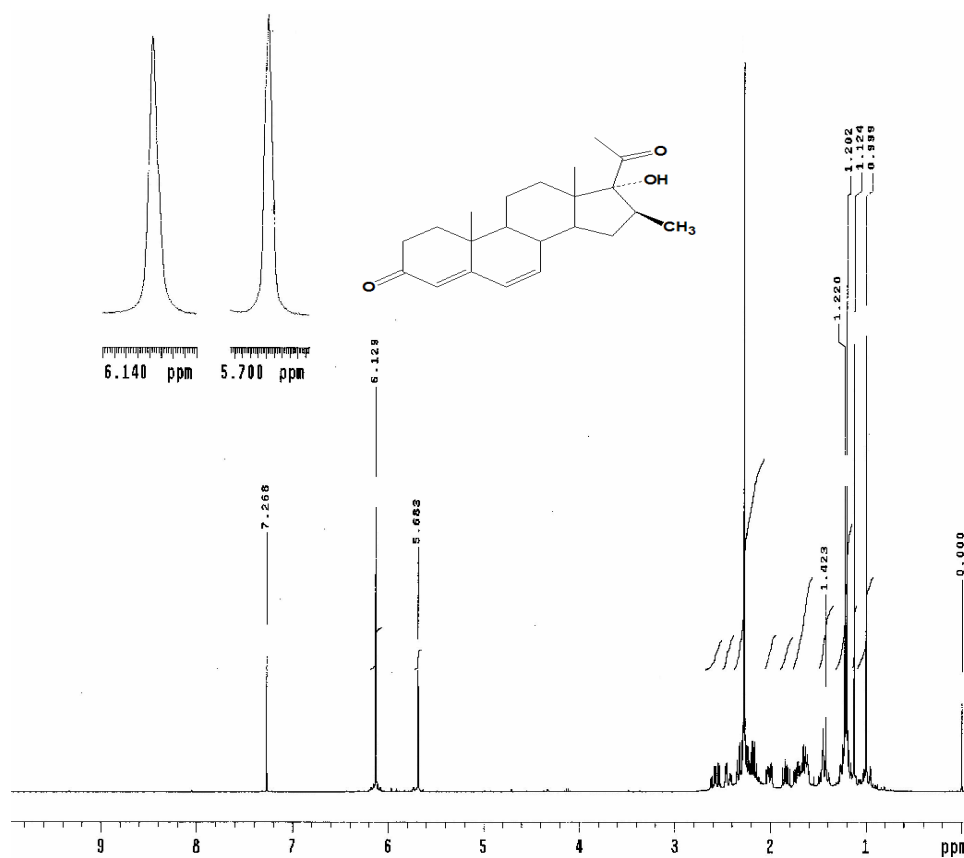
Espectro 30. EMIE del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-5-pregnen-20-ona (6).



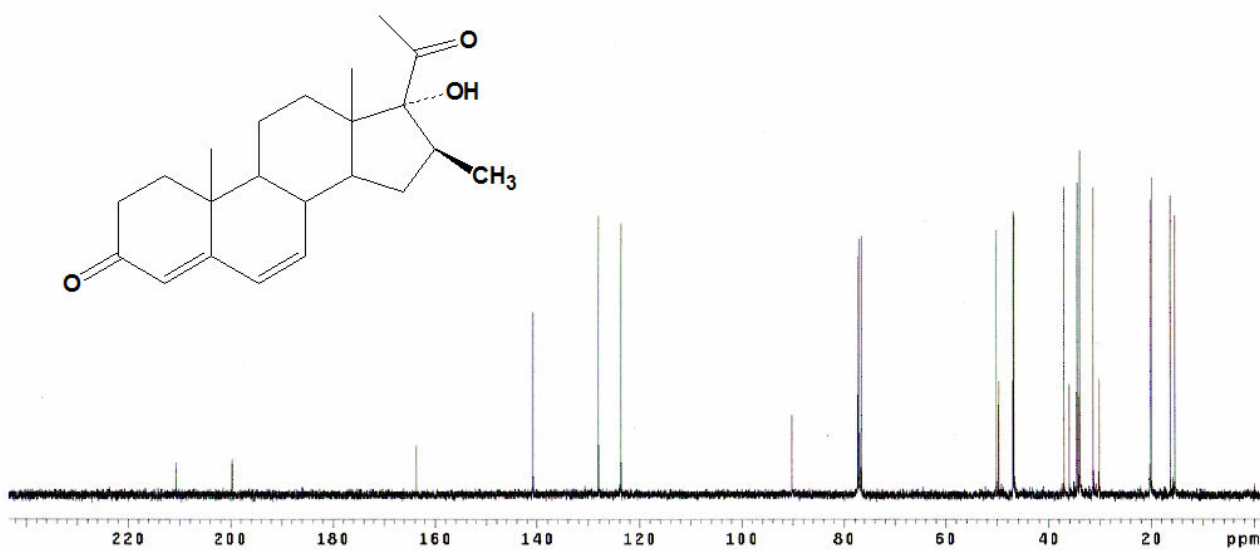
Espectro 31. Ultravioleta del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).



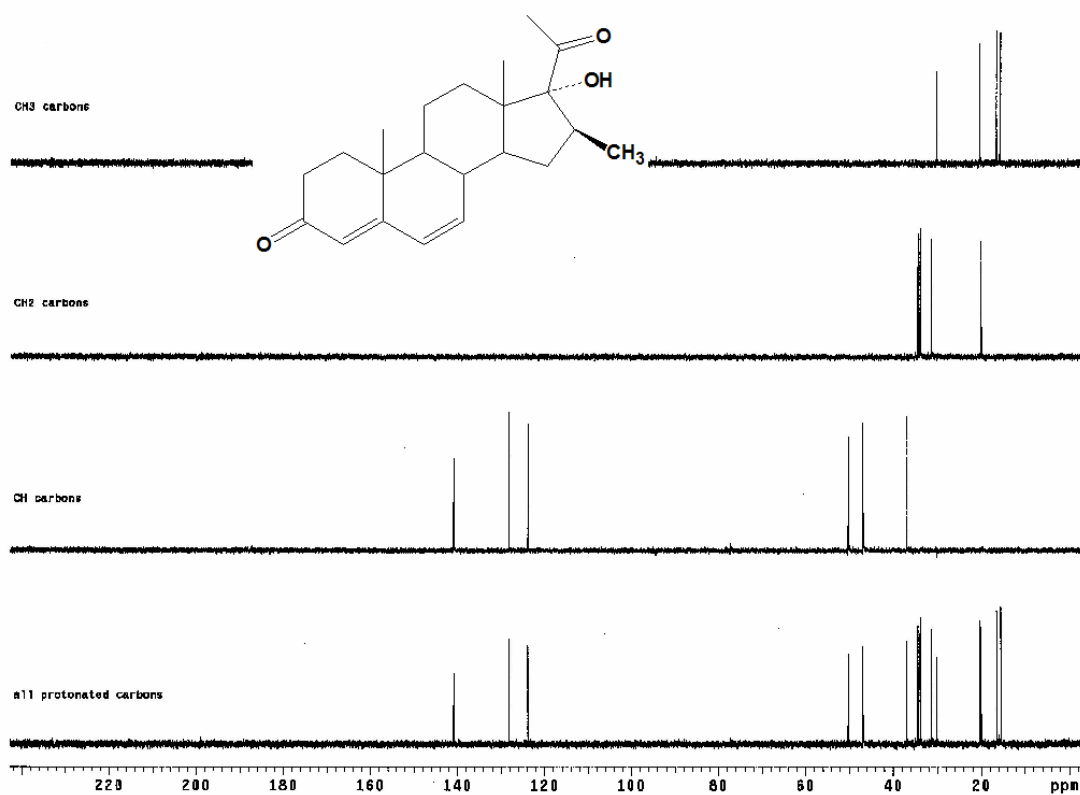
Espectro 32. Infrarrojo (película) del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).



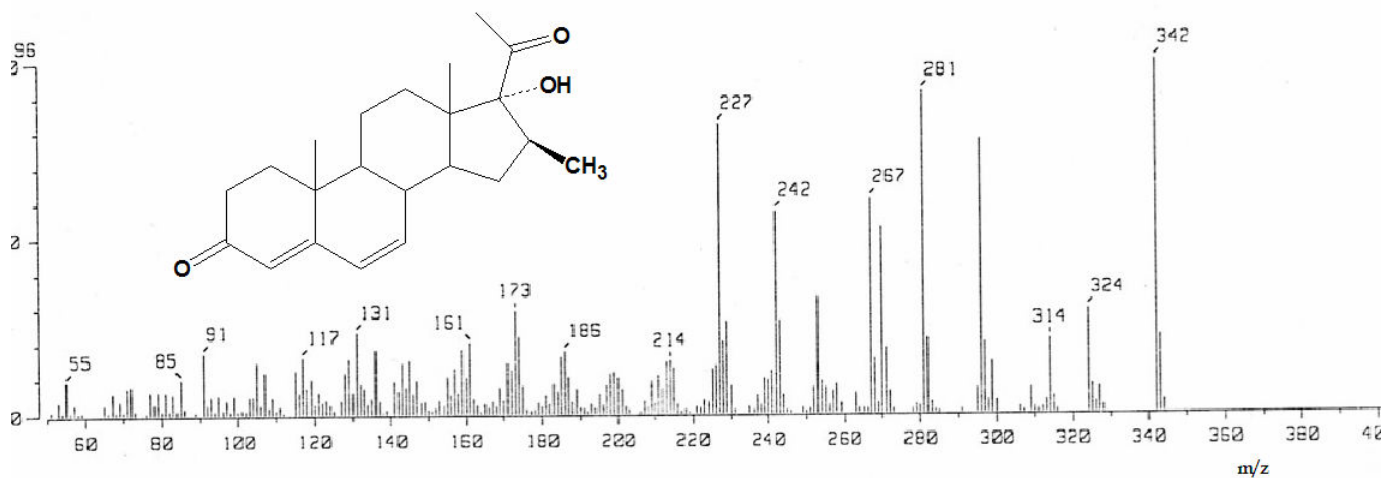
Espectro 33. RMN-¹H del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).



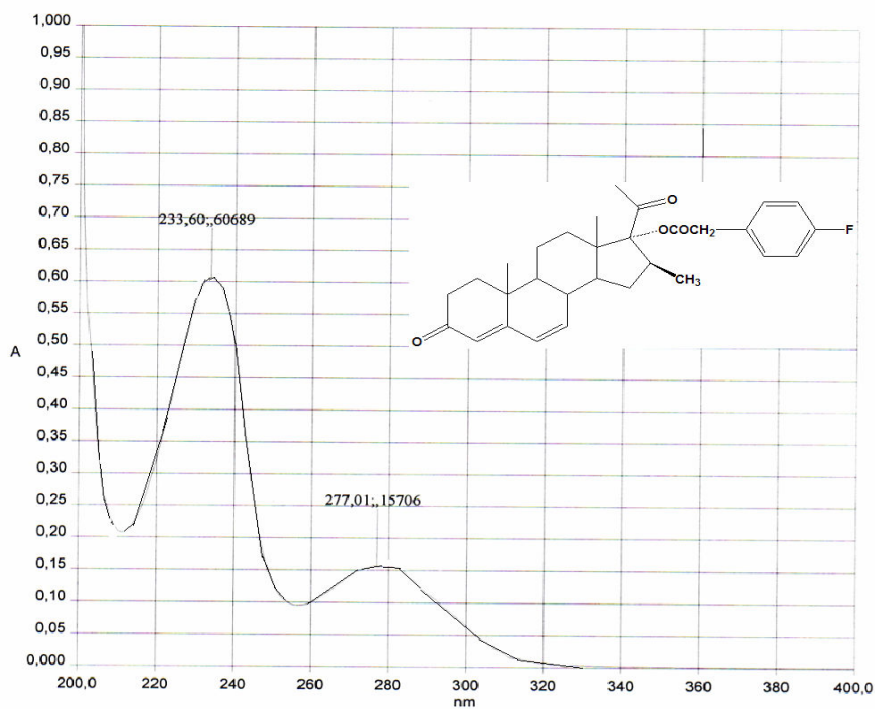
Espectro 34. RMN-¹³C del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).



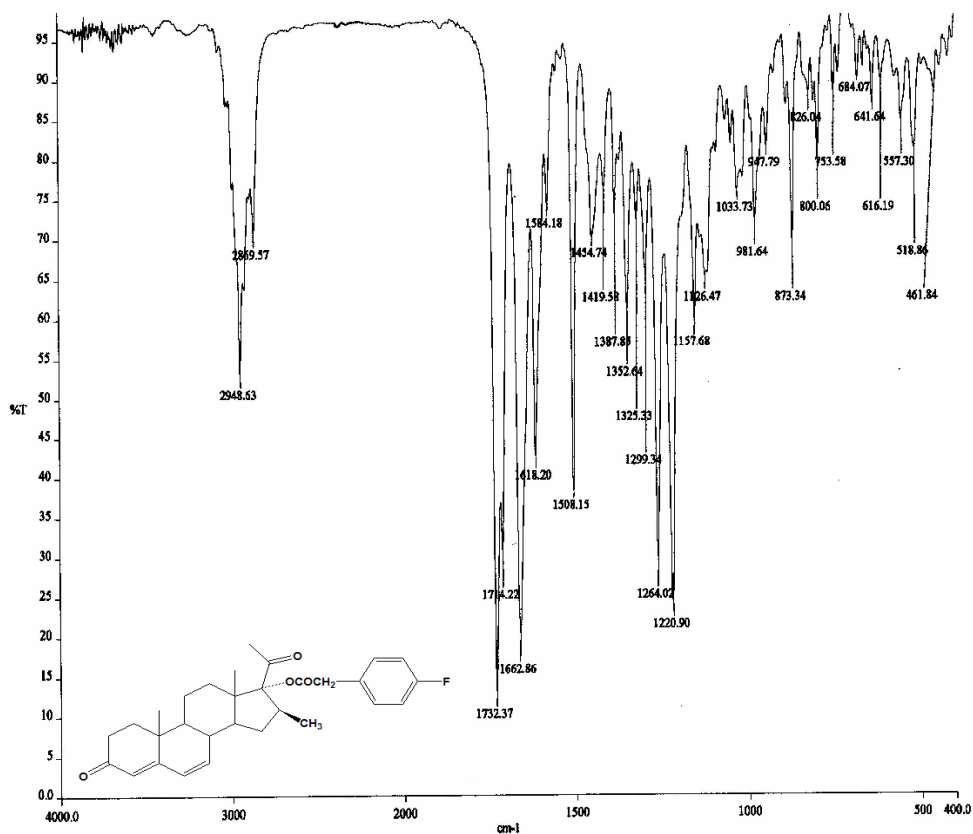
Espectro 35. DEPT del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).



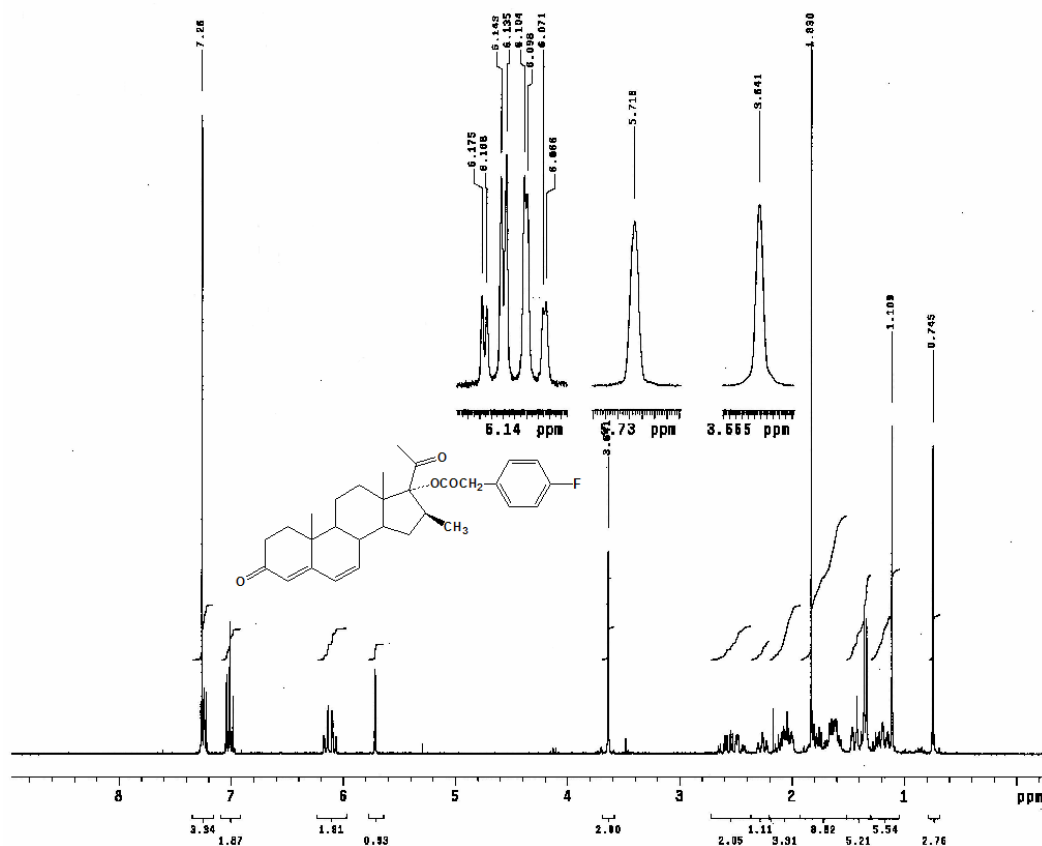
Espectro 36. EMIE del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).



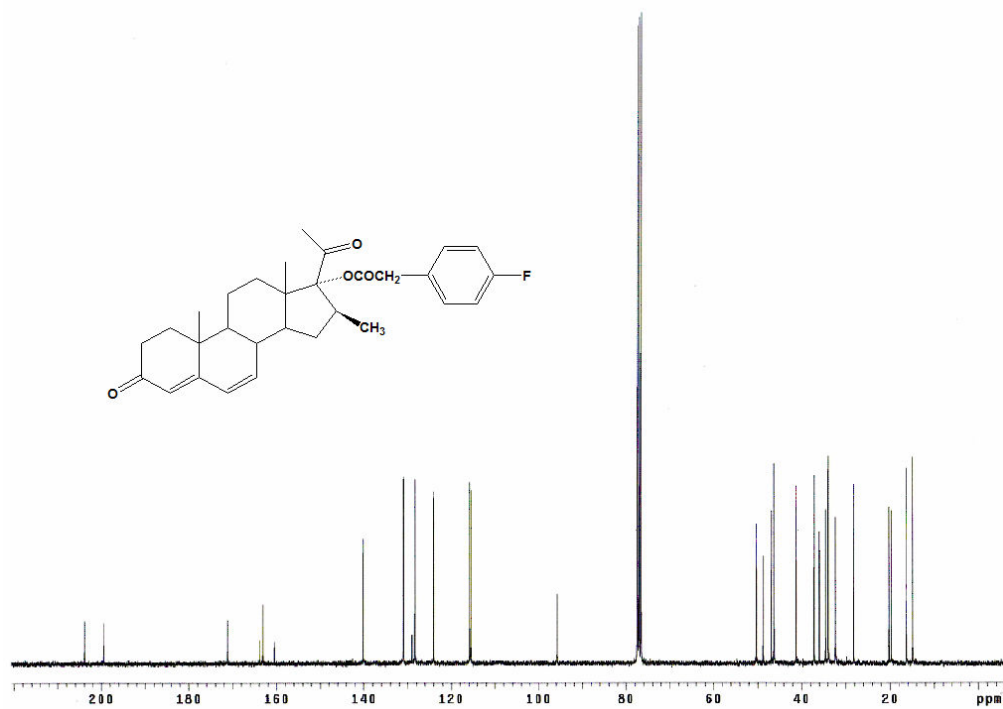
Espectro 37. Ultravioleta del compuesto 17α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).



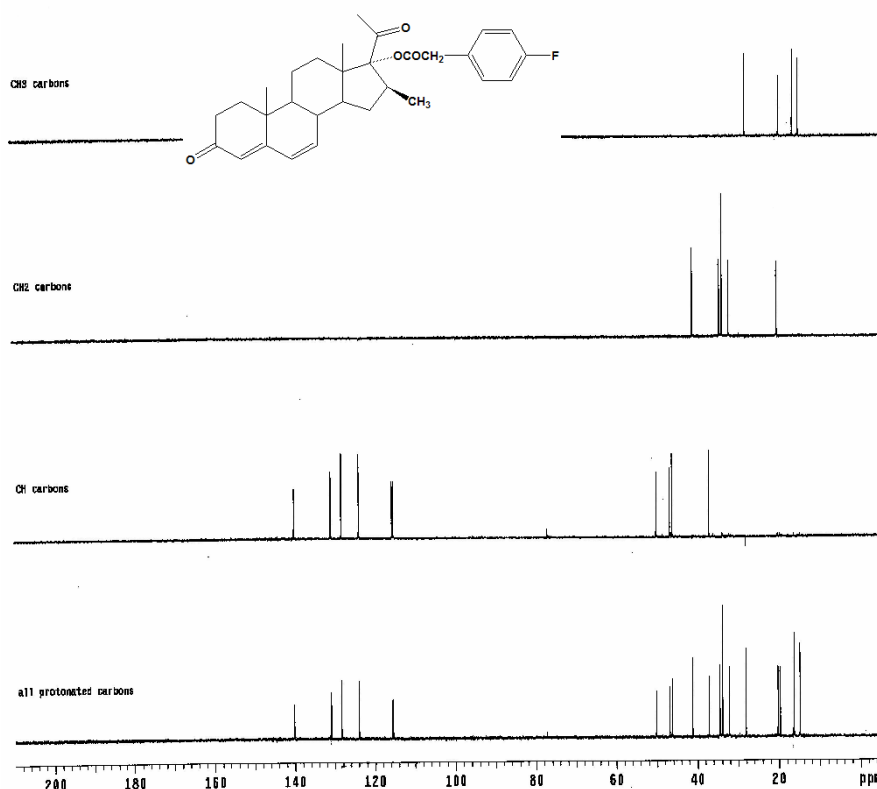
Espectro 38. Infrarrojo (película) del compuesto 17α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).



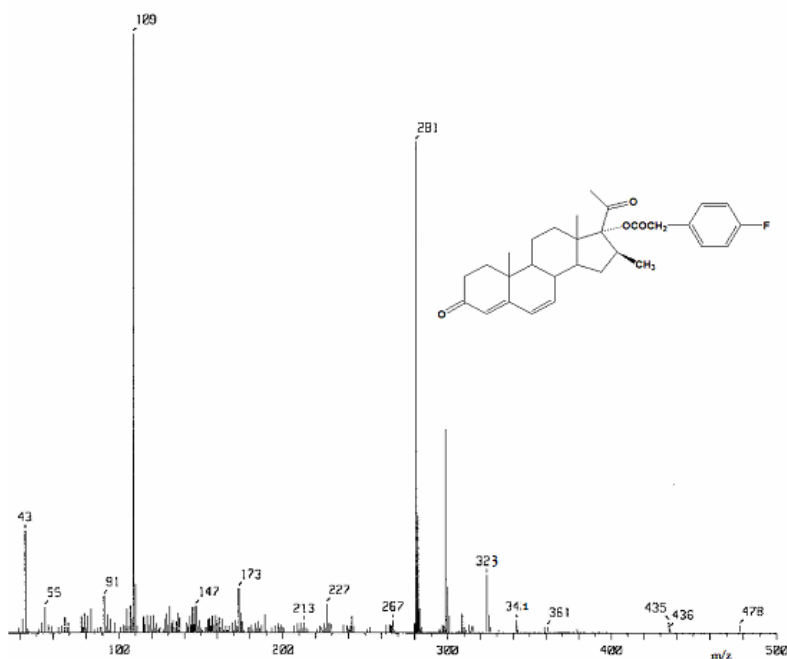
Espectro 39. RMN-¹H del compuesto 17 α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).



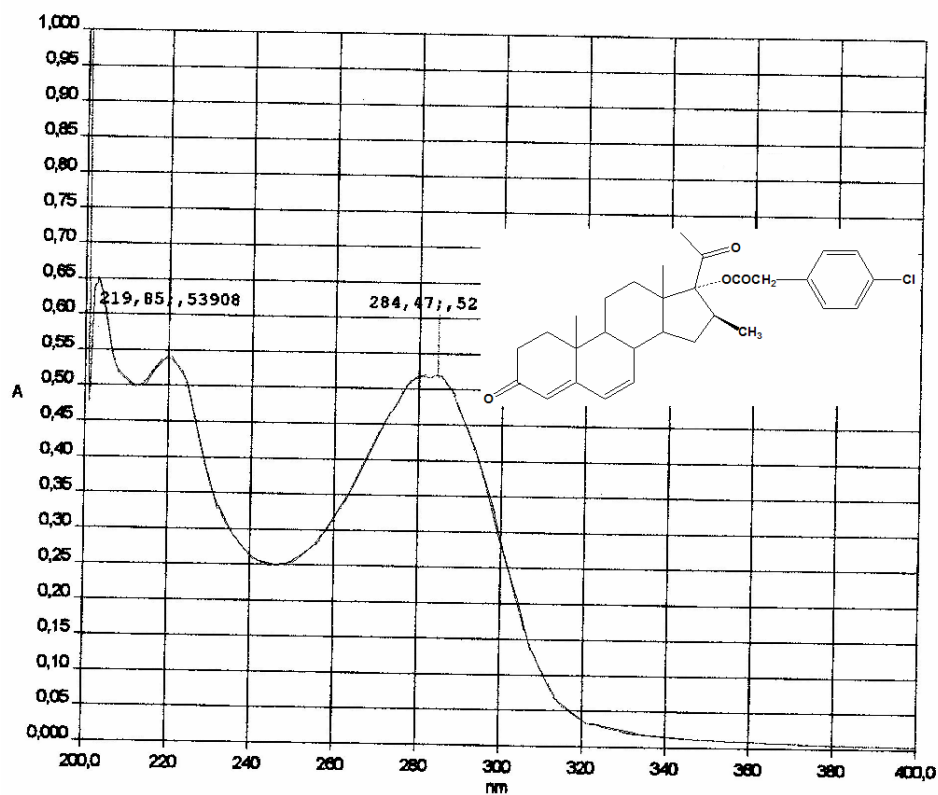
Espectro 40. RMN-¹³C del compuesto 17 α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).



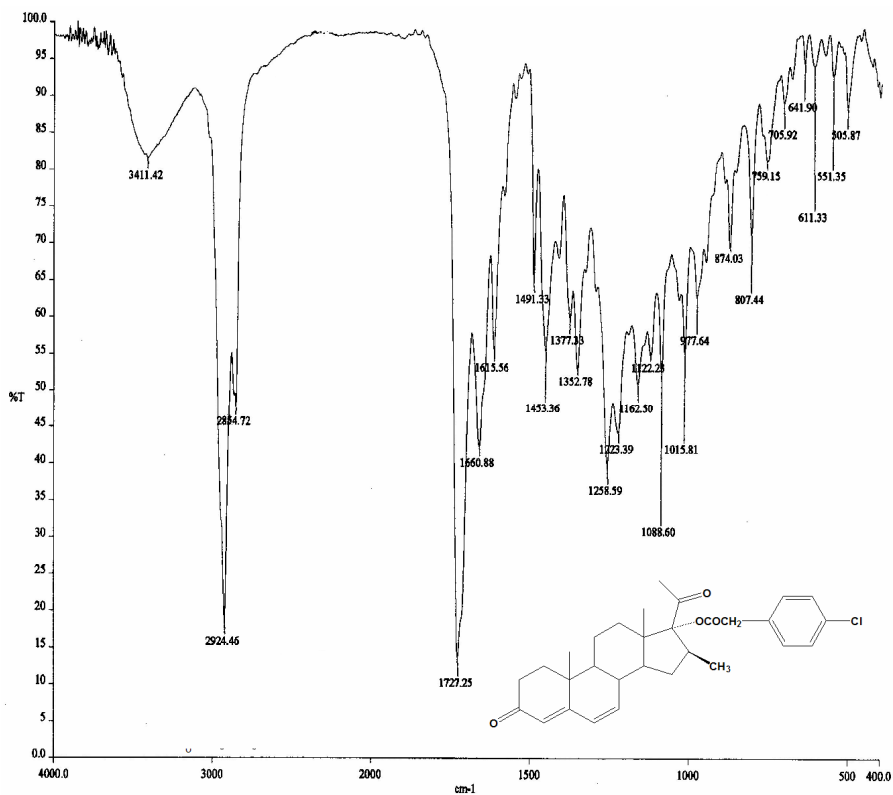
Espectro 41. DEPT del compuesto 17α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).



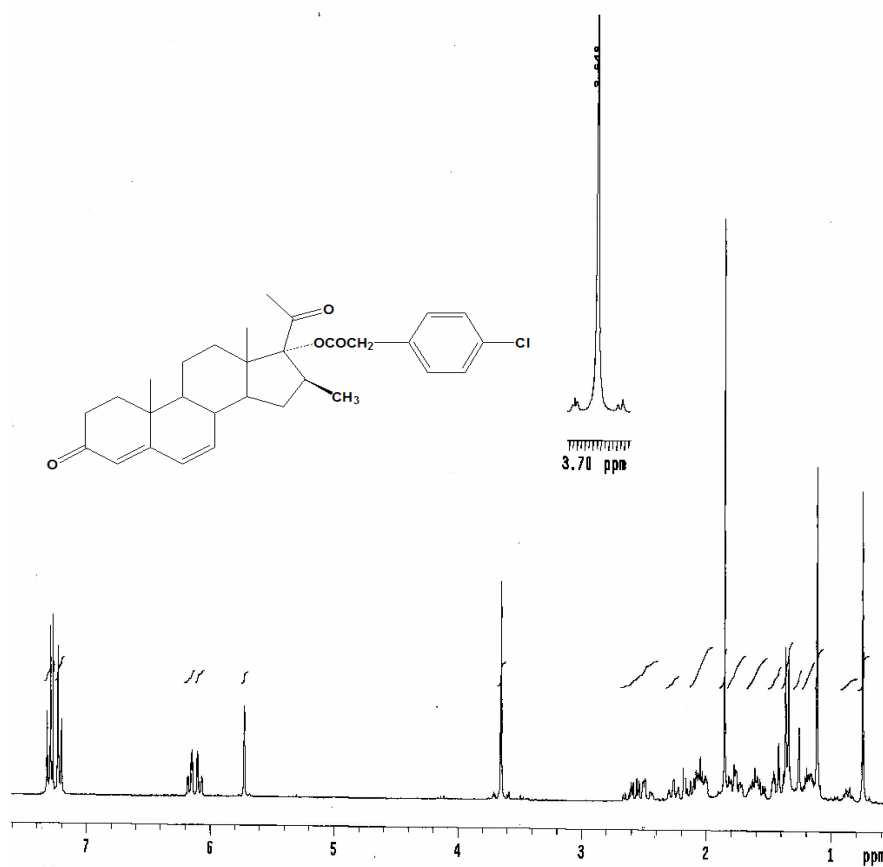
Espectro 42. EMIE del compuesto 17α -[(4-Fluorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).



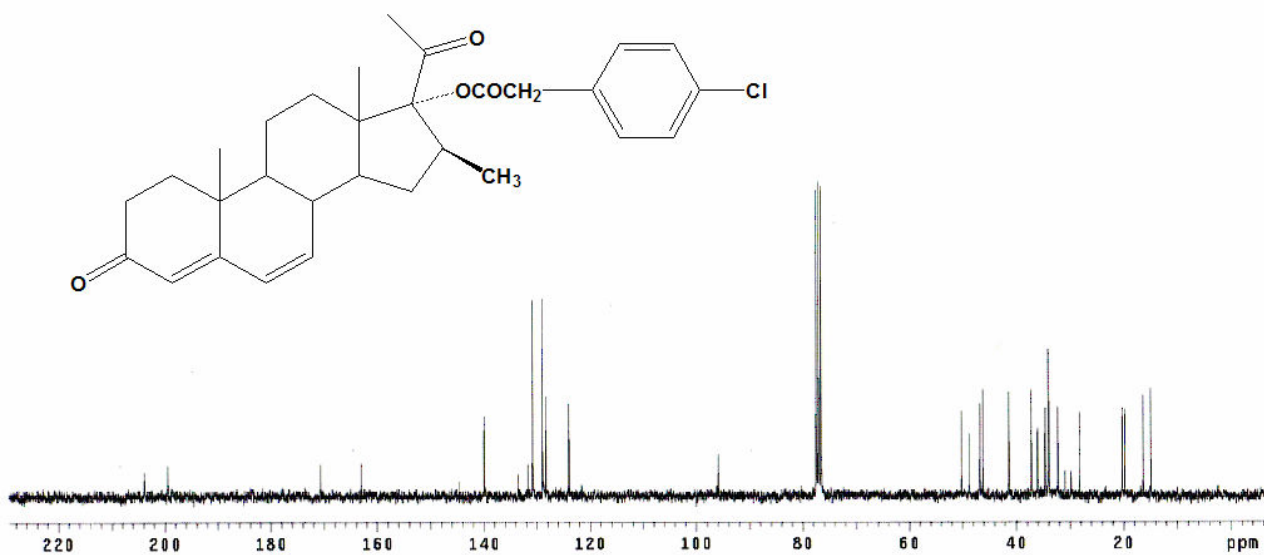
Espectro 43. Ultravioleta del compuesto 17α -[(4-Clorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).



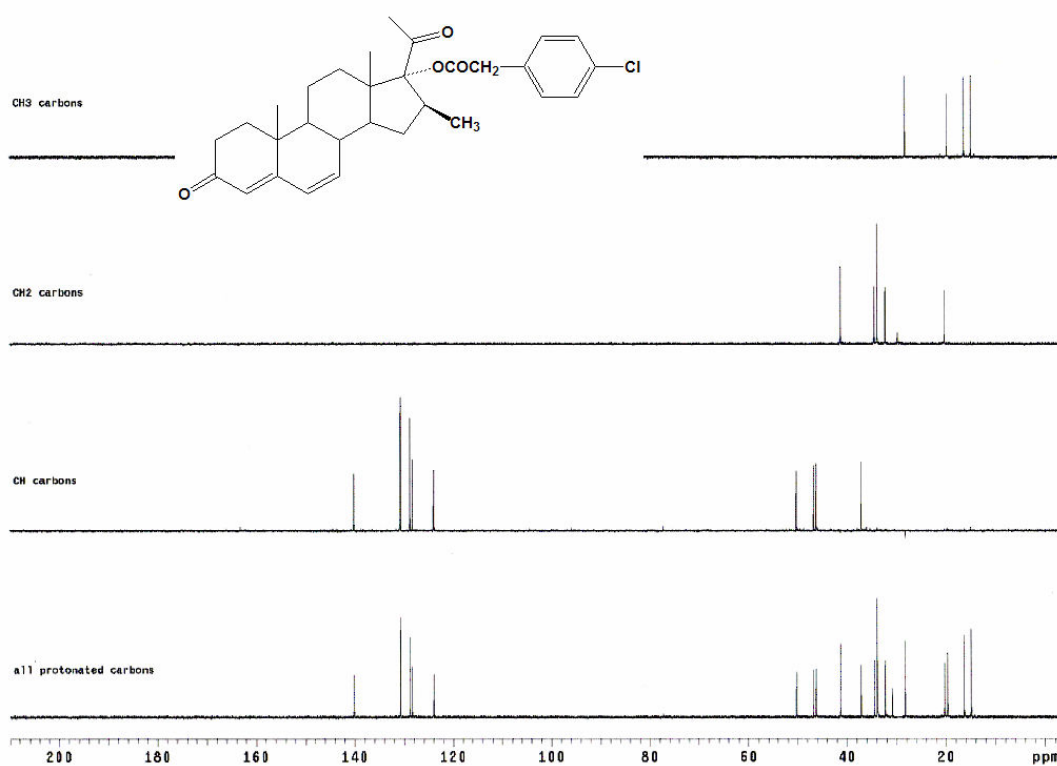
Espectro 44. Infrarrojo del compuesto 17α -[(4-Clorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).



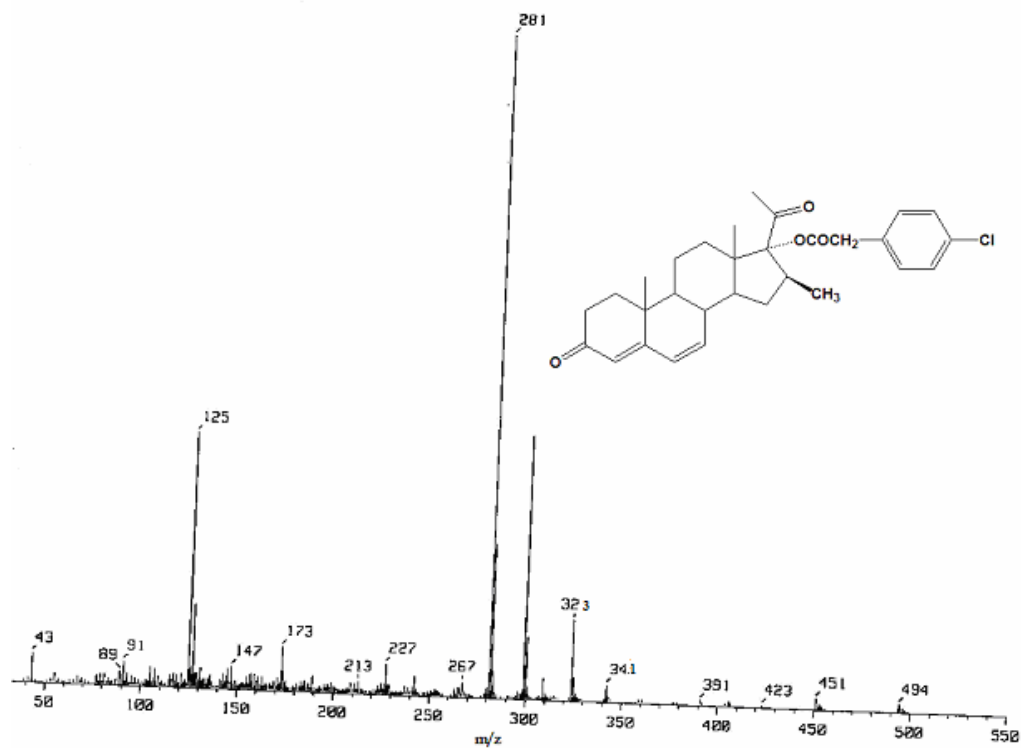
Espectro 45. RMN-¹H del compuesto 17 α -(4-Clorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).



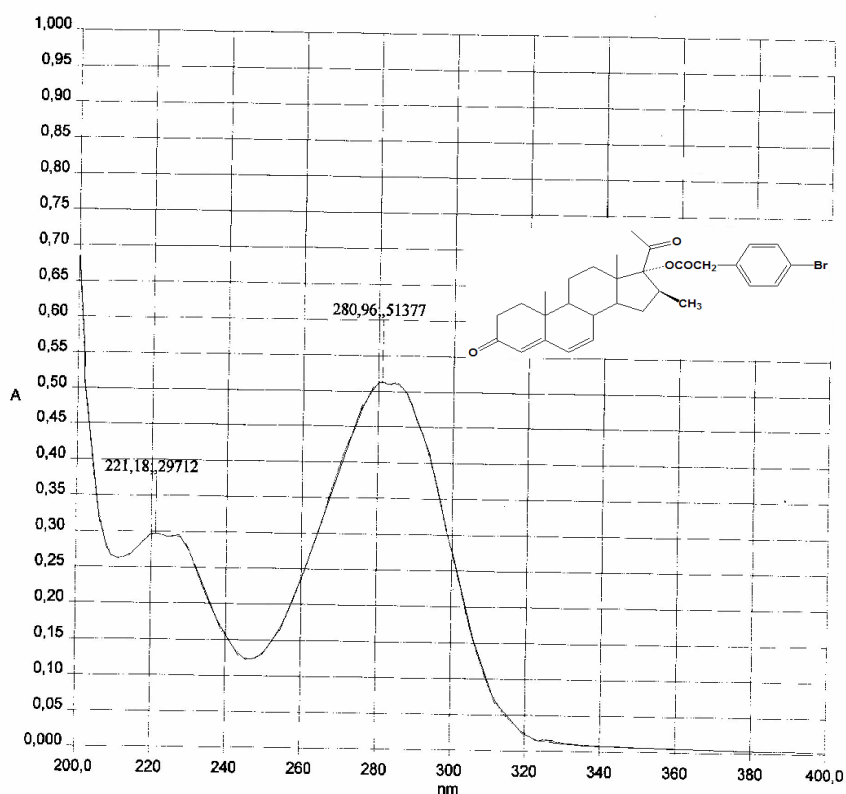
Espectro 46. RMN-¹³C del compuesto 17 α -(4-Clorofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).



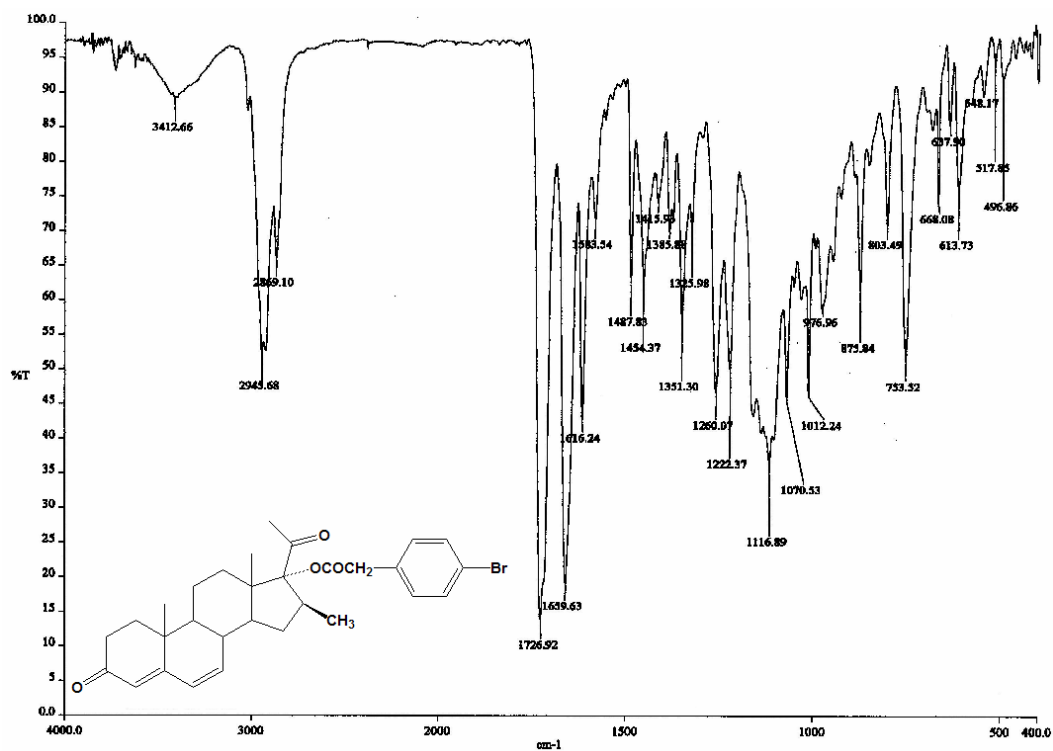
Espectro 47. DEPT del compuesto 17α -[(4-Clorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).



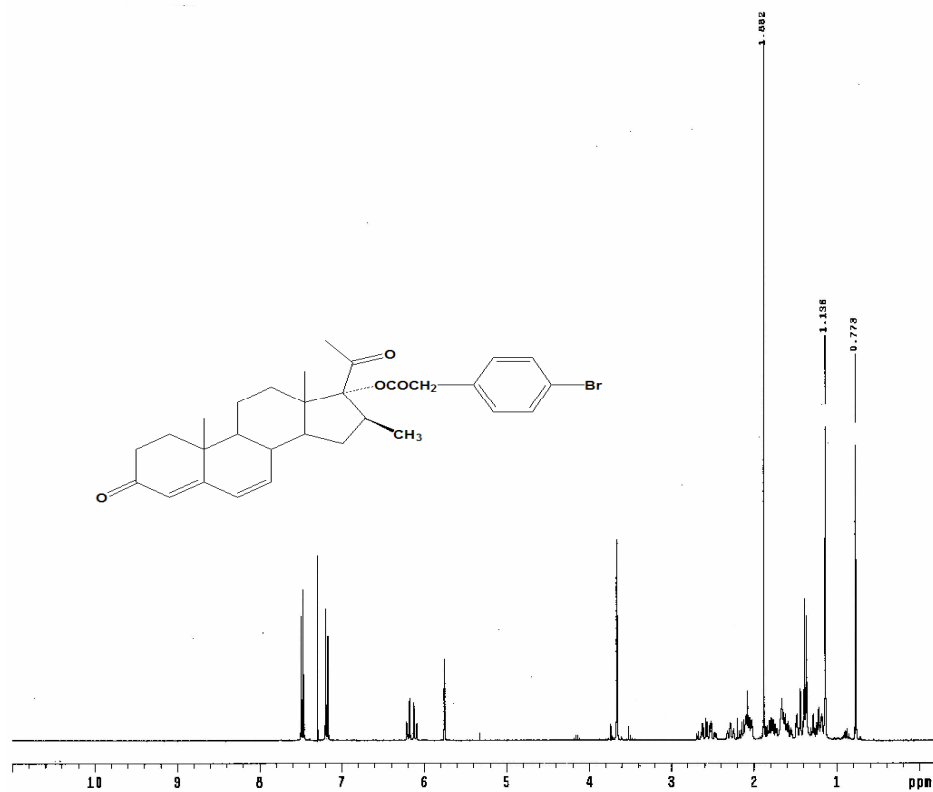
Espectro 48. EMIE del compuesto 17α -[(4-Clorofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).



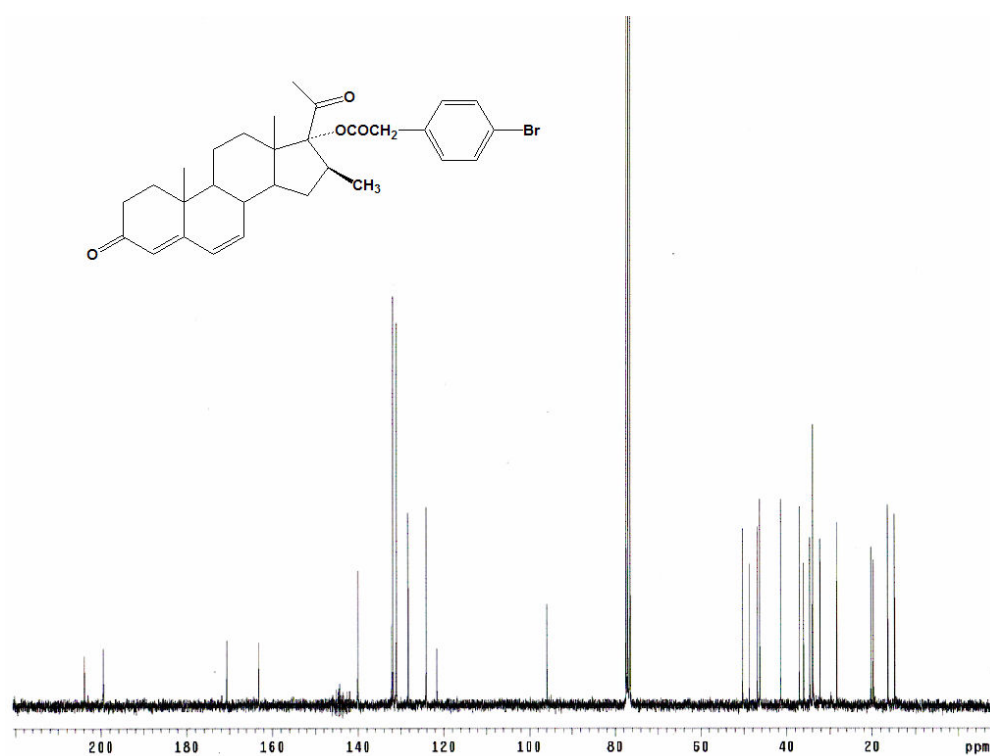
Espectro 49. Ultravioleta del compuesto 17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).



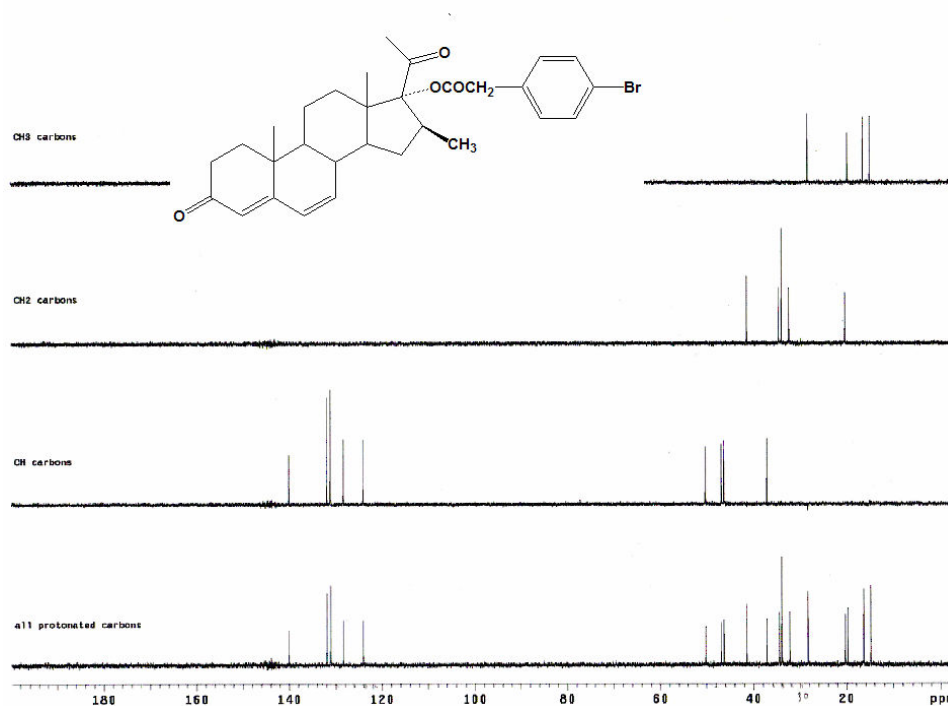
Espectro 50. Infrarrojo (película) del compuesto 17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).



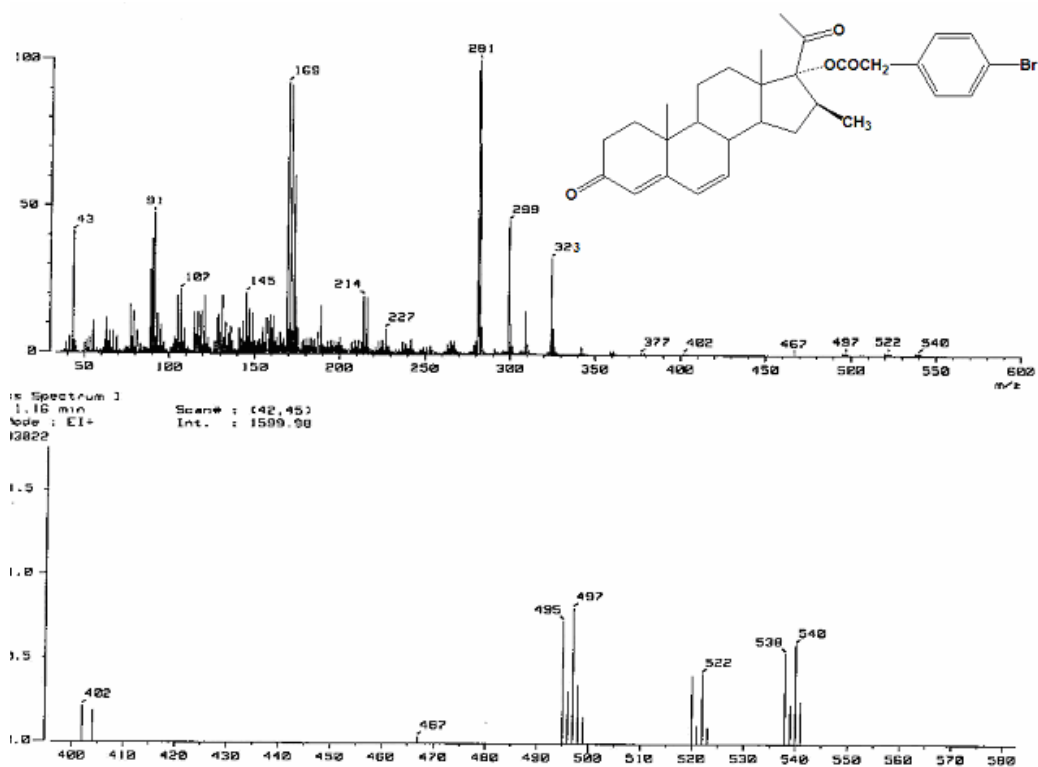
Espectro 51. RMN-¹H del compuesto 17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).



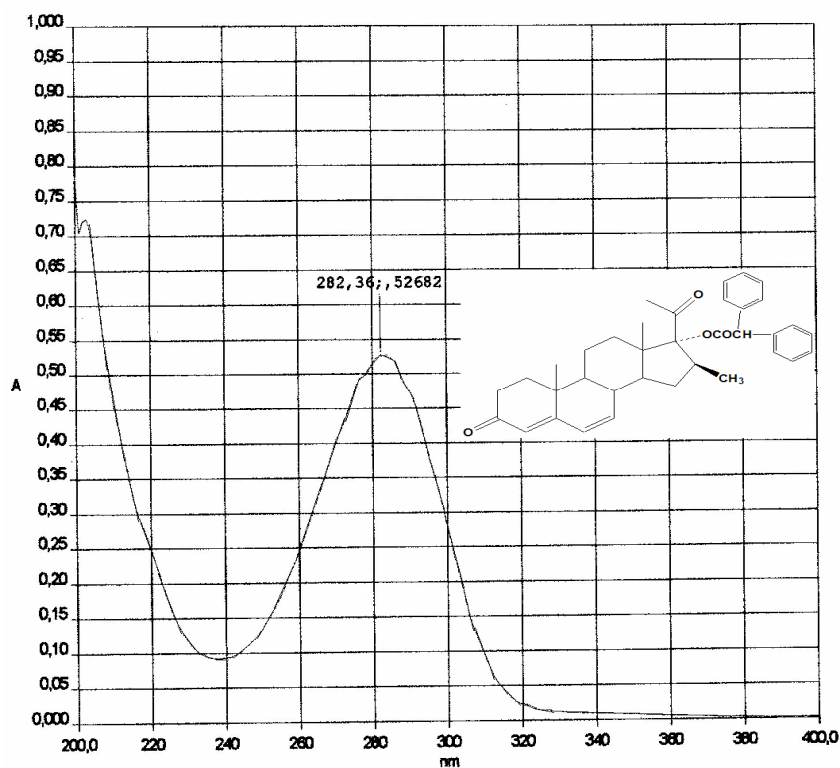
Espectro 52. RMN-¹³C del compuesto 17 α -[(4-Bromofenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).



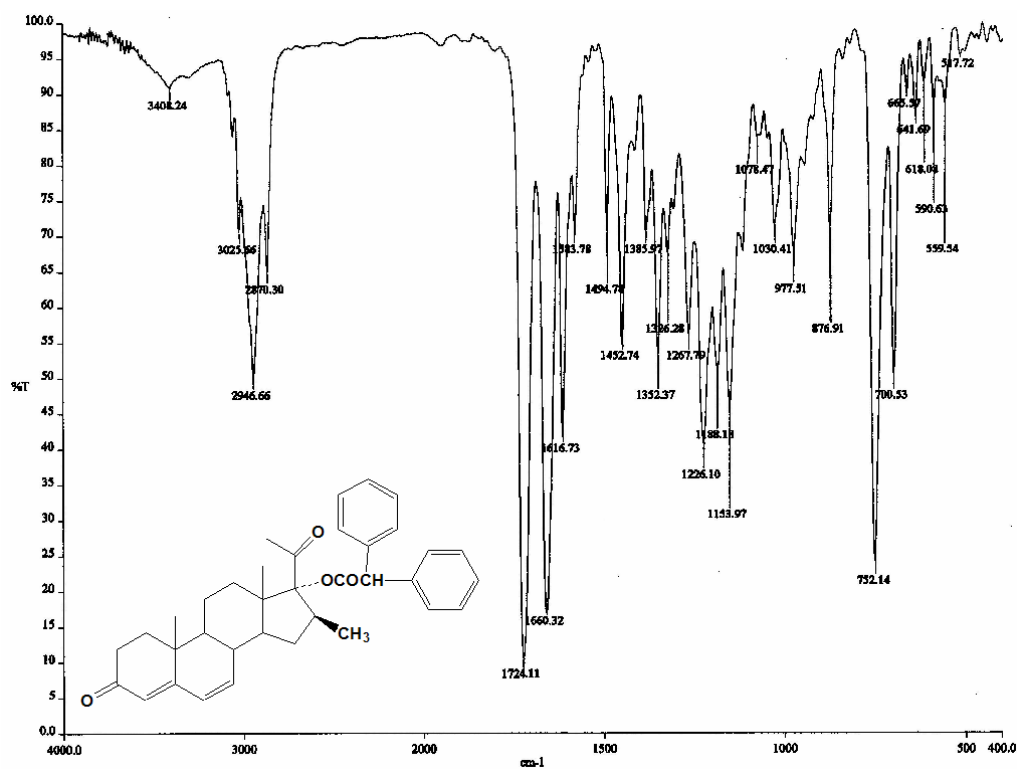
Espectro 53. DEPT del compuesto 17α -[(4-Bromofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).



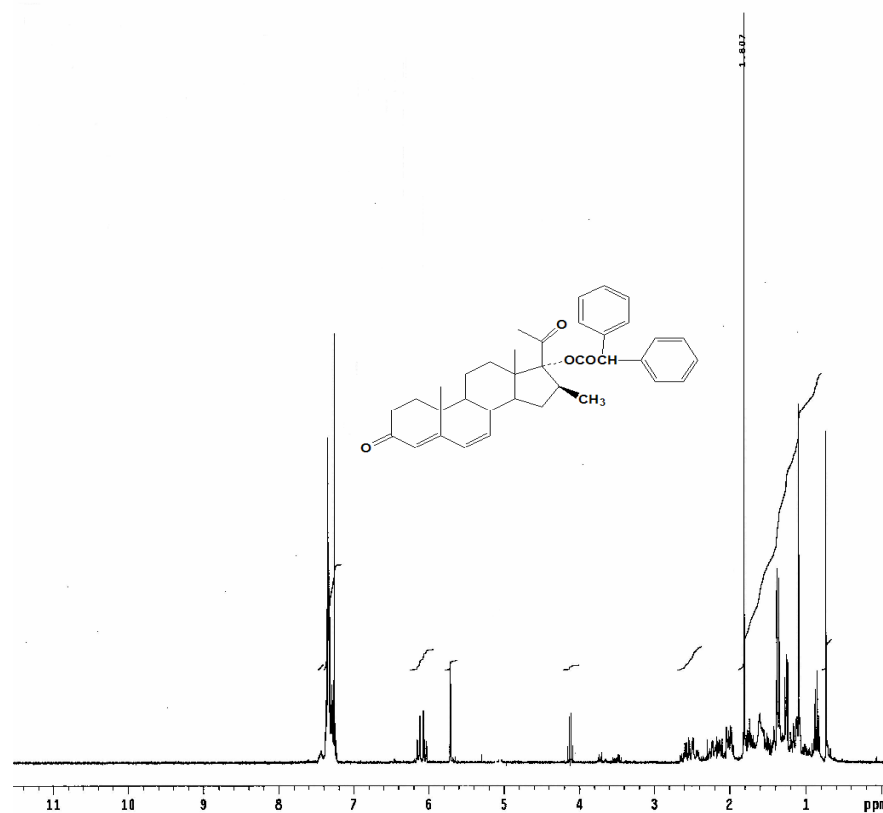
Espectro 54. EMIE del compuesto 17α -[(4-Bromofenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).



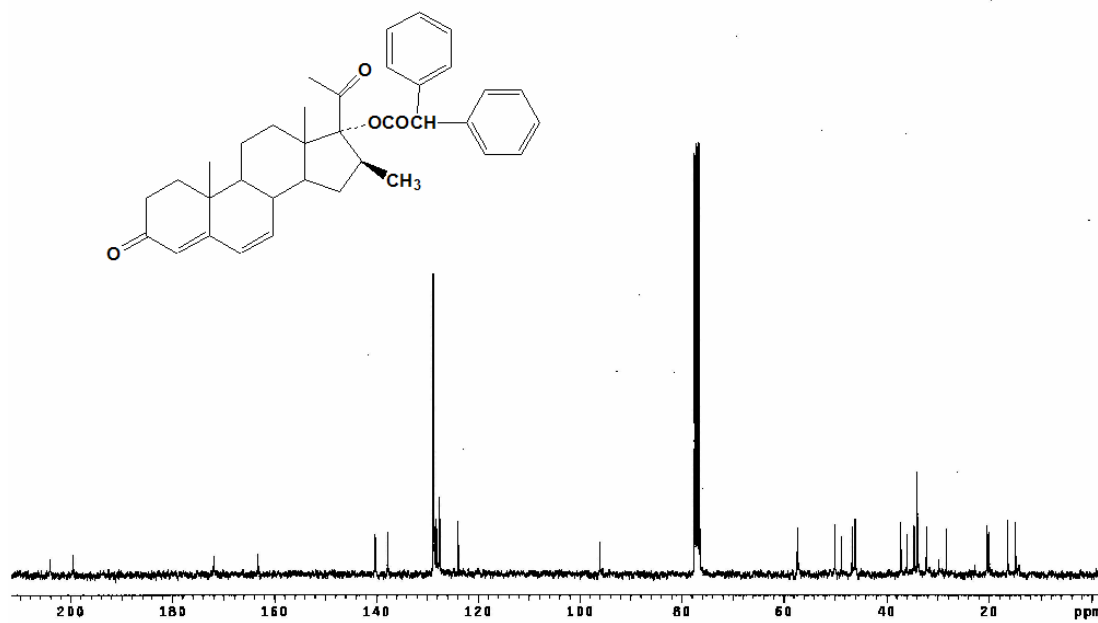
Espectro 55. Ultravioleta del compuesto 17α -[(Difenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).



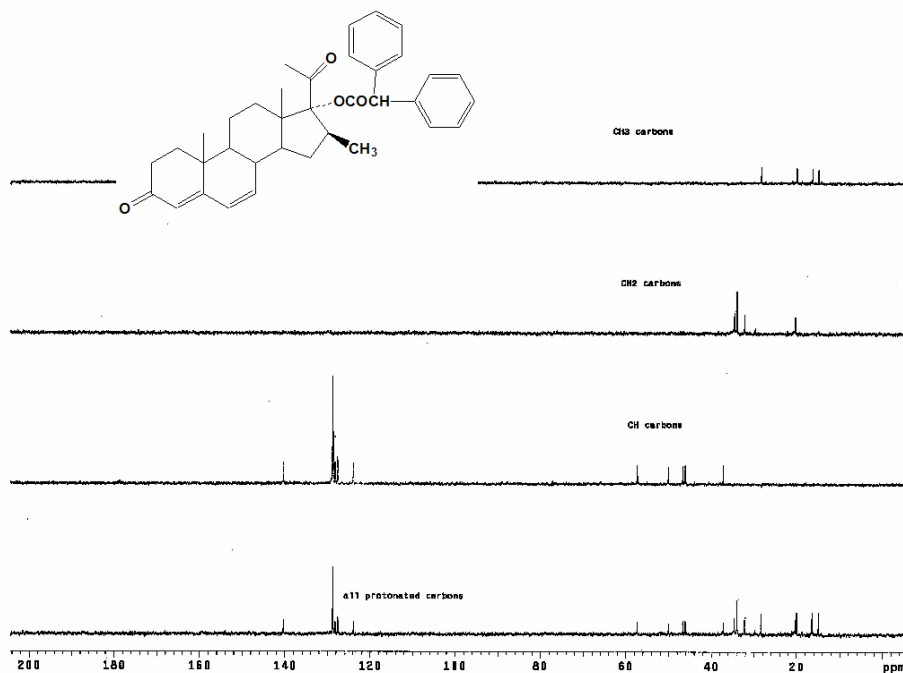
Espectro 56. Infrarrojo (película) del compuesto 17α -[(Difenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).



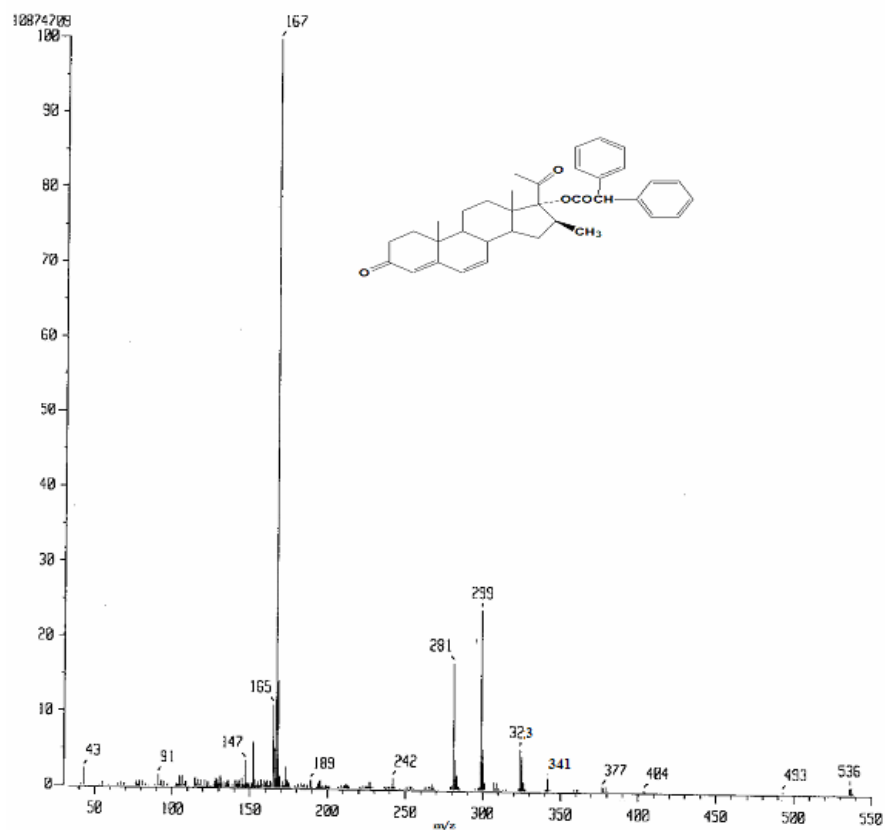
Espectro 57. RMN- ^1H del compuesto 17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).



Espectro 58. RMN- ^{13}C del compuesto 17 α -[(Difenil) acetoxi]-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).



Espectro 59. DEPT del compuesto 17α -[(Difenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).



Espectro 60. EMIE del compuesto 17α -[(Difenil) acetoxi]- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).