

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**"SÍNTESIS DE DERIVADOS DE LA PROGESTERONA
CON UN GRUPO ÉSTER EN C-3
COMO ANTIANDRÓGENOS "**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA.

ANGEL ALEJANDRO CRUZ HERNÁNDEZ



MÉXICO D.F.

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.

AGRADECIMIENTOS

Con gran admiración al Dr. Eugene Bratoeff que me brindo un lugar en el laboratorio además de sus conocimientos. Gracias Dr. Bratoeff

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas. Por su aportación en la determinación de la actividad Biológica de los compuestos sintetizados.

A mis sinodales:

Eugene Bratoeff, Fernando Malanco y Ernestina Cervera, por los comentarios y sugerencias hechos a este trabajo.

Al personal académico de la USAI por la realización de los espectros de IR, RMN ^1H y ^{13}C EM-IE.

A la Dra. Elenita y A Vic. Por todo su tiempo y sus conocimientos. Gracias ya que por sus aportaciones el trabajo en el laboratorio es tan fácil. Y sobre todo Gracias por ser mis amigos.

A mis Amigos y compañeros del Laboratorio 125 del Departamento de Farmacia en el Edificio "E" de la Facultad de Química por el apoyo que brindaron durante la realización de este trabajo

A mis Amigos de la FACULTAD DE QUÍMICA. Con quienes tanto compartí durante más de 5 años

A MIS PAPAS: ROSALBA Y LINO.

Solo puedo decirles muchas gracias, por que siempre han sido el apoyo para lograr mis metas. Ahora les presento el fruto de su esfuerzo. GRACIAS LOS AMO.

A MIS HERMANOS: GUADALUPE Y LINO.

Un logro más, que como familia conseguimos. Sepan también que siempre han sido un ejemplo para mí. Gracias los Amo sigamos luchando.

A MI FAMILIA: ANDREA, PABLO, ROSA Y LORENZO PRIMOS Y TIOS.

Gracias a todos por que siempre me han apoyado y ofrecido una sonrisa, un consejo, tantas alegrías y un regaño cuando fue necesario. Comparto con todos ustedes este trabajo.

A LORENA.

Mi chava también gracias a ti por todo el tiempo y apoyo a mi vida. Te Amo.

Y finalmente el mayor agradecimiento a DIOS gracias por mi vida, mi familia y todas las personas que pusiste en mi camino para lograr este paso más.

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 La Próstata.....	4
2.2 Hiperplasia Prostática Benigna.....	4
2.3 Cáncer de Próstata.....	5
2.4 Tratamientos para el Cáncer de Próstata e HPB.....	7
2.5 Esteroides.....	7
2.5.1 Clasificación de los Esteroides.....	8
2.5.2 Efectos fisiológicos de los Esteroides.....	9
2.5.3 Otros Usos de los Esteroides.....	11
2.6 Andrógenos.....	11
2.6.1 Producción y función da la testosterona.....	12
2.6.2 La enzima 5 α -reductasa y la transformación de Testosterona a Dihidrotestosterona.....	13
2.7 Antiandrógenos.....	15
2.7.1 Clasificación de los antiandrógenos.....	16
2.7.2 Antiandrógenos No Esteroidales.....	16
2.7.3 Antiandrógenos Esteroidales.....	17
2.8 Síntesis de Antiandrógenos.....	18
2.8.1 Síntesis de Antiandrógenos Esteroidales como alternativa de tratamiento para HPB y el Cáncer de próstata.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo General.....	20
3.2 Objetivos Particulares.....	20
4. METODOLOGÍA.....	21
4.1 Etapa 1. Síntesis y Caracterización de los Compuestos.....	21
4.2 Descripción de la Ruta de Síntesis.....	24
4.2.1 Caracterización la Materia Prima (A-1).....	24
4.2.2 Síntesis de (A-2): 3-Acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona.....	24
4.2.3 Síntesis de (A-3): 3-Acetoxi-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.....	24
4.2.4 Síntesis de (A-4): 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.....	25
4.2.5 Síntesis de (A-5): 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.....	26
4.2.6 Síntesis de (A-6): 3, β -(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.....	26
4.2.7 Síntesis de (A-7): 3, β -(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.....	27
4.3 Etapa 2. Descripción de las pruebas biológicas.....	28
4.3.1 Material Biológico.....	29
4.3.2 Ensayo in vitro con la ezima 5 α -reductasa.....	29

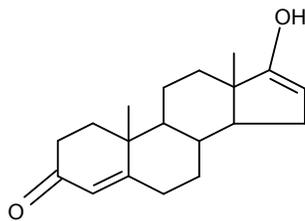
5. RESULTADOS	31
5.1 Resultados de la Sección Química.	31
5.1.1 Acetato de 16-dehidropregnenolona (A-1). Materia Prima.	31
5.1.2 Caracterización de (A-2): 3-Acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona.....	32
5.1.3 Caracterización de (A-3): 3-Acetoxi-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.	34
5.1.4 Caracterización de (A-4): 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.	36
5.1.5 Caracterización de (A-5): 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.	37
5.1.6 Caracterización de (A-6): 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien- 6,20-diona.	39
5.1.7 Caracterización de (A-6): 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien- 6,20-diona.	41
5.2 Resultados de la Sección Biológica.....	43
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
6.1 Discusión de la Síntesis Química.	45
6.2 Discusión de las Pruebas Biológicas.	56
7. CONCLUSIONES	57
8. BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXO	61
Espectros de IR.	62
Espectros de RMN ¹ H.....	66
Espectros de RMN ¹³ C.....	70
Espectros de RMN ¹³ C DEPT.....	74
Espectros de EM-IE.....	78

1. INTRODUCCIÓN

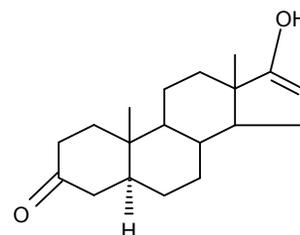
El cáncer de la próstata es la segunda neoplasia diagnosticada, solo detrás del cáncer de piel y es la segunda causa de muerte por cáncer en la población masculina. Este mal surge cuando las células comienzan a multiplicarse sin ningún control y de manera progresiva hasta llegar a la formación de un tumor, si este tumor no invade los tejidos vecinos y queda circunscrito se forma un tumor benigno. Si el tumor invade tanto los tejidos vecinos como los que se encuentran a distancia (metástasis) entonces se forma un tumor maligno ó cáncer (1).

Estos padecimientos, están relacionados con una serie de factores etiológicos en común como: la Alimentación, la Raza, la Edad, los Factores Hereditarios y los Factores Hormonales (2). Los Factores Hormonales son los que se consideran más importantes, ya que los andrógenos son hormonas esteroidales responsables de regular la fisiología sexual de varón promoviendo y manteniendo las características sexuales.

El andrógeno predominante en la circulación sanguínea es la testosterona (T), sin embargo el andrógeno activo es la dihidrotestosterona (DHT),(3) La transformación de la testosterona (T) endógena a su metabolito DHT se lleva a cabo en la presencia de la enzima 5α -reductasa y el cofactor NADHP. La DHT es un potente andrógeno que se relaciona con diversos padecimientos como el acné, la hiperplasia protática benigna y el cáncer prostático.



(T) Testosterona



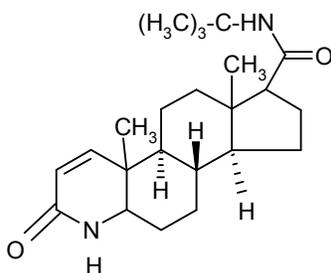
(DHT) 5α -Dihidrotestosterona

Fig. 1. Andr6genos de mayor Importancia.

Los tratamientos que actualmente se utilizan para el control de estos padecimientos van desde la radiación y la cirugía, empleados principalmente para eliminar el cáncer local, las dietas bajas en colesterol (ya que es precursor de hormonas como la T y la DHT), la Terapia Hormonal (utilizando compuestos esteroideos), aunque estos presentan efectos secundarios importantes como, incontinencia, lesión intestinal, impotencia sexual y efectos propios de la radiación (4).

Con base en lo anterior, la inhibición de la síntesis de los metabolitos, activos de los andrógenos, constituye una opción, para el tratamiento de la HPB y el Cáncer de Próstata.

Actualmente se dispone de compuestos sintéticos para inhibir la acción andrónica de la T y la DHT, uno de ellos es la finasterida (fig. 2). Cuyo nombre comercial es Proscar, es un fármaco que inhibe la actividad de la enzima 5α -reductasa tipo 2 que se encuentra presente en la próstata (4).



Finasterida

Fig. 2. Inhibidor Esteroidal de la Enzima 5α -reductasa

Por lo anterior el presente trabajo consiste en la síntesis, caracterización y evaluación biológica de dos compuestos con actividad antiandrogénica potencial.

Los compuestos son:

(A-6) el 3, β -(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona

y (A-7) el 3, β -(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona

Para la síntesis de los compuestos de interés se utilizó como materia prima el acetato de 16-dehidropegnenolona por su disponibilidad comercial y por la presencia de las funciones químicas necesarias.

Los esteroides se caracterizaron por sus propiedades físicas (p.f.) y espectroscópicas (IR, RMN¹H, RMN¹³C y EM-IE) y se evaluaron en próstata de cadáver humano en la transformación T a DHT (*in vitro*).

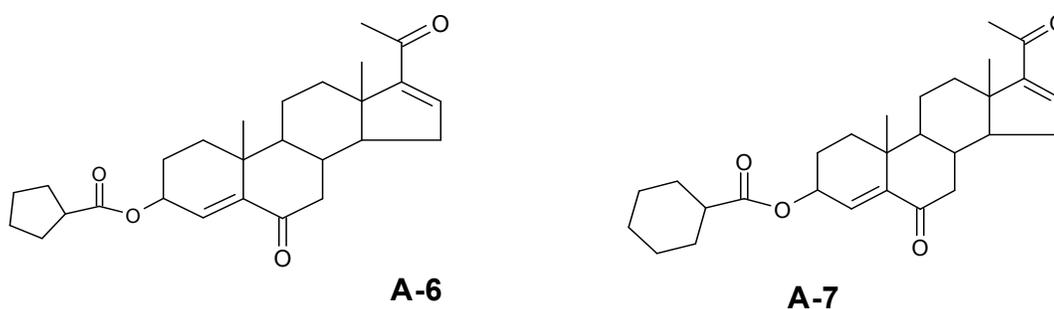


Fig. 3 Estructura de los compuestos esteroidales a sintetizar.

2. ANTECEDENTES.

2.1 La Próstata.

La próstata es un órgano que se encuentra debajo de la vejiga de varón, rodeando la uretra. El tamaño normal de la próstata es el de una nuez, el tamaño puede variar conforme avanza la edad y sobre todo cuando se alcanzan los 50 años.

La próstata tiene dos funciones, una es en el control urinario, que ayuda a controlar la velocidad con la que sale la orina y la otra función es su participación en la vida sexual, ya que se encarga de secretar líquido a la uretra durante la eyaculación para la motilidad del espermatozoide en la uretra y constituye la tercera parte del fluido seminal, dando a este su apariencia blanquecina. (3,4)

2.2 Hiperplasia Prostática Benigna.

La Hiperplasia prostática benigna (HPB), se caracteriza por un agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos que no corresponde al Cáncer (1,5). Puede aparecer clínicamente desde los 50 años y ya cercanos a los 70 años el 70% de los hombres lo presentan. Solo en algunos pacientes producen síntomas derivados de la compresión del conducto de salida de la orina (uretra prostática) y del mayor esfuerzo que debe hacer la vejiga para lograr la micción (6).

El presentar un crecimiento prostático debe ser evaluado para determinar el grado de obstrucción y las posibles complicaciones que se producen por la dificultad en el vaciamiento vesical. Existen múltiples alternativas terapéuticas que varían debido a que cada caso es distinto. Es la evaluación individual la que determina cual es la mejor opción para cada paciente (6).

2.3 Cáncer de Próstata.

En los últimos años, ha habido un incremento significativo en el uso de pruebas de exploración del cáncer de próstata y con ello el diagnóstico de la enfermedad. Cuando se utiliza el término CANCER es para agrupar aproximadamente 200 enfermedades que se caracterizan por crecimiento anormal de las células, situación que es transmitida a células hijas que se manifiesta por una reducción del control de crecimiento y la función celular (1,5,7). Por lo tanto este mal surge cuando las células comienzan a multiplicarse sin ningún control y de manera progresiva hasta llegar a la formación de un tumor, si este tumor no invade los tejidos vecinos y queda circunscrito se forma un tumor benigno. Si el tumor invade tanto los tejidos vecinos como los que se encuentran a distancia (metástasis) entonces se forma un tumor maligno ó cáncer. Cuando existe metástasis invade órganos vecinos, huesos y ganglios linfáticos entre otros. (7, 8)

En su estado inicial el cáncer de próstata puede no producir signos o síntomas. Según crece el tumor puede presentarse lo siguientes (6):

- Dificultad al comenzar o terminar de orinar.
- Fuerza reducida del chorro de la orina.
- Goteo al final de la micción.
- Micción dolorosa o con ardor.
- Orinar poca cantidad cada vez y frecuentemente, especialmente por la noche.
- Eyaculación dolorosa.
- Sangre en la orina.
- Incapacidad para orinar.

- Dolor continuo en parte baja de la espalda, en la pelvis, o en la zona superior de los muslos.

Las células del carcinoma prostático, al igual que las células glandulares prostáticas normales, dependen en su desarrollo con una serie de factores en común que a continuación se describen (8).

La alimentación. Existen estudios que nos sugieren balancear nuestra alimentación por que con esto, podemos prevenir ó combatir padecimientos y enfermedades, pero poco se menciona que también nos ayuda a combatir el cáncer de próstata. Trabajos recientes sugieren que la ingesta adecuada en nuestra dieta diaria de vitamina E, licopenos, carotenos, selenio, frutas y verduras con alto contenido de fructuosa, aunado a la disminución de la ingesta de grasas de origen animal y alimentos como la leche y sus derivados, que tienen alto contenido de calcio, reducen la incidencia de padecer el cáncer de próstata (9,10,11).

La raza. El riesgo de padecer cáncer de próstata es mucho mayor en hombres de raza negra con respecto a los blancos y asiáticos (5,2).

La edad. El agrandamiento de la próstata es un trastorno que presenta una de cada tres individuos de más de 60 años de edad en los que el órgano incrementa su tamaño de dos a cuatro veces en relación al tamaño normal (5,12).

Factores Hereditarios. El riesgo de padecer el cáncer de próstata es alto o se duplica cuando se tienen algún familiar de primera generación (padres ó hermanos), con este padecimiento. El riesgo es mayor aun si se tiene mas de un familiar con este padecimiento, en especial si se detecta en familiares jóvenes (2,13).

Factores Hormonales. Este tipo de factores son los que se consideran mas importantes, ya que los andrógenos son hormonas esteroidales responsables de regular la

fisiología sexual de varón promoviendo y manteniendo las características sexuales primarias y secundarias, el andrógeno predominante en la circulación sanguínea es la testosterona (T), sin embargo el andrógeno activo es la dihidrotestosterona (DHT) (3), aunado que con la edad en el varón aumentan los niveles de estradiol (hormona sexual femenina) y juntos aumentan el riesgo de padecer el cáncer de próstata. (2)

2.4 Tratamientos para el Cáncer de Próstata e HPB.

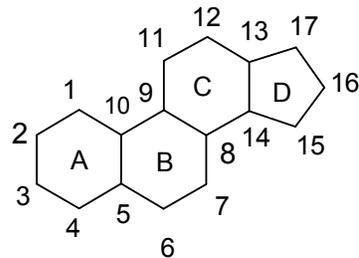
Algunos de los métodos disponibles para el tratamiento del cáncer de próstata se encuentran la prostatectomía, la orquiectomía bilateral (extirpación de testículos en donde se sintetiza el 95% de la testosterona endógena), tratamientos con láser como el ILC (Interstitial Laser Coagulation), terapias con microondas como TUMT (Transurethral Microwave Therapy of Prostate) y las terapias hormonales utilizando agonistas androgénicos (agentes esteroidales y no esteroidales), que actúan al reducir ó modificar la producción de andrógenos a través de la inhibición de la Hormona liberadora Luteinizante ó por la inhibición de la enzima 5α -reductasa responsable de la conversión testosterona a dihidrotestosterona ó bien, con la competencia antagonista por el receptor androgénico, entre otros métodos. La elección de la terapia es influenciada por la etapa de la enfermedad en que se encuentre el individuo, así como la edad, condición física y respuesta al tratamiento (4).

2.5 Esteroides.

La mayoría de los esteroides actúan como hormonas, mensajeros químicos secretados por las glándulas y transportadas por la corriente sanguínea a los tejidos blanco o

efectores. Los esteroides tienen dos funciones principales; 1) Es la de hormonas sexuales, que controlan la maduración sexual y la reproducción y 2) La de hormonas adrenocorticales, que regulan una gran cantidad de procesos metabólicos (14).

Los esteroides son lípidos derivados del colesterol que contienen en su estructura base, el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno (fig. 4, pág. 8), que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, tanto en el reino vegetal como en el reino animal. (15,16). La estructura de los esteroides, la forman cuatro anillos de carbonos (A, B, C, D) comenzando en el extremo inferior izquierdo, numerando los átomos de carbono por el anillo A. Los esteroides se diferencian entre sí por el número y localización de sustituyentes (17).



Ciclopentanoperhidrofenantreno

Figura 4. Numeración de un Esteroide.

2.5.1 Clasificación de los Esteroides.

Los esteroides se clasifican considerando su estructura química. Por lo general se encuentran sustituidos en C-10 y C-13 por un metilo y por un grupo oxhidrilo o carbonilo en C-3. Para nombrarlos se toma en cuenta la cadena que presentan en la posición C-17 (fig. 5, pág. 9)(17).

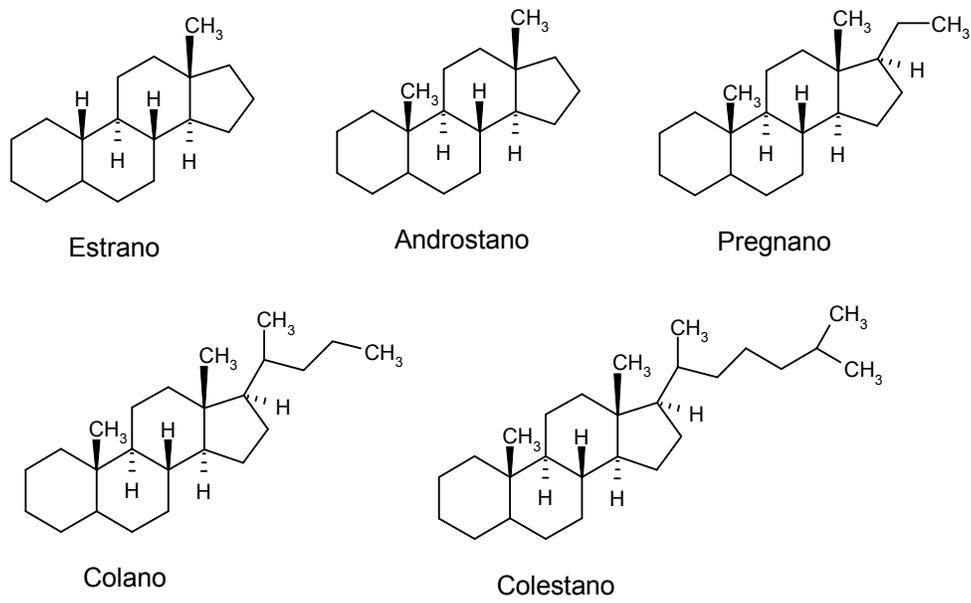
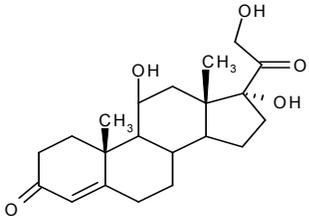


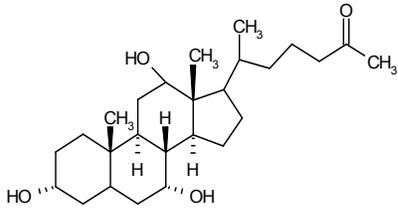
Figura 5. Clasificación de los esteroides.

2.5.2 Efectos fisiológicos de los esteroides.

Las hormonas esteroidales se agrupan en 5 categorías: progestagenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos. Los efectos fisiológicos varían de un compuesto a otro, su función va desde vitamina hasta hormonas sexuales (6). En la tabla 1. Se presentan algunos ejemplos.

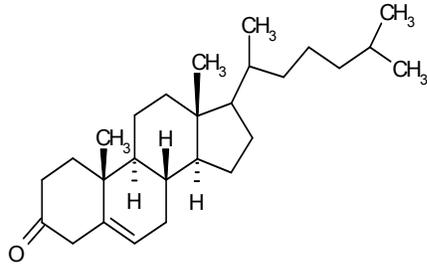
Tabla 1. Efectos fisiológicos de los esteroides.

Esteroides	Efecto Fisiológico
 <p style="text-align: center;">Cortisol</p>	<p>Posee múltiples funciones para el control del metabolismo de las proteínas, de los carbohidratos y de los lípidos, tal como la aldosterona, que es un corticoide.</p>



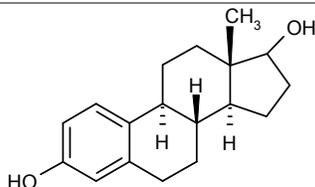
Ácido Cólico

Principal ácido biliar sintetizado en el hígado, secretado en forma de conjugado de glicina o taurina a la vesícula biliar.



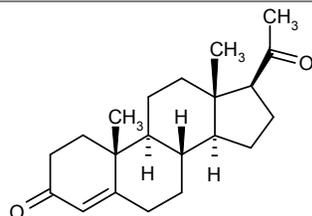
Colesterol

Precursor de las hormonas esteroidales y de los ácidos biliares. Se encuentra en casi todos los tejidos de los vertebrados y es el principal constituyente de los cálculos o piedras biliares.



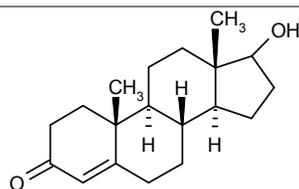
Estradiol

Hormona Estrogénica más importante de la mujer, es secretada por los ovarios.



Progesterona

Hormona que es secretada durante el embarazo por el cuerpo lúteo. Es el progestágeno más abundante y es precursor de los glucocorticoides y de la testosterona.



Testosterona

Hormona sexual masculina, regula la diferenciación celular, la expresión de las características sexuales secundarias y los modelos de comportamiento sexual.

La biogénesis de la testosterona en el organismo se lleva a cabo mediante la degradación enzimática parcial de la cadena lateral del colesterol, dando lugar a la formación de la pregnenolona y posteriormente la producción de progesterona.

2.5.3 Otros Usos de los Esteroides.

Además de los esteroides aislados de las plantas y de los animales, se han sintetizados algunos otros en los laboratorios farmacéuticos. Entre los esteroides sintéticos mejor conocidos se encuentran los antiandrógenos, los anticonceptivos orales y los agentes anabólicos (7). (fig. 6)

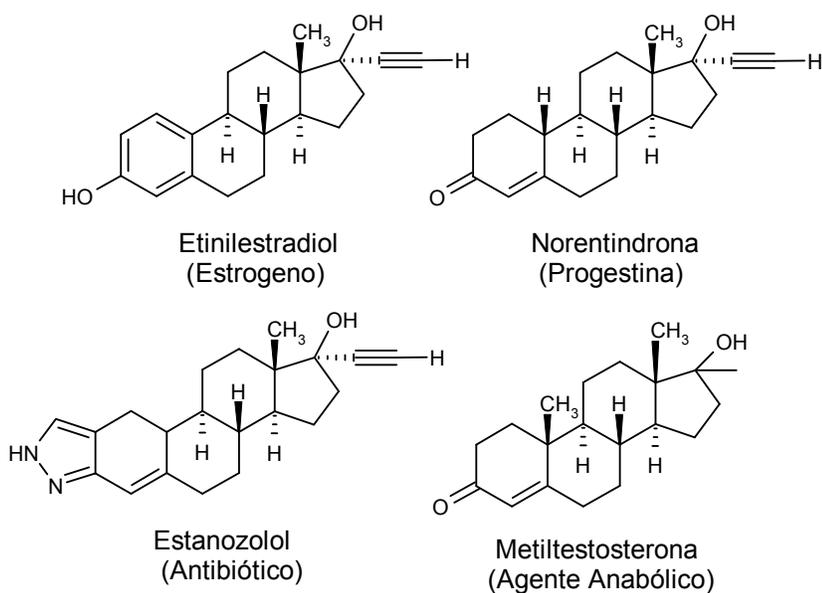


Figura 6. Algunos Esteroides Sintéticos.

2.6 Andrógenos.

Los andrógenos son hormonas esteroidales pertenecientes al grupo del androstano (fig. 7, pág. 12), como ya se mencionó, son los que regulan las características fisiológicas más importantes en el comportamiento sexual, regulan el funcionamiento de la próstata y vesículas seminales, actúan como anabólicos y son los responsables de la expresión de algunos caracteres secundarios (15,19). Uno de los principales andrógenos es la

testosterona (T), que para realizar sus funciones tiene que estar en su forma activa la dihidrotestosterona (DHT). (T y DHT figura 1, pág. 1)

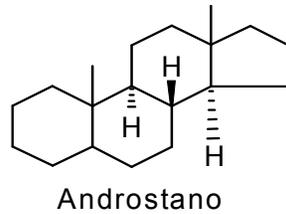


Figura 7. Androstano

2.6.1 Producción y función de la testosterona.

La producción de la testosterona en los testículos, se encuentra regulada por el hipotálamo, ya que secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que controla la síntesis y liberación de las hormonas de las gonadas, su nombre específico es el factor de liberación de la Hormona Luteinizante (LH), que a su vez estimula la secreción de la Hormona Estimulante de las Células Intersticiales (HSCI) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH) en el lóbulo anterior de la hipófisis. El siguiente paso es la producción de la testosterona, es en los testículos bajo la influencia de HSCI y FSH por las células intersticiales de Leydig. Aproximadamente un 95% de la testosterona es producida en los testículos y el 5% restante es liberado por las glándulas suprarrenales (15,20).

La acción primaria de la testosterona a nivel molecular, consiste en aumentar la síntesis proteica de los órganos blancos específicamente: próstata y vesículas seminales. Su principal función es producir el desarrollo normal de los órganos reproductores masculinos y mantener las características sexuales secundarias. La testosterona también es efectiva para mantener la espermatogénesis.

Las características masculinas desarrolladas en la presencia de la testosterona son: cambio de voz, crecimiento del pene, crecimiento del escroto, así como el desarrollo del

músculo esquelético. Inhibe el desarrollo y la función de la glándula mamaria además de estimular la libido (21).

2.6.2 La enzima 5 α -reductasa y la transformación de Testosterona a Dihidrotestosterona.

La testosterona (T) está considerada como una prohormona y el mecanismo de acción para convertirse de testosterona a dihidrotestosterona (DHT) es el siguiente.

La T entra a la célula blanco, al parecer por difusión pasiva (15,20), en el retículo endoplásmico o en la membrana nuclear se lleva a cabo la transformación de la prohormona en DHT, la transformación es biológicamente irreversible y está catalizada por una enzima que se encuentra fija en la membrana, esta enzima es denominada 5 α -reductasa, y requiere de NADPH (forma reducida de la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) como cofactor para llevar a cabo dicha transformación.

Esta transformación consiste en la reducción estereoespecífica por la adición del hidruro del NADPH a la posición C-5 de la T. El enolato formado en C-3 – C-4 se estabiliza por algún residuo electrofílico (E^+) de la enzima 5 α -reductasa. Posteriormente por tautomerismo, se regenera el grupo carbonilo, formándose así, la 5 α -dihidrotestosterona y la liberación de NADPH. (fig. 8, pág. 14) (22).

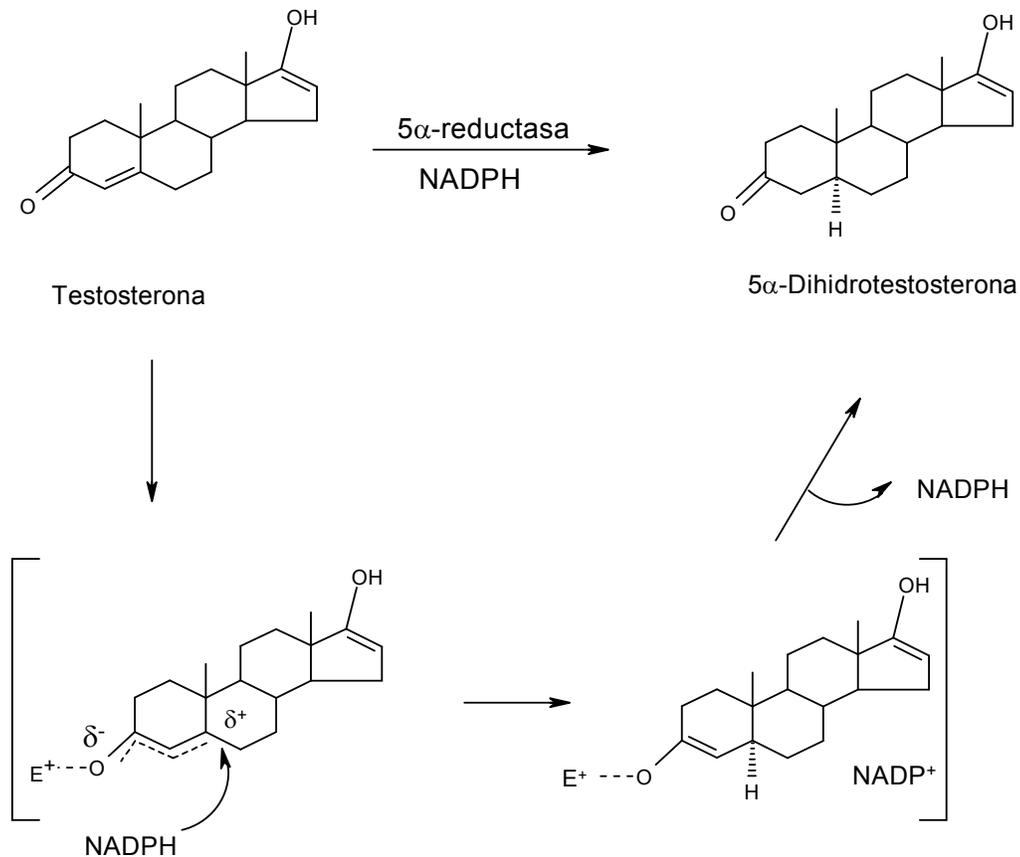


Figura 8. Mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa.

La enzima 5 α -reductasa, es una proteína hidrofóbica formada por 259 aminoácidos con un peso molecular de 29,462 Dalton y se localiza en la fracción microsomal de las células blanco para los andrógenos (5,8). Se encuentra en dos formas denominadas tipo I y tipo II; las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función (9,13). La isoenzima 5 α -reductasa tipo I se encuentra predominantemente en las glándulas sebáceas de la piel y en el hígado, tiene un pH óptimo de 6-9 y requiere de concentraciones elevadas de T para saturarse ($K_m = 4 \mu M$). La isoenzima 5 α -reductasa tipo II requiere de concentraciones bajas de T para saturarse ($K_m = 0.5 \mu M$) y predomina en el tejido genital, por ejemplo la próstata, testículos y vesículas seminales. Este tipo de enzima tiene un pH óptimo de 5.5 (10,11), funciona de manera anabólica en la expresión de los

andrógenos para la conversión efectiva de T a DHT (15,20) y se relaciona directamente al cáncer de próstata y HPB (22,23). Es importante mencionar la relación inversa que presenta la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo inhibidor, pues mientras un compuesto resulta ser muy activo sobre la enzima tipo II en la mayoría de los casos es poco activo sobre la tipo I (23).

Al unirse la DHT con los receptores intracelulares específicos se forma un complejo hormona receptor que penetra al núcleo celular para unirse a la cromatina y producir la estimulación de la síntesis proteica y de las enzimas intracelulares responsables de las acciones androgénicas (7).

La biogénesis de la testosterona en el organismo se lleva a cabo mediante la degradación enzimática parcial de la cadena lateral del colesterol dando lugar a la formación de la pregnenolona y posteriormente a la producción de progesterona que es el precursor de la testosterona (6).

2.7 Antiandrógenos.

Los antiandrógenos son sustancias químicas, generalmente, esteroides sintéticos o de origen endógeno, que previenen la expresión de los andrógenos en su sitio de acción al bloquear los receptores androgénicos en los órganos blanco, esto es debido al carácter antagónico competitivo que tienen frente a los andrógenos para unirse a la misma proteína receptora. Un ejemplo de un fármaco que tiene este mecanismo de acción es la Flutamida y el Acetato de Ciproterona (24,25,26). (fig. 9, pág. 16). Otro mecanismo antiandrogénico es la inhibición de la síntesis de la T y se logra cuando se bloquea la acción del factor de liberación de gonadotropina (GnRF) sobre la adenohipófisis, resultando en la disminución

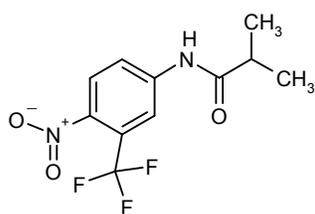
de la liberación de la hormona luteinizante (LH) y en la hormona estimulante del foliculo (FSH). Es importante señalar que el empleo de tipo estos fármacos presentan efectos secundarios como, bloquear al citocromo P-450, complejo enzimático involucrado en la biosíntesis de hormonas esteroidales. Un ejemplo de un fármaco que tiene este mecanismo de acción es el Ketoconazol. (fig. 9, pág. 16) (26).

2.7.1 Clasificación de los antiandrógenos.

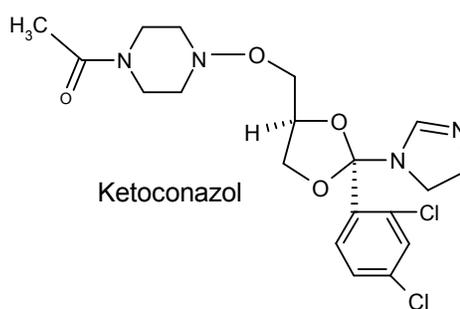
Los andrógenos se clasifican en dos grandes grupos: esteroidales y no esteroidales.

2.7.2 Antiandrógenos No Esteroidales.

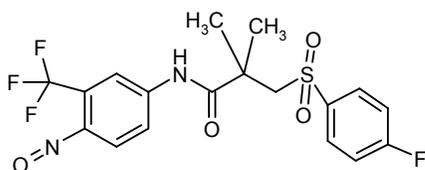
Los antiandrógenos no esteroidales, también presentan algunas ventajas: ya que tiene afinidad por el receptor debido a su estructura química y por lo tanto, reduce del 25 al 30% el tamaño de la próstata. Las desventajas observadas: es que actúa sobre la oxido nitroso sintetasa, que estimula la erección y ocasiona efectos adversos como la insuficiencia hepática (22,24,25,26) (fig. 9 pág. 16).



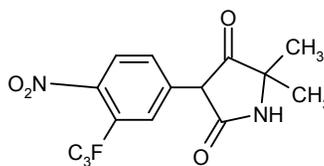
Flutamida



Ketoconazol



Bicalutamida



Anandron

Figura 9. Antiandrógenos No Esteroidales

2.7.3 Antiandrógenos Esteroidales.

Los antiandrógenos esteroidales son compuestos que derivan de la molécula de la progesterona y las ventajas que presenta son que: actúan específicamente con el receptor androgénico, son de mayor interés terapéutico y la relación costo-beneficio es la mejor opción. Las desventajas que en general presentan es que: reduce la concentración de la testosterona y como consecuencia la actividad enzimática de la enzima 5α -reductasa por lo tanto, se ve disminuido el tamaño de los órganos sexuales (4,6,7,22) (fig. 10, pág. 17).

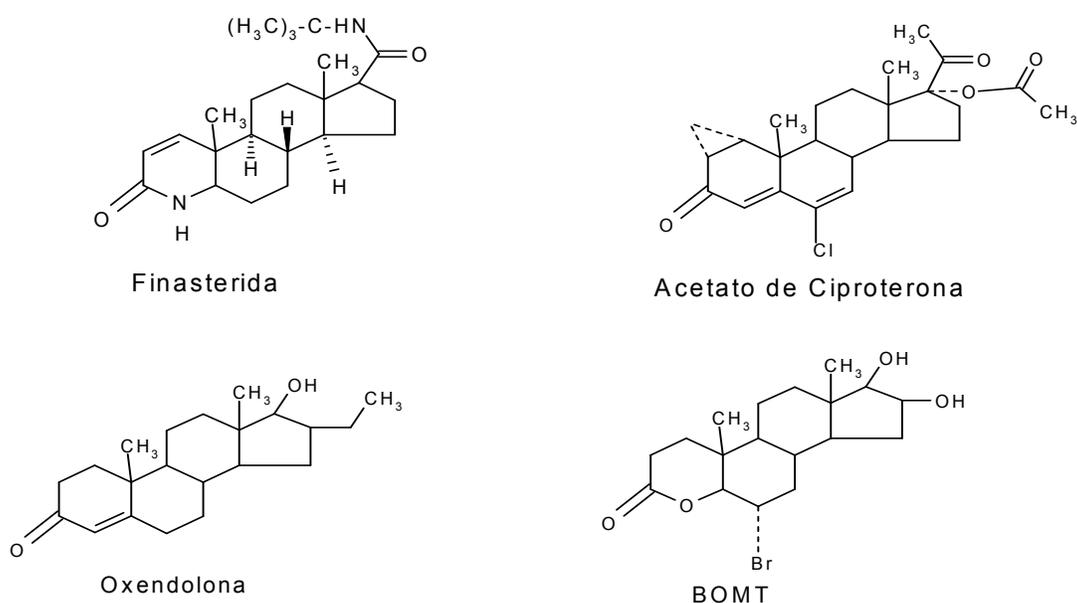


Figura 10. Antiandrógenos Esteroidales

Para que un derivado de la progesterona se pueda usar como antiandrógeno debe poseer las siguientes características (18).

- Una baja o nula toxicidad.
- Presentar elevada actividad antiandrogénica.
- Tener baja actividad hormonal.
- No disminuir la libido.

2.8 Síntesis de Antiandrógenos.

Se conocen dos métodos para sintetizar un esteroide con características antiandrogénicas (4).

1. Modificar la molécula de la testosterona, de manera que el compuesto sintetizado interaccione con el receptor sin producir un efecto androgénico, bloqueando la formación del complejo andrógeno-receptor, de manera que se tenga un efecto antagónico.
2. Modificar la molécula de la progesterona que es un antiandrógeno natural, pero debido a su efecto hormonal no puede ser utilizada como tal. Se esperaría que sus análogos sintéticos presenten la misma actividad biológica.

2.8.1 Síntesis de Antiandrógenos Esteroidales como alternativa de tratamiento para HPB y el Cáncer de próstata.

Los antiandrógenos esteroidales son de alto interés terapéutico, en especial los derivados de la progesterona, por ser homólogos de los esteroides de origen natural. Uno de los principales mecanismos por el cual se controla el cáncer de próstata es utilizando los antiandrógenos como inhibidores de la actividad enzimática (15,20,27), por que se ha observado que; cuando el cáncer de próstata se manifiesta, los niveles de T y en particular de DHT están altos, por lo que los antiandrógenos juegan un papel muy importante, ya que cuentan con una estructura similar a los andrógenos y actúan como inhibidores competitivos de la enzima 5α -reductasa, disminuyendo así los niveles de la forma activa del andrógeno. El mejor ejemplo de un fármaco que actúa bajo este mecanismo de acción es la finasterida (fig. 10, pág. 17), además de ser el fármaco que marca la vanguardia de las alternativas presentes el mercado (20,27).

Actualmente el desarrollo de agentes hormonales antiandrogénicos se ha acentuado debido a su amplia utilidad en la terapia médica, pues también se busca disminuir los efectos colaterales que generalmente ocasiona el empleo de estos fármacos. Los efectos colaterales que generalmente se presentan son: diarrea, intolerancia al alcohol, efectos hepatotóxicos severos, alteraciones hormonales, fallas cardíacas, retención de líquidos y pérdida del deseo sexual (2,8,27).

Debido a lo traumático y costoso que puede resultar la cirugía y los tratamientos en contra de la HPB y Cáncer de Próstata, así como los efectos nocivos provocados por los fármacos existentes en el mercado (finasterida, Proscar etc...) resulta de gran importancia el esfuerzo realizado en el diseño y síntesis de nuevos fármacos que ayuden como alternativas para la terapia hormonal de la segunda causa de muerte por cáncer en hombres mayores de 50 años “El Cáncer de Próstata”(1).

3. OBJETIVOS.

Considerando la relación existente entre la estructura química y la actividad biológica de los antiandrógenos de tipo esteroidal, se plantean los objetivos del presente trabajo:

3.1 Objetivo General.

Sintetizar compuestos derivados de la progesterona que presenten las siguientes características estructurales: un grupo éster en C-3 una doble ligadura en C-4 – C-5, otra más en C-16 – C-17, así como, dos grupos carbonilo, uno en C-6 y otro en C-20 y que estos compuestos presenten actividad antiandrogénica como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.

3.2 Objetivos Particulares.

- Sintetizar el compuesto **3, β -(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-6)**, con posible actividad antiandrogénica.
- Sintetizar el compuesto **3, β -(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-7)**, con posible actividad antiandrogénica.
- Aislar, purificar y caracterizar mediante sus propiedades físicas (punto de fusión) y espectroscópicas (IR, RMN¹H, RMN¹³C Y EM-IE) los intermediarios y productos finales de la ruta sintética.
- Probar la posible actividad antiandrogénica de los compuestos sintetizados, a través de un ensayo Biológico *in vitro* (inhibición de la enzima 5 α -reductasa) sobre próstata de cadáver humano.

4. METODOLOGÍA

Este trabajo consta de dos etapas: la sección química y las pruebas biológicas.

En la primera, se realizó la síntesis química, caracterización física y espectroscópica de los intermediarios A-1 – A-5 y de los productos finales (compuestos **A-6** y **A-7**). En la figura 11 (pág. 23), se muestra la secuencia sintética de este trabajo (28).

En la segunda etapa, se efectuó la evaluación de la actividad antiandrogénica de los compuestos sintetizados, tomándose como parámetro de actividad (respuesta biológica), un sistema *in vitro* en donde se determinó la capacidad de inhibición de la enzima 5 α -reductasa.

4.1 Etapa 1. Síntesis y caracterización de los compuestos.

Las pruebas espectroscópicas se realizaron en la USAI de la Facultad de Química y los equipos empleados en los diversos estudios fueron.

Para Espectrofotometría de Absorción de Infrarrojo (IR) un equipo Perkin Elmer modelo 1600, utilizando la técnica de película de KBr.

En la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y de Carbono 13 (RMN ^{13}C), se emplearon un espectrómetro analítico Varían, Gemini 200 y VRX-300S, usando CDCl_3 como disolvente; los desplazamientos químicos están dados en ppm referidos al TMS (Tetrametil Silano) como referencia interna. Para indicar los patrones de acoplamiento se emplearon las siguientes abreviaturas: s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), dd (señal doble de dobles), m (señal múltiple). La constante de acoplamiento (J) esta expresada en Hertz.

Por último en la Espectrometría de Masas (EM-IE) se empleó un espectrómetro de masas HP 5985-B CG/MS mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV. Los valores se expresan en relación masa/carga (m/z).

Los puntos de fusión de los compuestos obtenidos se determinaron en aparato Fisher-Jonhes y no están corregidos.

El monitoreo de los diferentes intermediarios y compuestos finales se realizaron mediante la técnica de cromatografía en capa fina (ccf) utilizando Gel de sílice Merck 7730, Silica Gel GF 254 y Silica Gel 60 G y como revelador, se utilizó una solución de CoCl_2 al 1 % en H_2SO_4 y una lámpara de luz UV ($\lambda=254\text{nm}$).

Lista de Reactivos de la Síntesis Química

- Acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA)
- Ácido 3-cloroperbenzoico (m-CPBA)
- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Acetona
- Agua (H_2O)
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Ácido ciclopentanoico y Ácido ciclohexanoico
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Bisulfito de sodio (NaHSO_3)
- Cloroformo (CHCl_3)
- Cloroformo Deuterado (CDCl_3)
- Cloruro de Cobalto (CoCl_2)
- Diclorometano (CH_2Cl_2)
- 1,3-Diciclohexilcarbodiimida (DCC)
- 4-Dimetilaminopiridina (4-DMAP)
- Gel de sílice 69 F254 Merck para CCF
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Hexano (C_6H_{12})
- Metanol (MeOH)
- Trióxido de cromo (CrO_3)
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
- Piridina (Py)
- Cloruro de Tionilo (SOCl_2)

RUTA DE SINTESIS

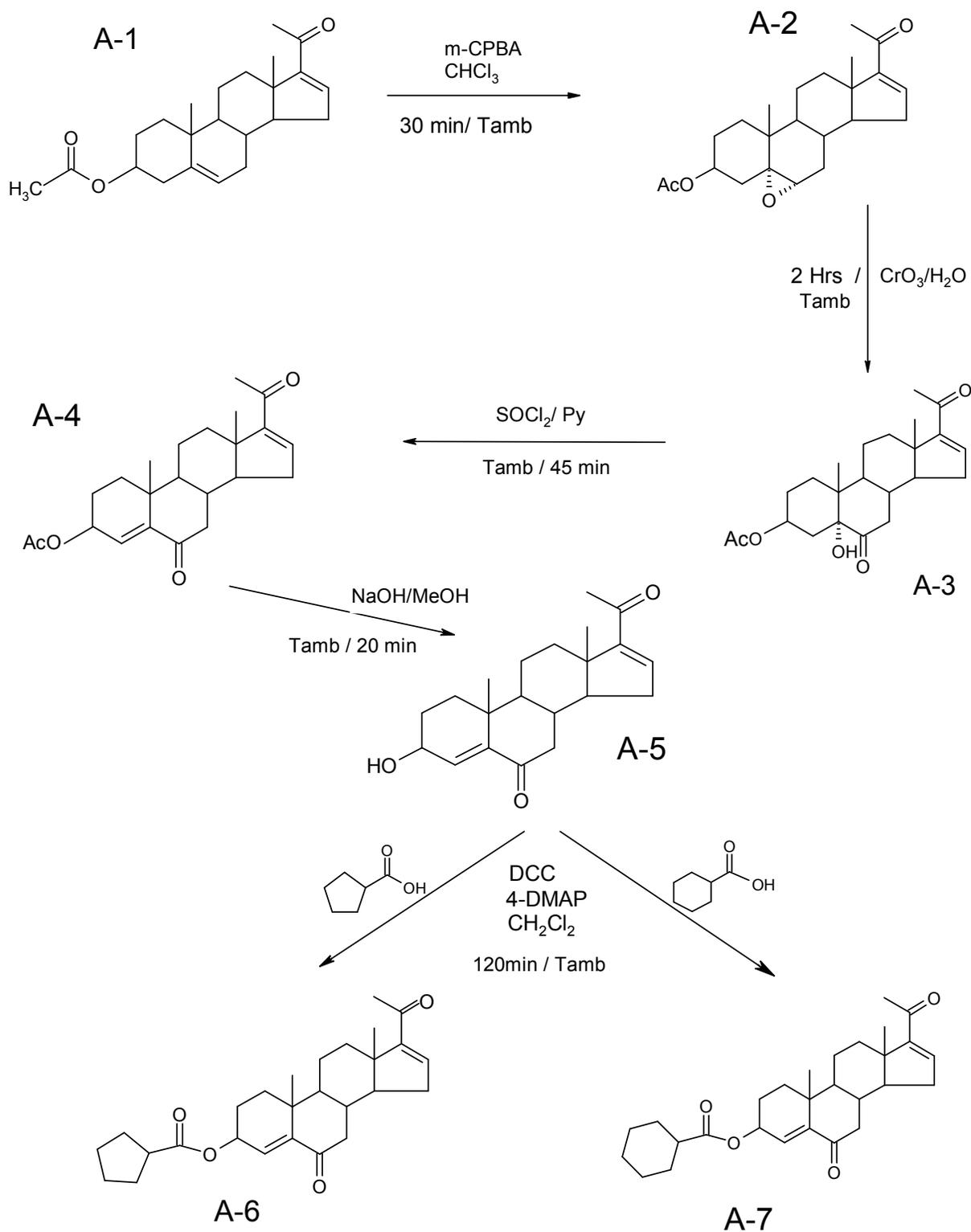


Figura 11. Ruta de síntesis de A-6 y A-7.

El trabajo experimental de la sección química se realizó en el Laboratorio 125, Conjunto “E” Departamento de Farmacia de la Facultad de Química.

4.2 Descripción de la Ruta de Síntesis.

4.2.1 Caracterización la Materia Prima (A-1).

La materia prima (A-1) el Acetato de 16-dehidropregnenolona es un polvo ligeramente amarillo el cual fue recristalizado de metanol. Se obtuvieron cristales en forma de agujas de color blanco, cuyas propiedades físicas y espectroscópicas se encuentran reportadas en la Tabla 2 (pág. 31).

4.2.2 Síntesis de (A-2): 3-Acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona.

En un matraz de 150 mL, se disolvió 1g (2.8 mmol) de A-1 en 50 mL de CHCl₃. Después se adicionaron 1.4g (8.1 mmol) de ácido *m*-cloroperoxibenzoico. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, con agitación magnética constante. Terminado el tiempo de reacción, se adicionaron 50 mL de una solución de NaHSO₄/NaHCO₃ al 5%. La mezcla contenida en el matraz se extrajo con CHCl₃ (3 x 150 mL). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio y posteriormente se concentró en un rotaevaporador. El sólido resultante se recristalizó de una mezcla de Hexano/AcOEt (8:2 % v/v) obteniéndose cristales blancos (tabla 3, pág. 33).

4.2.3 Síntesis de (A-3): 3-Acetoxi-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.

En un matraz de 100 mL, se disolvió 1g (2.68 mmol) de Epóxido (A-2) en 50 mL de Acetona. Manteniendo el sistema con agitación magnética durante toda la reacción y controlado la temperatura del sistema introduciendo el matraz en un baño de hielo mientras

se le añadía gota a gota 830mg (8.30 mmol) de CrO_3 previamente disueltos en 4.1mL de agua. Después de 30 minutos se adicionó otra carga más de la misma solución oxidante, repitiendo este procedimiento una vez más 30 minutos después. Un total de 3 cargas de Oxidante. La mezcla de reacción se vertió en un vaso con 150 mL hielo para que precipitara el producto. El sólido resultante se filtró al vacío a través de papel filtro y se dejó secar al vacío durante 24 horas. La fracción líquida se concentró, se filtró y el sólido obtenido se cristalizó de una mezcla de Hexano/AcOEt (8:2 % v/v), obteniéndose el producto en forma de polvo blanco, que se juntó con el sólido previamente obtenido, ya que coincidía en su totalidad en sus propiedades físicas (Tabla 4, pág. 34).

4.2.4 Síntesis de (A-4): 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

Esta reacción requirió de mantener agitación magnética constante y condiciones anhidras durante toda la reacción y esto se logró mediante una atmósfera de Nitrógeno. En un matraz de 100 mL, se disolvió 1g (2.57 mmol) del producto de la oxidación (A-3) en 10 mL (1.24 mmol) de Py. La mezcla de reacción se introdujo en un baño hielo y se fue agregando gota a gota 1mL (13.79 mmol) de SOCl_2 . Después de 45 minutos, la mezcla se vertió en un vaso con 100 mL agua y hielo, con esto precipitó el producto deseado. El sólido resultante se filtró al vacío a través de papel filtro y se dejó secar al vacío. La fracción líquida se concentró, se filtró y el sólido obtenido se cristalizó de una mezcla de Hexano/AcOEt (7:3 % v/v), obteniéndose el producto en forma de polvo ligeramente rosa, que se junto con el sólido previamente obtenido, ya que coincidía en su totalidad en sus propiedades físicas (Tabla 5, pág. 36).

4.2.5 Síntesis de (A-5): 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

En un matraz de 250 mL, se disolvió 1g (2.70 mmol) del producto de la eliminación (A-4) en 150 mL de MeOH. Se adicionaron 10 mL de NaOH (5 mmol) al 2%. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética constante a temperatura ambiente durante 20 minutos. Terminado el tiempo de reacción el contenido del matraz se vertió en un vaso con 200 mL de agua y hielo para precipitar el producto de interés. El producto se filtró y se secó al vacío, la porción líquida se concentró, se filtró y se cristalizó de una mezcla de Hexano/AcOEt (8:2 % v/v), para obtener un polvo blanco (Tabla 6, pág. 38).

4.2.6 Síntesis de (A-6): 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

Para esta reacción también se manejaron condiciones anhidras mediante una atmósfera de Nitrógeno. En un matraz de 150 mL, se disolvió 1g (3.04 mmol) del producto de la hidrólisis (A-5) en 100 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Después se adicionaron 280mg (4.86 mmol) de ácido ciclopentanoico, 1.04g (5.04 mmol) de DCC y 600 mg (4.91 mmol) de 4-DMAP. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación magnética constante durante 120 minutos. El producto de reacción se concentró en un rotaevaporador. El sólido resultante se redisolvió en AcOEt se concentró en un rotaevaporador y se filtró para eliminar el precipitado formado (la dicitocarboxiurea). Repitiendo este procedimiento, hasta que no se observó la presencia de dicitocarboxiurea. La fase líquida se recrystalizó de una mezcla de Hexano/AcOEt (7:3 % v/v), obteniéndose cristales ligeramente amarillos (Tabla 7, pág. 39).

4.2.7 Síntesis de (A-7): 3,β-(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

Para esta reacción también se manejaron condiciones anhidras mediante atmósfera de Nitrógeno. En un matraz de 150 mL, se disolvió 1g (3.04 mmol) del producto de la hidrólisis (A-5) en 100 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Después se adicionaron 310mg (4.86 mmol) de ácido ciclohexanoico, 1.04g (5.04 mmol) de DCC y 0.6g (4.91 mmol) de 4-DMAP. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación magnética constante durante 120 minutos. El producto de reacción se concentró en un rotaevaporador. El sólido resultante se redisolvió en AcOEt se concentró en un rotaevaporador y se filtró para eliminar el precipitado formado (la diciclocarboxiurea). Repitiendo este procedimiento, hasta que no se observó la presencia de diciclocarboxiurea. La fase líquida se recristalizó de una mezcla de Hexano/AcOEt (7:3 % v/v), obteniéndose cristales ligeramente amarillos (Tabla 8, pág. 41).

4.3 Etapa 2. Descripción de las pruebas biológicas.

Para determinar la actividad biológica de los compuestos **A-6** y **A-7** y sus intermediarios se realizó un ensayo *in vitro* con tejido prostático de cadáveres humanos.

Estas pruebas se realizaron en el laboratorio 006 del Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal de la UAM Xochimilco, por la Dra. Mariza Cabeza.

El equipo empleado en este estudio fue el siguiente:

Para medir la radiactividad se usó un contador de centello Liquid Scintillation Analyzer, modelo Tricards 2100 TR-Packard con impresora Panasonic Quiet KX-P3123, una incubadora modelo Beckman; micropipetas electrónicas, Advanced Electronic Pipette Rain modelo Edp3, con capacidad para 10, 100 y 1000 μ L; una lámpara de UV λ 254nm.

Los reactivos utilizados se encuentran en la siguiente lista.

Lista de Reactivos de las Pruebas Biológicas.

- Compuestos **A-6** y **A-7**.
- Carbón Activado.
- Cromatofolios de gel de sílice 60F₂₅₄ Merck.
- Dextrán.
- Ditioneitol (DTT).
- Dihidrotestosterona (DHT).
- Dihidrotestosterona Tritiada ³[H] DHT.
- Diclorometano CH₂Cl₂.
- Ácido etilendiaminotetraacético.
- Éter.
- Gliceról.
- HCl-Tris (Trisma Hydrochloride).
- Líquido de centelleo Ultima Gold.
- Molibdato de Sodio.
- NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato).
- Sacarosa.
- Solución Amortiguadora de fosfatos pH = 6.5 y pH = 7.0.
- Testosterona.
- Testosterona Tritida ³[H] T.

4.3.1 Material Biológico.

- Tejido de próstata humana de cadáveres conservado a -70 °C. Proporcionado por el Dr. Avissai Alcántara, del Departamento de Patología del Hospital General de México.

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

- Por cada uno de los nuevos compuestos sintetizados (A-6 y A-7) se prepararon una serie de tubos en los cuales se colocaron cantidades crecientes de los compuestos a probar (100pM, 1nM, 10nM, 50nM, 100nM y 100 μ M) disueltos en metanol y testosterona [H^3] a una concentración final de 2nM.
- Se incluyeron tubos controles a los que solo se les adicionó testosterona [H^3] a una concentración final de 2nM.
- Los tubos se colocaron en un baño maría y bajo una atmósfera de Nitrógeno hasta evaporar completamente el disolvente.
- Enseguida se añadieron 720 μ L de buffer de fosfatos [40nM] pH=6.5, 80 μ L de fracción microsomal de próstata de cadáver humano que contenía 134 μ g de proteína, que fue determinado por el método de Bradford. Dicha fracción microsomal contiene predominantemente a la isoforma 2 de la enzima 5 α -reductasa. También se agregaron 100 μ L de DTT (1nM) y 100 μ L de NADPH (2nM) con lo que se dio inicio a la reacción.
- Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron a 37 °C durante 60 minutos.
- Al término de la incubación se agregó 1mL de diclorometano para detener la reacción y se agitaron por 1 minuto mas en el vortex.

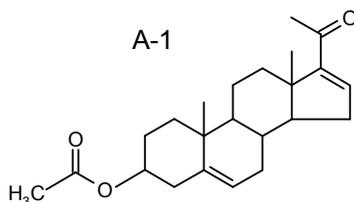
- Se extrajo la fase orgánica en la cual se encontraba la DHT [H^3]. Se realizaron 3 extracciones más y una vez reunidos los extractos orgánicos se evaporó el disolvente en un baño maría hasta sequedad.
- El extracto de cada tubo se disolvió en 6 gotas de metanol y se aplicó gota a gota en una placa 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 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 %.
- La zona correspondiente a la DHT [H^3] ($R_f = 0.64$), se marcó, cortó y colocó en viales. A cada vial se le adicionó 5 mL de líquido de centello Ultima Gold (Packard). Finalmente se leyó la radiactividad producida por la DHT [H^3] en el analizador de centello.
- La actividad de la enzima 5α -reductasa se calculó con base a los controles que se incubaron en presencia únicamente de T [H^3].
- Se determinó el valor de IC_{50} (concentración del esteroide que inhibe el 50% de la actividad enzimática) y los valores obtenidos se encuentran reportados en la tabla 9 (pág. 42) (28,29,30).

5. RESULTADOS

5.1 Resultados de la Sección Química.

Los resultados obtenidos de las pruebas Físicas y Espectroscópicas de los compuestos sintetizados se presentan a continuación.

5.1.1 Acetato de 16-dehidropregnenolona (A-1). Materia Prima.



La materia prima solo se recrystalizó en metanol y se obtuvieron cristales en forma de aguja de color blanco a los cuales se les determinaron las propiedades físicas y espectroscópicas.

Tabla 2.

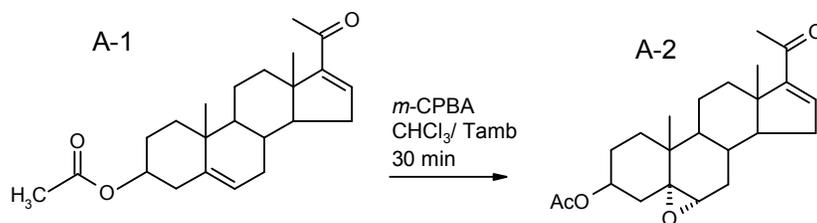
Propiedades físicas y espectroscópicas del (A-1).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	170-172
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₃
Peso molecular (UMA)	356.5
Valor Espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹) <i>Espectro # 1, pág. 62</i>	
2941.04	C-H de CH ₃ y CH ₂
2862.20	C-H de CH ₃ y CH ₂
1731.06	C=O de éster en C-3
1662.87	C=O α, β insaturado en C-20
1587.69	C=C conjugado con C-16
1433.87	CH ₃ -CO en C-20
1369.83	CH ₃ y CH ₂
1236.34	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3

1036.15	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3
RMN ¹H (ppm) Espectro # 8, pág. 66	
0.920 (s,3H)	-H en C-18
1.060 (s,3H)	-H en C-19
2.037 (s,3H)	-H de CH ₃ COO- en C-3
2.265 (s,3H)	-H en C-21
4.612 (m,1H)	-H en C-3
5.378 (t,1H)	C=C-H en C-6
6.714 (dd,1H)	C=C-H en C-16
RMN ¹³C (ppm) Espectros # 15 y 22, págs. 70 y 74	
15.683	C-18
19.198	C-19
21.401	C-21
27.124	C 3-2' de CH ₃ COO- en C-3
73.839	C-3 base de CH ₃ COO-
121.964	C-6 vinílico
140.233	C-5 vinílico
144.394	C-16 vinílico
155.316	C-17 vinílico
170.504	C3 de C=O de acetona
196.814	C20 de base C=O
EM-IE (m/z) Espectro # 29, pág. 78	
341	M+ -[CH ₃ CO]•
296	M+ -[CH ₃ COOH]• (pico base)

5.1.2 Caracterización de (A-2): 3-Acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona.

El procedimiento experimental involucró la utilización del Acetato de 16-dehidropregnenolona o 3-*p*-Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona, como materia prima el cual se epóxido en C-5 y C-6 con ácido *m*-CPBA en CHCl₃ obteniendo el (A-2).



3-Acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona (A-2).

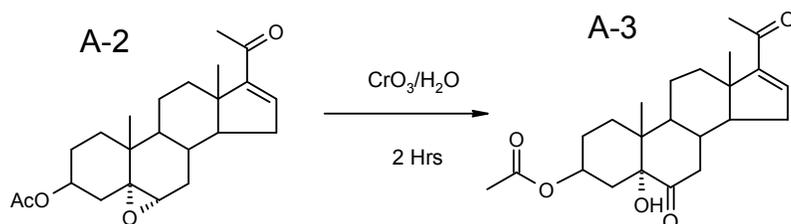
Tabla 3.
Propiedades físicas y espectroscópicas del (A-2).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	173-175
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₄
Peso molecular (UMA)	372.49
Rendimiento	89%
Valor Espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹) <i>Espectro # 2, pág. 62</i>	
2940.83	C-H de CH ₃ y CH ₂
2859.32	C-H de CH ₃ y CH ₂
1734.51	C=O de éster en C-3
1660.48	C=O α, β insaturado en C-20
1588.54	C=C conjugado con C-16
1371.81	CH ₃ y CH ₂
1252.04	C-O-C de CH ₃ -COO- en C-3
1040.64	Estiramiento C-O-C
RMN ¹H (ppm) <i>Espectro # 9, pág. 66</i>	
0.860 (s,3H)	H en C-18
1.126 (s,3H)	H en C-19
2.031 (s,3H)	H en C-21
2.255 (s,3H)	CH ₃ de CH ₃ COO- en C-3
4.777 (m,1H)	H en C-3
4.960 (d,1H)	H en C-6
6.696 (dd, 1H)	C= CH en C-16
RMN ¹³C (ppm) <i>Espectros # 16 y 23 págs. 70 y 74</i>	
15.799	C-18
16.934	C-19

21.370	C-21
27.124	C 3-2' de CH ₃ COO- en C-3
63.247	C-6
65.346	C-5
144.077	C-16 vinílico
155.225	C-17 vinílico
170.516	C3-1' de C=O de CH ₃ COO-
196.710	C20 de base C=O
EM-IE (m/z) Espectro # 30, pág. 78	
372	M+
357	M+ -[CH ₃] [•]
329	M+ -[CH ₃ C=O] [•]
312	M+ -[CH ₃ COOH] [•] (pico base)

5.1.3 Caracterización de (A-3): 3-Acetoxi-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.

El compuesto A-2 se oxidó con CrO₃ en H₂O para darnos como producto el 3-Acetoxi-5-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (A-3).



3-Acetoxi-5-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (A-3).

Tabla 4.

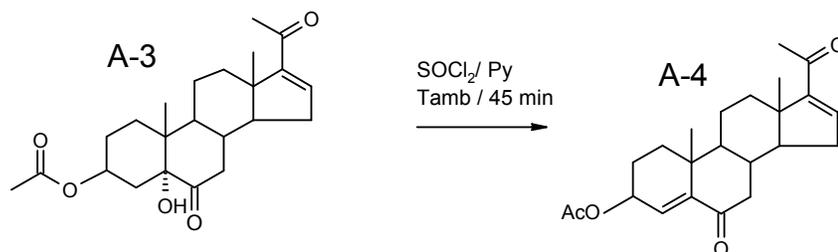
Propiedades físicas y espectroscópicas del (A-3).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	242-244
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₅
Peso molecular (UMA)	388.497
Rendimiento	70%
Valor Espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹) Espectro # 3, pág. 63	

3451.63	OH en C-5
2942.45	CH ₃ y CH ₂
1713.61	C=O en C-6
1665.06	C=O α, β insaturado en C-20
1586.18	C=C conjugado con C-16
1436.06	-CH ₂
1369.93	-CH ₃
1237.73	C-O-C de CH ₃ -COO- en C-3
1039.77	Estiramiento C-O-C
RMN ¹H (ppm) Espectro # 10, pág. 67	
0.834 (s,3H)	H en C-18
0.851 (s,3H)	H en C-19
2.004 (s,3H)	CH ₃ de CH ₃ COO- en C-3
2.252 (s,3H)	H en C-21
2.871(t,1H)	H en C-4
5.010 (m,1H)	H en C-3
6.681 (dd,1H)	C=CH en C-16
RMN ¹³C (ppm) Espectros # 17 y 24, págs. 71 y 75	
13.841	C-18
15.763	C-19
21.352	C-21
27.088	C 3-2' de CH ₃ COO- en C-3
80.216	C-5 base de OH
70.648	C-3 base de CH ₃ COO-
143.997	C-16 vinílico
155.023	C-17 vinílico
170.516	C 3-1' de C=O de CH ₃ COO-
196.716	C-20 base C=O
211.867	C-6 base C=O
EM-IE (m/z) Espectro # 31, pág. 79	
388	M+
373	M+ -[CH ₃] [•]
345	M+ -[CH ₃ C=O] [•]
328	345 - H ₂ O (pico base)

5.1.4 Caracterización de (A-4): 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

Al producto A-3 se le realizó la eliminación del alcohol en C-5, con SOCl_2 y Py con la respectiva formación de la doble ligadura entre C-4 – C-5 quedando solo el carbonilo en C-6. El producto es el 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-4).



3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona(A-4).

Tabla 5.

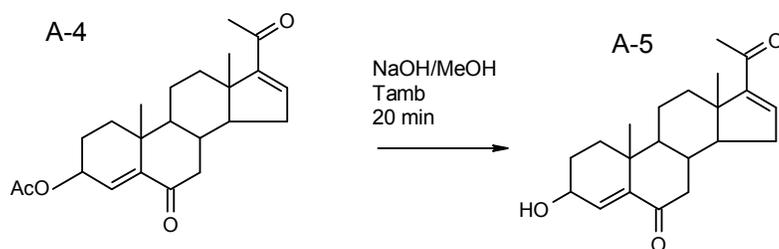
Propiedades físicas y espectroscópicas del (A-4).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	204-206
Fórmula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$
Peso molecular (UMA)	370.482
Rendimiento	52%
Valor Espectroscópico	Asignación
IR (cm^{-1}) <i>Espectro # 4, pág. 63</i>	
2942.63	CH_3 y CH_2
2870.59	CH_3 y CH_2
1735.08	C=O de éster
1681.05	C=O α,β insaturado en C-6
1658.36	C=O α,β insaturado en C20
1633.42	Estiramientos C=C
1371.72	$-\text{CH}_3$
1234.37	Estiramiento de $\text{CH}_3\text{-COO-}$
1041.94	Estiramiento C-O-C de éster
RMN ^1H (ppm) <i>Espectro # 11, pág. 67</i>	
0.915 (s,3H)	H en C-18
1.047 (s,3H)	H en C-19
2.055 (s,3H)	H en C-21

2.261 (s,3H)	CH ₃ de CH ₃ COO- en C-3
5.313 (m,1H)	H en C-3
6.082 (m,1H)	C=CH en C-4
6.693 (dd,1H)	C=CH en C-16
RMN ¹³C (ppm) Espectros # 18 y 25 págs. 71 y 75	
15.741	C-18
19.541	C-19
21.152	C-21
27.096	C 3-2' de CH ₃ COO- en C-3
69.193	C-3 base de CH ₃ COO-
129.045	C-4 vinílico
143.839	C-16 vinílico
154.826	C-17 vinílico
170.709	C 3-1' de C=O de CH ₃ COO-
196.606	C-20 base C=O
201.831	C-6 base C=O
EM-IE (m/z) Espectro # 32, pág. 79	
370	M+
328	M+ -[CH ₃ COOH] •
313	328-[CH ₃] •

5.1.5 Caracterización de (A-5): 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-dióna.

En la siguiente reacción de la secuencia se realizó la hidrólisis del acetato de C-3 en un medio básico, para obtener como producto el 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20dióna (A-5).



3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-dióna (A-5).

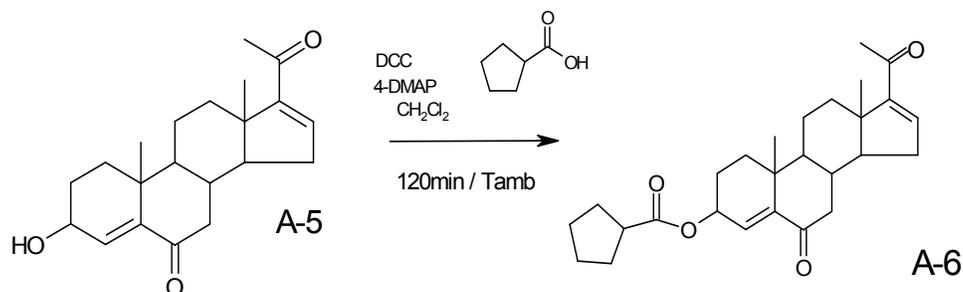
Tabla 6.
Propiedades físicas y espectroscópicas del (A-5).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	174-175
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₈ O ₃
Peso molecular (g/mol)	328.445
Rendimiento	58%
Valor Espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹) <i>Espectro # 5, pág. 64</i>	
3419.49	OH en C-3
2939.12	CH ₃ y CH ₂
2861.34	CH ₃ y CH ₂
1678.78	C=O α,β insaturado en C-6
1650.41	C=O α,β insaturado en C-20
1372.03	-CH ₃
RMN ¹H (ppm) <i>Espectro # 12, pág. 68</i>	
0.908(s,3H)	H en C-18
1.006(s,3H)	H en C-19
2.271 (s,3H)	H en C-21
3.51 (s,1H)	OH en C-3
4.159 (dd,1H)	H en C-3
6.107(t,1H)	C=CH en C-4
6.934 (t,1H)	C=CH en C-16
RMN ¹³C (ppm) <i>Espectros # 19 y 26 págs. 72 y 76</i>	
15.720	C-18
19.552	C-19
26.868	C-21
66.285	C-3 base de -OH
134.838	C-4 vinílico
145.034	C-16 vinílico
154.815	C-17 vinílico
196.411	C-20 base C=O
201.408	C-6 base C=O
EM-IE (m/z) <i>Espectro # 33, pág. 80</i>	
344	Impureza

328	M+(pico base)
313	M+ -[CH ₃] [•]
295	313 - H ₂ O
285	M+ -[CH ₃ C=O] [•]

5.1.6 Caracterización de (A-6): 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

La siguiente reacción fue la esterificación del alcohol con el Ácido Ciclopentanoico



3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-6).

Tabla 7.

Propiedades físicas y espectroscópicas del (A-6).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	169 – 171
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₆ O ₄
Peso molecular (g/mol)	424
Rendimiento	82%
Valor Espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹) <i>Espectro # 6, pág. 64</i>	
2945.51	CH ₃ y CH ₂
2868.13	CH ₃ y CH ₂
1727.96	C=O de éster

1691.64	C=O α,β insaturado en C-6
1664.40	C=O α,β insaturado en C-20
1638.81	Estiramiento C=C
1370.45	CH ₃
1233.64	Estiramiento C-O-C de éster
1172.75	Estiramiento C-O-C de éster
RMN ¹H (ppm) Espectro # 13, pág. 68	
0.930(s,3H)	H en C-18
1.063(s,3H)	H en C-19
2.277 (s,3H)	H en C-21
5.328	H en C-3
6.091(t,1H)	C=CH en C-4
6.709 (t,1H)	C=CH en C-16
RMN ¹³C (ppm) Espectros # 20 y 27 págs. 72 y 76	
15.751	C-18
19.625	C-19
20.534	C-21
68.897	C-3 base de CH ₃ COO-
129.457	C-4 vinílico
143.734	C-16 vinílico
147.689	C-5 vinílico
154.883	C-17 vinílico
176.410	C 3-1' de C=O de CH ₃ COO-
196.564	C-20 base C=O
201.787	C-6 base C=O
EM-IE (m/z) Espectro # 34, pág. 80	
425	M+
328	M+ -[C ₅ H ₈]C=O• (pico base)

5.1.7 Caracterización de (A-6): 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

La siguiente reacción fue la esterificación del alcohol con el Ácido Ciclohexanoico.

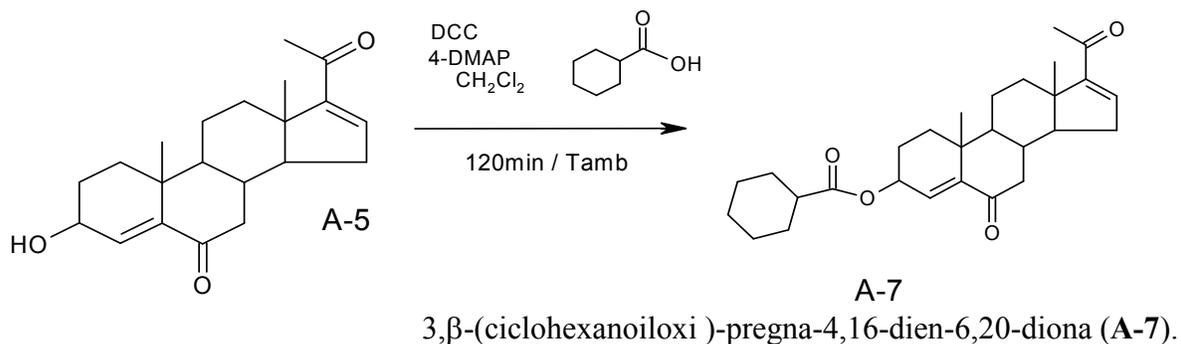


Tabla 8.
Propiedades físicas y espectroscópicas del (A-7).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	150 – 154
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₈ O ₃
Peso molecular (g/mol)	438
Rendimiento	79%
Valor Espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹) Espectro # 7, pág. 65	
2936.71	CH ₃ y CH ₂
2856.28	CH ₃ y CH ₂
1728.82	C=O de éster
1692.28	C=O α,β insaturado en C-6
1665.21	C=O α,β insaturado en C-20
1636.30	Estiramiento C=C
1371.77	CH ₃
1234.47	Estiramiento de CH ₃ -COO-
1166.21	Estiramiento C-O-C de éster
RMN ¹H (ppm) Espectro # 14, pág. 69	
0.929(s,3H)	H en C-18
1.060(s,3H)	H en C-19
2.277 (s,3H)	H en C-21

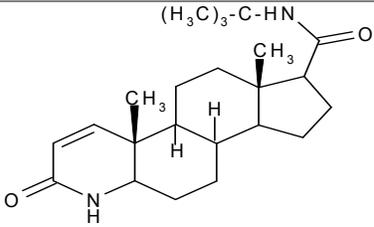
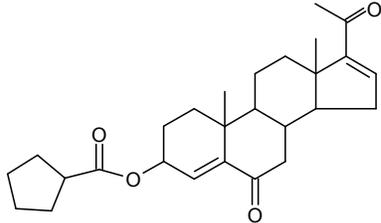
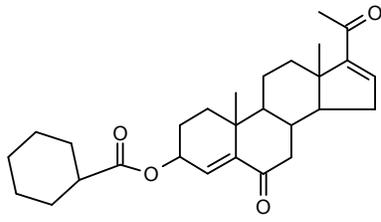
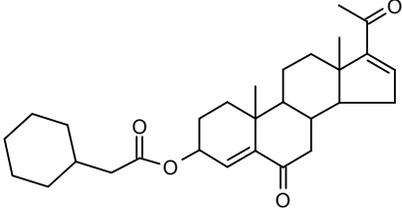
5.326	H en C-3
6.076(t,1H)	C=CH en C-4
6.708 (t,1H)	C=CH en C-16
RMN ¹³C (ppm) Espectros # 21 y 28 págs. 73 y 77	
15.763	C-18
19.631	C-19
20.547	C-21
68.732	C-3 base de CH ₃ COO-
143.778	C-16 vinílico
154.901	C-17 vinílico
175.720	C 3-1' de C=O de CH ₃ COO-
196.576	C-20 base C=O
201.757	C-6 base C=O
EM-IE (m/z) Espectro # 35, pág. 81	
439	M+
328	M+ -[C ₆ H ₉]C=O• (pico base)

5.2 Resultados de la Sección Biológica.

En la tabla 9, se muestran los resultados obtenidos para la inhibición de la enzima 5α -reductasa por los nuevos compuestos **A-6** y **A-7**.

Tabla 9.

Resultados del ensayo *in vitro* con la enzima 5α -reductasa para determinar IC_{50} .

Compuesto	IC_{50}
 <p>(H₃C)₃-C-HN *Finasterida</p>	8.5 nM
 <p>A-6</p>	No presenta Inhibición de la enzima 5α -reductasa.
 <p>A-7</p>	No presenta Inhibición de la enzima 5α -reductasa.
 <p>**AM-15</p>	50 μM

*Compuesto de referencia para la inhibición a la enzima 5α -reductasa.

** Compuesto que se tomo como modelo para la síntesis de **A-6** y **A-7**, ya que presenta inhibición de la enzima 5α -reductasa.

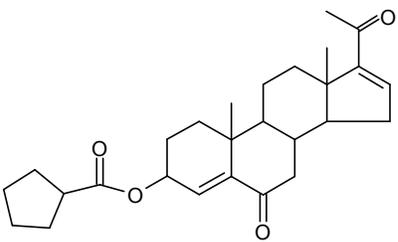
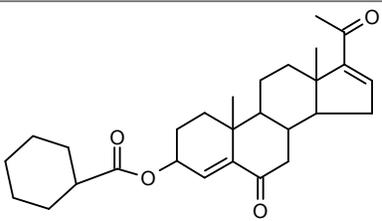
IC₅₀. Cantidad de sustrato para inhibir al 50% de la actividad de la enzima.

Como se observa en la tabla 9 (pág. 43) los compuestos **A-6** y **A-7** no inhibieron a la enzima la enzima 5 α -reductasa. Al contrario de lo esperado ambos compuestos estimularon la formación de DHT ³[H]. Por lo tanto se propuso calcular su EC₅₀ (concentración del esteroide que estimula el 50% de la actividad enzimática).

Los valores obtenidos experimentalmente se encuentran reportados en la tabla 10 (pág. 44) (28,29 y 30).

Tabla 10.

Resultado del ensayo *in vitro* con la enzima 5 α -reductasa para determinar EC₅₀.

Compuesto	EC ₅₀
 A-6	3nM
 A-7	1nM

EC₅₀. Cantidad de sustrato para estimular al 50% de la actividad de la enzima.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Discusión de la Síntesis Química.

- **Acetato de 16-dehidropregnenolona (A-1).**

Este compuesto es la materia prima de la síntesis que realizamos. Este compuesto se encuentra disponible comercialmente con el nombre de 3 β -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona y representa el punto de partida para la mayoría de los esteroides debido a, que presenta grupos funcionales necesarios para transformarse en una gran variedad de productos.

Para poder realizar el trabajo de síntesis, fue necesario caracterizar la materia prima, mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2 (pág. 31).

En el espectro de IR (Espectro 1, pág. 62), dentro de las señales más importantes tenemos las absorciones de la zona de los metilos y metilenos en 2941.04 cm^{-1} y 1369.83 cm^{-1} , la zona de los carbonilos en 1731.06 cm^{-1} y 1662.87 cm^{-1} correspondiente a los carbonilos del grupo acetoxi en C-3 y de la cetona α,β -insaturada en C-20 respectivamente; La banda en 1587.69 cm^{-1} indica la presencia de un doble enlace conjugado y las señales en 1236.34 cm^{-1} 1036.15 cm^{-1} respectivamente la vibración de C-O-C del éster en C-3.

En cuanto a la RMN ^1H (Espectro 8, pág. 66), se aprecian las señales características de las señales de los metilos angulares en C-18 y C-19 como son los singuletes en 0.920 y 1.060 ppm que integran para 3 protones cada una.

También se observan otras dos señales simples en 2.037 y 2.265 ppm que integran para 3 protones cada una, asignadas al metilo en C-21 y al metilo del grupo acetato en C-3 respectivamente. En la zona de los protones vinílicos se observó un dobletes en 5.378 ppm

y un doble de dobles en 6.714 ppm integrando cada uno para un protón, los cuales se deben al protón vinílico en C-6 y C-16 respectivamente. La señal múltiple, que integra para un protón en 4.612 ppm se asignó al protón en C-3.

La RMN ^{13}C (Espectro 15 y 22, págs. 70 y 74), muestra las señales en 15.683 ppm 19.198 ppm y 21.407 ppm las cuales se asignaron a los carbonos de los metilos en C-18, C-19 y C-21. En la zona de los carbonos vinílicos (sp^2) se aprecian las señales en 140.233 ppm y 121.964 ppm asignadas para C-5 y C-6. Las señales observadas en 155.316 ppm y 144.394 ppm corresponden a los carbonos C-17 y C-16. En 170.516 ppm se tiene una señal debida al carbono de la cetona en C-3 y el desplazamiento en 196.814 ppm se asignó al carbono del carbonilo en C-20.

La EM-IE de (Espectro 29, pág. 78). Se observó un pico pequeño en 341 m/z debido a la pérdida de $[\text{CH}_3 \cdot]$. También se observa la pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3 \text{COOH} \cdot]$ de un ión molecular con un pico de 296 m/z que corresponde al pico con 100% de abundancia relativa (pico base). El pico siguiente en 281 m/z se debe a la pérdida de 15 unidades a partir del pico base que puede deberse a la pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3 \cdot]$.

- **3-Acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona (A-2).**

En la síntesis de este compuesto se formó un epóxido entre C-5 y C-6 a partir de la doble ligadura que existía entre ellos. La epoxidación se realizó con m-CPBA en CHCl_3 . El compuesto deseado se obtuvo con un rendimiento del 89 % y se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas mostradas en la tabla 3 (pág. 33).

En el espectro de IR (Espectro 2, pág. 62), dentro de las señales más importantes tenemos las absorciones de la zona de los metilos y metilenos en 2940.83 cm^{-1} , 2859.32 cm^{-1} y 1371.81 cm^{-1} , la zona de los carbonilos en 1734.51 cm^{-1} y 1660.48 cm^{-1}

correspondiente a los carbonilos del grupo acetoxi en C-3 y de la cetona α,β -insaturada en C-20 respectivamente; La banda en 1588.54 cm^{-1} indica la presencia de un doble enlace conjugado y las señales en 1252.04 cm^{-1} 1040.64 cm^{-1} respectivamente la vibración de C-O-C del éster en C-3.

En cuanto a la RMN ^1H (Espectro 9, pág. 66), se observa la desaparición de la señal en 5.386 ppm correspondiente al protón vinílico en C-6, apareciendo una señal doble en 4.960 ppm que integra para un protón en el carbono base del epóxido. La señal múltiple en 4.777 ppm se asignó al protón en C-3; las señales simples en 0.860, 1.126 y 2.031 ppm que integran para tres protones cada una corresponden a los metilos angulares C-18, C-19 y al metilo α al carbonilo de C-21 respectivamente. La señal en 6.696 que integra para un protón se asignó al protón vinílico C-16.

En la RMN ^{13}C (Espectro 16 y 23, págs. 70 y 74), las señales en 15.779, 16.934 y 21.370 ppm se refieren a los carbonos de los metilos en C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Las señales en 63.247 y 65.346 ppm corresponden a los carbonos cuaternarios que forman la base del epóxido. Las asignaciones en 144.077 y 155.225 ppm en la zona de los carbonos vinílicos corresponden a C-16 y C-17 respectivamente. El desplazamiento químico en 196.710 se debe al carbono C-20 base del carbonilo.

La EM-IE de (Espectro 30, pág. 78). Se observa un Ión molecular M+1 de 372 m/z que corresponde al peso molecular de **A-2**. El pico de 357 m/z se debe a la pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3\cdot]$ a partir de un ión molecular. La señal en 329 m/z se debe a la pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3\text{C}=\text{O}\cdot]$ a partir del ión molecular. El pico base se localizó en 312 m/z y se debe a la pérdida de un radical $[\text{CH}_3\text{COOH}\cdot]$ proveniente del ión molecular.

- **3-Acetoxi-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (A-3).**

En la síntesis del compuesto (A-3) se empleó CrO_3 disuelto en agua para obtener un grupo ceto en C-6, aunque también se produce la formación de un grupo OH en posición C-5.

Después de lavar el producto con agua para eliminar el Cromo y recristalizar para obtener el producto con mayor pureza, el rendimiento que se obtuvo fue de 70%. Las propiedades físicas espectroscópicas obtenidas se encuentran en la tabla 4 (pág. 34) y a continuación se discuten.

En el espectro de IR (Espectro 3, pág. 63). Este espectro muestra dentro de las señales más importantes la banda característica de los OH en 3451 cm^{-1} que se asignó al oxhidrilo en C-5. También presenta una señal en 1713.61 cm^{-1} que se asigna al carbonilo presente en C-6 y la señal de 1665.06 cm^{-1} al carbonilo α,β -insaturada en C-20. Las señales en 2942.45 y 1436.06 cm^{-1} corresponden a los grupos metilo y metilenos. También se observan señales que indican la vibración del grupo éster presente en C-3 en 1237.73 y 1039.77 cm^{-1} .

En RMN ^1H (Espectro 10 pág. 67), no aparece más la señal de 4.960 ppm correspondiente al protón en C-6. También tenemos las señales en 0.834, 0.851 y 2.252 ppm respectivamente corresponden a los metilos presente en C-18, C-19 y C-21. La señal del protón vinílico en C-16 se mantiene constante como una señal doble de dobles en 6.681 ppm; la señal múltiple que integra para un protón en 5.010 ppm corresponde al protón en C-3. La señal triple en 2.871 ppm que integran para dos protones se asignó a los protones en C-4 y la señal presente en 2.525 ppm que corresponde al metilo del grupo acetoxi.

La RMN ^{13}C (Espectro 17 y 24, págs. 71 y 75), tiene señales importantes dentro de las que las destacan la señal en 80.216 ppm que se asignó al carbono base del oxhidrilo en C-5 y la señal en 211.867 ppm se asignó a la presencia del grupo carbonilo de acetona en C-6. Las señales que permanecieron constantes fueron las de metilos en C-18, C-19 y C-21 en 13.841, 15.763 y 21.352 ppm respectivamente. La señal en 27.088 ppm se debe al metilo del ester en C3-2'.

La EM-IE de (Espectro 31, pág. 79), muestra un ión molecular en 388 m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **A-3**. Presenta también un pico en 373 m/z que se debe a la pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3^*]$ a partir del ión molecular. La señal en 345 m/z se debe a la pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3\text{C}=\text{O}^*]$ a partir del ión molecular. El pico base se localizó en 328 m/z y se debe a la pérdida de una molécula de agua ó deshidratación del alcohol en C-5 del fragmento anterior.

- **3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona(A-4).**

El siguiente paso de la ruta de síntesis fue, la eliminación del oxhidrilo presente en C-5 y formar un doble enlace entre los carbonos C-4 y C-5. La técnica empleada requirió del uso cloruro de tionilo y piridina bajo una atmósfera de Nitrógeno. El rendimiento de esta reacción fue 52 %. El producto y se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. Los resultados se encuentran reportados en la tabla 5 (pág. 36).

En el IR (Espectro 4, pág. 63), se observó la desaparición de la banda intensa en 3451.63 cm^{-1} lo que indica la eliminación del grupo oxhidrilo en C-3. Las señales en 2942.63 , 2870.59 y 1371.72 cm^{-1} son representativas de los metilos y metilenos. La señal presente en 1735.08 cm^{-1} corresponde al carbonilo del éster. En 1681.05 y 1658.19 cm^{-1} se

tienen bandas que corresponden a los carbonilos α,β -insaturados en C-6 y C-20 respectivamente y las bandas en 1234.37 y 1041.94 cm^{-1} se deben a las señales de estiramiento C-O-C características del ester.

En cuanto a la RMN ^1H (Espectro 11, pág. 67), confirmó la formación del enlace doble entre C-4 y C-5 ya que la señal en 6.082 ppm que integra para un protón se asignó al protón vinílico presente en C-4. Las señales en 0.915, 1.047 y 2.055 ppm que integran cada una para tres protones se asignaron a los protones de los metilos en C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal en 5.313 ppm corresponde al protón del carbón base en C-3 y la señal doble de dobles que integra para un protón en 6.693 ppm se debe al protón vinílico en C-16.

La RMN ^{13}C (Espectro 18 y 25, págs. 71 y 75), observamos la aparición de dos señales importantes en 129.043 y 147.867 ppm que se asignaron a los carbonos vinílicos en C-4 y C-5 y que confirman la eliminación del grupo oxhidrilo en C-5. Las señales en 143.893 y 154.826 ppm son debidas a los carbonos de vinilo en C-16 y C-17 respectivamente. En 170.709 ppm tenemos la señal que corresponde al carbonilo del ester presente en C-3-1'. El desplazamiento químico en 196.606 ppm se asignó al carbono del carbonilo en C-20 y la señal en 201.813 ppm corresponde al carbonilo de cetona en C-6. Los desplazamientos químicos presentes en 15.741, 19.541 y 21.152 ppm pertenecen a los carbonos de metilos en C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal en 69.193 ppm corresponde al carbono base del ester en C-3 y la señal en 27.096 ppm fue asignada al carbono metílico del ester en C-3-2'.

La EM-IE de (Espectro 32, pág. 79), muestra un ión molecular de 370 m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **A-4**. El pico base se encuentra en 328 m/z y

se debe a la pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3\text{COOH}^*]$ del ión molecular. La pérdida de una entidad $[\text{CH}_3^*]$ del fragmento anterior genera un pico en 313 m/z.

- **3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-5).**

El siguiente paso en la ruta de síntesis fue la hidrólisis del éster presente en el carbono número 3 de A-4. Dicha hidrólisis fue promovida con el uso de NaOH al 10 % y MeOH a temperatura ambiente, formándose así el respectivo alcohol en C-3 del esteroide. El producto final, A-5 se obtuvo con un rendimiento del 58% y se identificó por sus propiedades físicas y espectroscópicas, resultados reportados en la tabla 6 (pág. 38).

En el IR (Espectro 5, pág. 63), confirmó la hidrólisis del éster en C-3, ya que la presencia de una banda ancha en 3419.49 cm^{-1} indicó la formación del alcohol como resultado de esta reacción. Las señales en 2939.12 y 2861.34 y 1372.03 cm^{-1} corresponden a los metilos y metilenos presentes en la estructura. Las bandas en 1678.78 y 1650.41 cm^{-1} son debidas a los carbonilos α,β -insaturados en C-6 y C-20 respectivamente.

En cuanto a la RMN ^1H (Espectro 12, pág. 68), se observó que las señales en 0.908 1.006 y 2.271 ppm corresponden a los metilos en C-18, C-19 y C-21 respectivamente y permanecen sin sufrir cambio alguno. Sin embargo, la señal debida al metilo del éster en C-3 desapareció, confirmando la hidrólisis del éster en el carbono 3. También observamos una señal importante en 3.512 que corresponde al carbono base del alcohol en C-3. Las señales en 6.107 y 6.934 ppm que integran para un protón corresponden a los protones de los carbonos vinílicos en C-4 y C-16 respectivamente y la señal en 4.159 ppm que integra para un protón se asignó al protón en C-3.

Dentro de los desplazamientos químicos más importantes en RMN ^{13}C (Espectros 19 y 26, págs. 72 y 76), tenemos la señal en 66.258 ppm que corresponde al carbono base del oxhidrilo en C-3. Los carbonos vinílicos C-4, C-5 y C-16 y C-17 presentan señales en 134.838, 145.711 y 145.034, 154.815 ppm respectivamente. En 15.720, 19.552 y 26.868 ppm se encuentran las señales asignadas a los metilos y se mantuvieron inalteradas. También se mantuvieron constantes las señales en 196.411 y 201.408 ppm que corresponden al carbonilo en C-20 y C-6 respectivamente.

En EM-IE de (Espectro 33, pág. 80), se observó un ión molecular en 328 m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **A-5** y también es el pico base del espectro. La pérdida de un fragmento $[\text{CH}_3\cdot]$ del ión molecular, mostró un pico en 313 m/z. El pico observado en 285 m/z, corresponde a la pérdida de $[\text{CH}_3\text{C}=\text{O}\cdot]$ del ión molecular. También se observó un pico muy pequeño en 295 m/z que se debe a la deshidratación del alcohol en C-3 a partir del fragmento observado en 313 m/z.

La siguiente etapa de la ruta sintética son las esterificaciones del alcohol formado en la reacción anterior (A-5), con el Ácido Cilopentanoico y el Ácido Ciclohexanoico para obtener los ésteres correspondientes.

- **3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-6).**

Para la reacción de esterificación se realizó con el alcohol obtenido en el paso anterior (**A-5**) más el ácido ciclopentanoico, también se utilizó dicitclohexilcarbodiimida, dimetilaminopiridina como catalizadores y diclorometano como disolvente, también se controló la humedad del sistema mediante de una atmósfera de nitrógeno, obteniendo como

resultado un éster nuevo y que no está reportado en la literatura. En esta reacción se obtuvo un rendimiento del 82% y las propiedades físicas y espectroscópicas por las cuales se determinó su estructura se encuentran en la tabla 7 (pág. 39) y a continuación se discuten.

En el IR (Espectro 6 pág. 64), **no** se observa más la presencia de la banda ancha en la zona de los alcoholes, lo que hace suponer la esterificación del ácido ciclopentanoico en C-3. Las señales en 2945.51, 2868.13 y 1370.45 cm^{-1} son características de los metilos y metilenos. La señal que confirma la esterificación se observa en 1727.96 cm^{-1} , las bandas en 1233.64 y 1172.75 cm^{-1} que corresponden a la señal de estiramiento de C-O-C del éster. Las bandas en 1691.64 y 1664.40 cm^{-1} se deben a los carbonilos α,β -insaturados en C-6 y C-20 respectivamente. También tenemos señales de estiramiento de C=C en 1638.81 cm^{-1} .

En cuanto a la RMN ^1H (Espectro 13, pág. 68), se aprecian las señales de los metilos C-18 C-19 y C-21 en 0.930, 1.063 y 2.277 ppm respectivamente. En 5.328 tenemos una señal múltiple que integra para un protón, señal que se asignó al protón que se encuentra en C-3. Las señales de los protones vinílicos en C-4 y C-16 aparecen en 6.091 y 6.709 ppm respectivamente.

La RMN ^{13}C (Espectro 20 y 27, págs. 72 y 76), confirmó la esterificación de **A-5** ya que en la zona de los carbonilos además de las señales de 201.787, 196.564 referentes a los carbonillos en C-6 y C-20, también se observa otra señal en 176.410 ppm que corresponde al carbonilo del éster formado en C-3. También permanecen constantes las señales en 129.457, 147.689 y 143.778 y 154.883 ppm que corresponden a las señales de los carbonos vinílicos en C-4 C-5 y C-16 C-17 respectivamente, así como, las señales de los metilos C-18, C-19 y C-21 cuyas señales aparecieron en 15.751, 19.625 y 20.534 ppm. La señal en 68.897 ppm se debe al carbono base del éster en C-3

La EM-IE de (Espectro 34, pág. 80), confirmó un ión molecular en 425 m/z correspondiente al peso molecular M⁺ de **A-6**. El pico en 328 m/z se debe a la pérdida del fragmento [(C₅H₈)C=O[•]]a partir del ión molecular que corresponde también al pico base ó pico con 100 % de abundancia relativa.

- **3,β-(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-7).**

Para la reacción de esterificación se realizó con el alcohol obtenido anteriormente (**A-5**) más el ácido ciclohexanoico, también se utilizó dicitclohexilcarbodiimida, dimetilaminopiridina como catalizadores y diclorometano como disolvente, se controló la humedad del sistema mediante una atmósfera de nitrógeno, obteniendo como resultado un éster nuevo y que no está reportado en la literatura. En esta reacción se obtuvo un rendimiento del 79% y las propiedades físicas y espectroscópicas por las cuales se determinó su estructura se encuentran en la tabla 8 (pág. 41) y a continuación se discuten.

En el IR (Espectro 7, pág. 65), **no** se observa más la presencia de la banda ancha en la zona de los alcoholes, lo que hace suponer la esterificación del ácido ciclohexanoico en C-3. Las señales en 2936.71, 2856.28 y 1371.77 cm⁻¹ son características de los metilos y metilenos. La señal que confirma la esterificación se observa en 1728.82 cm⁻¹, las bandas en 1234.47 y 1166.21 cm⁻¹ que corresponden a la señal de estiramiento de C-O-C del éster. Las bandas en 1692.28 y 1665.21 cm⁻¹ se deben a los carbonilos α,β-insaturados en C-6 y C-20 respectivamente. También tenemos señales de estiramiento de C=C en 1636.30 cm⁻¹.

En cuanto a la RMN ¹H (Espectro 14, pág. 69), se aprecian las señales de los metilos C-18 C-19 y C-21 en 0.929, 1.060 y 2.277 ppm respectivamente. En 5.326 tenemos una señal múltiple que integra para un protón, señal que se asignó al protón que se

encuentra en C-3. Las señales de los protones vinílicos en C-4 y C-16 aparecen en 6.076 y 6.708 ppm respectivamente.

La RMN ^{13}C (Espectro 21 y 28, págs. 73 y 77), confirmó la esterificación de **A-5** ya que en la zona de los carbonilos además de las señales de 201.757, 196.576 referentes a los carbonilos en C-6 y C-20, también se observa otra señal en 175.720 ppm que corresponde al carbonilo del éster formado en C-3. También permanecen constantes las señales en 129.445, 147.719 y 143.778, 154.901 ppm que corresponden a las señales de los carbonos vinílicos en C-4 C-5 y C-16 C-17 respectivamente, así como, las señales de los metilos C-18, C-19 y C-21 cuyas señales aparecieron en 15.763, 19.632 y 20.547 ppm. La señal en 68.732 ppm se debe al carbono base del éster en C-3

La EM-IE de (Espectro 35, pág. 81), confirmó un ión molecular en 425 m/z correspondiente al peso molecular M^+ de **A-7**. El pico en 328 m/z se debe a la pérdida del fragmento $[(\text{C}_6\text{H}_{10}) \text{C}=\text{O}^\bullet]$ a partir del ión molecular que corresponde también al pico base ó pico con 100 % de abundancia relativa.

6.2 Discusión de las Pruebas Biológicas.

Los resultados reportados en la tabla 9 (pág. 43), indican que los compuestos **A-6** y **A-7** no son inhibidores de la enzima 5α -reductasa y por lo tanto no presentan la actividad antiandrogénica esperada.

Al comparar los compuestos **A-7** y **AM-15** se observó que la falta de un metileno en el grupo sustituyente en C-3 afecta el efecto biológico, pues estimula a la enzima en lugar de inhibirla (tablas 9 y 10, págs. 43 y 44). Por otra parte el efecto estérico, también alteró el resultado biológico ya que al incrementar el número de carbonos en el anillo del grupo sustituyente en C-3 (compuesto **A-7**), con respecto al compuesto **A-6** la EC_{50} disminuye, indicando que se requiere menor concentración de **A-7** para estimular la actividad de la enzima 5α -reductasa (tabla 10).

Lo anterior indica que al modificar el grupo acilo en la posición C-3 del esteroide, por efecto estérico o por una disminución de un metileno que restringe el libre giro del anillo en la molécula, se altera drásticamente la actividad biológica.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados (Físicos, Espectroscópicos y Biológicos) obtenidos de este trabajo, se concluye que:

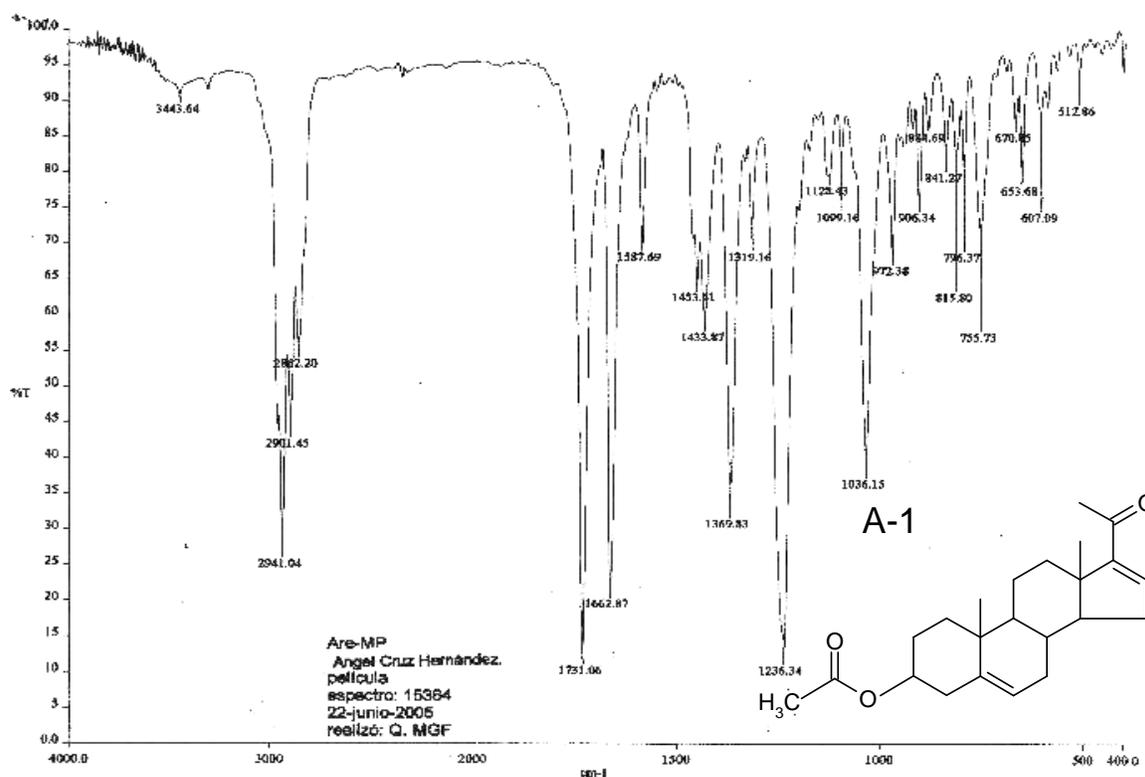
- Se logró la síntesis de los compuestos finales esperados, **el 3,β-ciclopentanoiloxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-6)** y **el 3,β-ciclohexanoiloxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (A-7)** derivados de la progesterona.
- Los compuestos **A-6** y **A-7** no inhibieron la enzima 5α-reductasa del tejido de la próstata de cadáver humano. Por lo que no tienen carácter antiandrogénico a través de este mecanismo. Sin embargo se observó una tendencia inversa, ya que se estimuló la transformación de la T a DHT por la enzima 5α-reductasa.
- El efecto estérico y la reducción del libre giro de los sustituyentes en C-3 por la ausencia de un metileno, proporciona un efecto androgénico en las moléculas sintetizadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

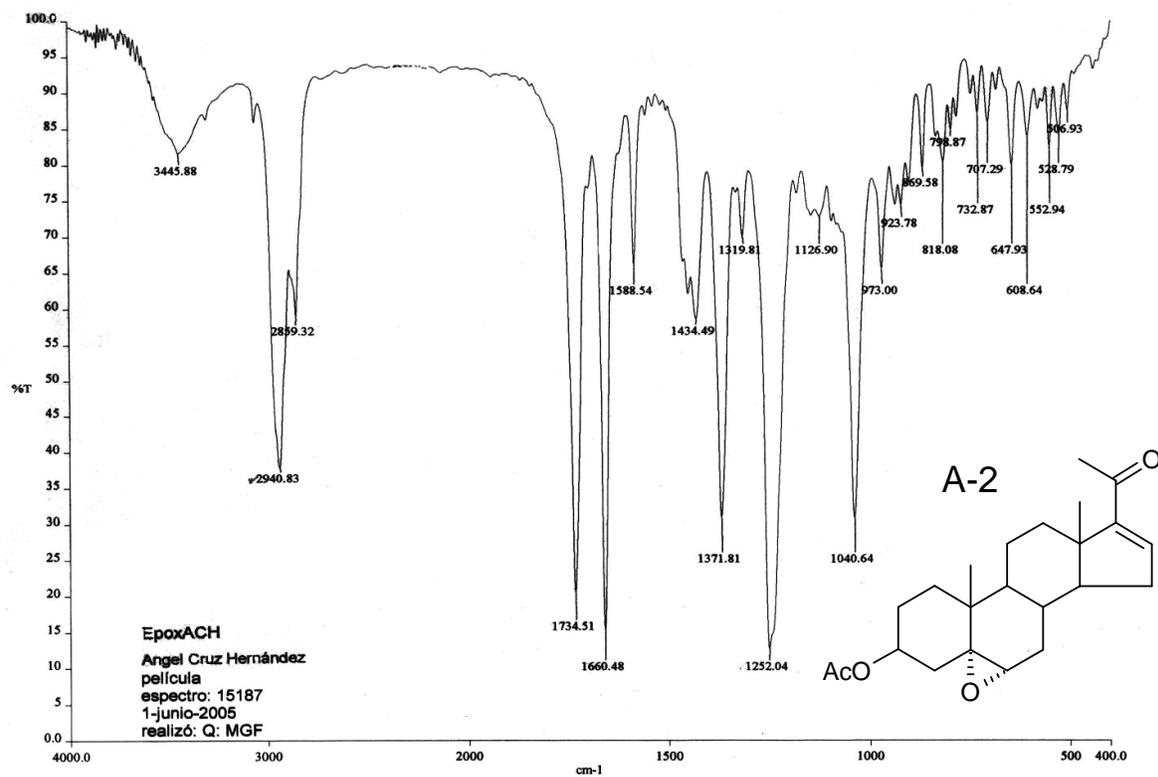
1. Catalona W, Scott W. Carcinoma of prostate In Walsh. P.C. et al. (eds). Campbell's Urology. Fifth Edition. Philadelphia W.B. Saunders y Co. (1986) (1463).
2. Hooker C.W. Reproduction in the male. In Ruch. T.C. Patton H.D. Physiology and Biophysics. 19th De. W.B Saunders Co. Philadelphia. (1965) (1205-1208).
3. Fruzzeeetti F, Bersi Ch, Parrini D, Ricci C, Genazzani A.R. Fertility and Sterility. (1999) (Vol. 64: 413-421).
4. Ramírez E. Síntesis de 6-Halo-16-beta metil-17-alfa valeriloxi-4,6-pregandien-3,20-diona como antiandrógenos. Tesis de Maestría en Química Farmacéutica. Facultad de Química. UNAM. 1998.
5. Tortora G, Anagnostakos N. Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial Harla. 3^a edición. México D.F. (1984).
6. Munguía A. Derivados de la Pregnadiona con un grupo Electronegativo en C-3 como Antiandrógenos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2003.
7. Orozco Chávez. Derivados de la Progesterona como antiandrógenos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México 2003.
8. Cesorsimo R. Carr D. Health-Syst Pharm. (1996) (Vol. 53: 381-383).
9. June M, Meir J, Stampfer J. What causes prostate Cancer? Seminars in Cancer Biology. (Vol 8) (1998).
10. Shiike M, Latkany L, et al. Lack of Effect of a Low-Fat, High Fruit, Vegetable, and Fiber Diet on Serum Prostate-Specific Antigen of Men Without Prostate Cancer. Results from a Randomized Trial. Journal of Clinical Oncology. (2002) (Vol. 20: 3592-3598).

11. Qin L, Wang P, Kaneko T, et al. Estrogen: One of the risks factors in milk for prostate cancer. *Journal of Medical Hypotheses* (2004) (vol. 62. 132-142).
12. Brueggemeier R. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Ed. John Wiley Inc. 5a Ed. USA (1996) Cap. 2.
13. Ramzi S, Vinay K, Stanley L. *Patología Estructural y Funcional*. 4ª edición. Vol. II. Ed. Interamericana. McGraw Hill. Madrid. (2001) (1173-1176).
14. Litter M. *Farmacología Experimental y Clínica*. 6ª Edición. Ed. El Ateneo. Argentina (1980) (1218-1230).
15. Scott J, Engel L. *Mechanism of Action of Steroid Hormones*. Pregnamon Press. N.Y. (1961).
16. Tayler V. *Pharmacognosy*. Editorial. Lea and Febiger. 8ª Edición. Philadelphia, USA. (1981). Capitulo 7.
17. Mc. Murry John. *Química Orgánica*. 3ª Edición. Grupo editorial Iberoamericana USA. (1992) (1071-1078).
18. Bratoeff E, Rubio M, Ramírez E, Flores G, García J, y Ramírez G, *Chemistry Today*. (1998) (Vol. 22: 33-35).
19. Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª edición, Vol. II. Editorial Mc Graw Hill. México. (1997) (1531-1546).
20. Schulster D, Burstein S, Cooke B. *Molecular Endocrinology of steroid Hormones*. Wiley. London (1976).
21. Wilson J. D. *Recent Studies on the Mechanism of action of testosterone*. *New England J. Med.* (1972) (131: 1284-1290).

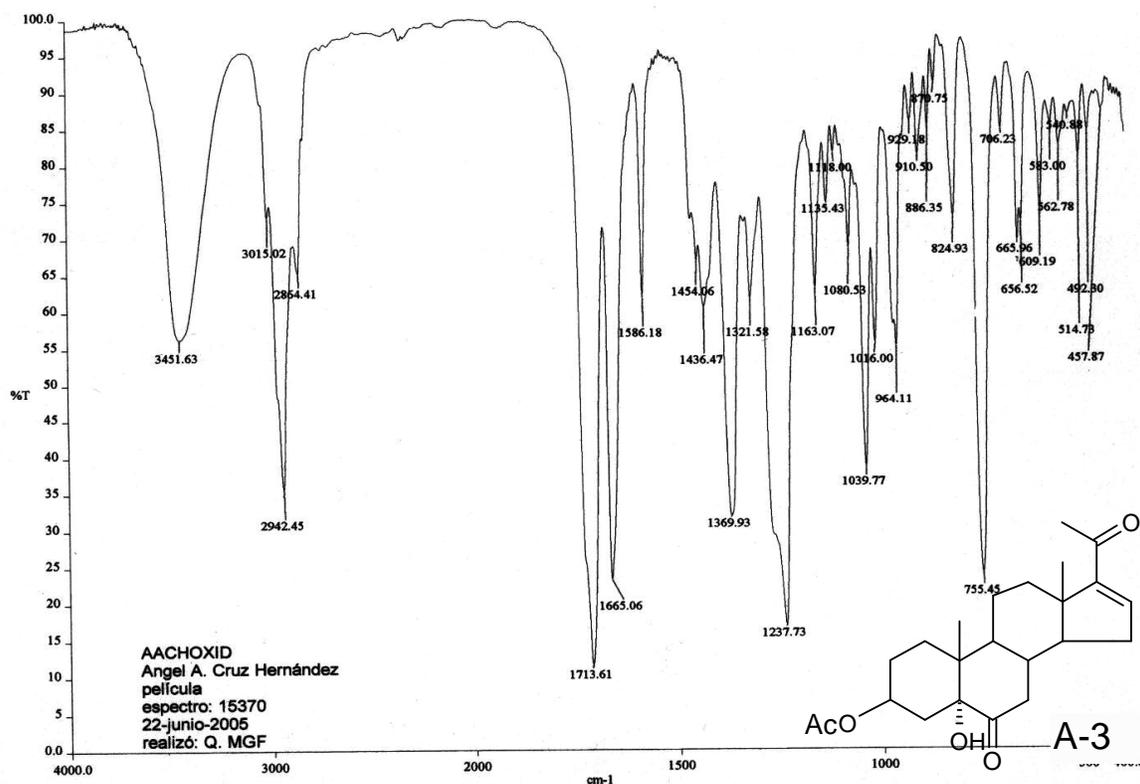
22. Ramírez E. Síntesis de 17-alfa-aciloiloxi derivados del pregnadieno con un sustituyente en C-16-beta como antiandrógenos. Tesis de Doctor en Ciencias. Facultad de Química. UNAM. 2002.
23. Metcalf B, Levy A, and Holt D. Inhibitors of steroid 5α -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne. *Trans. Pharmacol. Science* (1989), (Vol.10: 491-495).
24. Don F, Becket H. Effect of cyproterone acetate in comparison to Flutamide on the ventral prostate of adult male castrated Copenhagen-Fisher rats on Dunning B-3327H tumors. *Andrology*. (1992) (Vol. 24: 113-116).
25. Mukherjee M, Chattopadhyay. et al. Effect of flutamide on the physiological status epididymis and epididymal sperms. *Andrologia* (1992) (Vol. 24: 113-116).
26. Eil C. Ketoconazol binds to the human androgen receptor. *Hormone Metab. Res.* (1992) (Vol 24: 367-270).
27. Labrie F. Sugimoto, Y. *Endocrinology*. (1992) (Vol. 131: 1571).
28. Pérez V, Cabeza M, Bratoeff E, Rubio M, Hueze I, Sánchez M, Ramírez E, y Naranjo-Ramírez E. *Steroids*. (2005) (Vol. 70: 217-224).
29. Teran N. Síntesis de derivados fluorados del pregnadieno con un grupo fenilo en C-16. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Química. UNAM. 2005.
30. Rojas A. Síntesis de esteres halogenados de pregnadieno con un grupo metilo en C-16. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Química. UNAM. 2006.



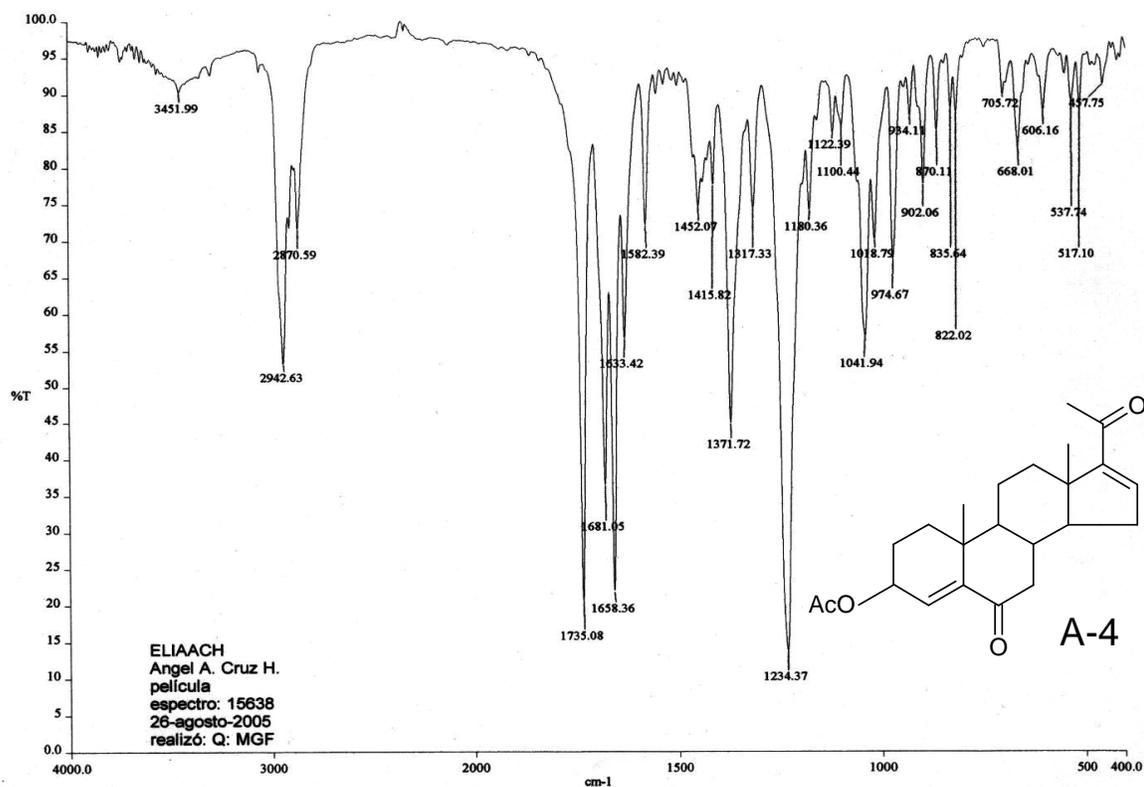
Espectro 1. IR del Acetato de 16-dehidropregnenolona.



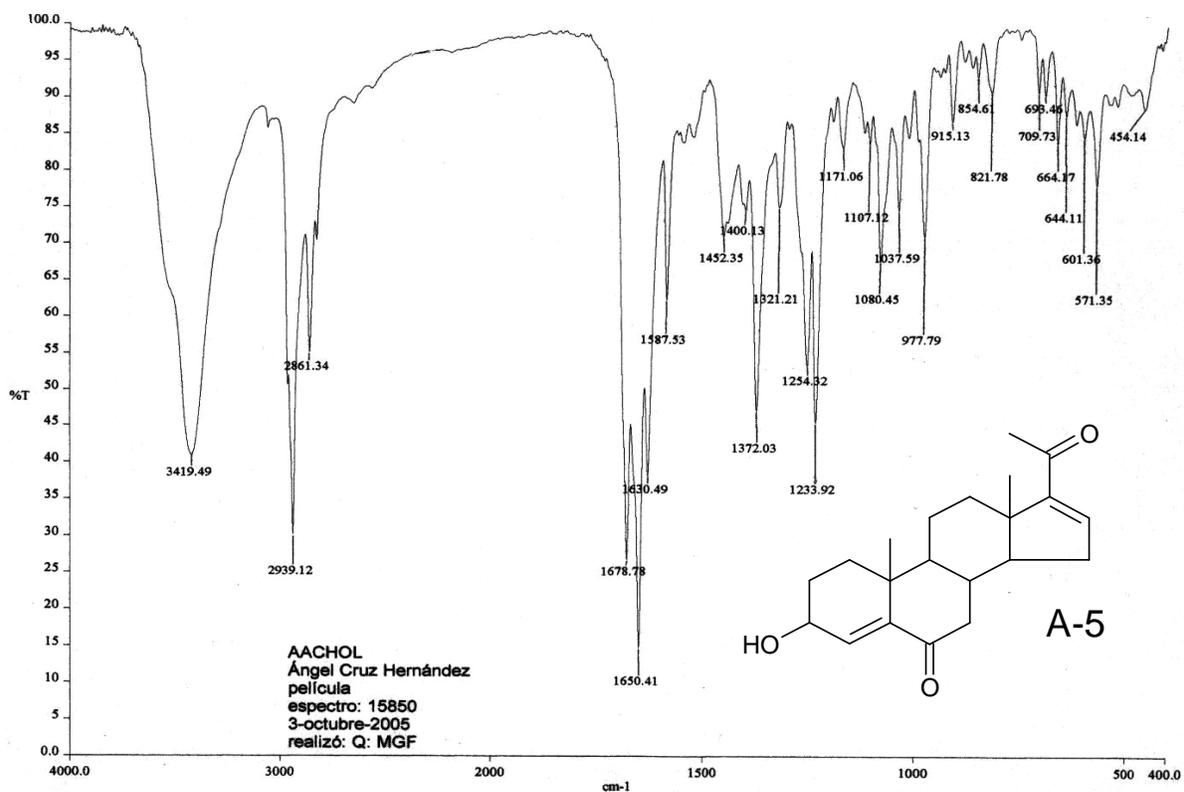
Espectro 2. IR del 3-Acetoxy-5,6-epoxy-pregn-16-en-20-ona.



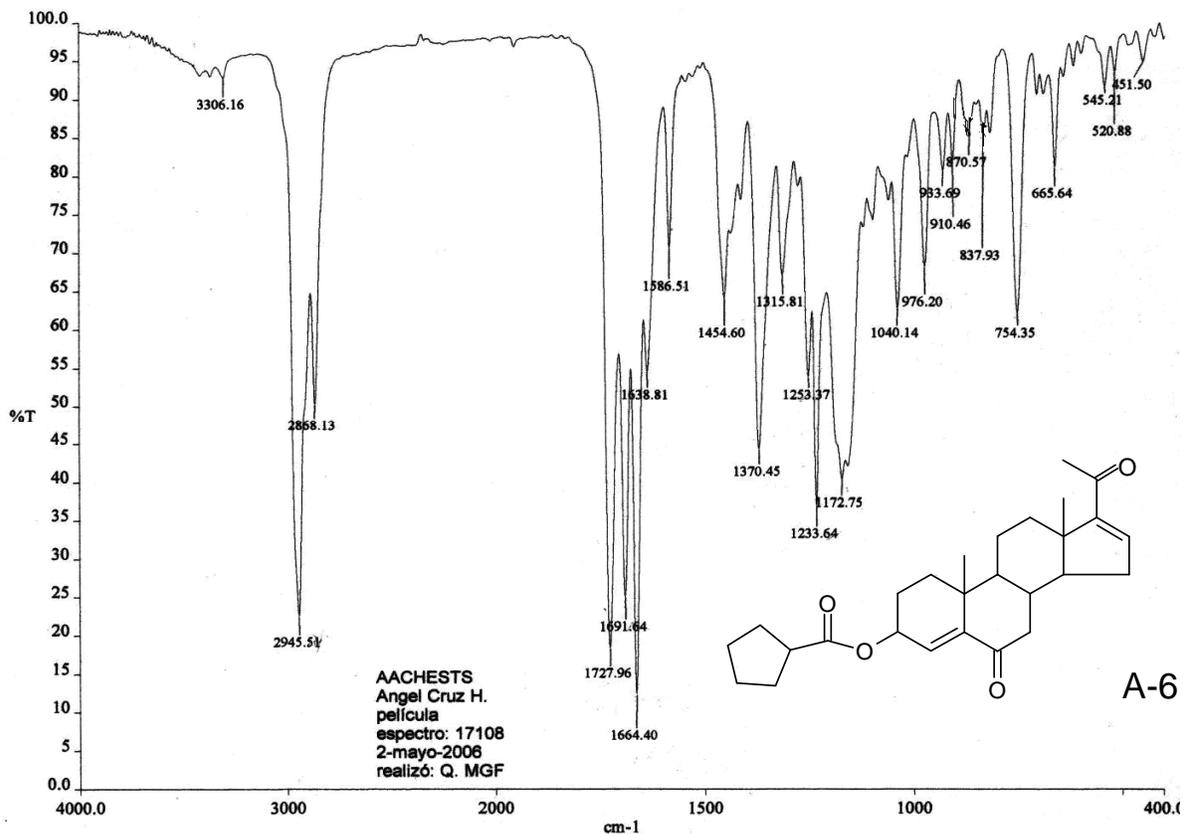
Espectro 3. IR del 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.



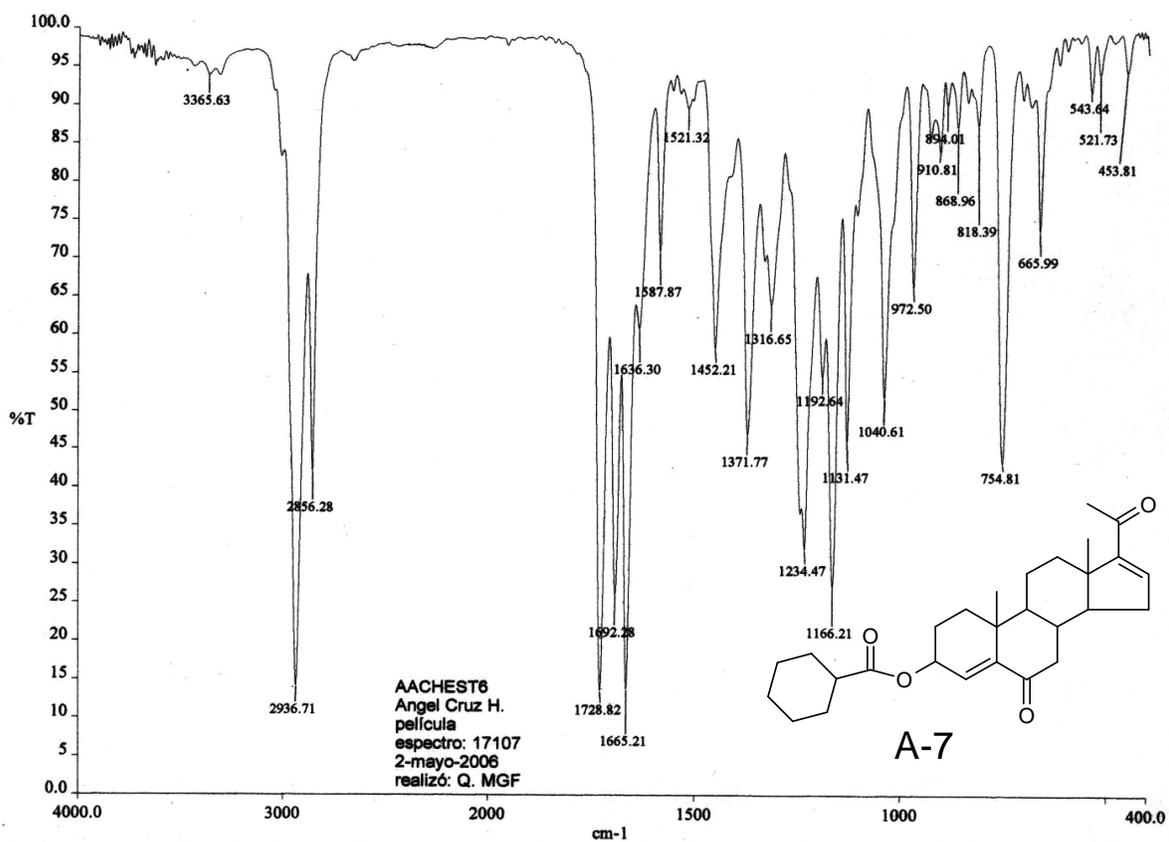
Espectro 4. IR del 3-Acetoxy-pregna-4,16-dien-6,20-diona.



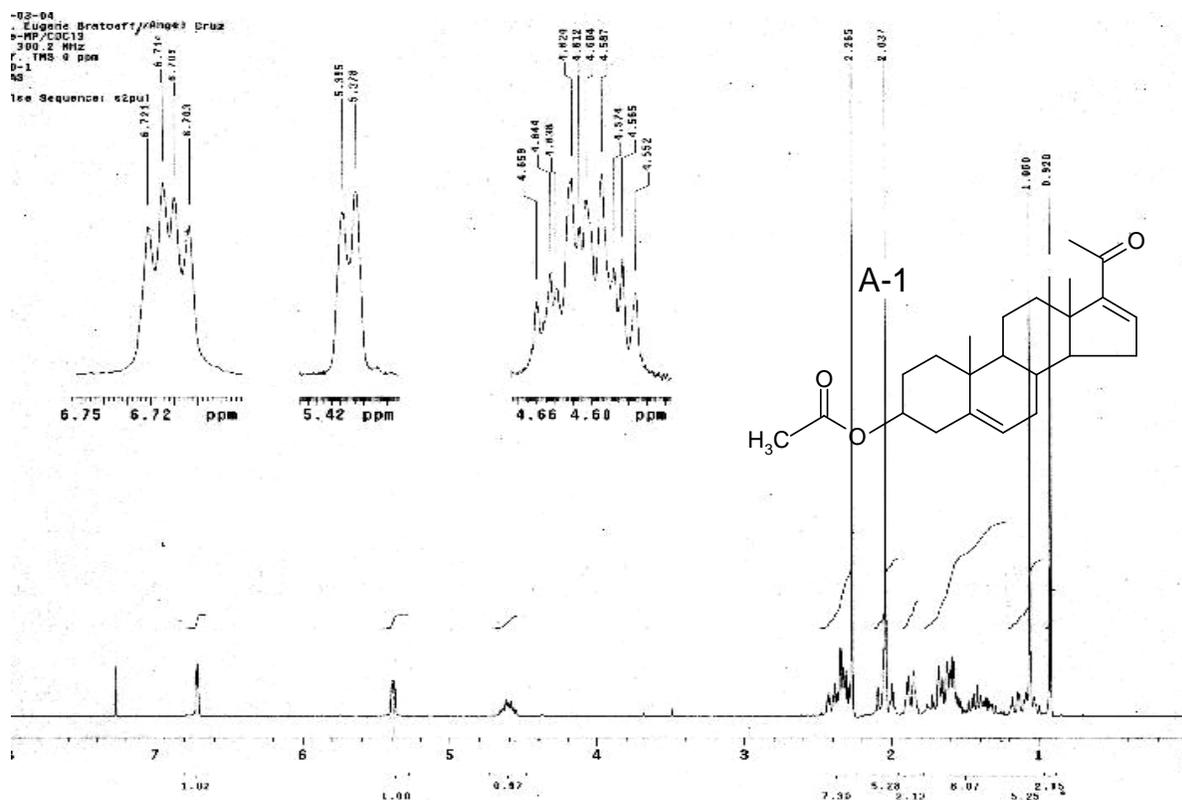
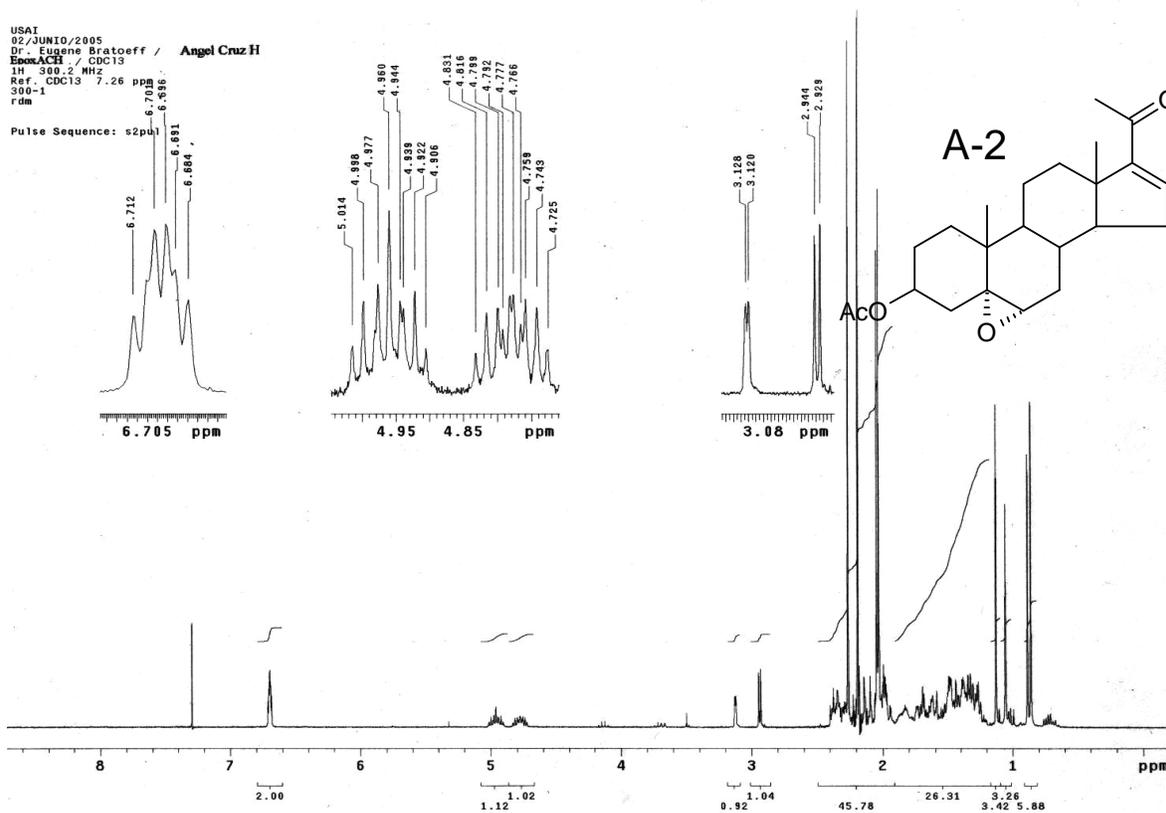
Espectro 5. IR del 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

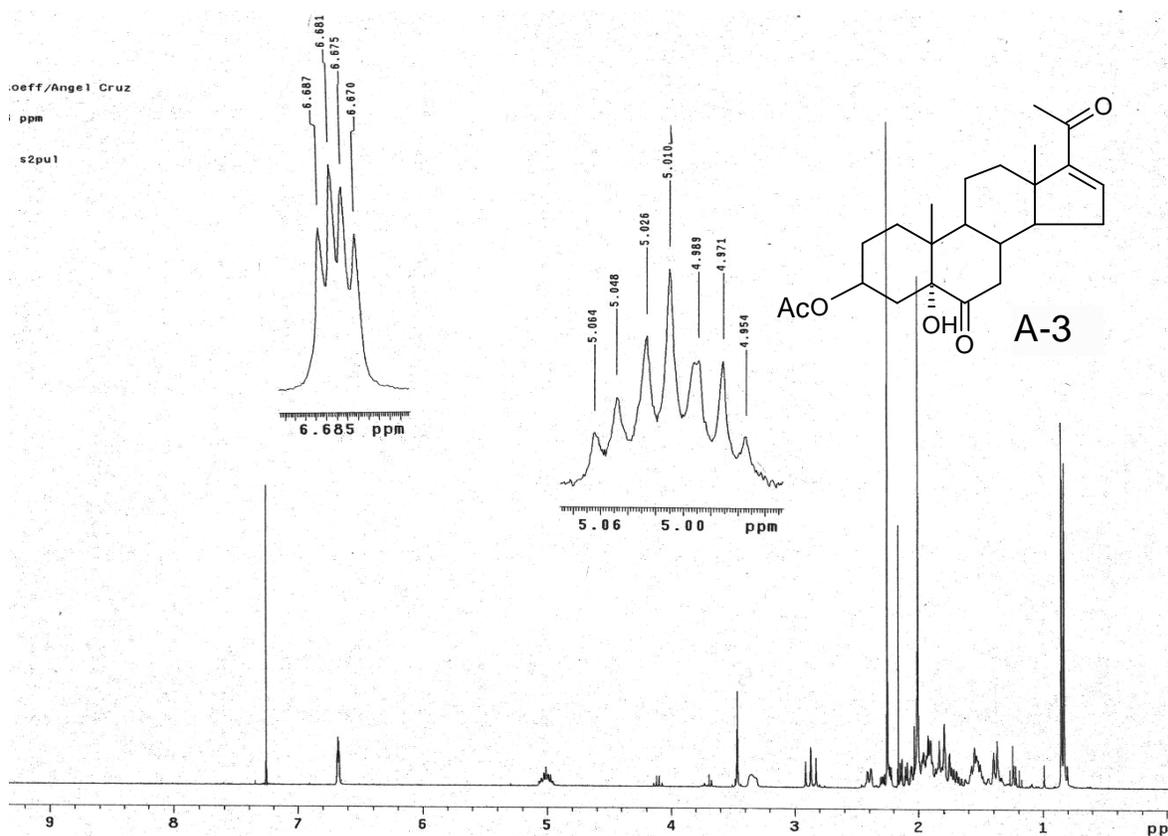


Espectro 6. IR del 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

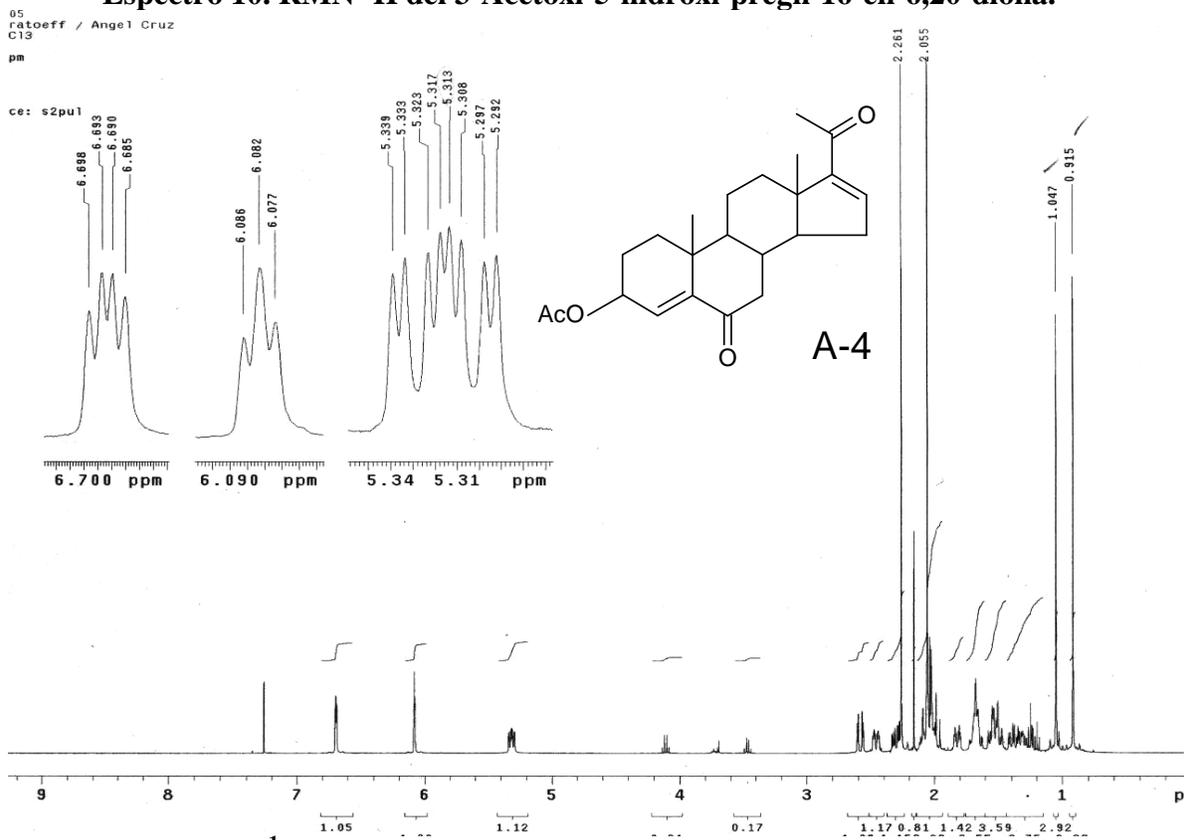


Espectro 7. IR del 3,β-(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

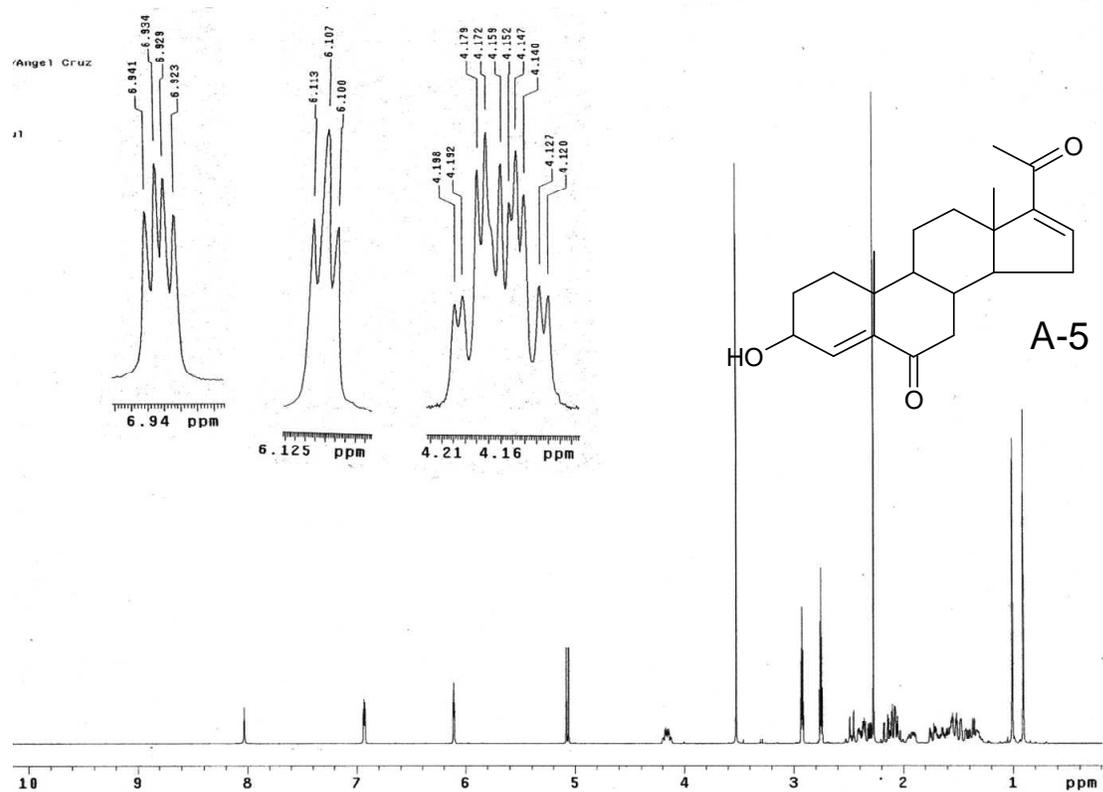
Espectro 8. RMN ^1H del Acetato de 16-dehidropregnenolona.Espectro 9. RMN ^1H del 3-Acetoxy-5,6-epoxy-pregn-16-en-20-ona.



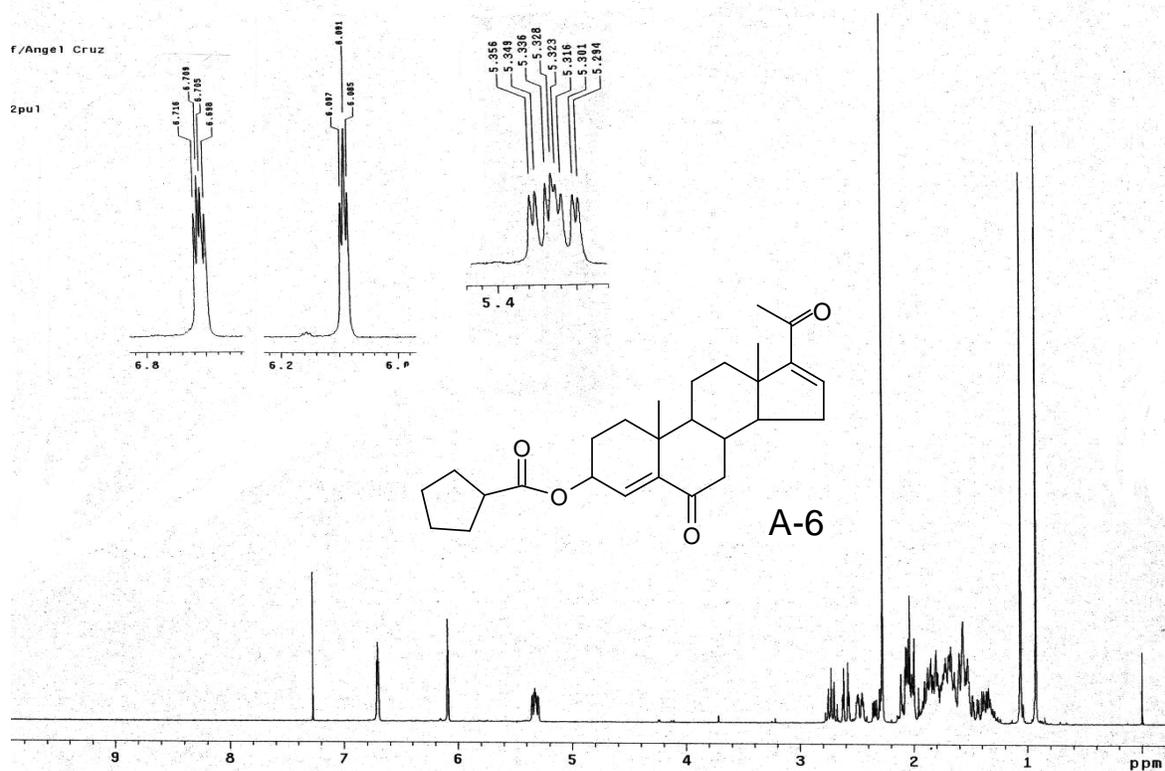
Espectro 10. RMN ^1H del 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.



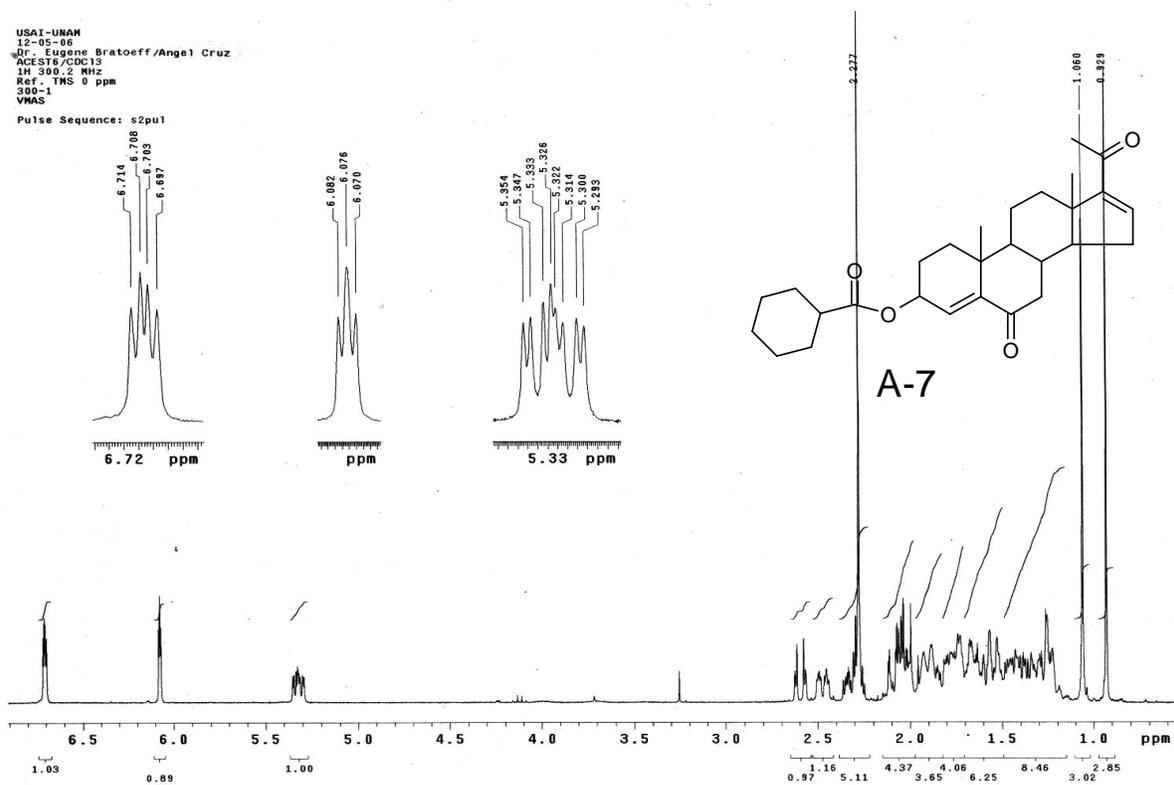
Espectro 11. RMN ^1H del 3-Acetoxy-pregna-4,16-dien-6,20-diona.



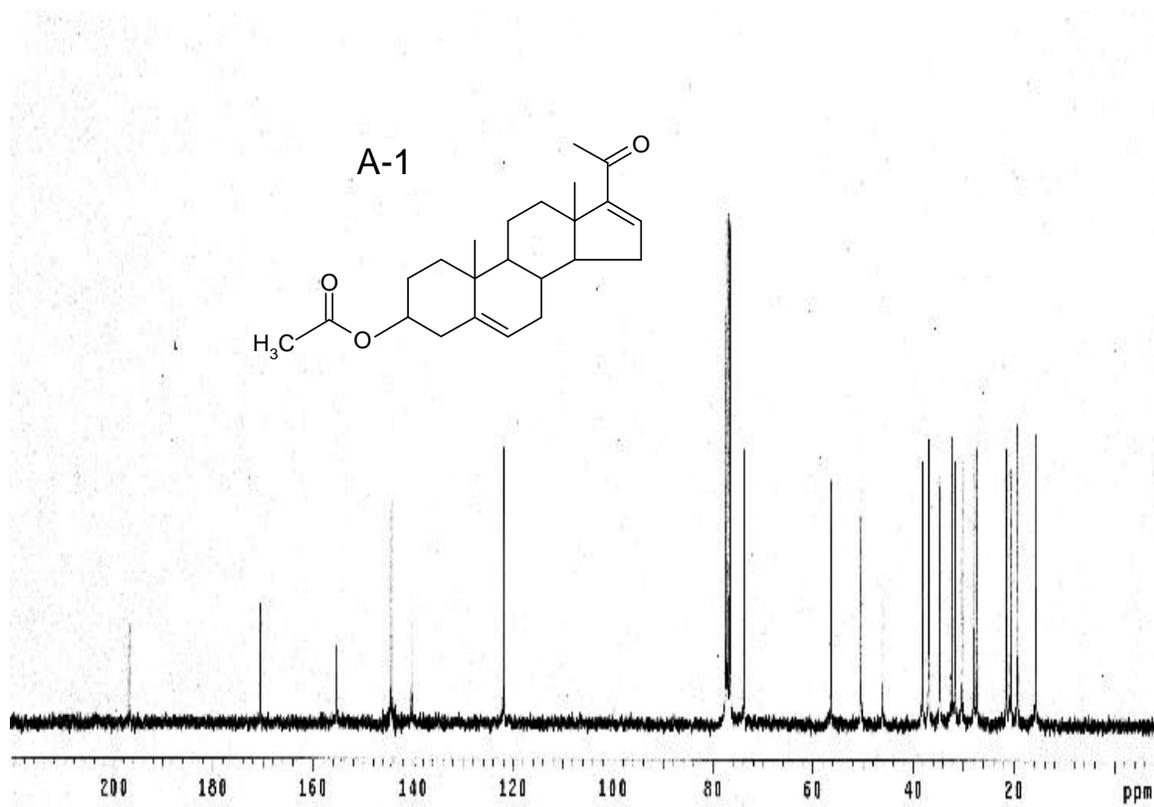
Espectro 12. RMN ^1H del 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.



Espectro 13. RMN ^1H del 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

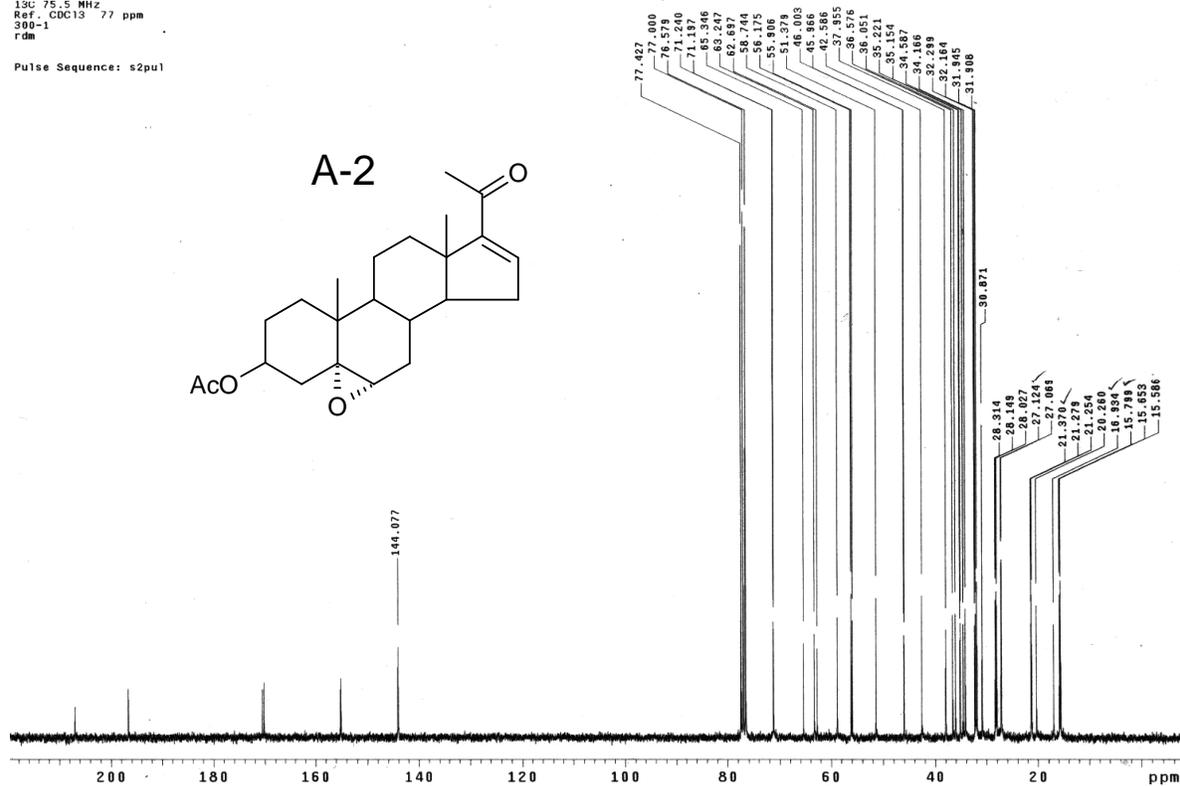


Espectro 14. RMN ^1H del 3, β -(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

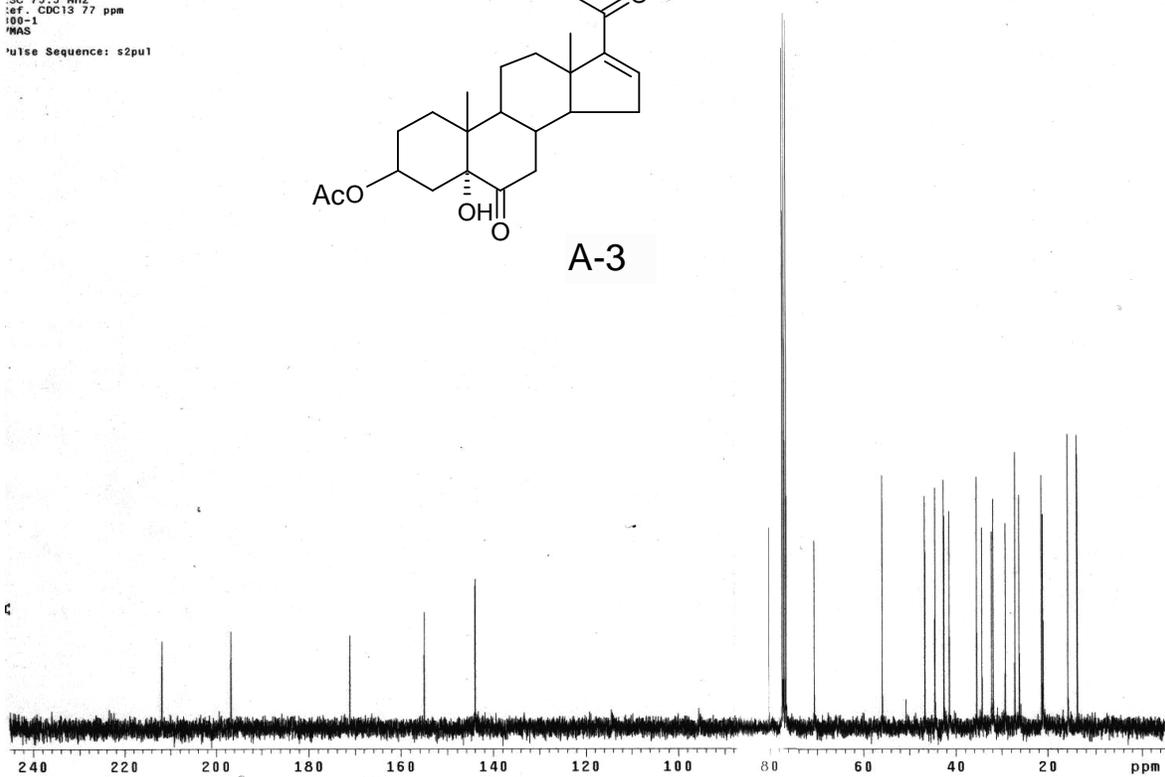
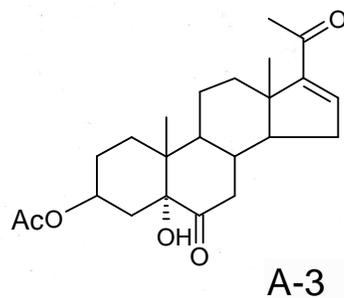


02/JUNIO/2005
 Dr. Eugene Bratoeff / Angel Cruz H
 Esp. NACH CDC13
 13C 75.5 MHz
 Ref. CDC13 77 ppm
 300-1
 rdm

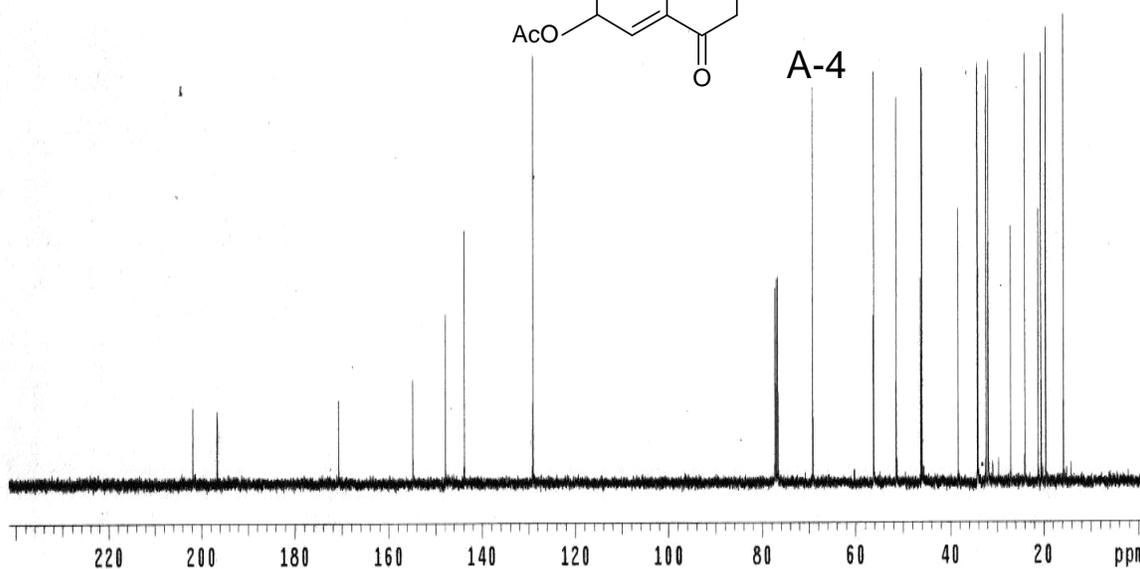
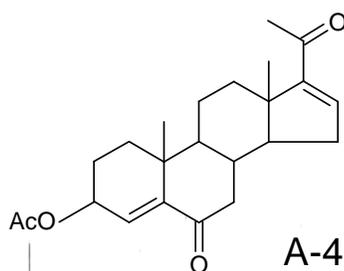
Pulse Sequence: s2pul



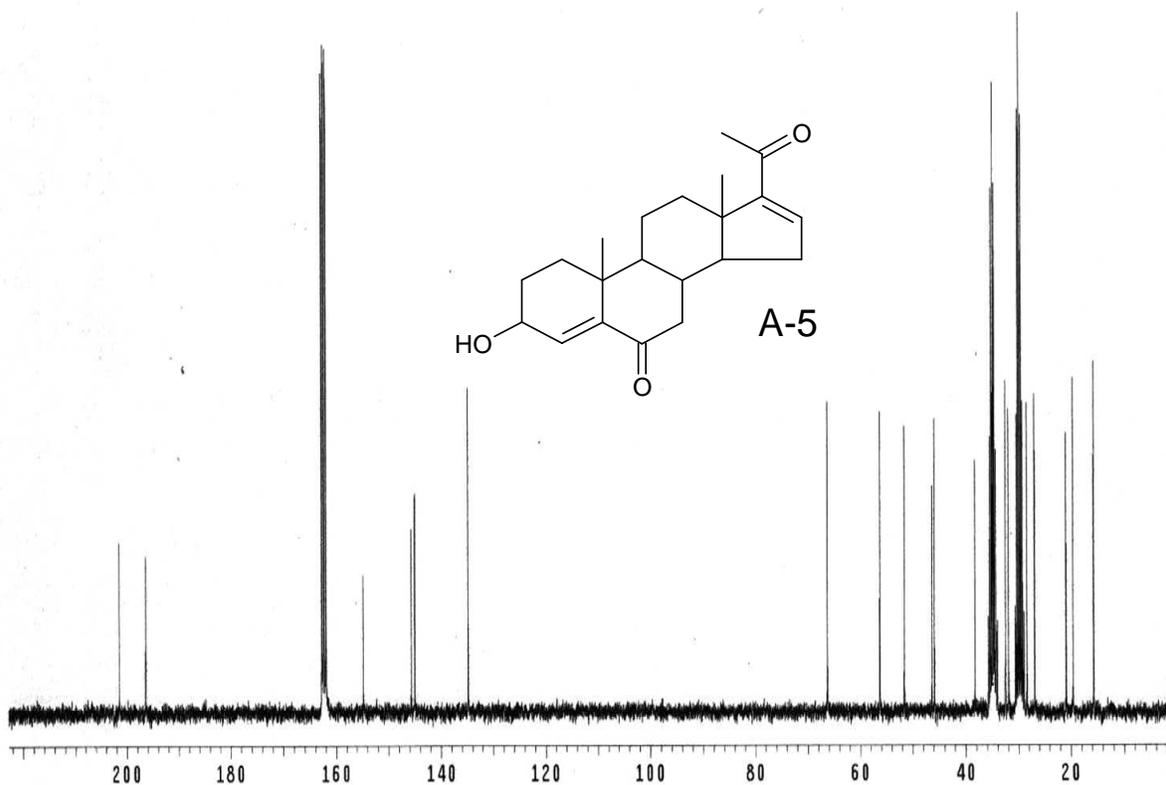
0-06-85
Dr. Eugene Bratoeff/Angel Cruz
ACHOXID
3C 75.5 MHz
ref. CDC13 77 ppm
100-1
MAS
pulse Sequence: s2pu1



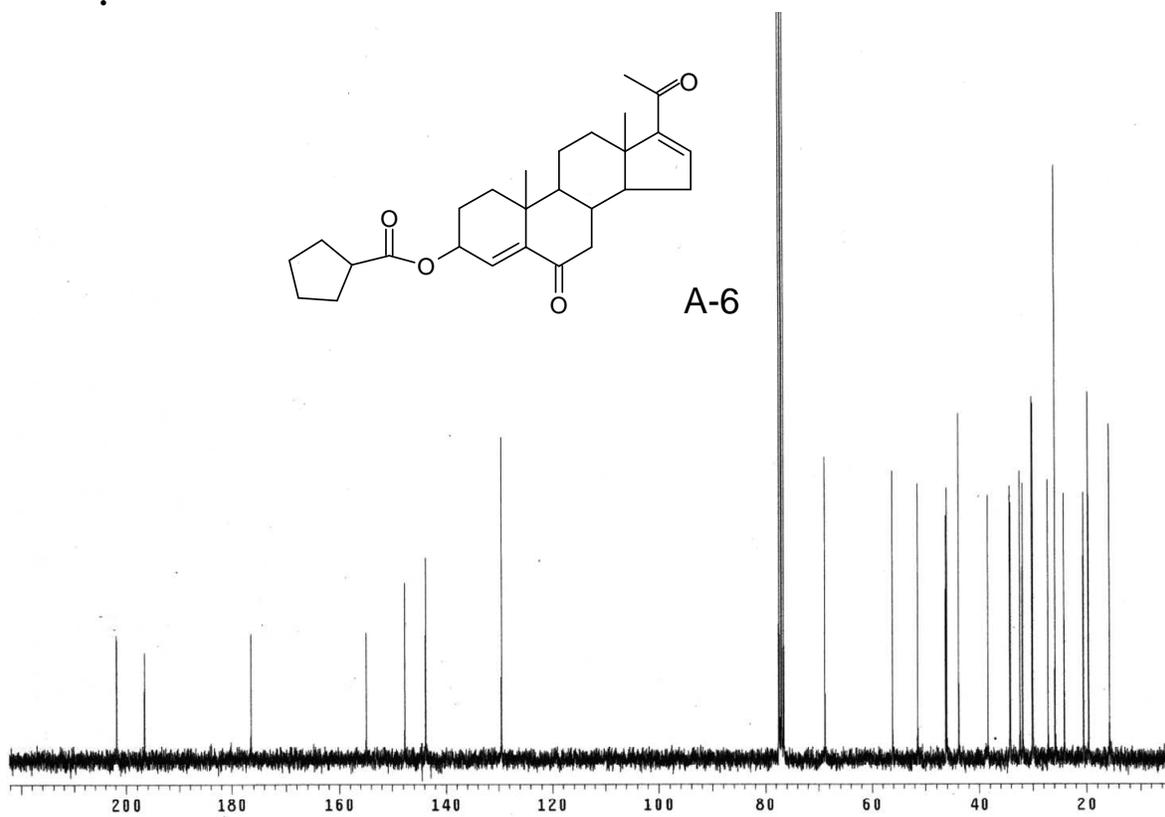
Espectro 17. RMN ^{13}C del 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.



Espectro 18. RMN ^{13}C del 3-Acetoxy-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

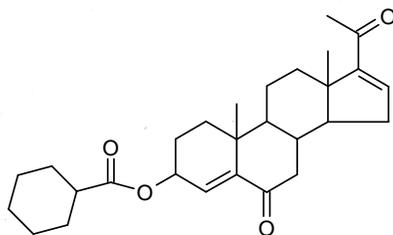


Espectro 19. RMN ^{13}C del 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona

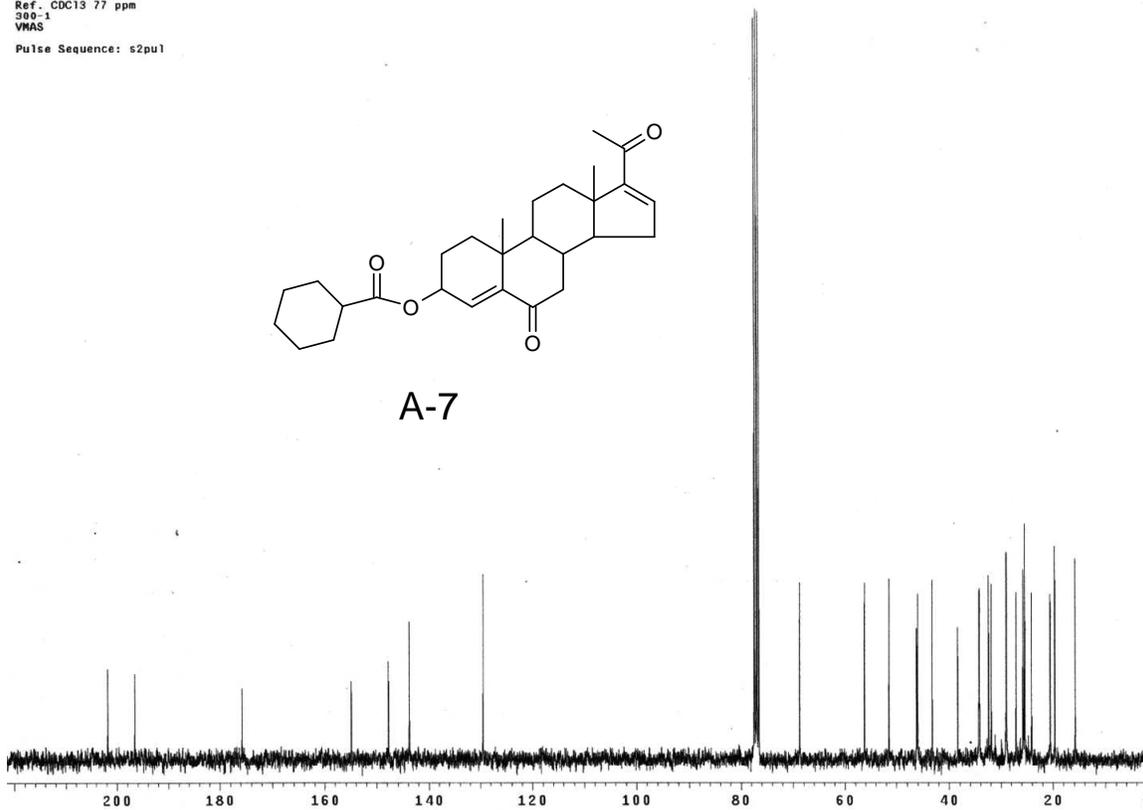


Espectro 20. RMN ^{13}C del 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

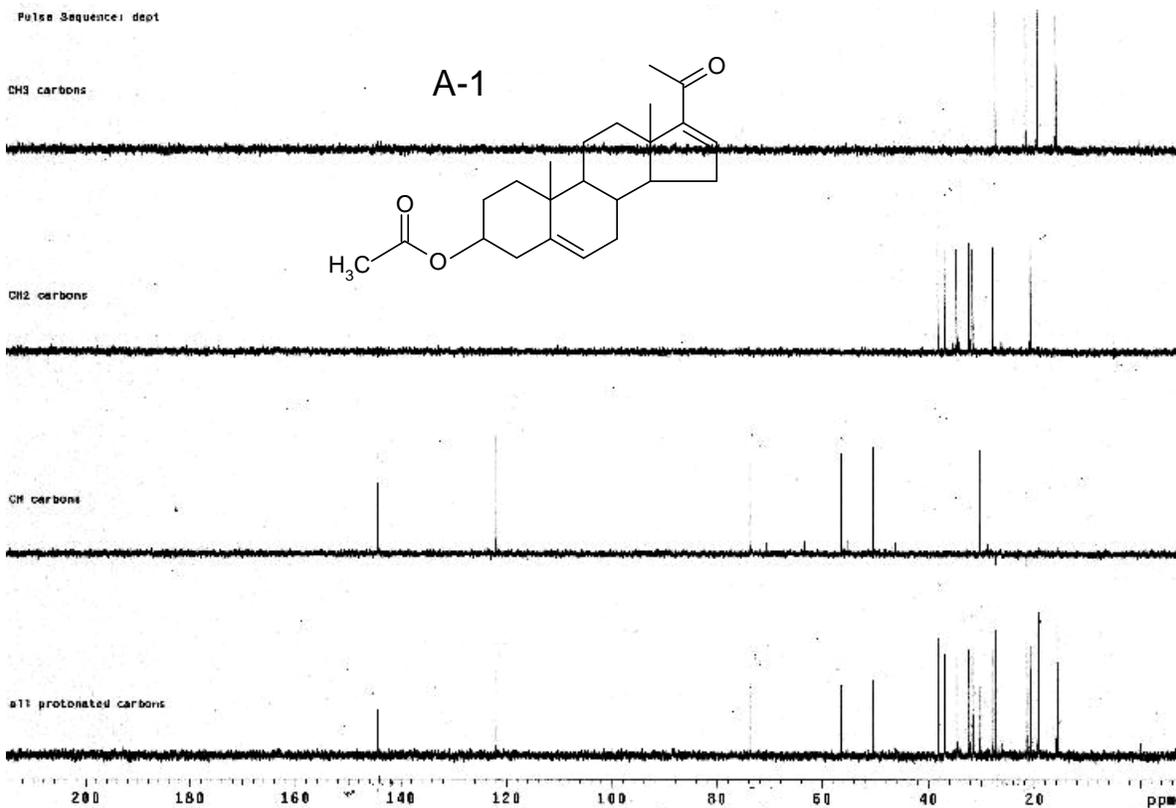
Ref.: CDCl₃ 77 ppm
300-1
VMAS
Pulse Sequence: s2pu1



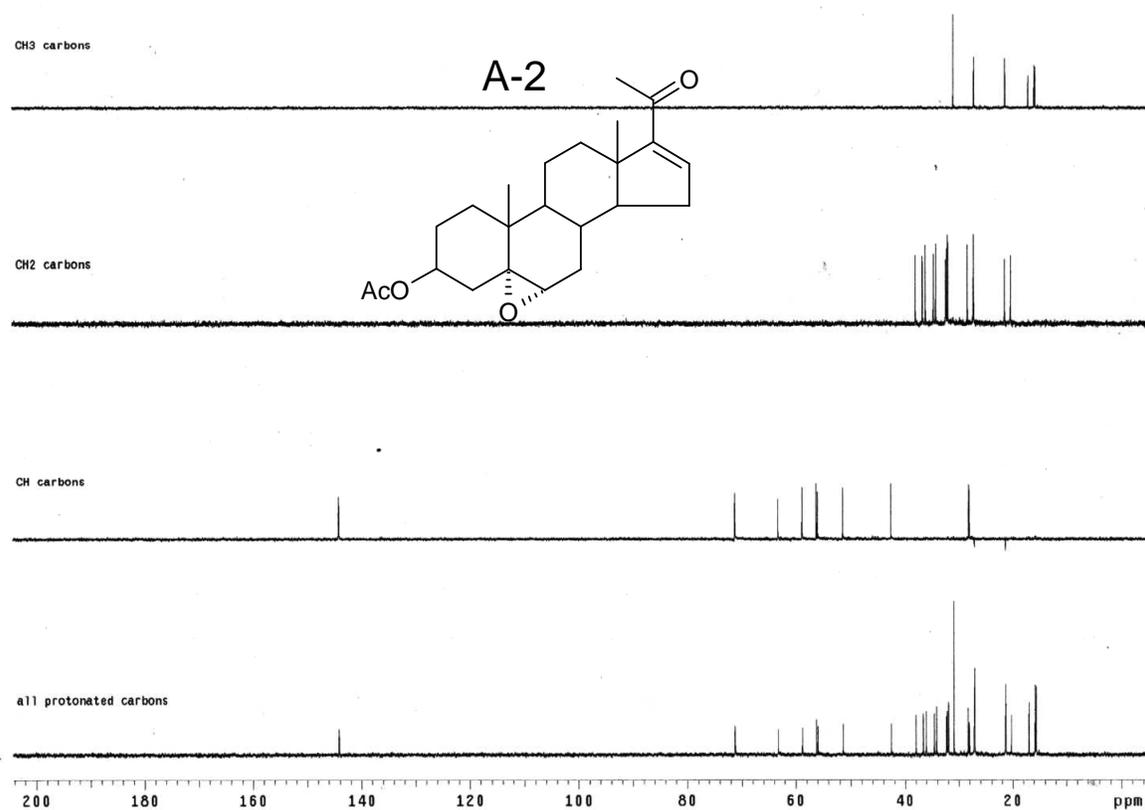
A-7



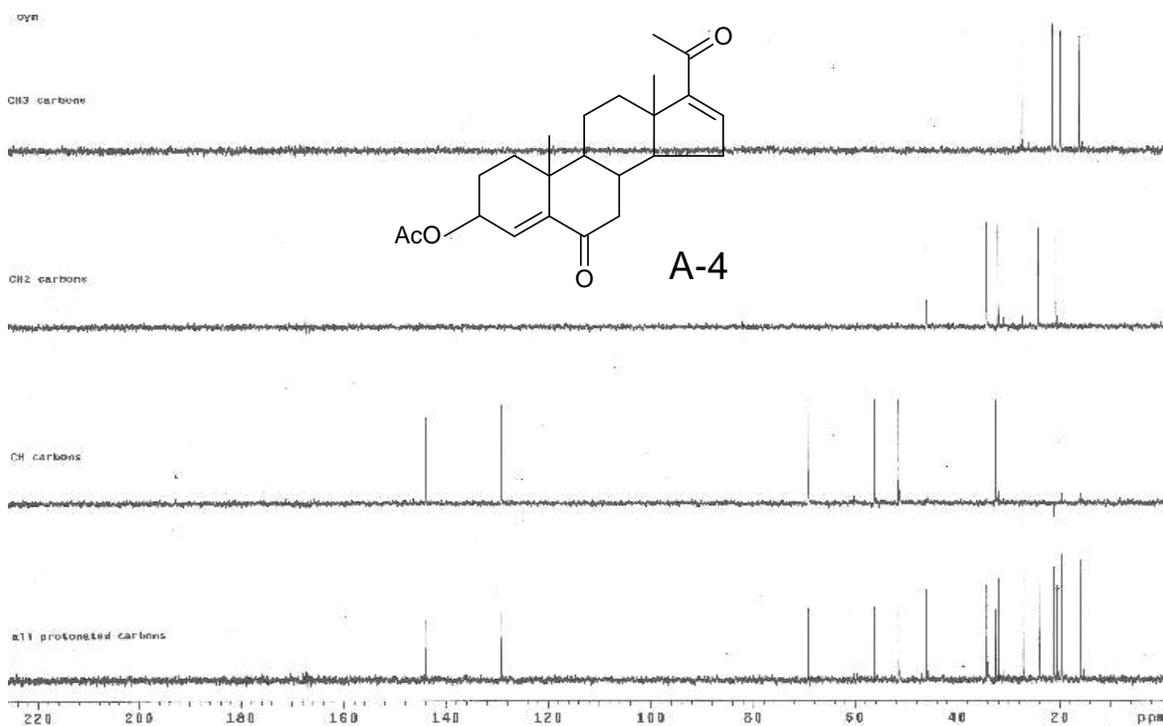
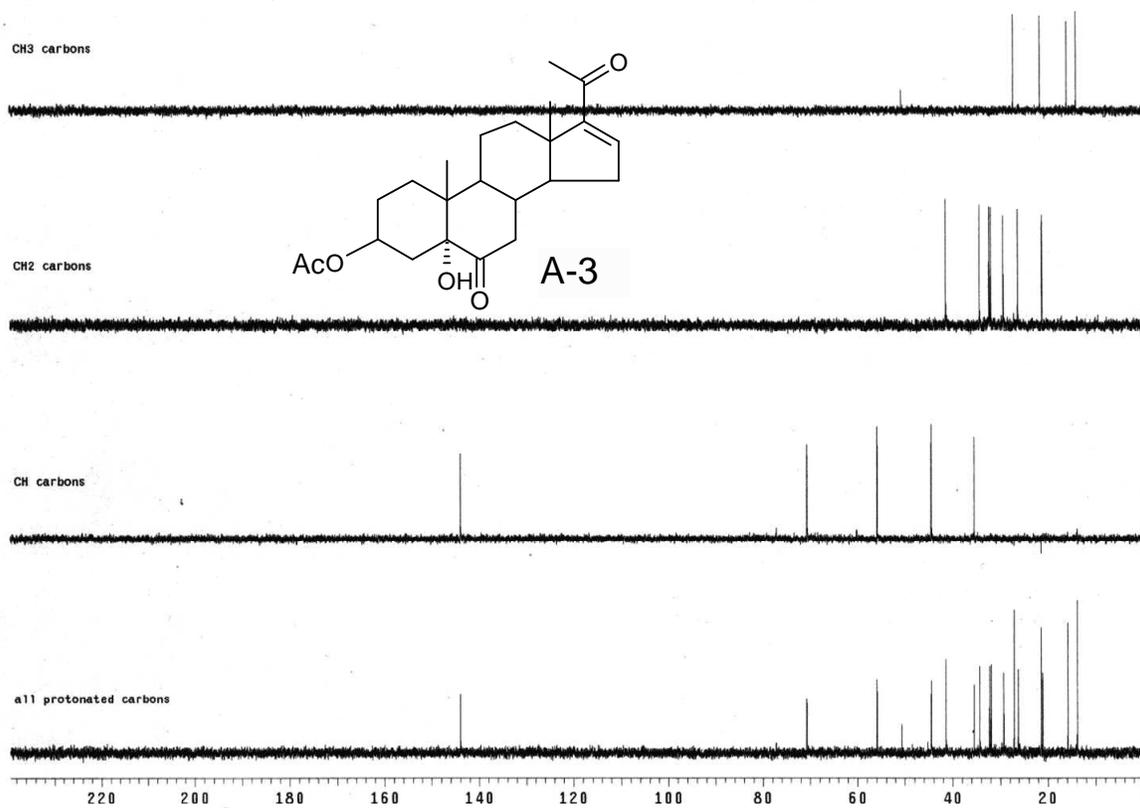
Espectro 21. RMN ¹³C del 3,β-(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

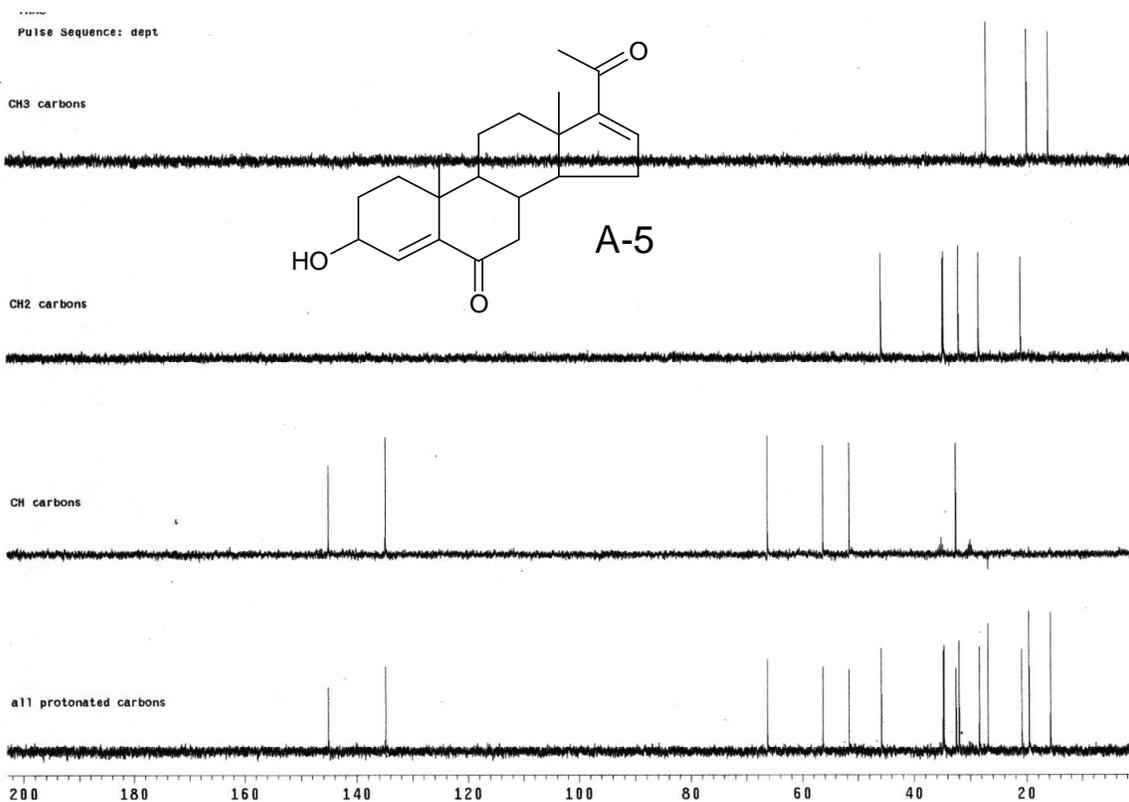


Espectro 22. RMN ^{13}C en Versión DEPT del Acetato de 16-dehidropregnenolona.

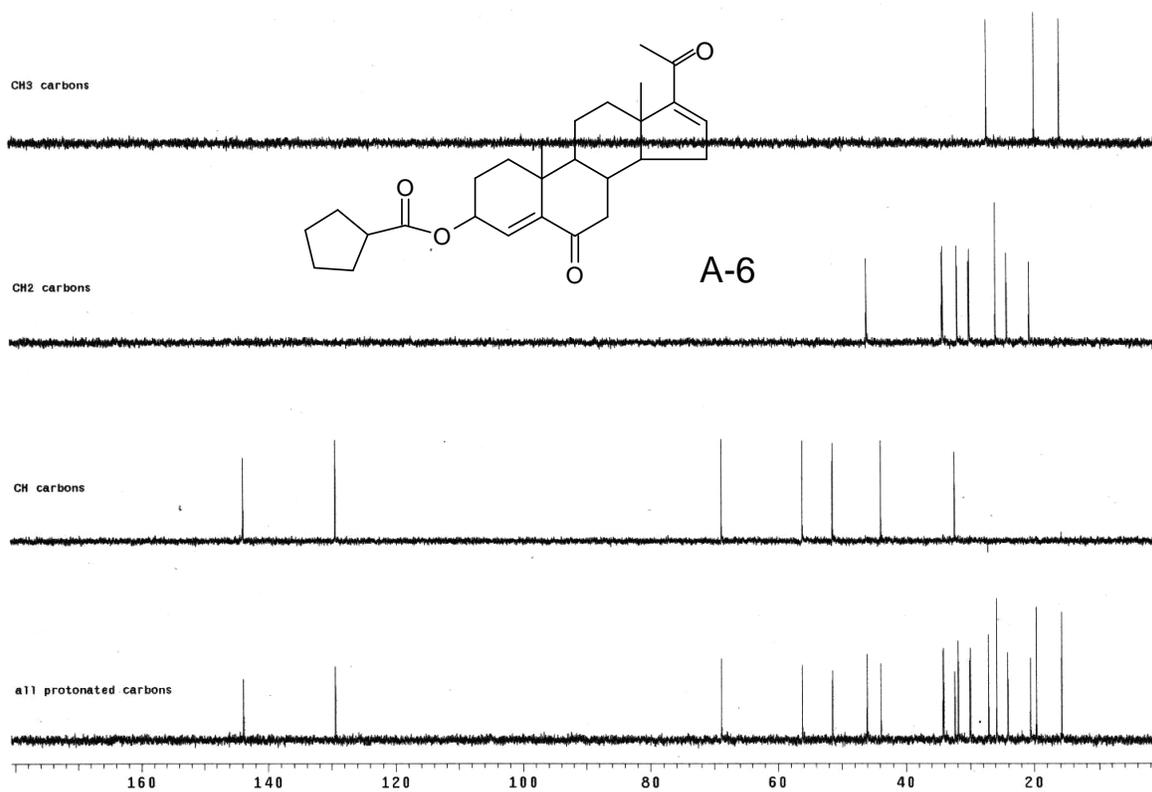


Espectro 23. RMN ^{13}C en Versión DEPT del 3-Acetoxy-5,6-epoxy-pregn-16-en-20-ona.





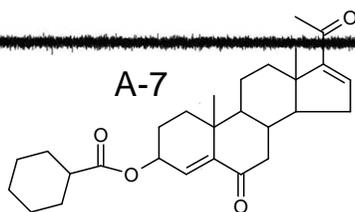
Espectro 26. RMN ^{13}C en Versión DEPT del 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona.



Espectro 27. RMN ^{13}C en Versión DEPT del 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.

Pulse Sequence: dept

CH3 carbons



CH2 carbons



CH carbons

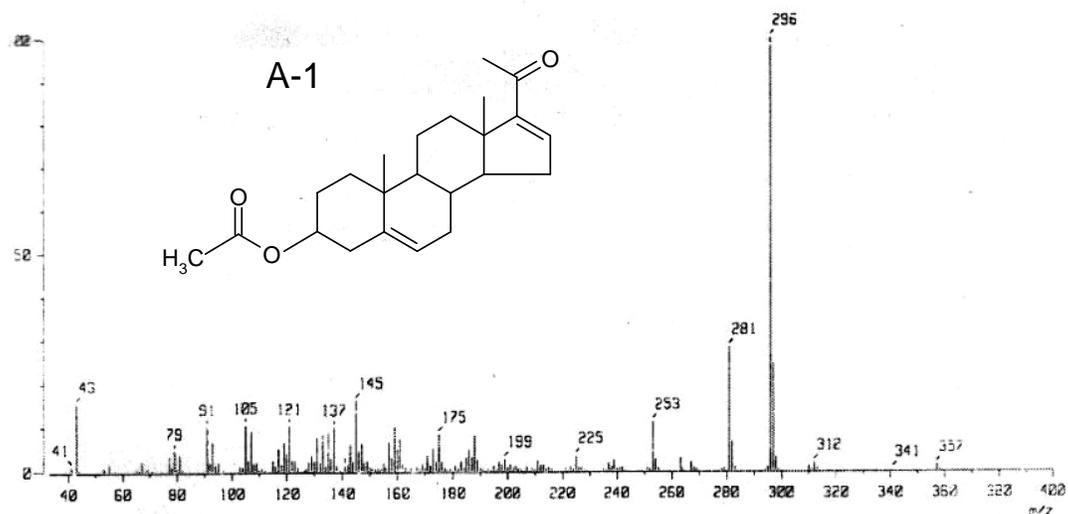


all protonated carbons

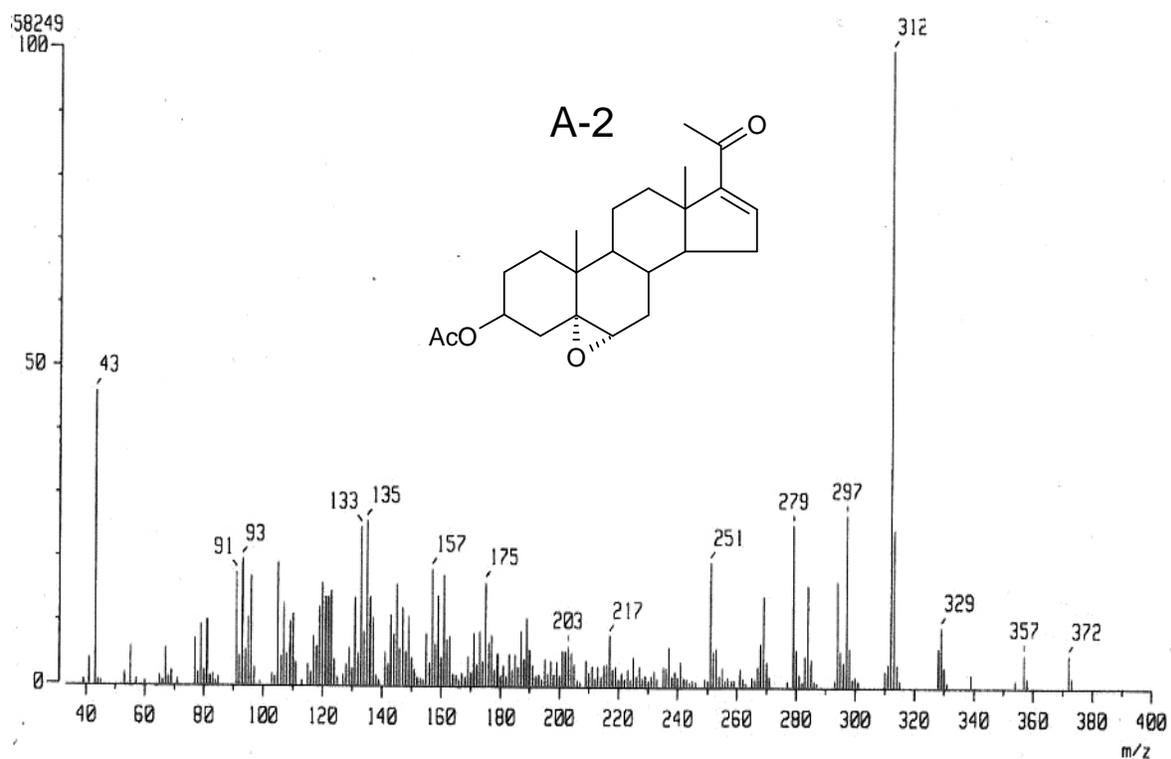


180 160 140 120 100 80 60 40 20 1

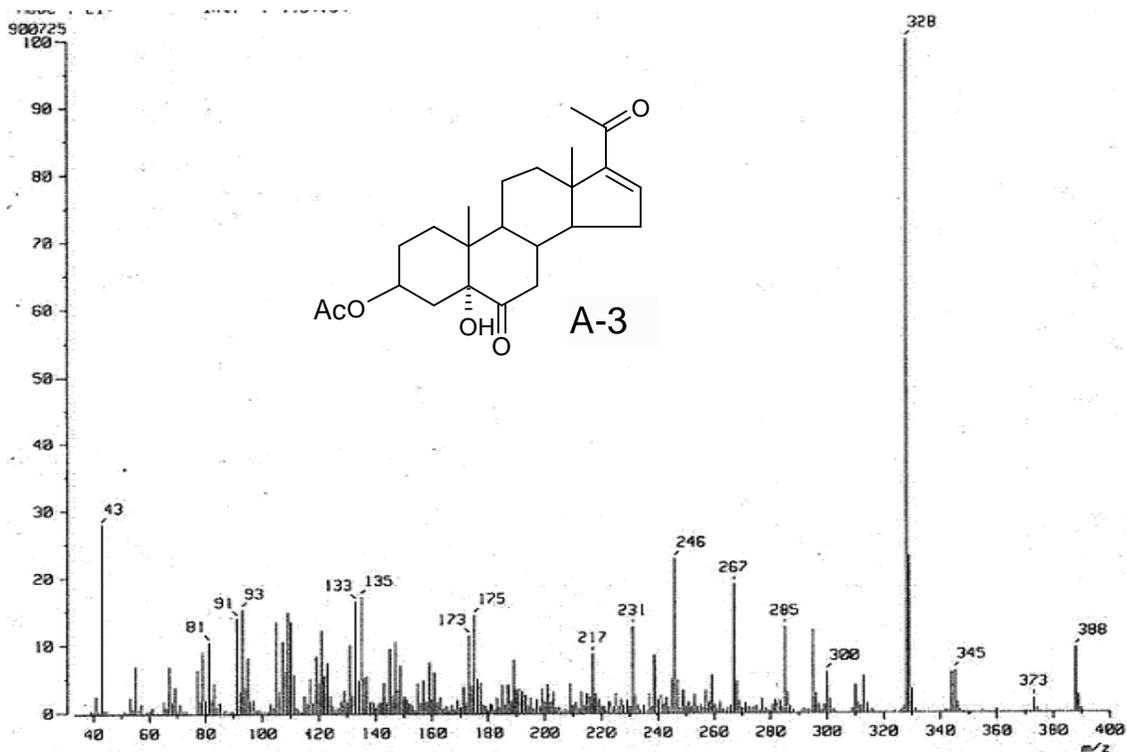
Espectro 28. RMN ^{13}C en Versión DEPT del 3,β-(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.



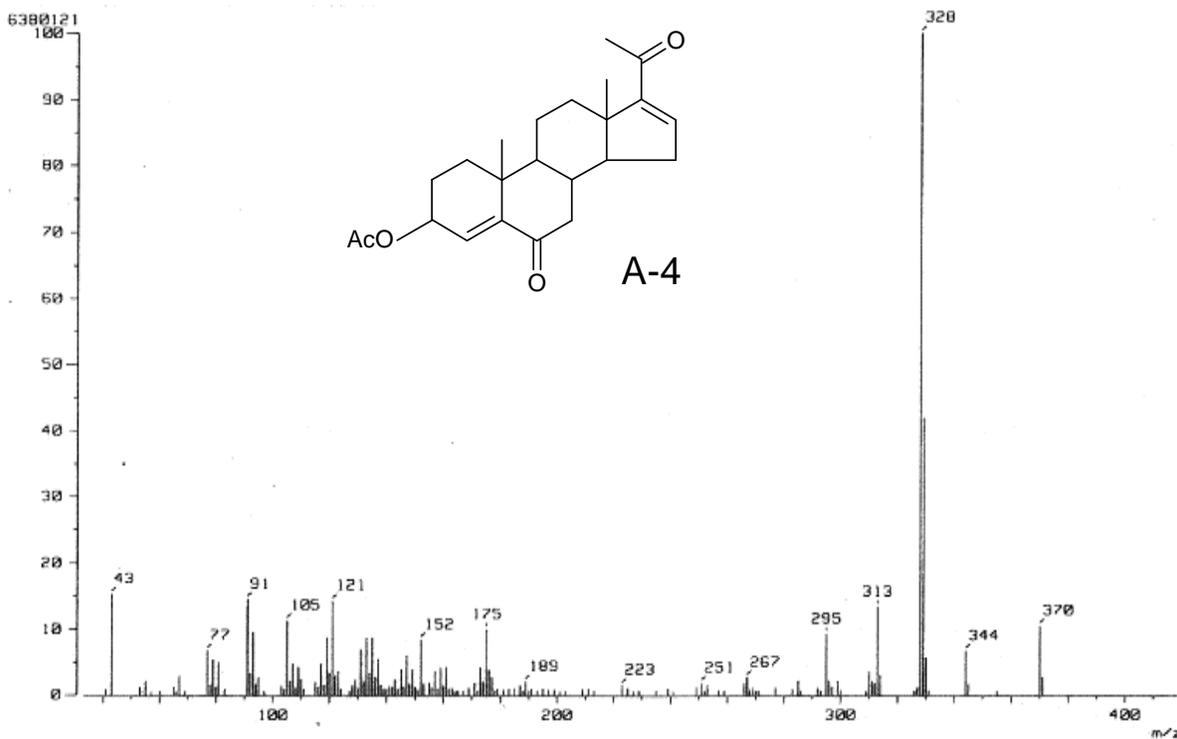
Espectro 29. EM-IE del Acetato de 16-dehidropregnenolona.



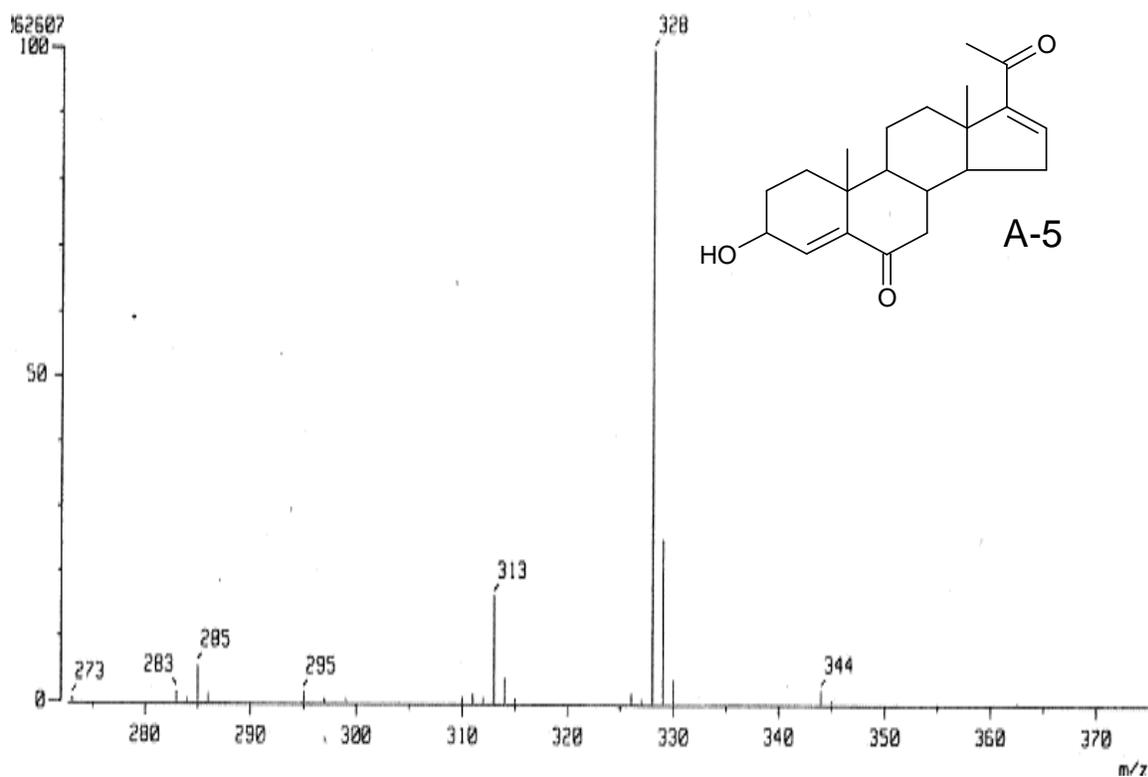
Espectro 30. EM-IE del 3-Acetoxy-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona.



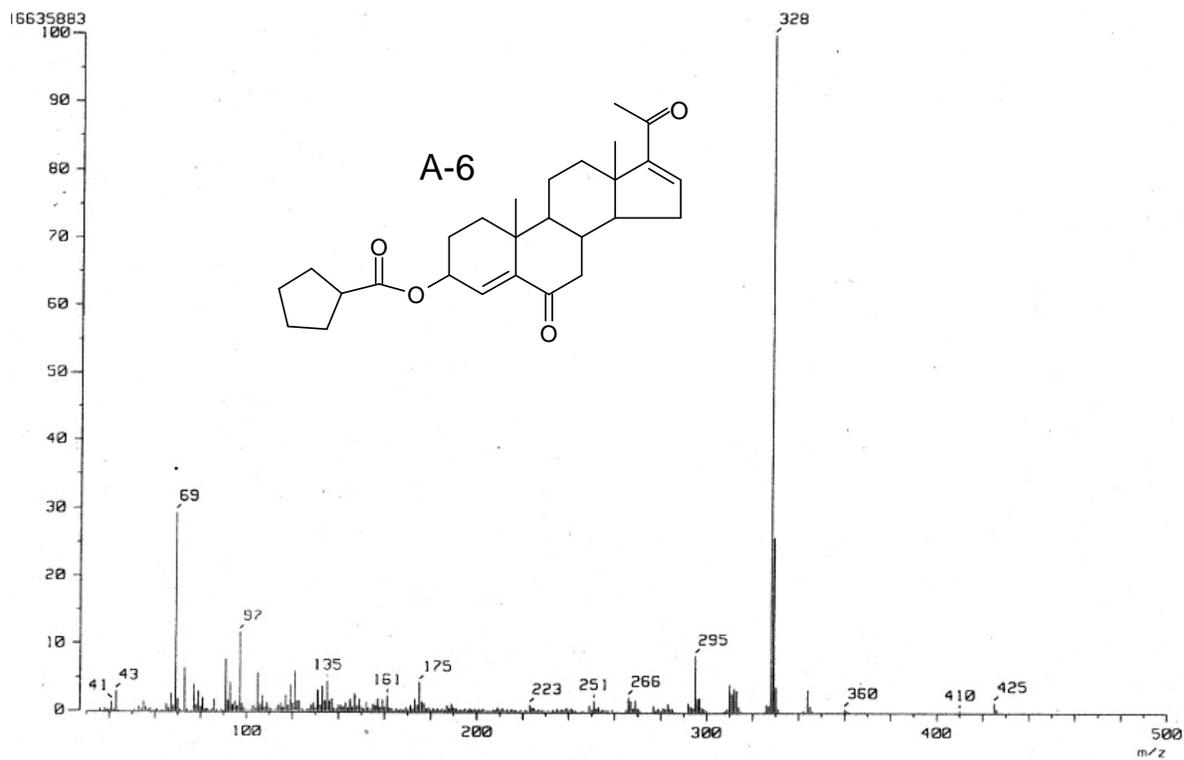
Espectro 31. EM-IE del 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona.



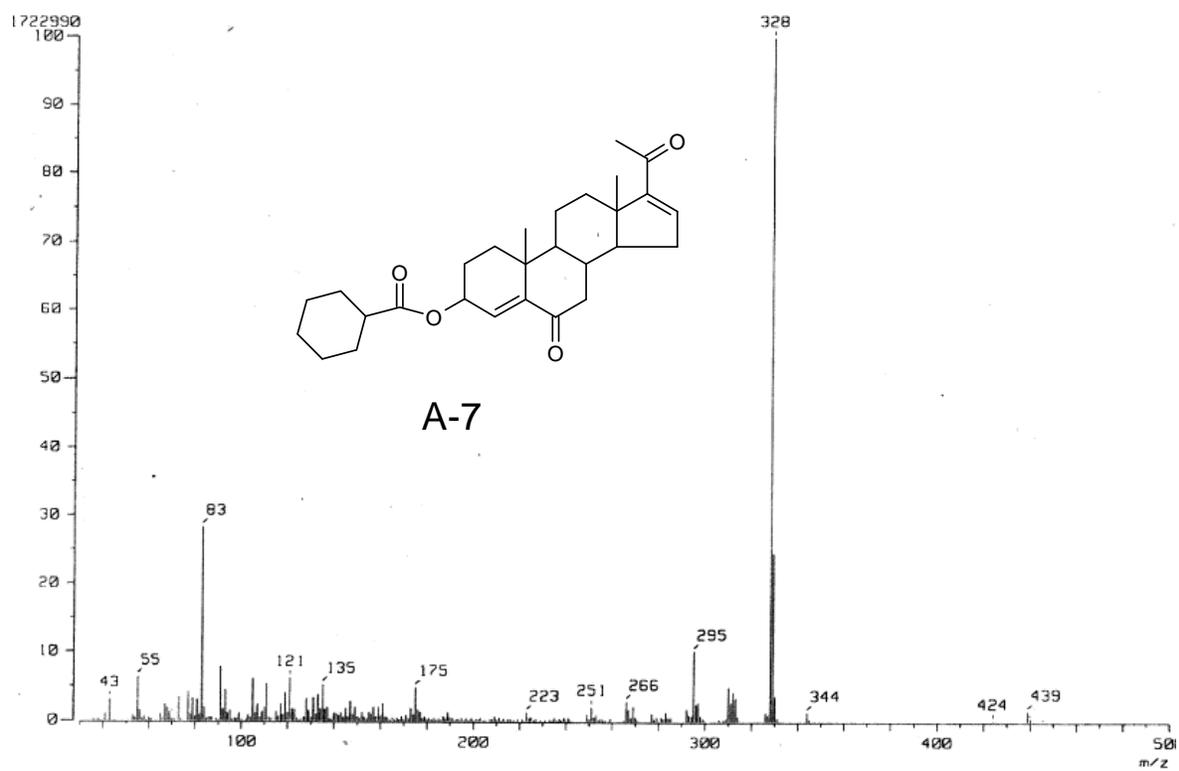
Espectro 32. EM-IE del 3-Acetoxy-pregna-4,16-dien-6,20-diona.



Espectro 33. EM-IE del 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien- 6,20-dóna.



Espectro 34. EM-IE del 3,β-(ciclopentanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.



Espectro 35. EM-IE del 3,β-(ciclohexanoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona.