

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

SÍNTESIS DE NUEVOS 17α -ACILOILOXI-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONAS
CON Y SIN UN ÁTOMO DE CLORO EN C-6

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ARMANDO ZAMBRANO HUERTA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Federico Alfredo García Jiménez.

Vocal: Dr. Héctor Jaime Salgado Zamora.

Secretario: Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

Primer suplente: Dr. Martín Iglesias Arteaga.

Segundo suplente: Dr. René Miranda Ruvalcaba.

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

- Laboratorio 125, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Eugene Bratoeff.
- Laboratorio G-006, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza Salinas.

Asesor: Dr. Eugene Bratoeff T.

Sustentante: Q.F.B. Armando Zambrano Huerta

AGRADECIMIENTOS

- A **CONACyT** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.
- Al Dr. Eugene Bratoeff por la oportunidad de estar en su grupo de trabajo.
- A los miembros del jurado que con sus observaciones enriquecieron este trabajo.
- Al Dr. Eduardo Bárzana, la Dra. Josefina De Gyves y al PBA 2008 Comité por su apoyo.
- Al personal académico de la USAI por su apoyo en la realización de los espectros de UV, IR, RMN¹H, RMN ¹³C y EMIE
- A la Dra. Marisa Cabeza por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas.
- Al Dr. Avissai Alcántara. Jefe del Departamento de Patología del Hospital General, SSA, por facilitar material para la realización de las pruebas biológicas.
- A la UNAM y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas

***A mi familia y amigos
que me han acompañado a lo largo
de mi vida***

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen.....	XXII
Abstract.....	XIV
Abreviaturas.....	XV
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	3
2.1. Cáncer.....	3
2.2. Cáncer de la próstata e hiperplasia prostática benigna.....	4
2.2.1. Generalidades.....	4
2.2.2. Métodos de diagnóstico.....	5
2.2.3. Tratamiento.....	6
2.3. Antiandrógenos.....	8
2.3.1. Andrógenos.....	8
2.3.2. Acción molecular de los andrógenos.....	10
2.3.3. Andrógenos y próstata.....	11
2.3.4. Antiandrógenos.....	10
2.4. Enzima 5 α -reductasa.....	12
2.5. Receptor androgénico.....	13
2.6. Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.....	14
2.7. Desarrollo de nuevos antiandrógenos esteroideos.....	15
2.7.1. Derivados del androstano.....	16
2.7.2. Derivados del pregnano.....	16
Capítulo 3. Planteamiento del problema.....	18
Capítulo 4. Hipótesis y objetivos.....	22
Capítulo 5. Desarrollo experimental.....	23
Capítulo 6. Metodología y resultados.....	25
6.1. Parte química.....	25
6.1.1. 17 α -Acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1)	25
6.1.2. 17 α -Acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2)	26
6.1.3. 17 α -Acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3)	27
6.1.4. 17 α -Acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4)	28
6.1.5. 6-Cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5)	30
6.1.6a. 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a)	31
6.1.6b. 6-Cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b)	33

6.1.6c. 6-Cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).....	34
6.1.6d. 17 α -4'-Bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d).....	36
6.1.7. 17 α -Hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).....	37
6.1.8a. 17 α -Benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).....	39
6.1.8b. 17 α -4'-Fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).....	40
6.1.8c. 17 α -4'-Clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).....	42
6.1.8d. 17 α -4'-Bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).....	43
6.2. Parte biológica.....	45
6.2.1. Material biológico.....	45
6.2.2. Sustancias y equipos.....	45
6.2.3. Ensayo <i>in vivo</i> : Peso de la próstata.....	45
6.2.4. Ensayo <i>in vitro</i> : Inhibición de la enzima 5 α -reductasa.....	46
6.2.4.1. Extracción de la enzima 5 α -reductasa.....	46
6.2.4.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50% (IC ₅₀) de los compuestos 1 – 5 en la enzima 5 α -reductasa.....	47
6.2.5. Ensayo <i>in vitro</i> : Afinidad por el receptor androgénico.....	48
6.2.5.1. Curva de saturación de los sitios del receptor.....	48
6.2.5.2. Análisis por competencia por el receptor.....	49
6.2.6. Ensayo <i>in vitro</i> : Citotóxicidad en líneas celulares cancerosas humanas de los compuestos 6a-6d y 8a-8d	50
Capítulo 7. Análisis de resultados.....	52
7.1. Parte química.....	52
7.2. Parte biológica.....	82
Capítulo 8. Conclusiones.....	87
Capítulo 9. Referencias.....	88
Espectroscopia.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
2.1. Comparación de las isoformas de la enzima 5 α -reductasa.....	12
2.2. Tipos de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.....	13
2.3. Antagonistas del receptor androgénico.....	14
2.4. Mapa de actividad biológica para derivados del androstano.....	16
2.5. Mapa de actividad biológica para derivados del pregnano.....	17
3.1. Radio atómico del átomo de hidrógeno y halógenos.....	20
3.2. Constantes para halógenos.....	21
6.1.1. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1)	25
6.1.2. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2)	26
6.1.3. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3)	27
6.1.4. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4)	29
6.1.5. Propiedades físicas y espectroscópicas de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5)	30
6.1.6. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a)	32
6.1.7. Propiedades físicas y espectroscópicas de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b)	33
6.1.8. Propiedades físicas y espectroscópicas de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c)	35
6.1.9. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d)	36
6.1.10. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7)	38
6.1.11. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)	39
6.1.12. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi -4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)	41
6.1.13. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-clorobenzoiloxi -4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)	42
6.1.14. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-bromobenzoiloxi -4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)	44
6.2.1. Efecto de los compuestos 1 – 5 sobre el peso de la próstata.....	46
6.2.2. IC ₅₀ de la enzima 5 α -reductasa por los compuestos 1 – 5	48
6.2.3. Ensayo de afinidad por el receptor androgénico.....	49
6.2.4. Screening primario de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas por los compuestos 6a-6d – 8a-8d	50
6.2.5. Determinación del IC ₅₀ de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas por los compuestos 6d, 8a, 8d	51
7.2.1. LogPc de compuestos 1-6d	83
7.2.2. Mapa de actividad biológica de los compuestos sintetizados.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
2.1. Muertes causadas por cáncer en 2002.....	3
2.2. Principales tipos de cáncer en el mundo.....	4
2.3. Andrógenos.....	8
2.4. Eventos celulares en la biosíntesis de testosterona.....	9
2.5. Mecanismo de acción de los andrógenos.....	10
2.6. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa.....	12
2.7. Mecanismo de reducción de testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa.....	13
2.8. Antagonistas del receptor androgénico.....	14
2.9. Finasterida, antiandrógeno esteroidal.....	15
2.10. Mecanismo de inhibición propuesto para finasterida.....	15
2.11. Esqueleto del androstano.....	16
2.12. Esqueleto del pregnano.....	17
3.1. Estructuras químicas de los compuestos sintetizados en el presente trabajo.....	18
3.2. Complejos de activación en adiciones 1,4 y 1,6.....	19
3.3. Metabolismo de la progesterona.....	19
3.4. Efectos electrónicos de los halógenos.....	20
3.5. Halogenación obstructiva.....	21
5.1. Ruta General de síntesis.....	24
6.1. Efecto antiandrógeno de los compuestos 1 – 5 sobre el peso de la próstata.....	46
6.2. Gráfica del ensayo de unión de mibolerona al receptor androgénico.....	49
7.1.1. Diagrama de fragmentación del compuesto 1 observado en EMIE.....	53
7.1.2. Mecanismos de fragmentación del compuesto 1 para explicar los picos <i>m/z</i> 330, <i>m/z</i> 312 <i>m/z</i> 287 y <i>m/z</i> 269.....	53
7.1.3. Mecanismo de fragmentación del compuesto 1 para explicar el pico <i>m/z</i> 312.....	54
7.1.4. Mecanismo de reacción de la deshidrogenación para la formación del compuesto 2	54
7.1.5. Estructuras resonantes del compuesto 2	55
7.1.6. Diagrama de fragmentación del compuesto 2	56
7.1.7. Mecanismos de fragmentación del compuesto 2 para explicar la formación de los picos <i>m/z</i> 328, <i>m/z</i> 310, <i>m/z</i> 285 y <i>m/z</i> 267.....	56
7.1.8. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 3	57
7.1.9. Diagrama de fragmentación del compuesto 3	58
7.1.10. Mecanismo de fragmentación del compuesto 3 para explicar el pico <i>m/z</i> 343.....	58
7.1.11. Mecanismo de fragmentación del compuesto 3 para explicar los picos <i>m/z</i> 326, <i>m/z</i> 283.....	59
7.1.12. Mecanismo de fragmentación del compuesto 3 para explicar los picos <i>m/z</i> 344, <i>m/z</i> 326, <i>m/z</i> 301 y <i>m/z</i> 283.....	59
7.1.13. Mecanismo de reacción para el compuesto 4	60
7.1.14. Diagrama de fragmentación del compuesto 4	61
7.1.15. Mecanismo de fragmentación del compuesto 4 para explicar los picos <i>m/z</i> 344, <i>m/z</i> 301.....	61
7.1.16. Mecanismo de fragmentación del compuesto 4 para explicar los picos <i>m/z</i> 344, <i>m/z</i> 301.....	62
7.1.17. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 5	62
7.1.18. Diagrama de fragmentación del compuesto 5	64
7.1.19. Mecanismo de fragmentación del compuesto 5 para explicar los picos <i>m/z</i> 344, <i>m/z</i> 301.....	64

7.1.20. Mecanismo de fragmentación del compuesto 5 para explicar el pico m/z 319.....	64
7.1.21. Mecanismo de fragmentación del compuesto 5 para explicar los picos m/z 347 y m/z 319.....	64
7.1.22. Mecanismo de reacción para la formación de los compuestos 6a-6d	65
7.1.23. Diagrama de fragmentación del compuesto 6a	66
7.1.24. Mecanismo de fragmentación A de los compuestos 6a-6d	67
7.1.25. Mecanismo de fragmentación B de los compuestos 6a-6d	67
7.1.26. Mecanismo de fragmentación C de los compuestos 6a-6d	67
7.1.27. Diagrama de fragmentación del compuesto 6b	69
7.1.28. Diagrama de fragmentación del compuesto 6c	70
7.1.29. Diagrama de fragmentación del compuesto 6d	72
7.1.30. Diagrama de fragmentación del compuesto 7	73
7.1.31. Mecanismo de fragmentación del compuesto 7 para explicar los picos m/z 310, m/z 267.....	74
7.1.32. Mecanismo de fragmentación del compuesto 7 para explicar los picos m/z 313 y m/z 285.....	74
7.1.33. Diagrama de fragmentación del compuesto 8a	75
7.1.34. Mecanismo de fragmentación A de los compuestos 8a-8d	76
7.1.35. Mecanismo de fragmentación B de los compuestos 8a-8d	76
7.1.36. Mecanismo de fragmentación C de los compuestos 8a-8d	76
7.1.37. Diagrama de fragmentación del compuesto 8b	78
7.1.38. Diagrama de fragmentación del compuesto 8c	79
7.1.39. Diagrama de fragmentación del compuesto 8d	81
7.2.1. Relación entre el LogPc de los compuestos 1-4 y la inhibición de la enzima 5 α -reductasa.....	82
7.2.2. Mecanismo de inhibición irreversible propuesto de la enzima 5 α -reductasa.....	84
7.2.3. Relación entre el LogPc y el peso de la próstata.....	86
10.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).....	92
10.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).....	92
10.3. Espectro de masas de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).....	93
10.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).....	93
10.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).....	94
10.6. Espectro de RMN ^{13}C DEPT de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).....	94
11.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).....	95
11.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).....	95
11.3. Espectro de masas de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).....	96
11.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).....	96
11.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).....	97
11.6. Espectro de RMN ^{13}C DEPT de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).....	97
11.7. Difracción de rayos X de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).....	98
12.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).....	99
12.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).....	99
12.3. Espectro de masas de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).....	100
12.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).....	100
12.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).....	101
12.6. Espectro de RMN ^{13}C DEPT de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).....	101
12.7. Difracción de rayos X de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).....	102

13.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).....	103
13.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).....	103
13.3. Espectro de masas de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).....	104
13.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).....	104
13.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).....	105
13.6. Espectro de RMN ^{13}C DEPT de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).....	105
14.1. Espectro de IR de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	106
14.2. Espectro de UV de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	106
14.3. Espectro de masas de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	107
14.4. Espectro de RMN ^1H de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	107
14.5. Espectro de RMN ^1H de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (Intercambio con D $_2$ O) (5).....	108
14.6. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	108
14.7. Espectro de RMN ^{13}C DEPT de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	109
14.8. Espectro de RMN HSQC de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	109
14.9. Espectro de RMN HMBC de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).....	110
15.1. Espectro de IR de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).....	111
15.2. Espectro de UV de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).....	111
15.3. Espectro de masas de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).....	112
15.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).....	112
15.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).....	113
16.1. Espectro de IR de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b).....	114
16.2. Espectro de UV de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b).....	114
16.3. Espectro de masas de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b).....	115
16.4. Espectro de RMN ^1H de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b).....	115
16.5. Espectro de RMN ^{13}C de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b).....	116
17.1. Espectro de IR de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).....	117
17.2. Espectro de UV de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).....	117
17.3. Espectro de masas de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).....	118
17.4. Espectro de RMN ^1H de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).....	118
17.5. Espectro de RMN ^{13}C de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).....	119
18.1. Espectro de IR de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d).....	120
18.2. Espectro de UV de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d).....	120
18.3. Espectro de masas de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d).....	121
18.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d).....	121
18.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d).....	122
19.1. Espectro de IR de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).....	123
19.2. Espectro de UV de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).....	123
19.3. Espectro de masas de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).....	124
19.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).....	124
19.5. Espectro de RMN ^1H de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (Intercambio con D $_2$ O) (7).....	125
19.6. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).....	125

19.7. Espectro de RMN ¹³ C DEPT de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7)	126
19.8. Espectro de RMN HSQC de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7)	126
19.9. Espectro de RMN HMBC de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7)	127
20.1. Espectro de IR de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)	128
20.2. Espectro de UV de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)	128
20.3. Espectro de masas de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)	129
20.4. Espectro de RMN ¹ H de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)	129
20.5. Espectro de RMN ¹³ C de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)	130
20.6. Espectro de RMN ¹³ C DEPT de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)	130
21.1. Espectro de IR de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)	131
21.2. Espectro de UV de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)	131
21.3. Espectro de RMN ¹ H de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)	132
21.4. Espectro de RMN ¹ H de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)	132
21.5. Espectro de RMN ¹³ C de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)	133
21.6. Espectro de RMN ¹³ C DEPT de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)	133
22.1. Espectro de IR de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)	134
22.2. Espectro de UV de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)	134
22.3. Espectro de masas de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)	135
22.4. Espectro de RMN ¹ H de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)	135
22.5. Espectro de RMN ¹³ C de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c)	136
23.1. Espectro de IR de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)	137
23.2. Espectro de UV de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)	137
23.3. Espectro de masas de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)	138
23.4. Espectro de RMN ¹ H de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)	138
23.5. Espectro de RMN ¹³ C de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)	139

RESUMEN

Actualmente el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son dos padecimientos con una incidencia creciente que afectan a la población masculina de edad avanzada. Ambos padecimientos son andrógeno-dependientes, es decir, que su desarrollo y patología es dependiente de las concentraciones de andrógenos en el organismo, principalmente de la dihidrotestosterona, que es el andrógeno más potente.

Es por ello que se han creado diversos tratamientos para disminuir la concentraciones de ésta en el organismo, siendo de vital interés los inhibidores de la enzima 5α -reductasa, debido a que ésta enzima es la encargada de la reducción de testosterona a dihidrotestosterona. Desde el punto de vista farmacológico este tratamiento resulta muy atractivo ya que únicamente se detienen las acciones andrógenicas causadas por la dihidrotestosterona sin afectar las funciones fisiológicas de la testosterona, en consecuencia los efectos secundarios son menores.

En este trabajo de investigación se describe la síntesis y evaluación biológica de derivados de la progesterona con y sin un átomo de cloro en C-6: 17α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6a**), 6-cloro- 17α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6b**), 6-cloro- 17α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6c**), 17α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**), 17α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8a**), 17α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**), 17α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**) y 17α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**). La estructura química de cada una de las moléculas se elucidó mediante IR, UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C y EMIE; así mismo se realizó la evaluación biológica de estos como de sus intermediarios mediante: ensayos *in vitro* de inhibición de la enzima 5α -reductasa de próstata de cadáver humano, de afinidad por el receptor androgénico y de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas, como *in vivo* de inhibición del crecimiento de la próstata en hámsteres castrados.

Los compuestos **1-5** en el ensayo *in vitro* muestran una actividad moderada significativa de inhibición frente a la enzima 5α -reductasa comparables con la actividad inhibitoria de finasterida, fármaco de elección para el tratamiento de cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. Por otra parte, en el ensayo *in vitro* de afinidad por el receptor androgénico, ninguno de los compuestos presentó afinidad por el receptor androgénico; en el tercer ensayo *in vitro* de citotoxicidad en líneas celulares para los compuestos **6a-6d** y **8a-8d**, el compuesto **8d** presentó una alto porcentaje de inhibición del crecimiento de las células cancerosas, siendo mayor para el cáncer de próstata. El ensayo *in vivo* en hámsteres para los compuestos **1-5** indica que todos ellos presentan una actividad moderada de inhibición del crecimiento de la próstata, sugiriendo que algún parámetro farmacocinético, como la absorción y distribución, afectó en su actividad.

La información recabada en este estudio aporta nuevas herramientas sobre los requerimientos estructurales que son determinantes en el efecto antiandrogénico de derivados de progesterona, en el desarrollo de moléculas medicinales anticancerígenas con posible uso en la terapéutica de padecimientos andrógeno-dependientes.

ABSTRACT

Nowadays prostate cancer and benign prostatic hyperplasia are two diseases with high incidence in old men; both afflictions depend on the concentrations of androgens, mainly dihydrotestosterone, the most active androgen.

That is the reason why many treatments have been developed to decrease the concentrations of dihydrotestosterone, one of them are the 5α -reductase inhibitors. This enzyme, 5α -reductase, converts testosterone to dihydrotestosterone; therefore, the inhibition of 5α -reductase enzyme is a logical treatment for these disorders. When the action of dihydrotestosterone is blocked it still allows testosterone to exhibit its physiological functions.

In this work is described the synthesis and biological evaluation of a series of progesterone derivatives with and without a chlorine atom at C-6: 17α -benzoiloxo-6-chloro-4,6-pregnadien-3,20-dione (**6a**), 6-chloro- 17α -4'-fluorobenzoiloxo-4,6-pregnadien-3,20-dione (**6b**), 6-chloro- 17α -4'-chlorobenzoiloxo-4,6-pregnadien-3,20-dione (**6c**), 17α -4'-bromobenzoiloxo-6-chloro-4,6-pregnadien-3,20-dione (**6d**), 17α -benzoiloxo-4,6-pregnadien-3,20-dione (**8a**), 17α -4'-fluorobenzoiloxo-4,6-pregnadien-3,20-dione (**8b**), 17α -4'-chlorobenzoiloxo-4,6-pregnadien-3,20-dione (**8c**) and 17α -4'-bromobenzoiloxo-4,6-pregnadien-3,20-dione (**8d**). The structure of these compounds was determined by IR, UV, NMR ^1H , NMR ^{13}C and mass spectrometry; the biological activities of these steroidal derivatives and their intermediates were assayed *in vitro* tests as 5α -reductase inhibitors, the affinity for the androgen receptor, cytotoxicity of cancer cellular lines as well as *in vivo* test on gonadectomized adult male hamsters.

In the *in vitro* biological tests compounds **1-5** showed moderate inhibition of 5α -reductase as compared to Finasteride, the drug of choice for the treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. In the *in vitro* test for the affinity for the androgen receptor for compounds **1-8d** failed to show an affinity for the androgen receptor. In the *in vitro* test for cytotoxicity of cell lines, compounds **6a-6d** and **8a-8d**, **8d** showed high inhibition of the growth of cell lines, mainly prostate cancer cell line. Finally the *in vivo* test for compounds **1-5** showed a moderate activity for the growth of the prostate gland, thus suggesting that a pharmacokinetic parameter altered the activity.

The information obtained in this work furnished valuable structure-activity relationships information for the antiandrogenic effect of progesterone derivatives, and new strategies for the development of anticancer medicinal compounds for androgen-dependent diseases.

Ab. Rel	Abundancia relativa
AcOEt	Acetato de etilo
Ác-mCIPB	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARNm	ARN mensajero
Arom	Aromático
as	Asimétrico
CCF	Cromatografía en capa fina
d	Señal doble en RMN ¹ H
dd	Señal doble de doble en RMN ¹ H
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DHT	Dihidrotestosterona
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
ERH	Elementos de respuesta hormonal
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HMBC	Heteronuclear múltiple-bond correlation
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HSQC	Heteronuclear single quantum coherent
Hz	Hertzio
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LH	Hormona luteinizante
LogP	Coefficiente de partición
LogPc	Coefficiente de partición calculado <i>in silico</i>
m	Señal múltiple en RMN ¹ H
<i>m/z</i>	Relación masa carga en EMIE
M	Banda de intensidad mediana en IR
M ⁺	Ión molecular
MHz	Mega Hertz
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato (forma reducida)
NADP ⁺	Nicotin adenin dinucleótido fosfato (forma oxidada)
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
pf	Punto de fusión
PTS	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
REA	Estudios de relación estructura-actividad
r.f.	Relación de frentes
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
s	Señal simple en RMN ¹ H
S	Banda de intensidad fuerte en IR
si	Simétrico
st	Vibración de tensión en IR
t	Señal triple en RMN ¹ H
T	Testosterona
T. amb.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
W	Banda de intensidad débil en IR
δ	Vibración de deformación (IR) o desplazamiento químico (RMN)
λ máx	Longitud de onda de máxima absorción

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La palabra cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de células, se transmite a células hijas y se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular. Esta enfermedad se encuentra entre las tres primeras causas de muerte de adultos en países desarrollados, siendo la segunda causa de muerte con un 12.5% del total de las muertes.

En el caso de los hombres, el cáncer de próstata representa el segundo cáncer más diagnosticado y la tercera causa de muerte, caracterizándose como una enfermedad de alta incidencia en hombres de edad avanzada. De acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, en el 2008 se estima que habrá 186, 320 nuevos casos de cáncer de próstata y 28, 660 muertes; en México no existen datos actuales; sin embargo, según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud, hay 16 muertes por cada 100, 000 hombres, y se estima que el cáncer en el 2030 será casi el 14% de las causas de muerte en México.

Otro padecimiento que afecta a la glándula prostática es la enfermedad conocida como hiperplasia prostática benigna (HPB), que también tiene alta incidencia en adultos y se caracteriza por el agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos.

Ambos padecimientos son andrógeno-dependientes, es decir, su desarrollo y patología son dependientes de altas concentraciones de andrógenos en el organismo, principalmente de la dihidrotestosterona que es el andrógeno más potente. Es por ello que se han creado diversos tratamientos para disminuir la concentraciones de ésta en el organismo, estos son: prostatectomía, orquiectomía, criocirugía, braquiterapia, radiación externa y quimioterapia. Sin embargo; con estos tratamientos existen desventajas siendo las principales la incontinencia, la impotencia, la pérdida de deseo sexual, la esterilidad y problemas psicológicos. Por ello surge la terapia hormonal como una alternativa para tratar dichos padecimientos. En un inicio se utilizaron agonistas y/o antagonistas de GnRH (Hormona liberadora de gonadotropinas); sin embargo, ellos presentan algunos efectos secundarios como hipogonadismo sintomático, bochornos, alteraciones del metabolismo de lípidos, impotencia y desarrollo de osteoporosis.

Posteriormente surgen los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa como tratamiento alternativo, debido a que esta enzima es la encargada de la reducción de testosterona a dihidrotestosterona. Desde el punto de vista farmacológico, este tratamiento resulta muy atractivo ya que únicamente se detienen las acciones andrógenicas causadas por la dihidrotestosterona sin afectar las funciones fisiológicas de la testosterona, produciendo menos efectos secundarios. El fármaco de elección en el mercado es finasterida, que aún presenta ciertos efectos secundarios como diarrea, daño hepático, etc.

Por ello, considerando el aumento de la incidencia de estos padecimientos y las desventajas de los fármacos disponibles en el mercado, es indispensable la búsqueda de nuevas moléculas que no presenten o que sean menores los efectos secundarios producidos, problemática de la cuál surge este trabajo, el cual intenta proporcionar información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiandrogénica a través de la síntesis y evaluación biológica *in vivo* e *in vitro* de derivados de la progesterona con y sin un átomo de cloro en la posición C-6.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. CÁNCER

La palabra cáncer es utilizada para describir más de 100 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de células, situación que es transmitida a células hijas y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular.^{1,2} Existen muchas causas que originan este grupo de padecimientos, las cuales se pueden integrar de la manera siguiente: ^{1,3}

- Predisposición genética.
- Factores ambientales (ocupacionales, dieta, fármacos, contaminantes).
- Factores ambientales interaccionando con predisposiciones genéticas.
- Factores desconocidos.

Actualmente, el cáncer se encuentra entre las tres primeras causas de muerte de adultos en países desarrollados, siendo la segunda causa de muerte con un 12.5% del total de las muertes, dicho valor es mayor que el causado por enfermedades como el SIDA, la tuberculosis y la malaria juntas.²

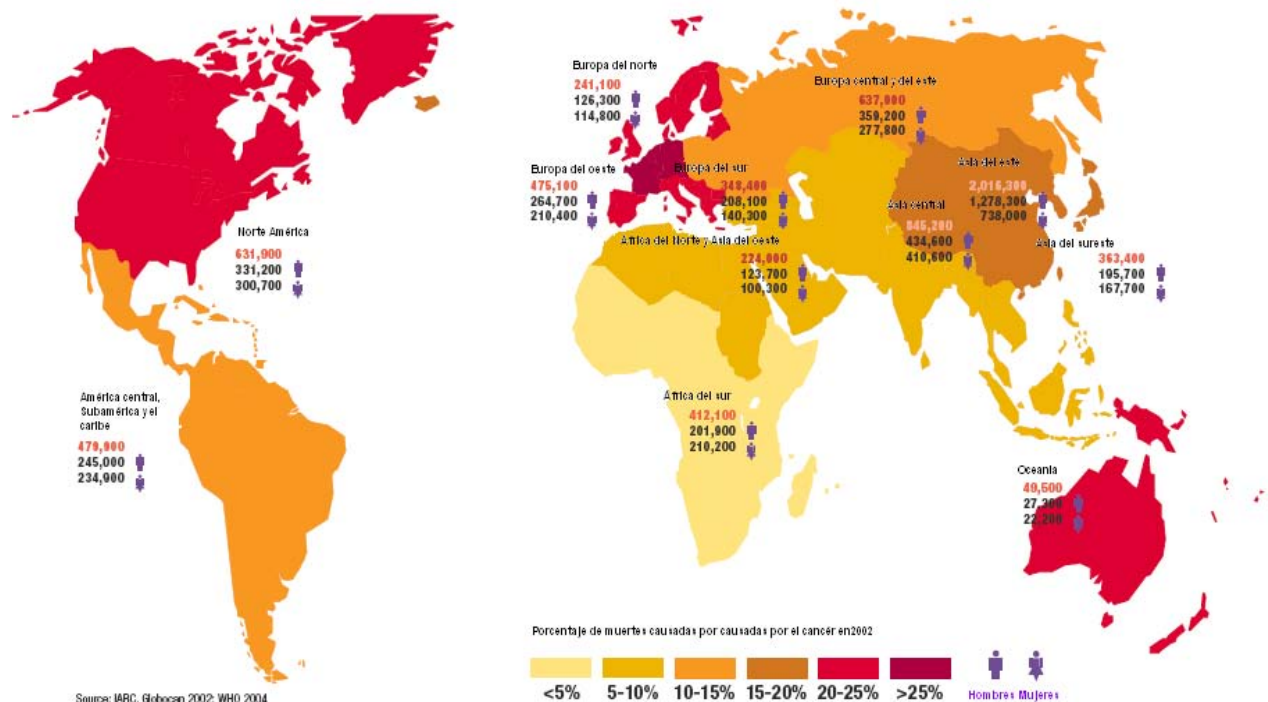


Figura 2.1. Muertes causadas por cáncer en 2002.²

Cada tipo de cáncer se comporta de manera distinta y presentan velocidades de crecimiento y capacidades para invadir otros tejidos diferentes; es por eso que cada tipo de cáncer necesita un tratamiento

especifico. La Figura 2.2 muestra los tres principales tipos de cáncer en el mundo, siendo el cáncer de pulmón el principal.

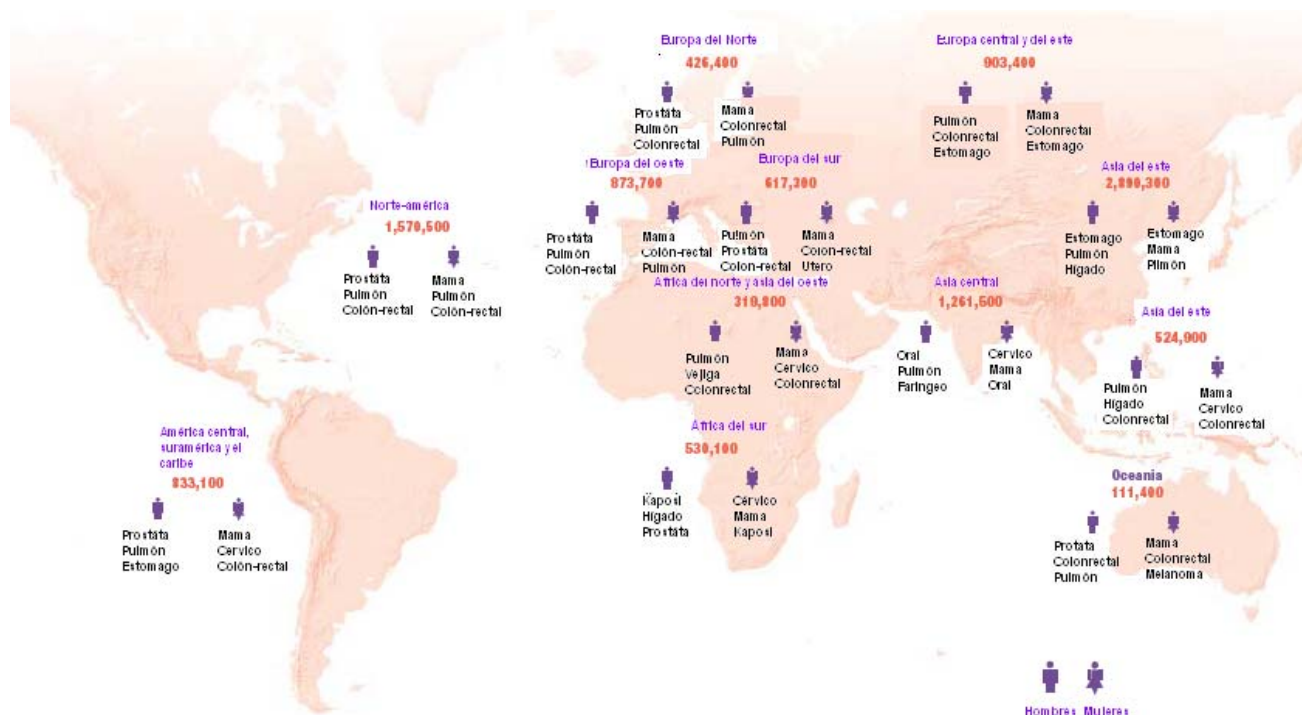


Figura 2.2. Principales tipos de cáncer en el mundo²

2.2. CANCER DE LA PRÓSTATA E HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

2.2.1. GENERALIDADES

En el caso de los hombres, el cáncer de próstata representa el segundo cáncer más diagnóstico y la tercera causa de muerte. Esta enfermedad es de alta incidencia en hombres de edad avanzada.^{4,5,6}

De acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, en el 2008 se estima que habrá 186, 320 nuevos casos de cáncer de próstata y 28, 660 muertes;¹ en México no existen datos actuales; sin embargo, de acuerdo con datos reportados por la Organización Mundial de la Salud hay 16 muertes por cada 100, 000 hombres y de acuerdo con los pronósticos para el 2030 se estima que ocupará casi el 14% de las causas de muerte.⁷

Otro padecimiento que afecta a la glándula prostática es la enfermedad conocida como hiperplasia prostática benigna (HPB) que también se caracteriza por tener alta incidencia en adultos y por el agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos.^{8,9}

Ambas patologías presentan ciertas características en común, como son:^{8,10}

- Alta incidencia en personas adultas.
- Historias clínicas relacionadas.
- Altas concentraciones de andrógenos.
- Responden a tratamientos que eliminan o disminuyen la concentración de andrógenos.

Existen diversos factores de riesgo que predisponen a estas enfermedades, los cuales son:^{11,12}

- Edad.
- Factores genéticos.
- Raza.
- Dieta.
- Historial clínico.
- Ejercicio.

La edad juega un papel importante en el desarrollo del cáncer de la próstata debido a que la próstata continua creciendo con la edad por la influencia de los andrógenos a lo largo de la vida, esta es la razón de que sea raro diagnosticar cáncer prostático en hombres menores a 50 años, es así que la probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en un hombre menor a 40 años es de 1 en 10 000, mientras que en un hombre entre 60-79 años es de 1 en 8;¹⁴ por otro lado, un ejemplo claro de los factores genéticos es la incidencia del cáncer de próstata en hombres negros, que es 37% más alta que en hombres blancos, con un índice de mortalidad dos veces mayor;^{10,13} mientras que en hombres asiáticos son enfermedades poco comunes siendo otros tipos de cáncer los causantes de muerte;^{1,10,13} finalmente, en países donde hay dieta rica en grasas (mayor a 120 g por día) el índice de mortalidad es elevado.¹³

Algunos de los signos y síntomas de ambas enfermedades son: flujo de orina lento, interrumpido o con difícil control, frecuente necesidad para orinar, dolor al orinar, dolor pélvico o en la espalda. Todos estos síntomas se deben al agrandamiento de la próstata que obstruye los conductos urinarios y los tejidos que se encuentran alrededor de ella.¹²

2.2.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico temprano es difícil debido a que es asintomático, sólo el cáncer prostático localizado y el cáncer metastático son los que presentan los síntomas. Sin embargo, se han desarrollado diversas metodologías para su diagnóstico oportuno, las cuales son:¹⁴

1. Antígeno prostático específico (PSA).
2. Examinación por tacto rectal.

3. Ultrasonido transrectal.
4. Biopsia.

El PSA es una glucoproteína que normalmente segregan las células epiteliales de la próstata (4 ng/mL), sus niveles en circulación aumentan cuando existe un padecimiento canceroso. Sin embargo, esta prueba es inespecífica, ya que el 25% de los hombres con cáncer tiene niveles altos de PSA y más de la mitad de los hombres diagnosticados con niveles altos de PSA se encuentran sanos.¹⁵ El examen por tacto rectal permite detectar mecánicamente el tamaño, tumores, nódulos de la próstata pero no puede determinar tumores microscópicos y la mayoría de los hombres renuncia a éste examen.¹⁵ El ultrasonido transrectal y la biopsia sólo son indicados si se sospecha de cáncer prostático por niveles altos de PSA y si se descubre anormalidades durante el tacto rectal.¹⁵

2.2.3. TRATAMIENTO

Existen diversos tratamientos para el cáncer de próstata, pero cada tratamiento depende del número de factores involucrados como lo son la edad, el estado de salud, el estadio del cáncer y los efectos secundarios relacionados con cada tratamiento.¹ Entre los tratamientos disponibles se encuentran:

- Vigilancia activa (Watchful waiting).
- Prostatectomía.
- Orquiectomía.
- Criocirugía.
- Braquiterapia.
- Radiación externa.
- Quimioterapia.
- Terapia hormonal.

La vigilancia activa es recomendada para hombres mayores a 70 años, en donde el cáncer no les presenta un problema debido a que presentan otras enfermedades; sin embargo, existen evaluaciones periódicas del estado del cáncer a través de la prueba del PSA.^{1, 15} La prostatectomía es una cirugía que es utilizada cuando el cáncer prostático se encuentra localizado en la próstata, que regularmente es el 70% de los casos; sin embargo, existen desventajas siendo las principales la incontinencia, la impotencia y la esterilidad.¹

La orquiectomía es una cirugía que extirpa los testículos, los cuales son la principal fuente de hormonas masculinas; las desventajas de este método son de tipo psicológicas y de tipo fisiológicas por la falta de las hormonas masculinas (pérdida de deseo sexual, impotencia, etc.).^{1,15} La braquiterapia es el implante de

pellets radiactivos directamente en la próstata los cuales emiten radiación directamente en la glándula. Su implantación es relativamente sencilla y requiere mínima hospitalización; desafortunadamente, en ocasiones los pellets a veces se distribuyen en sitios diferentes de la próstata causando daños a otros órganos.^{1,15} Por otro lado en la radioterapia externa se irradia directamente en la glándula prostática; sin embargo, esto implica riesgos de la radiación en los órganos alrededor de la próstata.¹⁵

La criocirugía es el congelamiento de las células cancerosas utilizando nitrógeno líquido, el cual se pasa a través de una aguja; los efectos secundarios son dolor, incontinencia e impotencia.¹⁵ La quimioterapia es utilizada cuando las células cancerígenas se han esparcido fuera de la próstata y la terapia hormonal no ha funcionado, no se usa como tratamiento para etapas tempranas de cáncer.¹

Finalmente, la terapia hormonal es la más frecuentemente utilizada, se basa en el hecho de que los andrógenos promueven el crecimiento de los tumores prostáticos, si se evita que el cuerpo los produzca o se bloquee su acción, la células malignas mueren. Los tratamientos hormonales que existen son:¹⁵

- Agonistas / Antagonistas Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante (**LHRH**).
- Agonistas de estrógenos.
- Inhibidores de la biosíntesis de andrógenos.
- Antagonistas del receptor androgénico.

Los agonistas **LHRH** actúan por sobre-estimulación de los receptores de la glándula pituitaria y por retroalimentación negativa detienen la liberación de la hormona luteinizante (**LH**), por lo que los niveles de testosterona circulante se reducen como si se tratase de una castración, disminuyendo el tamaño del cáncer, la muerte tumoral o una progresión lenta. Los principales efectos secundarios son la reducción del deseo sexual e impotencia.^{1,15,16} Los antagonistas **LHRH** disminuyen los niveles de testosterona más rápidamente que los análogos **LHRH**; sin embargo, en un pequeño porcentaje causan alergia, por tal razón sólo se utilizan en hombres que no pueden tomar otro tipo de terapia hormonal.¹

Los otros tratamientos de la terapia hormonal lo constituyen los antiandrógenos, los cuales reducen o modifican la acción de los andrógenos en el tejido prostático y presentan menos efectos sexuales secundarios que los provocados por los otros tratamientos.^{1,15,16} Lo importante de esta terapia es que se puede combinar con la radiación, lo cuál permite el incremento de tiempo de vida de los pacientes que se someten a ella, que si sólo se sometieran a la radiación.^{1,10,15,16}

2.3. ANTIANDRÓGENOS

2.3.1. ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas esteroidales masculinas que regulan la fisiología, el comportamiento sexual en el hombre y la masculinización.¹⁷ Promueven el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales primarios y secundarios, así como el crecimiento esquelético y de la masa muscular.^{17,18,19} En general, la estructura química de los andrógenos se basa en el esqueleto androstano.^{18,19} Los principales andrógenos en el organismo del hombre son la testosterona (**T**), que es la principal hormona sexual masculina en circulación producida principalmente en los testículos y la dihidrotestosterona (**DHT**), la cuál es un andrógeno más potente producido en ciertos órganos blanco por la enzima 5 α -reductasa^{1,15,18,19} (Figura 2.3).

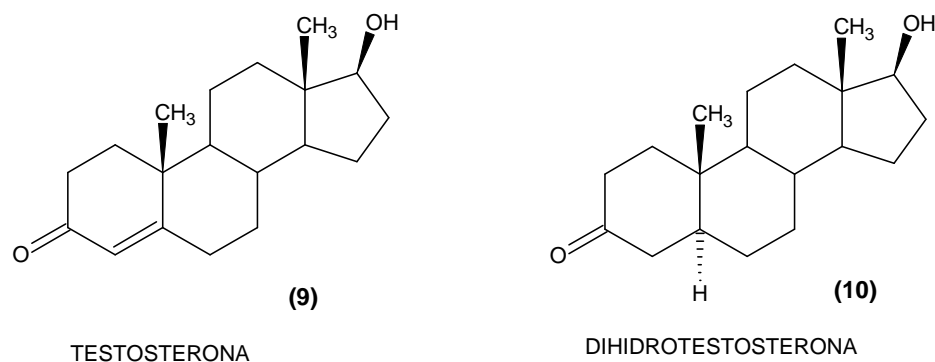


Figura 2.3. Andr6genos.

La producci3n de **T** en los test6culos se regula por la **LH** que es liberada por la gl3ndula pituitaria por la acci3n de la hormona liberadora de gonadotropinas (**GnRH**), que a su vez se segrega en el hipot3lamo.¹⁷ El receptor acoplado a prote6nas G de la **LH** se encuentra en la membrana de las c3lulas de Leyding, activa a la enzima adenilato ciclasa aumentando la concentraci3n intracelular de AMP c6clico (**AMPc**), 3ste a su vez activa a la prote6na cinasa A (dependiente de **AMPc**) que a su vez activa a las enzimas involucradas en la s6ntesis y liberaci3n de los andr6genos (Figura 2.9).¹⁸ Adicionalmente, la gl3ndula pituitaria tambi3n secreta la hormona fol6culo estimulante (**FSH**), la cual provoca la s6ntesis de prote6nas, como la prote6na de uni3n androg3nica (**ABP**) en las c3lulas de Sertoli; dicha prote6na aumenta los niveles de **T** y **DHT** en los t6bulos semin6feros promoviendo la espermatog3nesis.^{17, 20}

En la conversi3n de **T** a partir de colesterol se involucran una serie de conversiones qu6micas enzim3ticas pasando por pregnenolona, progesterona para finalmente llegar a la **T** (Figura 2.4).

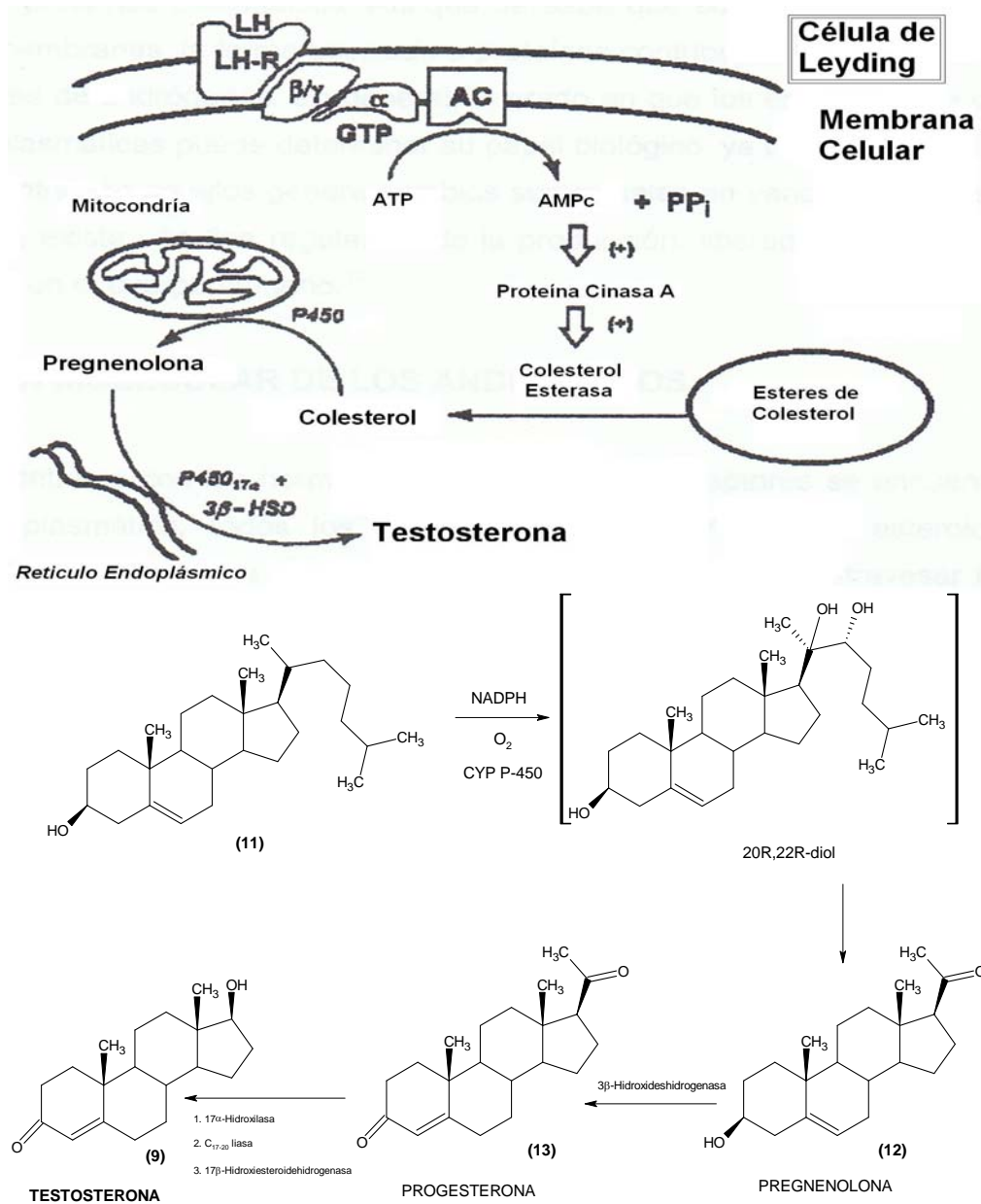


Figura 2.4. Eventos celulares y reacciones involucradas en la biosíntesis de testosterona.

Debido a su carácter lipofílico la T difunde a través de la membrana celular, penetra en el líquido intersticial y de ahí a la sangre, donde se puede encontrar libre o unida a proteínas plasmáticas, como la albúmina plasmática o la globulina ligadora de hormonas sexuales, de esta forma puede permanecer en circulación por varias horas hasta llegar a su órgano blanco.¹⁷ Es así que existe una fuerte regulación en la producción, liberación y disponibilidad de los andrógenos en el organismo.^{17,20}

2.3.2. ACCIÓN MOLECULAR DE LOS ANDRÓGENOS

Para que la **T** pueda ejercer su efecto debe estar en su forma libre, ya que esta forma es la única capaz de atravesar la membrana celular y alcanzar su receptor intracelular.^{17,21} Se estima que entre el 2-3% del total de la hormona existe en su forma libre y mediante un proceso de difusión pasiva ingresa al interior de la célula y provoca los efectos androgénicos por los siguientes mecanismos:²¹

- Sin ser metabolizada, la testosterona se une directamente al receptor androgénico.
- Es reducida por la enzima 5α -reductasa a **DHT** utilizando el cofactor NADPH, la **DHT** se une con una mayor afinidad al receptor androgénico amplificándose su efecto androgénico.^{17,21}

Independientemente de cuál sea el caso, los complejos testosterona-receptor ó dihidrotestosterona-receptor provocan cambios conformacionales en el receptor, propiciando la disociación de la proteína hsp90 y la dimerización de los complejos. los cuales cada uno se une a secuencias específicas del **ADN** conocidas como elementos de respuesta hormonal (**ERH**) para dar paso a la transcripción de los genes de respuesta a andrógenos. El ARN mensajero (**ARNm**) promueve el incremento de la síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico (enzimas, receptores y/o factores de secreción <por ejemplo PSA>) que secuencialmente resulta en la respuesta esteroidal, regulando así la función, el crecimiento y la diferenciación celular^{17,21,22} (Figura 2.5). Finalmente, la inactivación de la acción androgénica es vía metabólica en el tejido blanco o en el hígado.²⁴

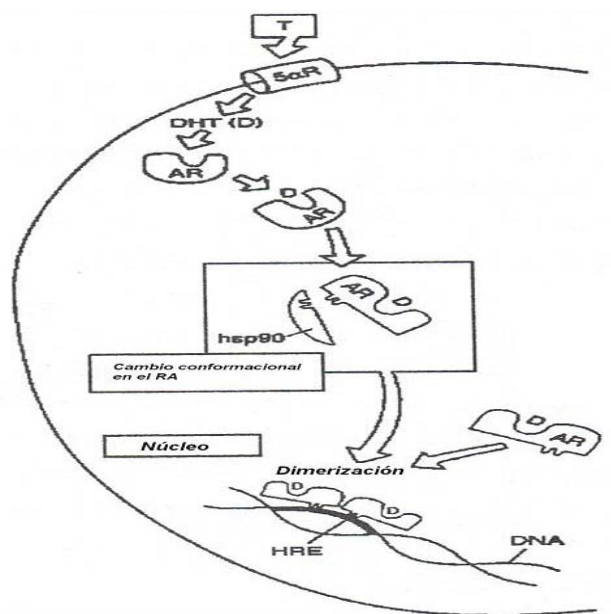


Figura 2.5. Mecanismo de acción de los andrógenos.

2.3.3. ADROGÉENOS Y PRÓSTATA

Desde el desarrollo fetal, el crecimiento de la próstata depende de la **T** y de la **DHT** y durante toda la vida del hombre su crecimiento dependerá de éstas para mantener su estructura y funcionalidad;²⁷ sin embargo, altas concentraciones de **DHT** (que es el andrógeno cuya concentración intracelular excede a la de cualquier otro andrógeno en la próstata¹⁷) están asociadas con diversos padecimientos en la próstata.¹⁷ Esta glándula se localiza por debajo de la vejiga y su función junto con las vesículas seminales y los testículos es la producción de semen.¹⁷ Como se ha mencionado anteriormente las enfermedades andrógeno-dependientes que ocurren en esta glándula son la **HPB** y el cáncer de próstata.

2.3.4. ANTIANDRÓGENOS

Con el fin de disminuir los altos niveles de andrógenos en el organismo se crearon los antiandrógenos, cuyo papel principal es antagonizar los efectos producidos por los andrógenos a través de:

- Bloqueo de la síntesis de los andrógenos.
- Impedimento de sus acciones biológicas en los órganos blanco.

Los diferentes niveles por los que se lleva a cabo la acción de los antiandrógenos son:

- A nivel del hipotálamo:
 - Agonistas de **LHRH**.
 - Antagonistas de **LHRH**.
- A nivel de la glándula pituitaria:
 - Agonistas de estrógenos.
- A nivel de la biosíntesis del esteroide:
 - Inhibidores de la 17α -hidroxilasa/ C_{17-20} liasa.
 - Inhibidores de la enzima 3β -Hidroxi- Δ^5 -esteroide-deshidrogenasa / 3-ceto- Δ^5 -esteroide-isomerasa (3β -HSD tipo 1).
 - Inhibidores de la enzima 5α -reductasa (Tipo 1 y 2).
- A nivel del receptor androgénico:
 - Antagonistas esteroidales y no esteroidales.

Adicionalmente, los antiandrógenos tienen potencial terapéutico en el tratamiento del acné, virilización en la mujer, hipersexualidad en el hombre, alopecia androgénica.¹⁸

2.4. ENZIMA 5 α -REDUCTASA

La enzima 5 α -reductasa cataliza la reducción estereoselectiva de **T** a **DHT** utilizando como cofactor NADPH en su forma reducida (Figura 2.7).²⁸ Existen dos isoformas de esta enzima denominadas tipo 1 y tipo 2, las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función.²⁹

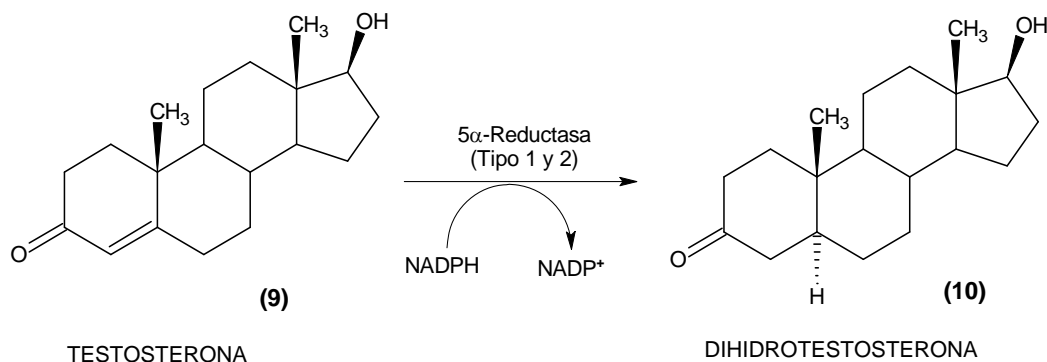


Figura 2.6. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa.

La isoenzima tipo 1 se encuentra predominantemente en el hígado, glándulas sebáceas, cuero cabelludo, cerebro y en bajas cantidades en la próstata; por otro lado, la isoforma tipo 2 se encuentra predominantemente en la próstata, piel genital y vesículas seminales.³⁰ La homología entre ambas es alrededor del 50%; las características entre ambas se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Comparación de las isoformas de la enzima 5 α -reductasa

	5 α -reductasa tipo 1	5 α -reductasa tipo 2
pH óptimo	6.5-7.5	5.5
Localización del gen	Cromosoma 5	Cromosoma 2
K _m (Para Testosterona)	7.7 μ M	0.3 μ M
K _i (Para Finasterida)	300 nM	3-5 nM
Homología en secuencia	Alrededor del 50%	

El mecanismo propuesto para la reducción irreversible de la **T** a **DHT** mediante la enzima 5 α -reductasa involucra la formación de un complejo binario entre la enzima y el cofactor **NADPH**, seguido por la formación de un complejo terciario con la **T**, donde ocurre una activación del sistema enona mediante una interacción fuerte con un residuo electrofílico presente en el sitio activo de la enzima generando un carbocatión con carga deslocalizada, el cuál es reducido selectivamente en el carbono C-5 por la cara α por la transferencia de un hidruro proveniente del **NADPH**, posteriormente, el enolato formado por un tautomerismo ceto-enol propicia la salida de dihidrotestosterona regenerando el complejo binario inicial entre el **NADP**⁺-Enzima, que

con la posterior liberación del **NADP⁺**, deja a la enzima libre para entrar a un nuevo ciclo catalítico (Figura 2.7).³⁰

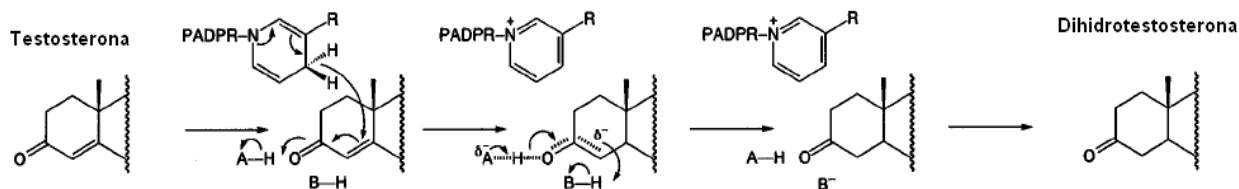


Figura 2.7. Mecanismo de reducción de testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa.

A pesar de no contar con una estructura tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2, diversos estudios de mutagénesis puntual dirigida han revelado dominios funcionales encontrando mutaciones que afectan la habilidad de la enzima para unir **T** y la afinidad por el **NADPH**, con base a estos estudios y con el mecanismo de reducción propuesto, se han diseñado dos clases de inhibidores, unos de tipo esteroidal y otro de tipo no esteroidal.³³⁻⁴⁶ Los ejemplos representativos de estos se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Tipos de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa

Esteroidales	No esterooidales
4-Azaesteroides	Benzo[f]quinolinonas
6-Azaesteroides	Benzo[c]quinolinonas
10-Azaesteroides	Benzo[c]quinolizin-3-onas
Ácidos androstencarboxílicos	Ácidos tricíclicos
	Bifenilos mono y polisustituídos

2.5. EL RECEPTOR ANDROGÉNICO

Los efectos de la **T** y **DHT** están modulados a través del receptor androgénico. Es una proteína perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares, como lo son los receptores de estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, entre otros. Está compuesto por cuatro dominios funcionales.⁴⁷⁻⁵¹

- Dominio NH₂-terminal de 555 aminoácidos, que abarca la mitad de la proteína y es indispensable para la activación transcripcional.
- Dominio de unión a **ADN** de 70 aminoácidos, dentro de los que destacan la secuencia de ocho residuos de cisteínas coordinadas con dos iones Zn²⁺ comúnmente conocidos como dedos de Zinc.
- Dominio adyacente al **ADN**, conocido como región Hinge que participa en la dimerización del receptor y lo dirige al núcleo celular.

- Dominio de unión al ligando COOH-terminal de 253 aminoácidos, cuya actividad transcripcional es dependiente de la unión con los andrógenos.

Cabe mencionar que los dos primeros dominios son esenciales para la unión a los **ERH** en el **ADN** y para estabilizar la interacción **ADN-receptor**.⁵⁰ El mecanismo de acción de los inhibidores del receptor androgénico es por el bloqueo de la unión del receptor con la **T** o la **DHT**;⁵⁰ la naturaleza de los antagonistas del receptor androgénico también es de tipo esterooidal y no esterooidal. Los ejemplos representativos se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Antagonistas del receptor androgénico

Esteroidales	No esterooidales
Acetato de ciproterona	Bicalutamida
	Flutamida
Mefepristona	Nilutamida

El acetato de ciproterona (Figura 2.8) es el prototipo de compuestos que compiten con la **DHT** por el sitio de unión en el receptor androgénico. Sin embargo, cuando se introdujo la flutamida (Figura 2.8) al mercado, el requerimiento molecular esterooidal para que una molécula bloqueara el receptor androgénico fue invalidado, debido a que la cadena lateral le permite adquirir la suficiente flexibilidad que asume un esteroide.⁵⁰⁻⁵⁴

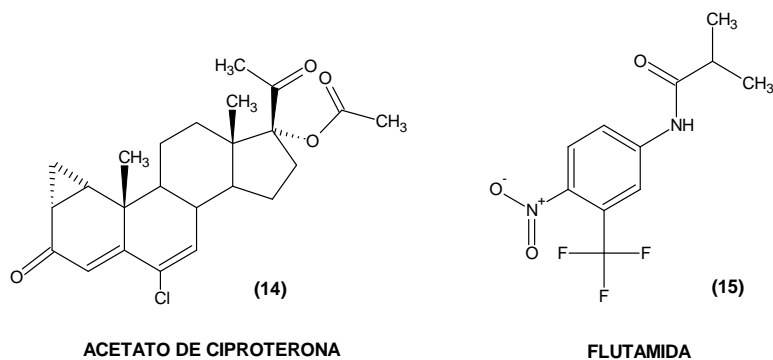


Figura 2.8. Antagonistas del receptor androgénico.

2.6. INHIBIDORES DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA

Los antiandrógenos esterooidales son los de mayor interés terapéutico, en especial los derivados de la progesterona, debido a que son homólogos de los esteroides de origen natural. El antiandrógeno esterooidal más conocido es finasterida³¹ (Proscar, Figura 2.9), se trata de un 4-azaesteroide el cuál es el prototipo de

los fármacos que actúan inhibiendo la enzima 5α -reductasa tipo 2, reduciendo los niveles de **DHT** drásticamente.

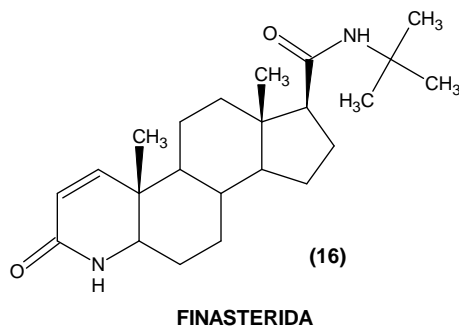


Figura 2.9. Finasterida un antiandrógeno esteroidal.

Su diseño está basado en el mecanismo de reducción de la **T** a la **DHT** haciendo que se una con mayor afinidad a la enzima 5α -reductasa a través de la formación de un aducto irreversible (Figura 2.10).

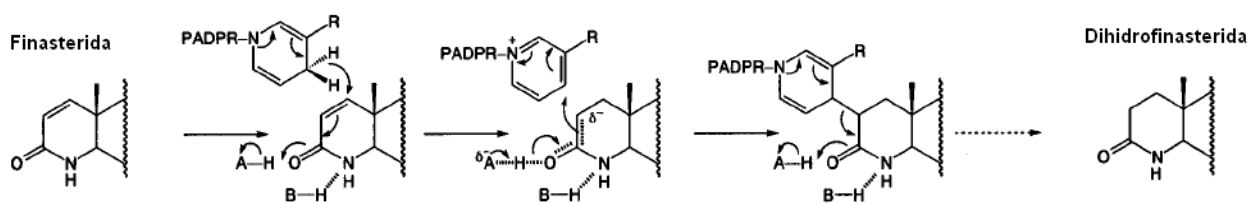


Figura 2.10. Mecanismo de inhibición propuesto para finasterida.

2.7. DESARROLLO DE ANTIANDRÓGENOS ESTEROIDALES

Debido a los efectos colaterales que presentan los antiandrógenos actuales en el mercado hay una búsqueda continua por desarrollar nuevos agentes esteroidales con mayor actividad antiandrógena y menores efectos secundarios.¹⁸ Como se había mencionado anteriormente, la **DHT** es el andrógeno responsable de varias de las enfermedades andrógeno-dependientes, por eso se considera un excelente blanco farmacológico la inhibición de la enzima 5α -reductasa ya que de esta forma sólo se bloquea la formación de la **DHT** sin afectar las funciones biológicas de la **T**.

A través de los estudios de Relación Estructura-Actividad (**REA**), se encontró ciertos requerimientos estructurales para la inhibición selectiva de la enzima 5α -reductasa tipo 2, que para el caso estructuras esteroidales pueden ser derivados del androstano o del pregnano.⁵⁵⁻⁷⁰

2.7.1. DERIVADOS DEL ANDROSTANO

Este tipo de inhibidores han sido diseñados modificando la estructura de la **T**; sin embargo, es de suma importancia la separación de los efectos inhibitorios con respecto a sus efectos andrógénicos, virilizantes y anabólicos.⁵⁵⁻⁶⁶ En la Tabla 2.4 se muestra el mapa de actividad biológica para el diseño de este tipo de antiandrógenos.

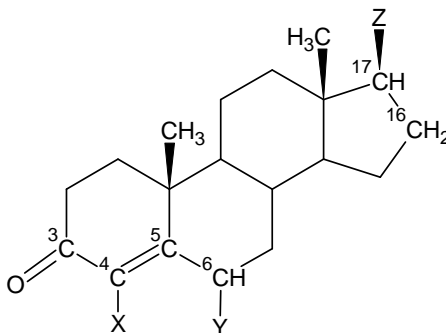


Figura 2.11. Esqueleto del androstano.

Tabla 2.4. Mapa de actividad biológica para derivados del androstano.

SITIO DE CAMBIO	MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL	OBSERVACIONES
C-1, C-2	Adición de un doble enlace	Disminuye ligeramente la actividad inhibitoria
C-3, C-4	Cetona α,β insaturada	El sistema conjugado es un requerimiento esencial para la actividad inhibitoria.
C-4	X= -Cl, -Br, metilo, etilo	Los grupos menos voluminosos mantienen la actividad inhibitoria hacia ambas enzimas.
C-3, C-4, C-6	Expansión de la conjugación a 4,6-dien-3-ona	Contribuye notablemente a la actividad inhibitoria.
C-6	Y= Metilo, etilo, propilo, butilo, -CH(Me) ₂	La alquilación aumenta la actividad antiandrogénica.
C-17	Z = -OCOR	Grupos voluminosos y lipofílicos contribuyen favorablemente a la inhibición.

2.7.2. DERIVADOS DEL PREGNANO

Este tipo de inhibidores han sido diseñados modificando la estructura de la progesterona, lo cual es una ventaja, ya que los compuestos obtenidos a partir de ella presentan una mayor actividad antiandrogénica, debido a que la progesterona es un antiandrógeno natural *per se* por la competencia que existe con la **T** por la unión a la enzima 5α -reductasa. Se han obtenido una serie de compuestos esteroidales con actividad antiandrogénica que presentan una baja actividad hormonal, baja toxicidad y no disminuyen el líbido. La única desventaja que presentan estos derivados es su actividad como progestágenos.⁶⁶⁻⁷⁰ En la Tabla 2.5 se muestra el mapa de actividad biológica de este tipo de compuestos.

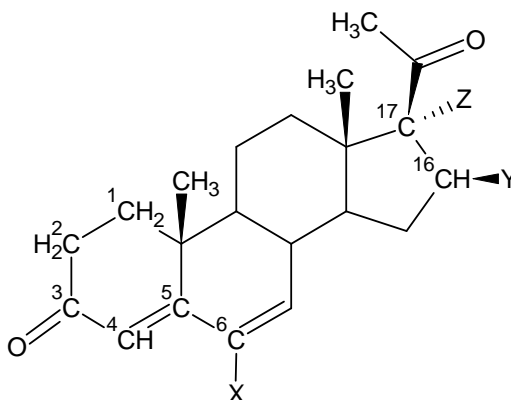


Figura 2.12. Esqueleto del pregnano.

Tabla 2.5. Mapa de actividad biológica para derivados del pregnano.

SITIO DE CAMBIO	MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL	OBSERVACIONES
C-1, C-2	Adición de una doble ligadura	Disminuye ligeramente la actividad inhibitoria; sin embargo, los inhibidores con esta característica estructural se reportan como irreversibles.
C-3, C-4, C-6	Sistema 4,6-dien-3-ona	El sistema conjugado es un requerimiento esencial para la actividad inhibitoria.
C-6	X= -CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , -Cl, -Br	Los grupos poco voluminosos mantienen la actividad inhibitoria.
C-4, C-6, C-10	Reemplazo isostérico de -CH ₂ por -NH- y -O-	Sólo la introducción de -NH- potencia la actividad inhibitoria.
C-16	Y= -CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ , -CH(CH ₃) ₂	Cualquier sustituyente disminuye la actividad por posible impedimento estérico.
C-17	Z = -CONHR, -CONR ₂ , -R ₁ NCOR ₂	Grupos voluminosos y lipofílicos contribuyen favorablemente a la inhibición.

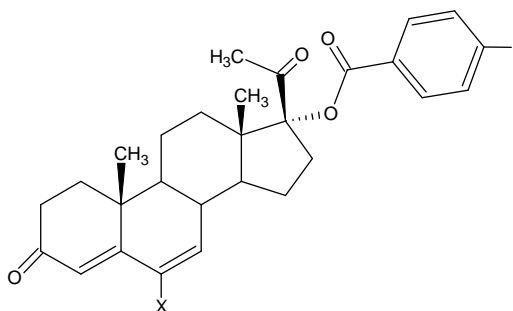
CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la creciente incidencia del cáncer de próstata e **HPB** en hombres de edad avanzada y los pronósticos dados por la organización mundial de la salud en México y en el mundo, estos padecimientos representan un serio problema de salud pública. Actualmente se sabe que la causa principal de ambos padecimientos son las altas concentraciones de **DHT**; sin embargo, las terapias existentes en el mercado proporcionan ciertas desventajas para su tratamiento, es por eso que resulta indispensable continuar con la investigación en la búsqueda de nuevas alternativas. Razón de la cual surge este trabajo el cual pretende aportar distintos compuestos que puedan ser útiles para el tratamiento de estos padecimientos o bien que sirvan de base a futuros proyectos que permitan establecer la relación estructura-actividad antiandrógena.

El diseño y síntesis de los compuestos antiandrógenos esteroideos de este trabajo fue basado en la información de la relación estructura-actividad⁵⁵⁻⁷⁰ de los derivados de androstano y pregnano. Es así que los compuestos sintetizados presentan:

- Sistema 4,6-dien-3-ona.
- Un átomo de cloro en C-6.
- Un grupo benzoiloxi en C-17 α , sustituido en posición 4' del anillo aromático por distintos átomos de halógeno.

Los compuestos sintetizados en este trabajo se ilustran en la Figura 3.1.



Donde:

6a: X=Cl, Y=H	8a: X=H, Y=H
6b: X=Cl, Y=F	8b: X=H, Y=F
6c: X=Cl, Y=Cl	8c: X=H, Y=Cl
6d: X=Cl, Y=Br	8d: X=H, Y=Br

Figura 3.1. Estructura química de los compuestos sintetizados en el presente trabajo.

La elección de estos requerimientos estructurales de los compuestos sintetizados se explica a continuación:

El sistema esteroidal 4-en-3-ona se considera la parte farmacofórica de la molécula, es decir, la parte responsable de la actividad de la molécula, de acuerdo al mecanismo de acción planteado por los distintos complejos de activación formados entre la 5 α -reductasa-NADPH-Esteroides. Si el sistema se modifica a 4,6-dien-3-ona, la actividad inhibitoria aumenta debido a que la energía de activación del complejo en una adición 1,6 es menor al de una adición 1,4 (Figura 3.2).⁷¹

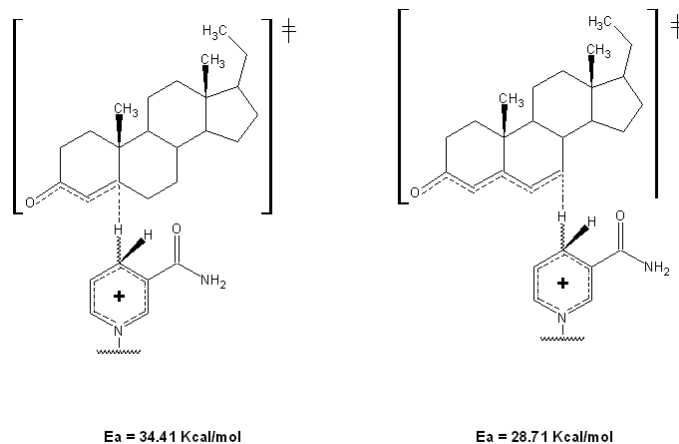


Figura 3.2. Complejos de activación en adiciones 1,4 y 1.6.

La razón principal de la introducción de un átomo de cloro en la posición C-6 del esteroide se debe al bloqueo metabólico, de esta forma se aumenta el tiempo de vida media del compuesto al disminuir la hidroxilación en esta posición.⁷²

En lo referente a la introducción del grupo benzoiloxi en C-17 α fue para aumentar la selectividad y la potencia, ya que le confiere cierta restricción conformacional disminuyendo su carácter como progestageno. Por otra parte, en el organismo la progesterona y sus derivados experimentan una degradación metabólica de la cadena lateral,⁷³ por lo que la introducción de un grupo voluminoso como el benzoiloxi produce un impedimento estérico y en consecuencia una resistencia metabólica a la molécula (Figura 3.3).

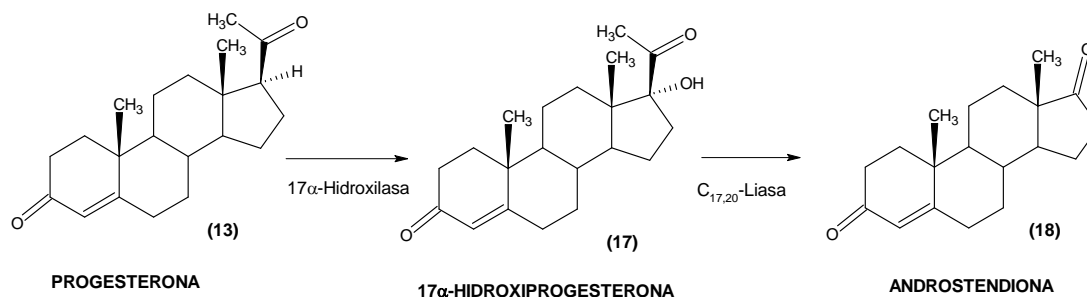


Figura 3.3. Metabolismo de la progesterona.

Finalmente, se decidió que la posición 4' del anillo aromático estuviese sustituido por distintos átomos de halógeno; ya que el reemplazo de un átomo de hidrógeno por un átomo de halógeno tiene repercusiones en dos aspectos:

- Estructurales:
 - Solubilidad.
 - Densidad electrónica.
 - Factores estéricos.
- Biológicos:
 - Biodisponibilidad.
 - Interacciones con el receptor.

Por tal razón este reemplazo es una practica muy común en química farmacéutica. El caso particular de los halógenos en anillos aromáticos presenta cuatro efectos: estéricos, electrónicos, hidrofóbicos y de halogenación obstructiva.⁷⁶⁻⁷⁹

El efecto estérico se debe al tamaño de cada halógeno que impone ciertas conformaciones a la molécula que se refleja en la actividad biológica. La Tabla 3.1 muestra los radios atómicos de los halógenos y del átomo de hidrógeno.⁷⁹

Tabla 3.1. Radio atómico del átomo de hidrógeno y halógenos.

ÁTOMO	RADIO ATÓMICO / (Å)	DISTANCIA INTER-ÁTOMICA (Å) C-X
Hidrógeno	0.29	1.14
Flúor	0.64	1.45
Cloro	0.99	1.74
Bromo	1.14	1.90
Yodo	1.33	2.12

Los efectos electrónicos de los halógenos son de dos tipos (Figura 3.4):⁷⁸

- Inductivo (-I) debido a la electronegatividad de cada átomo.
- Conjugativo (+R) como consecuencia de sus 3 pares de electrones libres.

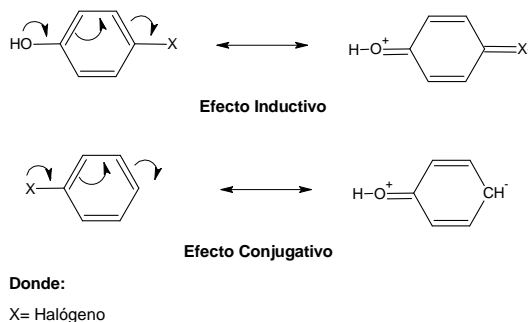


Figura 3.4. Efectos electrónicos de los halógenos.

La inserción de un átomo de halógeno en la molécula le proporciona ciertas características hidrofóbicas que aumentan la lipofilia del compuesto, esto se mide a través de la constante π , que proporciona la contribución lipofílica de cada átomo de halógeno. Todas estas propiedades se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Constantes para Halógenos

ÁTOMO	π	σ	MR
Hidrógeno	0.00	0.00	1.03
Flúor	0.14	0.06	0.92
Cloro	0.71	0.23	6.03
Bromo	0.86	0.23	8.88
Yodo	1.12	0.18	13.94

π de Hansh representa la contribución lipofílica (logP).

σ = Indica el carácter electrónico (Electroatractor).

MR= Refractibilidad Molar, se relaciona con el efecto estérico.

Por último, el efecto de halogenación obstructiva se debe a que el átomo de halógeno en posición 4' del anillo evita la oxidación metabólica en dicha posición y en consecuencia la eliminación del compuesto por conjugación con ácido glucurónico (Figura 3.5).

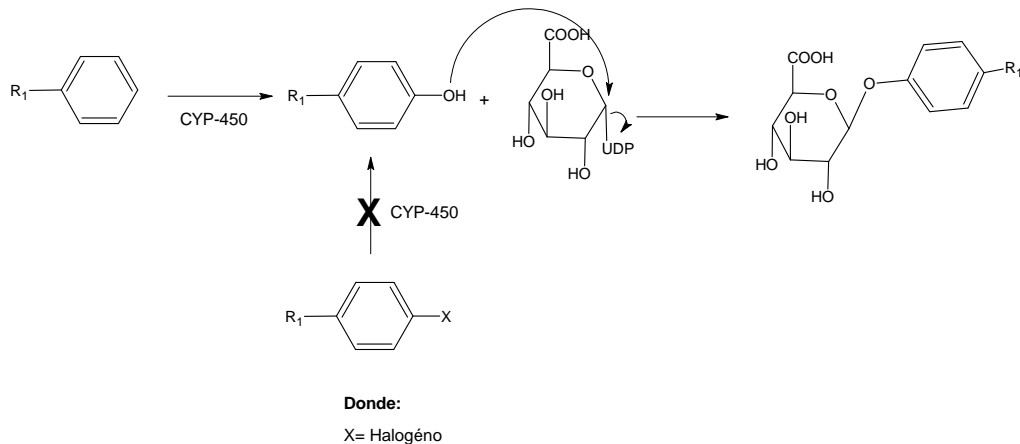


Figura 3.5. Halogenación obstructiva.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

Sí se considera que las posiciones C-6 y C-17 del pregnano son fundamentales para la selectividad y potencia inhibitoria hacia la enzima 5α -reductasa, entonces se espera que mediante la introducción de un átomo de cloro en C-6 y un grupo benzoiloxi en C-17 α sustituido en posición 4', se definirán los requerimientos estructurales, electrónicos, estéricos e hidrofóbicos que son determinantes para el perfil antiandrogénico de estos derivados.

4.2. OBJETIVO GENERAL

A partir de 17α -acetoxi-progesterona sintetizar y evaluar derivados de 17α -aciloiloxi-4,6-pregnadien-3,20-dionas con y sin un átomo de cloro en C-6, con diferentes átomos de halógeno en posición 4' del anillo aromático en C-17 α , los cuales al ser evaluados biológicamente *in vitro* e *in vivo* proporcionarán información sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiandrógena.

4.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar los derivados:
 - 17α -Benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6a**).
 - 6-Cloro- 17α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6b**).
 - 6-Cloro- 17α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6c**).
 - 17α -4'-Bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**).
 - 17α -Benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8a**).
 - 17α -4'-Fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**).
 - 17α -4'-Clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**).
 - 17α -4'-Bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**).

- Determinar la actividad biológica mediante:
 - Ensayo *in vitro* de inhibición de la enzima 5α -reductasa de próstata de cadáver humano.
 - Ensayo *in vitro* de afinidad por el receptor androgénico.
 - Ensayo *in vitro* de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas.
 - Ensayo *in vivo* de inhibición del crecimiento de la próstata en hámsteres castrados.

CAPÍTULO 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental del presente trabajo se dividió en dos partes. En la primera, la parte química se realizó la síntesis química, la caracterización física y espectroscópica de los intermediarios y de los compuestos finales. En la segunda parte, la parte biológica, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiandrogénica de los intermediarios y compuestos finales mediante ensayos *in vitro* de inhibición de la enzima 5 α -reductasa de próstata de cadáver humano, de afinidad por el receptor androgénico y de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas como *in vivo* de inhibición del crecimiento de la próstata en hámsteres castrados.

Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos. La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatoplasmas de gel de sílice (60GF₂₅₄, Merck), un sistema de elución hexano-acetato de etilo 3:2. Para visualizar las placas se empleó una solución de CoCl₂ al 2% en H₂SO₄ 2N y/o lámpara de luz U.V. ($\lambda = 254$ nm).

Los equipos utilizados para la caracterización de los intermediarios y de los compuestos finales fueron los siguientes:

Para la técnica de espectrofotometría de adsorción al ultravioleta (UV) se empleó el espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer modelo Lambda 2, utilizando como disolvente metanol; para la espectrofotometría de absorción al infrarrojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo 1605 utilizando por técnica la pastilla Bromuro de potasio (KBr).

Para la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ¹H) y de carbono (RMN ¹³C) se utilizaron los equipos Inova Varian, de 400 y 300 MHz respectivamente, utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente, los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) para RMN ¹H y CDCl₃ para RMN ¹³C; las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz. Por último para la espectrometría de masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas Termo-Electron, modelo: DFS (Double Focus sector) con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa), mediante la técnica de impacto electrónico.

En la Figura 5.1 se muestra la secuencia sintética que permitió obtener los compuestos finales con las características estructurales requeridas.

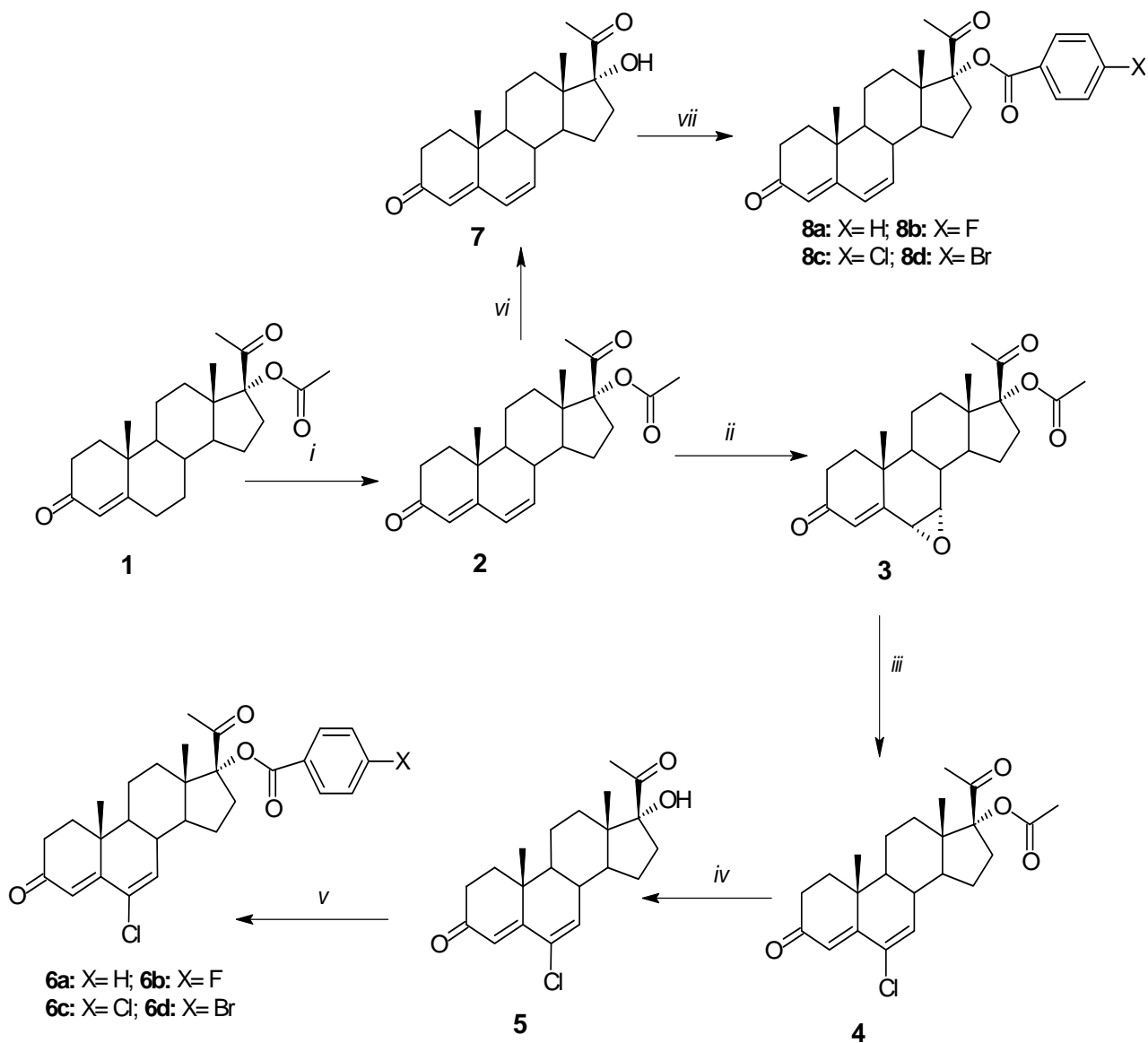


Figura 5.1. Ruta general de síntesis. *i* = cloranilo, ácido acético, tolueno, reflujo por 4 h, *ii* = ác. mCIPB, benceno, reflujo 4 h, *iii* = HCl, Ac₂O, 24 h a T. amb. *iv* = NaOH, MeOH, reflujo por 2 h, *v* = X-BzCOOH, (CF₃CO)₂O, PTS, 2-24 h, T. amb., *vi* = NaOH, MeOH, Reflujo por 2 h. *vii* = X-BzCOOH, (CF₃CO)₂O, PTS, 2-24 h, T. amb.

CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

6.1. PARTE QUÍMICA

6.1.1. 17 α -Acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1)

La purificación de la materia prima se realizó por recristalización de metanol, el sólido blanco obtenido se caracterizó de la siguiente manera:

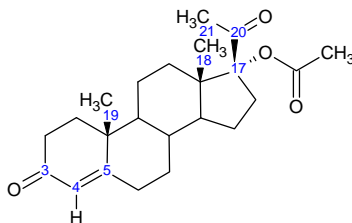
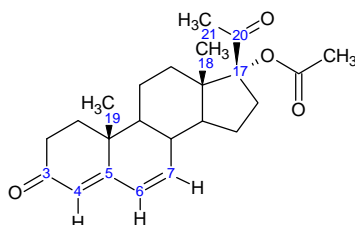


Tabla 6.1.1. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino.
Punto de fusión (°C)	252
Formula molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	372
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
239.54	$\lambda_{\text{máx.}}$ (C=O α , β -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
2952 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2933 (M)	C-H (st as) de -CH ₂ -
2868 (W)	C-H (st-si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1733 (S)	CH ₃ -CO-O- (st) en C-17
1718 (S)	C=O en C-20
1657 (S)	C=O en C-3
1616 (W)	C=C conjugado en C-4
1442 (W)	-CH ₂ (δ)
1375 (W)	-CH ₃ (δ)
1260 (S)	C-O (st si) de CH ₃ COO en C-17
1251 (S)	C-O (st as) de CH ₃ COO en C-17
RMN ¹H (ppm)	
0.68 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.19 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.05 (s, 3H)	-CH ₃ en -CH ₂ COO- en C-17
2.12 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
5.75 (s, 1H)	-CH=C en C-4
RMN ¹³C (ppm)	
14.6	C-18 (-CH ₃)
17.4	C-19 (-CH ₃)
21.2	-CH ₃ del CH ₃ COO- en C-17
26.3	C-21 (-CH ₃)
123.9	C-4 (-CH=C=)
170.4	C-5 (-CH=C=)
170.6	-O-C=O del CH ₃ COO- en C-17
199.3	C-3 (C=O α , β -insaturada)
203.9	C-20 (C=O)

EMIE <i>m/z</i> (%)	
372(1)	M^+
330 (10)	$[M^+ - 42 (CH_2=C=O)]^+$
312 (6)	$[M^+ - 60 (CH_3COOH)]^+$ ó $[330 - 18 (H_2O)]^+$
287 (42)	$[330 - 43 (CH_3CO)]^+$
269 (100)	$[312 - 43 (CH_3CO)]^+$

6.1.2. 17 α -Acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2)



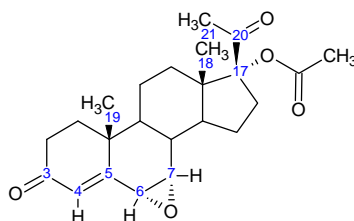
En un matraz bola de 50 mL se mezclaron 1 g (2.688 mmol) de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (**1**), 0.7 g (2.8 mmol) de cloranilo, 2 mL de tolueno y 8 mL de ácido acético glacial; posteriormente se agitó y calentó a ebullición bajo reflujo por 4 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se enfrió a temperatura ambiente en baño de agua, y se filtró al vacío. El filtrado obtenido se vertió en una mezcla hielo-agua, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u); se separó la fase orgánica y se lavó con 12.5 mL de hidróxido de sodio al 11%. Enseguida se hicieron lavados con agua hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro y el cloroformo se destiló a sequedad. El sólido obtenido se recristalizó de acetato de etilo. Se obtuvieron 0.7 g (1.892 mmol) de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**2**) correspondientes al 70.38% de rendimiento teórico.

Tabla 6.1.2. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**2**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido amarillo cristalino
Punto de fusión (°C)	224-226
Formula molecular	C ₂₃ H ₃₀ O ₄
Peso molecular / <i>m/z</i> (M ⁺)	370
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
282.42	$\lambda_{\text{máx.}}$, (C=O α , β , γ , δ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
2978 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2946 (M)	C-H (st as) de -CH ₂ -
2879 (W)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1733 (S)	CH ₃ -CO-O- (st) en C-17
1718 (S)	C=O en C-20
1652 (M)	C=O en C-3
1620 (M)	-CH=C-CH=CH- en C-3 a C-7
1440 (W)	-CH₂ (δ)
1373 (W)	-CH₃ (δ)
1260 (S)	C-O (st si) de CH ₃ COO en C-17
1248 (S)	C-O (st as) de CH ₃ COO en C-17
RMN ¹H (ppm)	
0.73 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18

1.13 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.06(s, 3H)	-CH ₃ en -CH ₂ COO- en C-17
2.11 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
5.70 (s, 1H)	-CH=C en C-4
6.12 (dd, 1H, J ₁ = 10 Hz, J ₂ = 1.2 Hz)	-CH=CH- en C-6
6.16 (dd, 1H, J ₁ = 9.6 Hz, J ₂ = 2 Hz)	-CH=CH- en C-7
RMN ¹³C (ppm)	
14.3	C-18 (-CH ₃)
16.3	C-19 (-CH ₃)
21.2	-CH ₃ del CH ₂ COO- en C-17
26.4	C-21 (-CH ₃)
123.9	C-4 (-CH=C=)
128.3	C-6 (-CH=CH-)
140.0	C-7 (-CH=CH-)
163.1	C-5 (-CH=C=)
170.6	-O-C=O del CH ₂ COO- en C-17
199.3	C-3 (C=O α,β,γ,δ-insaturada)
203.8	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
370 (1)	M ⁺
328 (1)	[M ⁺ - 42 (CH ₂ C=O)] ⁺
310 (2)	[328 - 18 (H ₂ O)] ⁺
285 (10)	[328 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
267 (100)	[310 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺

6.1.3. 17α-Acetoxi-6,7α-epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3)



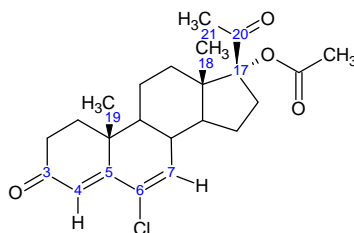
A un matraz bola de 50 mL se mezclaron 1 g (2.703 mmol) de 17α-acetoxi-4,6-pregnen-3,20-diona (**2**), 5 mL de benceno y ácido *m*-cloroperbenzoico en suspensión (1.25 g, 7.25 mmol en 15 mL de benceno); la mezcla resultante se calentó a reflujo por 4 h. Finalizado el tiempo de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se destiló el benceno a sequedad, se agregaron 12.5 mL de cloroformo y 84 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio que contenía 1 g de bisulfito de sodio, se agitó por 30 min. Se separó la fase orgánica, se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El sólido obtenido se recristalizó de metanol. Se obtuvieron 0.45 g (1.17 mmol) de 17α-acetoxi-6,7α-epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**) que corresponde al 43.13% de rendimiento teórico.

Tabla 6.1.3. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17α-acetoxi-6,7α-epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	245
Formula molecular	C ₂₃ H ₃₀ O ₅
Peso molecular / m/z (M ⁺)	386

VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
238.82 $\lambda_{\text{máx}}$.	(C=O α , β -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
2968 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ - y epóxido
2949 (M)	C-H (st as) de -CH ₂ -
1726 (S)	CH ₃ CO-O- (st) en C-17
1716 (S)	C=O (st) en C-20
1678 (S)	C=O (st) en C-3
1624 (W)	C=C (st) conjugado en C-4
1459 (W)	-CH₂ (δ)
1376 (W)	-CH₃ (δ si)
1258 (S)	C-O (st si) de CH ₃ COO en C-17
1248 (S)	C-O (st as) de CH ₃ COO en C-17
RMN ¹H (ppm)	
0.70 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.11 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.06 (s, 3H)	-CH ₃ en -CH ₃ COO- en C-17
2.13 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
3.38 (d, 1H, ³ J = 4Hz)	-CH en C-7
3.51 (d, 1H, ³ J = 4Hz)	-CH en C-6
6.15 (s, 1H)	-CH=C en C-4
RMN ¹³C (ppm)	
14.2	C-18 (-CH ₃)
17.2	C-19 (-CH ₃)
21.2	-CH ₃ del CH ₃ COO- en C-17
26.3	C-21 (-CH ₃)
35.5	C-6 (-CH(O)CH-)
47.2	C-7 (-CH(O)CH-)
131.3	C-4 (-CH=C=)
161.9	C-5 (-CH=C=)
170.7	-O-C=O del CH ₃ COO- en C-17
198.0	C-3 (C=O α , β -insaturada)
203.8	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
386 (1)	M ⁺
344 (4)	[M ⁺ - 42 (CH ₂ =C=O)] ⁺
343 (12)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
326 (6)	[M ⁺ - 60 (CH ₃ COOH)] ⁺ ó [344 - 18 (H ₂ O)] ⁺
301 (44)	[344-43 (CH ₃ CO)] ⁺
283 (100)	[326 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺

6.1.4. 17 α -Acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4)



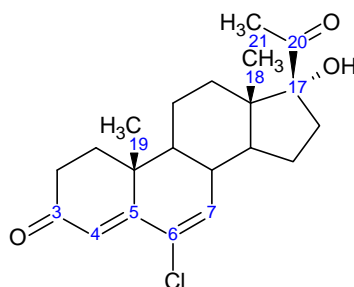
En un matraz bola de 250 mL se agregaron 110 mL de anhídrido acético, se colocó en baño de hielo y gota a gota se adicionaron 60 mL de ácido clorhídrico en agua (36%); posteriormente, se agregó 1 g (2.591 mmol) de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**), la solución resultante se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se vertió con precaución en un mezcla hielo-agua, se

agitó por 30 min; el precipitado formado fue filtrado al vacío y se lavó con agua hasta pH neutro. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice 60 (0.063-0.2 mm) y como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.9 g (2.23 mmol) de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**4**) que corresponde al 85.99% de rendimiento teórico.

Tabla 6.1.4. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**4**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido amarillo cristalino
Punto de fusión (°C)	210
Formula molecular	C ₂₃ H ₂₉ ClO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	404
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
283.21	$\lambda_{\text{máx}}$ (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
2964 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2944 (M)	C-H (st as) de -CH ₂ -
2885 (W)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1741 (S)	CH ₃ -CO-O- (st) en C-17
1716 (S)	C=O (st) en C-20
1657 (S)	C=O (st) en C-3
1605 (W)	C=C (st) conjugado en C-4
1442 (W)	-CH ₂ (δ)
1368 (W)	-CH ₃ (δ si)
1256 (S)	C-O (st si) de CH ₃ COO en C-17
1244 (S)	C-O (st as) de CH ₃ COO en C-17
880 (S)	C-Cl (st) en C-6
RMN ¹H (ppm)	
0.73 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.16 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.07 (s, 3H)	-CH ₃ en -CH ₃ COO- en C-17
2.11 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
6.32 (s, 1H)	-CH en C-4
6.33 (s, 1H)	-CCl=CH- en C-7
RMN ¹³C (ppm)	
14.2	C-18 (-CH ₃)
16.4	C-19 (-CH ₃)
21.1	-CH ₃ del CH ₃ COO- en C-17
26.4	C-21 (-CH ₃)
123.8	C-4 (-CH=C=)
130.3	C-6 (-CCl=CH-)
137.9	C-7 (-CCl=CH-)
158.7	C-5 (-CH=C=)
170.5	-O-C=O del CH ₃ COO- en C-17
198.9	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
203.6	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
404 (1)	M ⁺
362(1)	[M ⁺ - 42 (CH ₂ C=O)] ⁺
344 (4)	[M ⁺ - 60 (CH ₃ COOH)] ⁺ ó [362 - 18 (H ₂ O)] ⁺
319 (18)	[362 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
301 (100)	[344 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺

6.1.5. 6-Cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5)



En un matraz bola de 250 mL se mezclaron 1 g (2.763 mmol) de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4), 50 mL de metanol y 50 mL de una solución de hidróxido de sodio al 2%. Se calentó hasta ebullición y se reflujo por 2 h. Transcurrido el tiempo de reacción se enfrió el matraz a temperatura ambiente, posteriormente se destiló el exceso de metanol, se agregó hielo al matraz, se agitó hasta la fusión del hielo y el precipitado obtenido fue filtrado al vacío se lavó con agua hasta pH neutro; el producto crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice 60 (0.063-0.2 mm) y como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.51 g (1.32 mmol) de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5) que corresponde al 56.92% de rendimiento teórico.

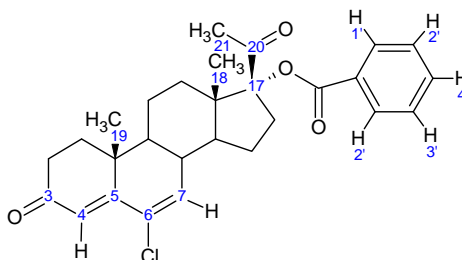
Tabla 6.1.5. Propiedades físicas y espectroscópicas de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5)

PROPIEDAD	VALOR	
Aspecto	Sólido amarillo cristalino	
Punto de fusión (°C)	195	
Formula molecular	C ₂₃ H ₂₇ ClO ₃	
Peso molecular / m/z (M ⁺)	362	
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA	
UV (nm)		
284.76	$\lambda_{\text{máx.}}$ (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)	
IR (cm⁻¹)		
3467 (M)	-O-H (st) de -OH en C-17	
2951 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -	
2870 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -	
1704 (S)	C=O (st) en C-20	
1646 (S)	C=O (st) en C-3	
1600 (M)	C=C (st) conjugado en C-4	
1458 (W)	-CH₃ (δ si)	
1352 (M)	-O-H (δ)	
1160 (W)	-C-OH (st) OH terciario	
884 (S)	C-Cl (st) en C-6	
RMN ¹H (ppm)		
0.79 (s, 3H)	-CH₃ en C-18	
1.15 (s, 3H)	-CH₃ en C-19	
2.29 (s, 3H)	-CH₃ en C-21	
4.77 (s, 1H)	-OH en C-17 (Intercambio con D ₂ O)	
6.32 (s, 1H)	-CH en C-4	
6.33 (d, 1H, ³ J = 2.4 Hz)	(-C=C-CH-) en C-7	
RMN ¹³C (ppm)	Asignación	Correlaciona con
15.2	C-18 (-CH₃)	C-13, C-12
16.5	C-19 (-CH₃)	C-5, C-9, C-19, C-1
20.2	C-11 (-CH₂)	C-12, C-9
23.3	C-15 (-CH₂)	C-16, C-14

27.6	C-21 (-CH ₃)	C-21
30.2	C-12 (-CH ₂)	C-18
33.7	C-16 (-CH ₂)	C-15
33.7	C-2 (-CH ₂ -)	C-19
34.3	C-1 (-CH ₂ -)	C-19
37.9	C-10 (-C-)	C-19, C-4
38.5	C-8 (-CH-)	C-7, C-14
47.7	C-14 (-CH-)	C-8, C-15.
48.9	C-13 (-C-)	C-18- C-9
49.9	C-9 (-CH-)	C-19, C-4
89.4	C-17 (-C-OH)	C-20, C-21, C-18
123.8	C-4 (-CH=C=)	C-5, C-6, C-9, C-10
130.2	C-6 (-CCl=CH-)	C-4, C-7
138.3	C-7 (-CCl=CH-)	C-5, C-6, C-4, C-8
158.8	C-5 (-CH=C=)	C-19, C-2, C-4, C-7
198.8	C-3 (C=O α,β,γ δ-insaturada)	C-2, C-4
210.7	C-20 (C=O)	C-20

EMIE m/z (%)	
364 (12)	M ⁺ + 2
362 (34)	M ⁺
347 (1)	[M ⁺ - 15 (CH ₃)] ⁺
344 (6)	[362 - 18 (H ₂ O)] ⁺
319 (100)	[347 - 28 (CO)] ⁺ ó [M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
301 (42)	[344 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺

6.1.6a. 17α-Benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a)

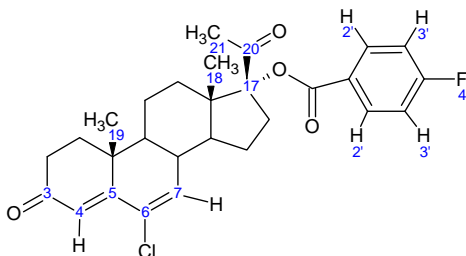


Un matraz bola de 50 mL conteniendo 1.687 g (13.828 mmol) de ácido benzoico y 200 mg de ácido *p*-toluensulfónico (PTS) se colocó en la estufa por 2 h (T = 60 °C), finalizado el tiempo, el matraz se enfrió a temperatura ambiente, se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético y se agitó a temperatura ambiente por 30 min; posteriormente, se adicionó 1 g (2.763 mmol) de 6-cloro-17α-hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**5**), se agitó por 2 h. Finalizado el tiempo de reacción se agregó 3 mL de cloroformo y se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló a sequedad. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.3 g (0.083 mmol) de 17α-benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6a**) correspondientes al 23.30% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.6. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	165-167
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₁ ClO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	466
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
230.47	λ_1 (Ester BzCOO- en C-17 α)
282.01	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3056 (W)	-C=C-H (st) aromático
2926 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2870.42 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1738 (S)	Bz-CO-O- (st) en C-17 α
1719 (S)	C=O (st) en C-20
1664 (M)	C=O (st) en C-3
1602 (M)	C=C (st) conjugado en C-4
1581 (W)	-C=C- (st) aromatico
1452 (W)	-CH ₃ (δ si)
1451 (W)	-CH ₂ (δ)
1373 (M)	-CH ₃ (δ)
1245 (S)	C-O (st si) de Bz-CO-O- en C-17 α
881 (W)	C-Cl (st) en C-6
RMN ¹H (ppm)	
0.81 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.19 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.11 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
6.34 (d, 1H, ³ J = 2.4 Hz)	(-CCl=CH-) en C-7
6.36 (s, 1H)	-CH en C-4
7.49 (t, 2H, ³ J ₁ = 8.4 Hz, ⁴ J ₂ = 1.5 Hz.)	H ₃ 's del grupo benzoilo en C-17 α
7.63 (t, 1H, ³ J ₁ = 7.5 Hz)	H ₄ del grupo benzoilo en C-17 α
8.04 (d, 2H, ³ J ₁ = 7.5 Hz)	H ₂ 's del grupo benzoilo en C-17 α
RMN ¹³C (ppm)	
14.4	C-18 (-CH ₃)
16.5	C-19 (-CH ₃)
26.5	C-21 (-CH ₃)
123.9	C-4 (-CH=C=)
128.7	C ₃ 's del grupo benzoilo en C-17 α
129.7	C ₂ 's del grupo benzoilo en C-17 α
129.8	C-6 (-CCl=CH-)
130.4	C ípso del grupo benzoilo en C-17 α
133.7	C ₄ 's del grupo benzoilo en C-17 α
137.9	C-7 (-CCl=CH-)
158.8	C-5 (-CH=C=)
163.1	-O-C=O del BzCOO- en C-17 α
198.9	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
212.2	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
466 (1)	M ⁺
423 (4)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
344 (4)	[M ⁺ - 122 (C ₇ H ₆ O ₂)] ⁺
301 (26)	[344 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
105 (100)	[M ⁺ - 361 (C ₂₁ H ₂₆ ClO ₃)] ⁺
77 (26)	[105 - 28 (CO)] ⁺

6.1.6b. 6-Cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b)



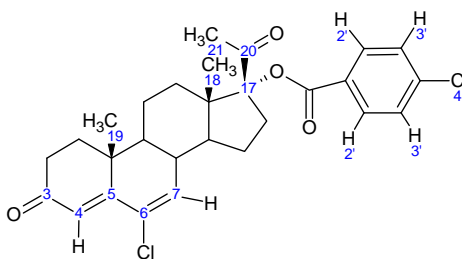
Un matraz bola de 50 mL conteniendo 1.935 g (13.843 mmol) de ácido 4-fluorobenzoico y 200 mg de PTS se colocó en la estufa por 2 h (T = 60°C). Después el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético; se agitó a temperatura ambiente por 1 h; posteriormente, se adicionó 1 g (2.763 mmol) de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**5**), se agitó por 6 h. Finalizado el tiempo de reacción se agregaron 3 mL de cloroformo y se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El crudo obtenido se purificó por CCF utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.25 g (0.052 mmol) de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6b**) correspondientes al 18.66% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.7. Propiedades físicas y espectroscópicas de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6b**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	215-218
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₀ ClFO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	485
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
233.93	λ_1 (Ester 4'-FBzCOO- en C-17 α)
281.88	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3077 (W)	-C=C-H (st) aromático
2949 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2875 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1716 (S)	4'-FBz-CO-O- (st) en C-17 α
1666 (M)	C=O (st) en C-3
1604 (M)	C=C (st) conjugado en C-4
1508 (M)	-C=C- (st) aromático
1460 (W)	-CH ₃ (δ si)
1352 (M)	-CH ₃ (δ)
1291 (S)	C-O (st si) de 4'-FBz-CO-O- en C-17 α
1111 (M)	C-F (st) de 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
880 (W)	C-Cl (st)
857 (W)	-C=C- (st) aromático para sustituido
RMN ¹H (ppm)	
0.80 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.19 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.11 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
6.34 (d, 1H, ³ J = 2.4 Hz)	(-CCl=CH-) en C-7
6.36 (s, 1H)	-CH en C-4
7.16 (m, 2H, ³ J _r = 9.6 Hz, ⁴ J ₂ = 2.8 Hz)	H ₃ 's del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α

8.05 (m, 2H, $^3J_{\text{H-F}} = 8.8$ Hz, $^4J_{\text{H-F}} = 5.2$ Hz)	H ₂ 's del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
RMN ¹³C (ppm)	
14.4	C-18 (-CH ₃)
16.6	C-19 (-CH ₃)
26.5	C-21 (-CH ₃)
115.9 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 16.61$ Hz)	C ₃ 's del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
124.0	C-4 (-CH=C=)
126.2	C-6 (-C(Cl)=CH-)
130.5	C ípso del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
132.3 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 7.097$ Hz)	C ₂ 's del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
137.7	C-7 (-C(Cl)=CH-)
158.5	C-5 (-CH=C=)
165.0	-O-C=O del 4'-FBzCOO- en C-17 α
166.6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 242.959$ Hz)	C ₄ -F del grupo 4'-FBzCOO- en C-17 α
198.8	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
210.6	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
484 (1)	M ⁺
441 (3)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
344 (2)	[M ⁺ - 140 (C ₇ H ₆ O ₂ F)] ⁺
301 (20)	[344 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
123 (100)	[M ⁺ - 361 (C ₂₁ H ₂₆ ClO ₃)] ⁺
95 (10)	[123 - 28 (CO)] ⁺

6.1.6c. 6-Cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c)

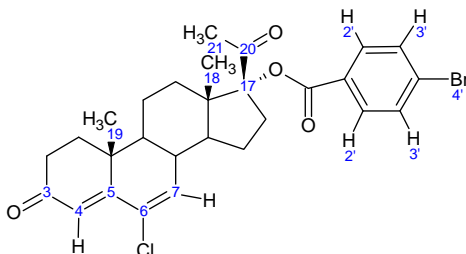


Un matraz bola de 50 mL conteniendo 2.162 g (13.815 mmol) de ácido 4-clorobenzoico y 200 mg de PTS; se colocó en la estufa por 2 h (T = 60°C), finalizado el tiempo, el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético y 2 mL de cloroformo; se agitó a temperatura ambiente por 2 h; posteriormente, se adicionó 1 g (2.763 mmol) de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**5**) y se agitó por 20 h. Finalizado el tiempo de reacción se agregaron 3 mL de cloroformo y se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El crudo obtenido se purificó por CCF utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.3 g (0.06 mmol) de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6c**) correspondientes al 21.72% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.8. Propiedades físicas y espectroscópicas de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6c**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	225-226
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₀ ClFO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	500
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
242.41	λ_1 (Ester 4'-ClBzCOO- en C-17 α)
282.30	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3079 (W)	-C=C-H (st) aromático
2949 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2873 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1719 (S)	4'-ClBz-CO-O- (st) en C-17
1664 (M)	C=O (st) en C-3
1630 (W)	C=C (st) conjugado en C-4
1594 (M)	-C=C- (st) aromático
1459 (W)	-CH ₃ (δ si)
1353 (M)	-CH ₃ (δ)
1292 (S)	C-O (st si) de 4'-ClBz-CO-O- en C-17 α
1280 (M)	C-O (st si) de 4'-ClBz-CO-O- en C-17 α
880 (W)	C-Cl (st) en C-6 y de 4'-ClBzCOO- en C-17 α
854 (W)	-C=C- (st) aromático <i>para</i> sustituido
RMN¹H (ppm)	
0.80 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.19 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.10 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
6.33 (d, 1H, ³ J=2.7 Hz)	(-CCl=CH-) en C-7
6.36 (s, 1H)	-CH en C-4
7.46 (d, 2H, ³ J= 8.7 Hz)	H ₃ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
7.96 (d, 2H, ³ J= 8.7 Hz)	H ₂ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
RMN¹³C (ppm)	
14.6	C-18 (-CH ₃)
16.8	C-19 (-CH ₃)
26.8	C-21 (-CH ₃)
124.2	C-4 (-CH=C=)
128.4	C-6 (-CCl=CH-)
129.3	C ₃ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
130.7	C ípso del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
131.2	C ₂ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
138.0	C-7 (-CCl=CH-)
140.5	C ₄ -Cl del grupo benzoilo en C-17 α
158.8	C-5 (-CH=C=)
165.3	-O-C=O del 4'-ClBzCOO- en C-17 α
199.1	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
203.5	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
500 (1)	M ⁺
457 (1)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
344 (4)	[M ⁺ - 156 (C ₇ H ₆ O ₂ Cl)] ⁺
301 (26)	[344 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
139 (100)	[M ⁺ - 361 (C ₂₁ H ₂₆ ClO ₃)] ⁺
111 (10)	[123 - 28 (CO)] ⁺

6.1.6d. 17 α -4'-Bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d)



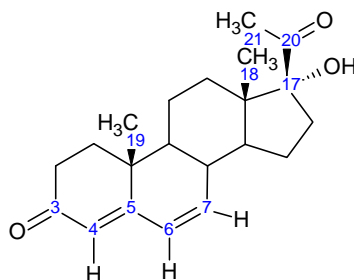
Un matraz bola de 50 mL conteniendo 2.777 g (13.816 mmol) de ácido 4-bromobenzoico y 200 mg de PTS se colocó en la estufa por 2 h (T = 60°C), después el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético y 5 mL de cloroformo, se dejó en agitación a temperatura ambiente por 2 h; posteriormente, se adicionó 1 g (2.763 mmol) de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**5**), se dejó en agitación por 24 h. Finalizado el tiempo de reacción se agregaron 3 mL de cloroformo y se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El crudo obtenido se purificó por CCF utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.35 g (0.065 mmol) de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**) correspondientes al 23.21% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.9. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	222-224
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₀ BrClO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	546
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
248.20	λ_1 (Ester 4'-BrBzCOO en C-17 α)
282.68	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3060 (W)	-C=C-H (st) aromático
2926 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2856 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1710 (S)	4'-BrBz-CO-O- (st) en C-17 α
1662 (M)	C=O (st) en C-3
1603 (M)	C=C (st) conjugado en C-4
1590 (M)	-C=C- (st) aromático
1459 (W)	-CH ₃ (δ si)
1353 (M)	-CH ₃ (δ)
1291 (M)	C-O (st si) de 4'-BrBz-CO-O- en C-17 α
1276 (M)	C-O (st as) de 4'-BrBz-CO-O- en C-17 α
881 (W)	C-Cl (st) en C-6
856 (W)	-C=C- (st) aromático <i>para</i> sustituido
592 (W)	C-Br (st) de 4'-BrBzCOO en C-17 α
RMN ¹H (ppm)	
0.80 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.19 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.10 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
6.33 (d, 1H, ³ J = 2.1 Hz)	(-CCl=CH-) en C-7

6.36 (s, 1H)	-CH en C-4
7.63 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz)	H ₃ 's del grupo 4'-bromobenzoilo en C-17 α
7.88 (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz)	H ₂ 's del grupo 4'-bromobenzoilo en C-17 α
RMN ¹³C (ppm)	
14.4	C-18 (-CH ₃)
16.5	C-19 (-CH ₃)
26.5	C-21 (-CH ₃)
123.9	C-4 (-CH=C=)
128.7	C-6 (-CCI=CH-)
128.9	C ₄ -Br del grupo 4'-bromobenzoilo en C-17 α
130.4	C ípso del grupo 4'-bromobenzoilo en C-17 α
131.1	C ₃ 's del grupo 4'-bromobenzoilo en C-17 α
132.1	C ₂ 's del grupo 4'-bromobenzoilo en C-17 α
137.8	C-7 (-CCI=CH-)
158.5	C-5 (-CH=C=)
165.2	-O-C=O del 4'-BrBzCOO- en C-17 α
198.9	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
203.9	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
546 (1)	M ⁺
503 (3)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
344 (6)	[M ⁺ - 202 (C ₇ H ₆ O ₂ Br)] ⁺
301 (58)	[344 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
183 (100)	[M ⁺ - 361 (C ₂₁ H ₂₆ ClO ₃)] ⁺
155 (10)	[183 - 28 (CO)] ⁺

6.1.7. 17 α -Hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7)

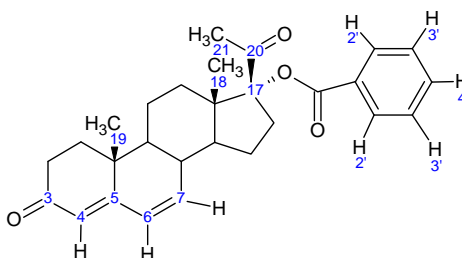


En un matraz bola de 50 mL se mezclaron 1 g (2.703 mmol) de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**2**), 50 mL de metanol y 50 mL de una solución de hidróxido de sodio al 2%, se calentó a ebullición y se reflujo por 2 h. Transcurrido el tiempo de reacción se enfrió el matraz a temperatura ambiente, posteriormente se destiló el exceso de metanol, se agregó hielo al matraz, se agitó hasta la fusión del hielo y el precipitado obtenido fue filtrado al vacío, se lavó con agua hasta pH neutro; el producto crudo obtenido se purificó por recristalización de metanol. Se obtuvieron 0.55 g de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**7**) que corresponde al 62.04% de rendimiento teórico.

Tabla 6.1.10. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7)

PROPIEDAD	VALOR	
Aspecto	Sólido amarillo cristalino	
Punto de fusión (°C)	254-256	
Formula molecular	C ₂₁ H ₂₆ O ₃	
Peso molecular / m/z (M ⁺)	328	
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA	
UV (nm)		
283.28	$\lambda_{\text{máx}}$ (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)	
IR (cm⁻¹)		
3412 (M)	-O-H (st) de -OH en C-17 α	
3026 (W)	-C=C-H (st)	
2945 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -	
2871 (W)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -	
1704 (S)	C=O en C-20	
1644 (S)	C=O en C-3	
1614 (S)	-CH=C-CH=CH- en C-4	
1458 (W)	-CH ₂ (δ)	
1381 (W)	-CH ₃ (δ)	
1354 (M)	-O-H (δ)	
1155 (W)	-C-OH (st) OH terciario	
RMN ¹H (ppm)		
0.80 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18	
1.12 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19	
2.29 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21	
4.95 (s, 1H)	-OH en C-17 (Intercambio con D ₂ O)	
5.69 (s, 1H)	-CH en C-4	
6.13 (s, 2H)	(-CH=CH-) en C-6 y C-7	
RMN ¹³C (ppm)	Asignación	Correlaciona con
15.2	C-18 (-CH ₃)	C-14, C-8, C-12
16.2	C-19 (-CH ₃)	C-9, C-2, C-1
20.0	C-11 (-CH ₂ -)	No observable
23.3	C-15 (-CH ₂ -)	No observable
27.8	C-21 (-CH ₃)	C-20, C-17, C-8
30.1	C-12 (-CH ₂ -)	C-18
33.5	C-10 (-C-)	C-19
33.8	C-16 (-CH ₂ -)	C-17
33.8	C-1 (-CH ₂ -)	C-19, C-4
35.9	C-13 (-C-)	C-18
37.3	C-2 (-CH ₂ -)	C-19, C-4
47.7	C-8 (-CH-)	C-18, C-21, C-7
48.9	C-14 (-CH-)	C-18
50.2	C-9 (-CH-)	C-19, C-7
89.5	C-17 (-C-OH)	C-18, C-21, C-16
123.7	C-4 (-CH=C-)	C-6
128.1	C-6 (-CH=CH-)	C-4
140.5	C-7 (-CH=CH-)	C-8
163.4	C-5 (-CH=C-)	C-19, C-7, C-6, C-4.
199.4	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)	C-2, C-1
211.2	C-20 (C=O)	C-21, C-17
EMIE m/z (%)		
330 (1)	M ⁺ + 2	
328 (32)	M ⁺	
313 (1)	[M ⁺ - 15 (CH ₃)] ⁺	
310 (48)	[M ⁺ - 18 (H ₂ O)] ⁺	
285 (100)	[313 - 28 (CO)] ⁺	
267 (92)	[310 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺	

6.1.8a. 17 α -Benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a)



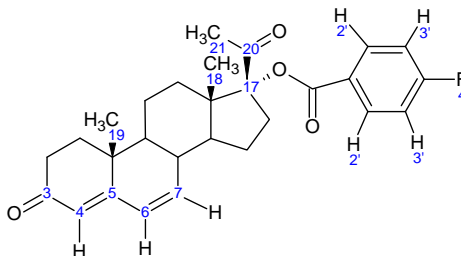
Un matraz bola de 50 mL conteniendo 1.862 g (15.262 mmol) de ácido benzoico y 200 mg de PTS se colocó en la estufa por 2 h (T = 60 °C), finalizado el tiempo, el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético, se agitó a temperatura ambiente por 30 min; posteriormente, se adicionó 1 g (3.049 mmol) de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**7**) y se agitó por 2 h. Finalizado el tiempo de reacción se agregaron 3 mL de cloroformo, se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El crudo obtenido se purificó por CCF utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.5 g (0.083 mmol) de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8a**) correspondientes al 37.96% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.11. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8a**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	230-231
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₂ O ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	432
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
231.97	λ_1 (Ester BzCOO- en C-17 α)
282.41	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3057 (W)	-C=C-H (st) aromático
3025 (W)	-C=C-H (st)
2946 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2872 (W)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1980 (W)	-C=C- (st) aromático
1713 (S)	Bz-CO-O- (st) en C-17
1658 (S)	C=O en C-20
1617 (M)	-CH=C-CH=CH- en C-4
1451 (W)	-CH ₂ (δ)
1385 (W)	-CH ₃ (δ)
1288 (S)	-C-O (st si) de Bz-CO-O- en C-17 α
RMN ¹H (ppm)	
0.81 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.16 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.11 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
5.73 (s, 1H)	-CH en C-4
6.16 (m, 2H)	(-CH=CH-) en C-6 y C-7
7.49 (t, 2H, ³ J ₁ = 7.8 Hz, ⁴ J ₂ = 1.6 Hz)	H ₃ 's del grupo benzoilo en C-17 α
7.62 (t, 1H, ³ J ₁ = 7.4 Hz, ⁴ J ₂ = 1.44 Hz)	H ₄ ' del grupo benzoilo en C-17 α
8.04 (d, 2H, ³ J ₁ = 8.4 Hz, ⁴ J ₂ = 1.2 Hz)	H ₂ 's del grupo benzoilo en C-17 α

RMN ¹³ C (ppm)	
14.4	C-18 (-CH ₃)
16.4	C-19 (-CH ₃)
26.4	C-21 (-CH ₃)
124.0	C-4 (-CH=C-)
128.4	C-6 (-CH=CH-)
128.6	C ₃ 's del grupo benzoilo en C-17 α
129.7	C ₂ 's del grupo benzoilo en C-17 α
129.8	C ípso del grupo benzoilo en C-17 α
133.6	C ₄ ' del grupo benzoilo en C-17 α
140.1	C-7 (-CH=CH-)
163.1	C-5 (-CH=C-)
165.9	-O-C=O del BzCOO- en C-17 α
199.4	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
203.7	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
432 (1)	M ⁺
389 (6)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
310 (8)	[M ⁺ - 122 (C ₇ H ₆ O ₂)] ⁺
267 (84)	[310 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
105 (100)	[M ⁺ - 327 (C ₂₁ H ₂₇ O ₃)] ⁺
77 (30)	[105 - 28 (CO)] ⁺

6.1.8b. 17 α -4'-Fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b)

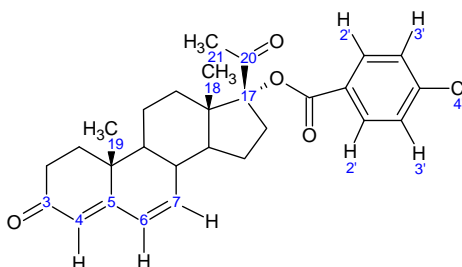


Un matraz bola de 50 mL conteniendo 2.136 g (15.258 mmol) de ácido 4-fluorobenzoico y 200 mg de PTS se colocó en la estufa por 2 h (T= 60°C); finalizado el tiempo, el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético, se agitó a temperatura ambiente por 1 h y se adicionó 1 g (3.049 mmol) de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**7**) la agitación continuo por 6 h más. Posteriormente se agregó 3 mL de cloroformo y se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El crudo obtenido se purificó por CCF utilizando como eluyente hexanoacetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.45 g (1 mmol) de 17 α -4'-flurorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**) correspondientes al 32.80% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.12. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi -4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	248-251
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₁ FO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	450
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
233.73	λ_1 (Ester 4'-FBzCOO- en C-17 α)
282.36	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3080 (W)	-C=C-H (st) aromático
2947 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2876 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1718 (S)	4'-FBz-CO-O- (st) en C-17 α
1660 (M)	C=O (st) en C-3
1617 (M)	C=O (st) en C-20
1603 (M)	C=C (st) conjugado en C-4
1508 (M)	-C=C- (st) aromático
1458 (W)	-CH ₃ (δ si)
1353 (M)	-CH ₃ (δ)
1292 (S)	C-O (st si) de 4'-FBz-CO-O- en C-17 α
1110 (W)	C-F (st) de 4'-FBz-COO- en C-17 α
861 (W)	-C=C- (st) aromático <i>para</i> sustituido
RMN ¹H (ppm)	
0.79 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.14 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.09 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
5.70 (s, 1H)	-CH en C-4
6.13 (d, 1H, ³ J = 8.8 Hz)	(-CH=CH-) en C-6
6.14 (t, 1H, ³ J ₁ = 8.8 Hz, ⁴ J ₂ = 2.4 Hz)	(-CH=CH-) en C-7
7.14 (m, 2H, ³ J ₁ = 9.6 Hz, ⁴ J ₂ = 2.2 Hz)	H ₃ 's del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
8.05 (m, 2H, ³ J ₁ = 8.8 Hz, ⁴ J ₂ = 5.6 Hz.)	H ₂ 's del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
RMN ¹³C (ppm)	
14.9	C-18 (-CH ₃)
16.8	C-19 (-CH ₃)
26.9	C-21 (-CH ₃)
116.1 (d, ² J _{C-F} = 21.9 Hz)	C ₃ 's del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
124.2	C-4 (-CH=C=)
126.2	C ípso del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
128.5	C-6 (-CH=CH-)
132.4 (d, ³ J _{C-F} = 9.1 Hz)	C ₂ 's del grupo α -4'-fluorobenzoilo en C-17 α
140.2	C-7 (-CH=CH-)
163.2	C-5 (-CH=C=)
165.0	-O-C=O del 4'-FBzCOO- en C-17 α
166.2 (d, ¹ J _{C-F} = 253.3 Hz)	C ₄ -F del grupo 4'-fluorobenzoilo en C-17 α
199.4	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
203.6	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
450 (1)	M ⁺
407 (4)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
310 (8)	[M ⁺ - 140 (C ₇ H ₆ O ₂ F)] ⁺
267 (84)	[310 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
123 (100)	[M ⁺ - 327 (C ₂₁ H ₂₇ O ₃)] ⁺
95 (24)	[123 - 28 (CO)] ⁺

6.1.8c. 17 α -4'-Clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**)



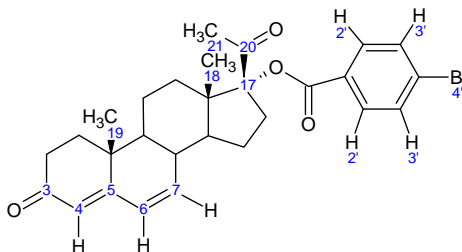
Un matraz bola de 50 mL conteniendo 2.387 g (15.252 mmol) de ácido 4-clorobenzoico y 200 mg de PTS se colocó en la estufa por 2 h (T = 60°C), finalizado el tiempo, el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético, se agitó a temperatura ambiente por 2 h; posteriormente, se agregó 1 g (3.049 mmol) de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**7**), se continuó la agitación por 20 h. Finalizado el tiempo de reacción se agregaron 3 mL de cloroformo y se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El crudo obtenido se purificó por CCF utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.40 g (0.858 mmol) de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**) correspondientes al 28.15% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.13. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-clorobenzoiloxi -4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	216-218
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₁ ClO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	466
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
241.54	λ_1 (Ester 4'-ClBzCOO- en C-17 α)
281.48	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3078 (W)	-C=C-H (st) aromático
3004 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2970 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2145 (S)	-C=C- (st) aromático
1717 (S)	4'-ClBz-CO-O- (st) en C-17
1677 (W)	C=O (st) en C-3
1630 (W)	C=C (st) conjugado en C-4
1421 (W)	-CH ₃ (δ si)
1364 (M)	-CH ₃ (δ)
1292 (W)	C-O (st si) de 4'-ClBz-CO-O- en C-17 α
1280 (W)	C-O (st si) de 4'-ClBz-CO-O- en C-17 α
880 (W)	-C-Cl (st) de 4'-ClBz-COO- en C-17 α
855 (W)	-C=C- (st) aromático <i>para</i> sustituido
RMN ¹H (ppm)	
0.80 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.16 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.10 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
5.73 (s, 1H)	-CH en C-4
6.15 (m, 2H)	(-CH=CH-) en C-6 y C-7
7.46 (d, 2H, J ₇ = 8.8 Hz)	H ₃ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
7.96 (d, 2H, J ₇ = 8.4)	H ₂ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α

RMN ¹³ C (ppm)	
14.5	C-18 (-CH ₃)
16.4	C-19 (-CH ₃)
26.5	C-21 (-CH ₃)
124.2	C-4 (-CH=C=)
128.5	C-6 (-CH=CH-)
129.1	C ₃ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
131.0	C ipso del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
131.0	C ₂ 's del grupo 4'-clorobenzoilo en C-17 α
139.7	C-7 (-CH=CH-)
139.8	C ₄ -Cl del grupo benzoilo en C-17 α
140.2	C-5 (-CH=C=)
165.1	-O-C=O del 4'-ClBzCOO- en C-17 α
199.0	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
201.9	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
466 (2)	M ⁺
423 (6)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
310 (8)	[M ⁺ - 156 (C ₇ H ₆ O ₂ Cl)] ⁺
267 (100)	[310 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
139 (92)	[M ⁺ - 327 (C ₂₁ H ₂₇ O ₃)] ⁺
111 (18)	[139 - 28 (CO)] ⁺

6.1.8d. 17 α -4'-Bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d)



Un matraz bola de 50 mL conteniendo 3.064 g (15.244 mmol) de ácido 4-clorobenzoico y 200 mg de PTS se colocó en la estufa por 2 h (T = 60°C); finalizado el tiempo, el matraz se enfrió a temperatura ambiente, se adicionaron 1.92 mL de anhídrido trifluoroacético y se agitó a temperatura ambiente por 2 h; posteriormente, se adicionó 1 g (3.049 mmol) de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**7**), se continuó la agitación por 24 h. Finalizado el tiempo de reacción, se agregaron 3 mL de cloroformo y se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó por 30 min, se extrajo con cloroformo (3 porciones, 5 mL c/u), se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el cloroformo a sequedad. El crudo obtenido se purificó por CCF utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1. Se obtuvieron 0.35 g (0.685 mmol) de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**) correspondientes al 22.47% del rendimiento teórico.

Tabla 6.1.14. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -4'-bromobenzoiolixi -4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**)

PROPIEDAD	VALOR
Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	196-199
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₁ BrO ₄
Peso molecular / m/z (M ⁺)	511
VALOR	ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA
UV (nm)	
243.05	λ_1 (Ester 4'-BrBzCOO- α en C-17)
281.83	λ_2 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en C-3)
IR (cm⁻¹)	
3061 (W)	-C=C-H (st) aromático
2947 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂ -
2873 (M)	C-H (st si) de -CH ₃ y -CH ₂ -
1780 (S)	-C=C- (st) aromático
1720 (S)	4'-BrBz-CO-O- (st) en C-17
1663 (M)	C=O (st) en C-3
1617 (M)	C=O (st) en C-20
1604 (M)	C=C (st) conjugado en C-4
1589 (M)	-C=C- (st) aromático
1461 (W)	-CH ₃ (δ si)
1354 (M)	-CH ₃ (δ)
1292 (M)	C-O (st si) de 4'-BrBz-CO-O- en C-17
1276 (M)	C-O (st as) de 4'-BrBz-CO-O- en C-17
853 (W)	-C=C- (st) aromático para sustituido
759 (W)	C-Br (st)
RMN ¹H (ppm)	
0.81 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.16 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.10 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
5.73 (s, 1H)	-CH en C-4
6.16 (m, 2H)	(-CH=CH-) en C-6 y C-7
7.63 (d, 2H, ³ J ₁ = 8.4 Hz, ⁴ J ₂ = 2.2 Hz)	H ₃ 's del grupo 4'-bromobenzoiol en C-17 α
7.89 (d, 2H, ³ J ₁ = 8.8 Hz, ⁴ J ₂ = 2.1 Hz)	H ₂ 's del grupo 4'-bromobenzoiol en C-17 α
RMN ¹³C (ppm)	
14.5	C-18 (-CH ₃)
16.4	C-19 (-CH ₃)
26.5	C-21 (-CH ₃)
124.2	C-4 (-CH=C=)
128.8	C-6 (-CH=CH-)
129.1	C ípso del grupo 4'-bromobenzoiol en C-17 α
131.1	C ₃ 's del grupo 4'-bromobenzoiol en C-17 α
132.1	C ₂ 's del grupo 4'-bromobenzoiol en C-17 α
139.7	C-7 (-CH=CH-)
139.8	C-Br del grupo 4'-bromobenzoiol en C-17 α
157.6	C-5 (-CH=C=)
165.9	-O-C=O del 4'-ClBzCOO- en C-17 α
197.2	C-3 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada)
213.7	C-20 (C=O)
EMIE m/z (%)	
512 (1)	M ⁺
469 (4)	[M ⁺ - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
310 (8)	[M ⁺ - 202 (C ₇ H ₆ O ₂ Br)] ⁺
267 (100)	[310 - 43 (CH ₃ CO)] ⁺
185 (70)	[M ⁺ - 327 (C ₂₁ H ₂₇ O ₃)] ⁺
157 (16)	[185 - 28 (CO)] ⁺

6.2. PARTE BIOLÓGICA

6.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- 24 Hámsteres machos de la cepa Syrian Golden con peso promedio entre 200-250 g.
- Tejido de próstata humana de cadáver conservado a -70°C proporcionado por el Dr. Avissai Alcántara del Departamento de Patología del Hospital General de México.

6.2.2. SUSTANCIAS Y EQUIPOS

- Testosterona [^3H] actividad específica 85-105 Ci/mmol suministrado por NEN Life Science Products, Inc. (Boston, MA).
- Miboleronona [^3H] actividad específica 70-87 Ci/mmol suministrado por NEN Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA).
- Ultracentrífuga marca Beckman modelo Optima L-70K.
- Centrífuga marca Beckman modelo Allegra 6R.
- Analizador de Centelleo Packard modelo Tri-Carb 2100 TR.
- Placas Cromatográficas de Sílica gel 60 GF₂₅₄ en soporte de aluminio (20x20 cm, Merck).

6.2.3. Ensayo *in vivo* : PESO DE LA PRÓSTATA

El efecto antiandrogénico de los esteroides sobre el peso de la próstata de hámsteres machos (150-200 g) castrados de la cepa Syrian Golden, se determinó en 8 grupos de 3 animales por experimento. Los animales se seleccionaron al azar y gonadectomizados 30 días antes del experimento, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22°C y en periodos de luz-oscuridad de 12 h, la comida y agua fue suministrada *ad libitum*. Diariamente por 6 días se les administró subcutáneamente (s.c.):

- Grupo control 1: 200 μL de aceite de sésamo (vehículo).
- Grupo control 2: 200 μg de Testosterona en 200 μL de aceite de sésamo.
- Grupo control 3: 200 μg de Testosterona más 200 μg de Finasterida en 200 μL de aceite de sésamo
- Grupos experimentales (4-8) 200 μg de Testosterona en 200 μL de aceite de sésamo más 400 μg de los compuestos **1-5**.

Después del tratamiento, los hámsteres se sacrificaron con CO_2 y posteriormente se realizó la disección de las próstatas para ser pesadas. Debido a la huelga en UAM hasta el momento sólo se realizó el experimento con los compuestos **1-5**; sin embargo, se está trabajando dándole continuidad en la evaluación de todos los compuestos.

Tabla 6.2.1. Efecto de los compuestos 1–5 sobre el peso de la próstata.

GRUPO	TRATAMIENTO	PESO DE LA PRÓSTATA (mg)
1	Aceite de sésamo (Vehículo)	56,3
2	T	125.33
3	T + F	75.733*
4	T + 17 α -Acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1)	79.633*
5	T + 17 α -Acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2)	78.000*
6	T + 17 α -Acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3)	69.400*
7	T + 17 α -Acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4)	61.00*
8	T + 6-Cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5)	87.167

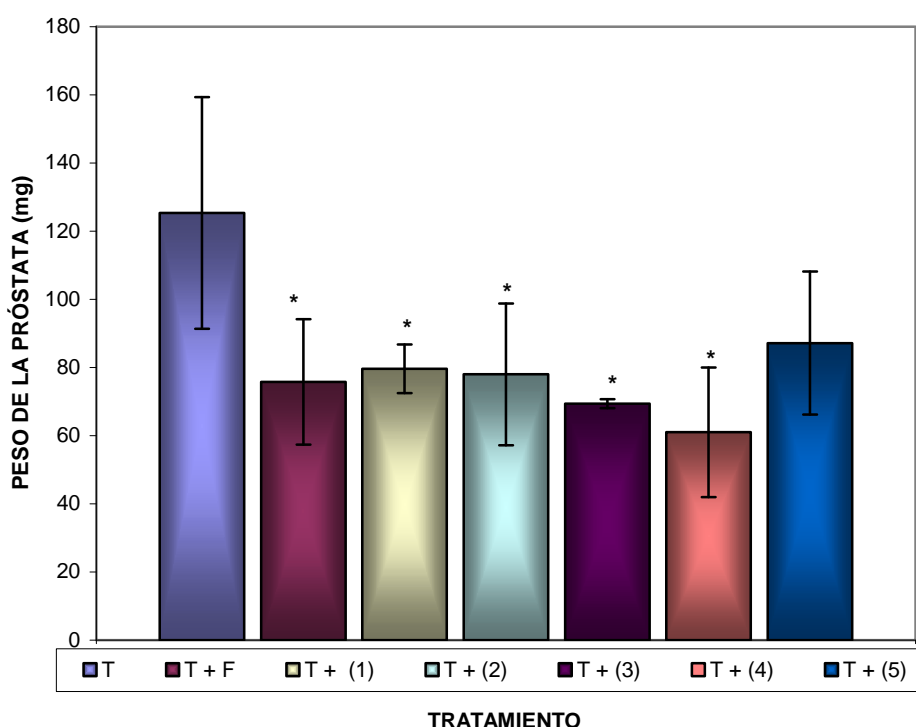


Figura 6.1. Efecto de los compuestos 1–5 sobre el peso de la próstata.

6.2.4. Ensayo *in vitro* : INHIBICIÓN DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA

6.2.4.1. EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA

La próstata de cadáver humano se cortó y homogenizó utilizando el medio A (20 mM fosfato de sodio 0.32 M sucrosa, 0.1 mM ditiotritol, pH= 6.5). El homogenizado se centrifugó a 1500 rpm durante 20 min. El pellet formado se separó y lavó con 3 volúmenes del medio A, una vez más se centrifugó a 4400 rpm durante 10 min. Finalmente el pellet se resuspendió en el medio A y se almacenó a -70°C . Se determinó

contenido de proteínas del pellet utilizando el método de Bradford⁹⁷ y albúmina sérica bovina como referencia.

6.2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50% (IC₅₀) DE LOS COMPUESTOS 1-5 EN LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA

Para cada uno de los compuestos **1-5** se preparó una serie de tubos en los cuales se utilizaron 6 series de tubos de ensaye conteniendo concentraciones crecientes (10^{-10} – 10^{-4} M) disueltos en metanol y conteniendo **T [³H]** a una concentración final de 2 nM; así mismo se incluyeron tubos controles a los que sólo se adicionó **T [³H]** a una concentración final de 2 nM. Los tubos se colocaron en baño de agua y en atmósfera de nitrógeno hasta evaporar totalmente el disolvente; enseguida se añadió 720 μ L de buffer de fosfatos (40mM), pH= 6.5, 80 μ L de fracción microsomal de próstata de cadáver humano, que contenía 360 μ g/mL de proteína. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de DTT (1mM) y 100 μ L de NADPH (2mM) con los que se dio inicio la reacción.

Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron a 37°C por una hora, finalizado el tiempo de incubación se agregó 1 mL de diclorometano para detener la reacción y se agitó nuevamente. Se extrajo la fase orgánica en la que se encontraba la **DHT [³H]** realizando 3 extracciones más y una vez reunidos los extractos, el disolvente se evaporó a baño de agua. El sólido formado se resuspendió con 0.5 mL de metanol y se aplicó gota a gota en una placa cromatográfica para separar la **DHT [³H]** formada; el procedimiento se repitió 5 veces; adicionalmente, se aplicaron los estándares de **T** y **DHT** en cada extremo de la placa. Se eluyó 3 veces en un sistema de elusión cloroformo-acetona 9:1.

Para la visualización de los estándares, las placas se observaron bajo luz UV ($\lambda = 254$ nm) y posteriormente se revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 8%. Se marcó y cortó la zona correspondiente a la **DHT [³H]** (Rf. 0.64), después, los pedazos de sílice se colocaron en viales en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold (Packard) y finalmente se leyó la radiactividad producida por la **DHT [³H]** en el analizador de centelleo. La actividad de la enzima se calculó en base a los controles que se incubaron en presencia únicamente de **T [³H]**. Cada experimento realizó por duplicado. En la Tabla 6.2.2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6.2.2. IC₅₀ de los compuestos 1–5 sobre la enzima 5α-reductasa

TRATAMIENTO	IC ₅₀ (nM)
finasterida	8.5
17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1)	10
17α-acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2)	70
17α-acetoxi-6,7α-epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3)	22
17α-acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4)	19
6-cloro-17α-hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5)	NI
17α-benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a)	NI
6-cloro-17α-4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b)	NI
6-cloro-17α-4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c)	NI
17α-4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6d)	NI

NI= No presentó inhibición.

6.2.5. Ensayo *in vitro* : AFINIDAD POR EL RECEPTOR ANDROGÉNICO

6.2.5.1. CURVA DE SATURACIÓN DE LOS SITIOS DEL RECEPTOR

Con la finalidad de conocer la unión máxima de mibolerona-³H al receptor androgénico, se realizó el siguiente ensayo: Se prepararon cuatro series de tubos denominados como CT (de cuentas totales), CD (de carbon-dextrán), UT (de unión total) que contenía cantidades crecientes de mibolerona-³H (0.25, 0.5, 0.75, 1 nM) disueltas en metanol y la última serie de UNE (de unión no específica) que contenía cantidades crecientes de mibolerona-³H (0.25, 0.5, 0.75, 1 nM) disueltas en metanol más 100 veces la concentración de mibolerona no radiactiva. Los tubos se colocaron en baño de agua hasta evaporar el disolvente. A los tubos de la serie CT y CD se les adicionaron volúmenes de 1 mL y 0.5 mL respectivamente de buffer TEMD pH= 8 (Tris HCl 40 mM, EDTA 3 mM, molibdato de sodio 20 mM, glicerol al 10% con ditiotreitól DTT 1 mM); a los tubos UT y UNE se les adicionaron 300 µL del mismo buffer más 200 µL de citosol de próstata de rata conteniendo 4.14 µg de proteína. Se incubaron por 18 h a 4 °C. Al término de la incubación, a los tubos UT y UNE se les adicionaron 0.27 mL de una solución saturada de sulfato de amonio (concentración final de 35%) y se incubaron a 4 °C. Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 3700 rpm durante 1.5 h. El precipitado formado se separó y resuspendió en 0.5 mL de una solución de TEMD pH= 8 y se agitó vigorosamente. A la suspensión anterior se le agregó 0.5 mL de carbón dextrán en agitación continua y se incubaron a 4°C por 40 min y posteriormente se centrifugaron a 3700 rpm por 5 min. De cada tubo se tomaron 200 µL de sobrenadante y se colocaron en un vial en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold para finalmente leer la radiactividad producida por el complejo mibolerona-receptor con el analizador de centelleo. En el caso de los tubos CT y CD se tomó una alícuota de 200 µL y se realizó el mismo procedimiento. La Figura 6.2 muestra los resultados.

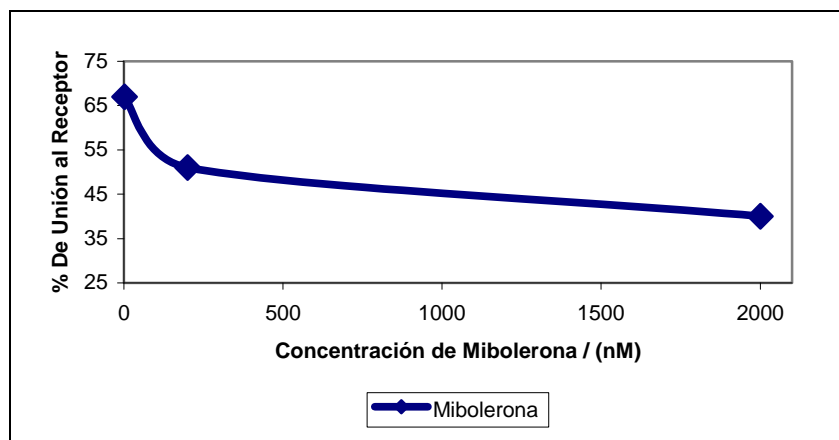


Figura 6.2. Gráfica del ensayo de unión de mibolerona al receptor androgénico.

6.2.5.2. ANÁLISIS POR COMPETENCIA POR EL RECEPTOR

Una vez conocida la cantidad de Mibolerona- $[^3\text{H}]$ necesaria para unirse al total de receptores, se preparó una serie de tubos que contenían 1.5 nM de mibolerona- $[^3\text{H}]$ más cantidades crecientes de mibolerona no radiactiva (10^{-9} - 10^{-7}) o los compuestos a evaluar. A estos tubos se le agregó 300 μL de solución amortiguadora TEMD más 200 μL de citosol. Los tubos se incubaron por 18 h a 4 °C. Al término de la incubación se les adicionó 0.27 mL de una solución saturada de sulfato de amonio (concentración final 35%) y se incubaron a 4°C. Se centrifugaron a 3700 rpm durante 1.5 h, el pellet formado se separó y se resuspendió en 0.5 mL de una solución de TEMD pH= 8 y se agitó vigorosamente, posteriormente se agregó 0.5 mL de carbón-dextrán, los tubos se agitaron e incubaron a 4 °C por 40 min. y posteriormente se centrifugaron a 3700 rpm por 5 min. De cada tubo se tomaron 200 μL de sobrenadante y se colocaron en un vial en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold para finalmente leer la radiactividad producida por el complejo Mibolerona- $[^3\text{H}]$ -receptor en el analizador de centelleo. La Tabla 6.2.3 muestra los resultados.

Tabla 6.2.3. Ensayo de afinidad por el receptor androgénico

COMPUESTO	% AFINIDAD DE UNIÓN RELATIVA
(1)	NA
(2)	NA
(3)	NA
(4)	NA
(5)	NA
(6a)	NA
(6b)	NA
(6c)	NA
(6d)	NA
(7)	NA
(8a)	NA
(8b)	NA
(8c)	NA
(8d)	NA

NA= No presentó afinidad

6.2.6. Ensayo *in vitro* : CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS HUMANAS DE LOS COMPUESTOS 6a-6d Y 8a-8d

Se utilizaron 6 líneas celulares cancerosas humanas (Glía del sistema nervioso central, próstata, leucemia, colon, mama y pulmón) que fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI). Dichas células se cultivaron en el medio RPMI-1640, enriquecido con 10% suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100 UI/mL Penicilina G, 100 µg/mL sulfato de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales; se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Posteriormente se tomó 100 µL de la línea celular correspondiente, el contenido de células por pozo varía entre 5000 a 40 000 dependiendo la línea celular; se incubó por 24 h. Se preparó una solución stock en dimetilsulfoxido (DMSO) de cada compuestos a evaluar, dicha solución se adicionó a cada pozo de las líneas celulares en 100 µL de medio de cultivo, la concentración final de cada compuesto fue de 50 µM; se incubó por 48 horas (Plato experimental). Adicionalmente se preparó otro pozo el cuál se adicionó únicamente medio de cultivo, este último se incubó por 1 hora (Plato basal); ambas incubaciones se llevaron a cabo a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ y 100% de humedad relativa. Finalizado el tiempo correspondiente se realizó la fijación de los cultivos celulares *in situ* por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) frío, se incubó por 60 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se hicieron 5 lavados con agua desionizada y se dejó secar por 24 h. Posteriormente se realizó el teñido adicionando 100 µL de sulforodamina B (SRB) (0.4 % p/v en 1% ácido acético) a cada pozo, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron lavados con una solución de ácido acético al 1% y se dejó secar por 24 h. Las células fijadas se resuspendieron utilizando 10 mM de buffer Tris, pH=10 en agitación por 5 min. Finalmente, se determinó la densidad óptica a 515 nm utilizando un lector de ELISA. Los resultados del screening primario se muestran en la Tabla 6.2.4.

Tabla 6.2.4. Screening primario de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas por los compuestos 6a-6d y 8a-8d

COMPUESTO (50 µM en DMSO)	% DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR LA LÍNEA CELULAR					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
6a	57.11	62.55	71.77	46.89	48.80	60.72
6b	63.36	48.08	45.83	36.92	45.20	42.05
6c	62.72	47.75	34.96	45.11	38.12	58.74
6d	85.73	64.31	46.63	43.99	43.32	58.74
8a	81.49	42.49	59.61	50.82	26.80	61.02
8b	53.06	30.92	22.40	35.59	29.16	36.12
8c	26.72	46.09	66.20	39.32	39.76	41.38
8d	72.67	84.71	69.57	53.87	44.44	65.89

U251= Glía del sistema nervioso central, PC-3= Próstata, K562= Leucemia, HCT-15= Colon, MCF-7= Mama, SKLU-1= Pulmón.

A los compuestos que tuvieron un porcentaje de inhibición mayor al 70% se les determinó la IC₅₀ de inhibición, el procedimiento fue el mismo que el anteriormente explicado, solo que en lugar de probar el compuesto a una sola concentración se prepararon series de disoluciones a distintas concentraciones. Los resultados se muestran en la Tabla 6.2.5.

Tabla 6.2.5. Determinación del IC₅₀ de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas por los compuestos **6d**, **8a**, **8d**

COMPUESTO	IC ₅₀ / (μM) DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR LA LÍNEA CELULAR	
	U251	PC-3
6d	ND	ND
8a	20.48 ± 0.6	ND
8d	20.09 ± 0.4	13.65 ± 1.2

U251= Glía del sistema nervioso central, PC-3= Próstata, ND= No determinada.

CAPÍTULO 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1. PARTE QUÍMICA

En la ruta de síntesis planteada en este trabajo (Figura 5.1, página 23) se utilizó como materia prima 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (**1**) debido a que es un compuesto disponible comercialmente y a que presenta la estructura necesaria para poder ser transformado a los compuestos de interés. Como paso previo a la síntesis se caracterizó la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas, correlacionando con las reportadas en la literatura. En la espectrofotometría de ultravioleta (Figura 10.2, página 92–Espectroscopia) presentó una λ máxima de 239.54 correspondiente a la cetona α,β insaturada en (4-en-3-ona), muy cercano al valor de 245 (215+30) calculado utilizando las reglas de Woodward.

En la espectroscopia de IR (Figura 10.1, página 92-Espectroscopia) se presentaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos alrededor de 2952 cm^{-1} y las correspondientes a los carbonilos en 1733 cm^{-1} , 1718 cm^{-1} y 1657 cm^{-1} indicativos del grupo acetoxi en C-17 α y de las cetonas en C-20 y C-3 respectivamente.

En lo referente a la RMN ^1H (Figura 10.4, página 94-Espectroscopia) se observaron cuatro señales simples en 0.68, 1.19, 2.05 y 2.12 ppm que integraron para 3 protones cada una, dichas señales se asignaron a los metilos C-18, C-19, -CH₃ en el CH₃COO- y C-21. Estas asignaciones se rectificaron al analizar los espectros HSQC y HMBC para el compuesto **5**. En estos espectros se aprecian los acoplamientos C-H a 1 enlace y a 3 enlaces; el metilo en C-18 se encuentra a campo alto debido a que se encuentra dentro del cono de protección generado por el carbonilo en C-20; por otra parte el metilo en C-21 y el metilo del grupo acetoxi en C-17 α se encuentran a campo bajo debido a que se encuentran fuera de la zona de protección de sus carbonilos correspondientes. La señal simple que se observa a 5.75 ppm que integra para un protón se asignó al hidrógeno en C-4, el cual, al ser vinílico y alfa a un grupo carbonilo, tiene un desplazamiento químico a campo bajo.

En la RMN ^{13}C y DEPT (Figuras 10.5 y 10.6, página 84-Espectroscopia) se realizaron las asignaciones para los metilos en C-18, C-19, -CH₃ en el CH₃COO- y C-21 a 14.6, 17.4, 21.2 y 26.3 ppm y con base a lo reportado en tablas se confirman los desplazamientos asignados; en lo referente al CH de C-4 se asignó a 123.9 ppm que concuerda lo reportado en la literatura⁸³ a 124 ppm. Por otra parte, a 170.6 ppm se asignó al carbono del grupo acetoxi en C-17 α , los carbonilos correspondientes a las posiciones C-3 y C-20 se asignaron a 199.3 y 203.9 ppm. El carbonilo en C-3 se asignó a un campo alto ligeramente mayor debido a que es una cetona α,β -insaturada.

Por último, en el espectro de masas adquirido por impacto electrónico (EMIE) (Figura 10.3, página 93- Espectroscopia) se observa el ión molecular de m/z 372 correspondiente al esperado. Se aprecia la pérdida de una cetena ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$, -42 unidades) por la formación del ión en m/z 330. Así mismo, a partir de este pico se derivan los fragmentos de m/z 287 y m/z 312 por la pérdida de agua (-18 unidades) y $\text{CH}_3\text{CO}^\cdot$ (-43 unidades) respectivamente. El pico base puede obtener de la pérdida de $\text{CH}_3\text{CO}^\cdot$ (-43 unidades) del ión de m/z 312 o a partir del ión molecular por la pérdida de ácido acético (60 unidades). A continuación se presenta el diagrama de fragmentación en donde se visualizan las fragmentaciones lógicas; así como sus los mecanismos (Figuras 7.1.1 – 7.1.3).

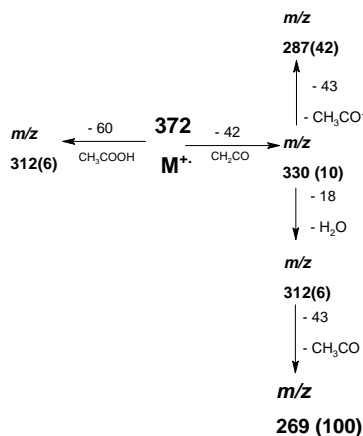


Figura 7.1.1. Diagrama de fragmentación del compuesto 1 observado en EMIE.

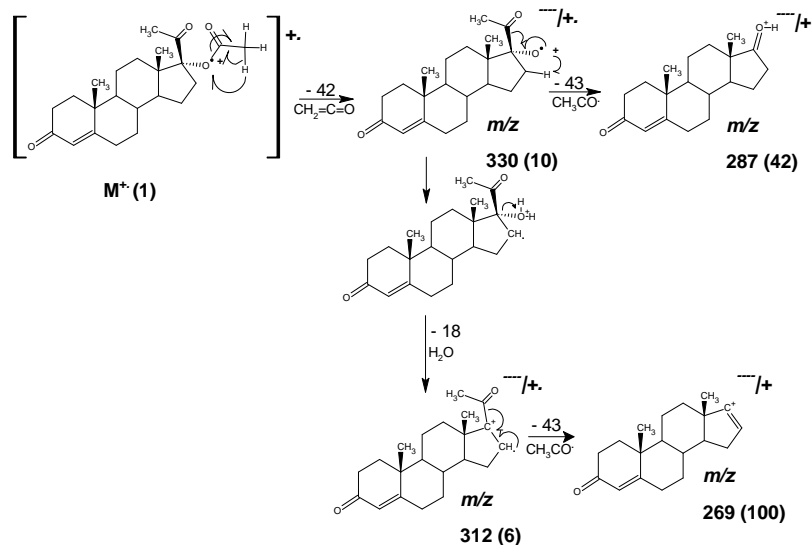


Figura 7.1.2. Mecanismos de fragmentación del compuesto 1 para explicar los picos m/z 330, m/z 312, m/z 287 y m/z 269.

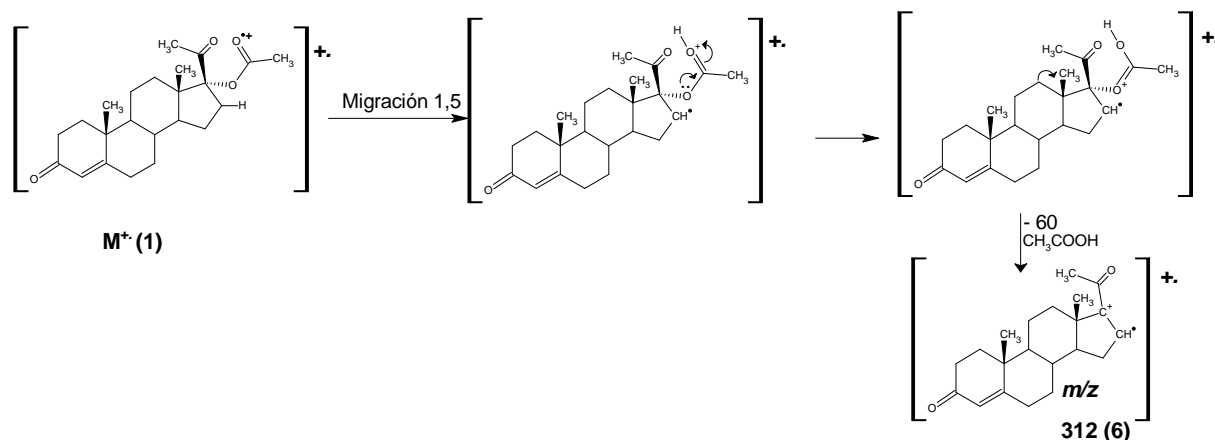


Figura 7.1.3. Mecanismo de fragmentación del compuesto **1** para la obtención del pico m/z 312.

Debido a que uno de los objetivos de la secuencia sintética planteada era la introducción de un átomo de cloro en C-6, fue necesario la funcionalización de dicha posición a través de la formación de un doble enlace entre los carbonos C-6 y C-7 para obtener el 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**2**). Dicha reacción de deshidrogenación se llevó a cabo utilizando **1** y cloranilo. De acuerdo con lo reportado por E.J. Agnello^{84,85} se propone el siguiente mecanismo de reacción:

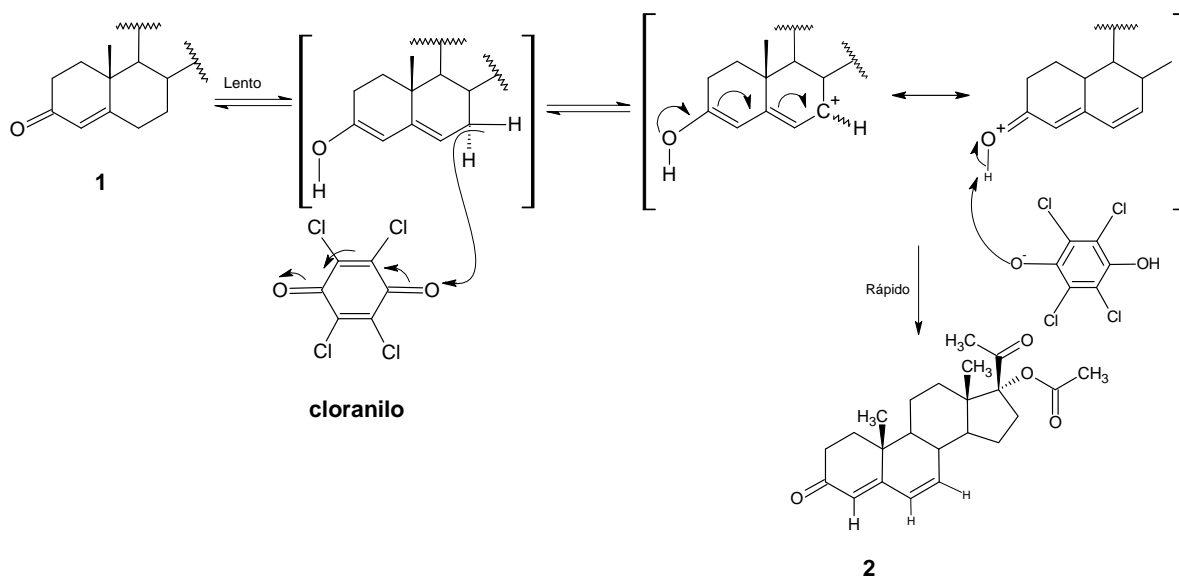


Figura 7.1.4. Mecanismo de reacción de la deshidrogenación para la formación del compuesto **2**.

El compuesto deseado se obtuvo con un 70.38% de rendimiento y se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En la espectrofotometría de UV (Figura 11.2, Página 95-Espectroscopia) se observa un incremento en la λ máxima de absorción, cambiando de 239.54 nm a 282.42 (teórica 287 nm); lo cual indica que la doble ligadura formada se llevo acabo en los carbonos C-6 y C-7 con lo cuál se extendió la conjugación y por consiguiente aumentó la λ de máxima absorción.

En el espectro de IR (Figura 11.1, Página 95-Espectroscopia) para este compuesto se observa a una banda de intensidad media a 1620 cm^{-1} correspondiente a las dobles ligaduras conjugadas entre los carbonos C-4, C-5, C-6 y C-7; a 1733 cm^{-1} una banda intensa correspondiente al ester acético en C-17 α , a 1718 cm^{-1} y 1652 cm^{-1} correspondientes a las cetonas en C-20 y C-3.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 11.4, Página 96-Espectroscopia) se observa una señal doble de doble a 6.12 ppm, la cual integra para un protón en C-6. Dicha señal presenta dos constantes de acoplamiento: la primera, $^3J_1 = 10\text{ Hz}$ correspondiente al acoplamiento con el protón en C-7, la magnitud de esta constante de acoplamiento corresponde a una disposición cisoide; la segunda, $^4J_2 = 1.2\text{ Hz}$ presenta un acoplamiento con el protón en C-8. Por otra parte, a 6.16 ppm se observa otra señal doble de doble que integra para un protón, dicha señal se asignó al protón en C-7, debido a que esta posición se encontraría más desprotegida y en consecuencia a campo bajo debido al carácter electropositivo del carbono C-7 inducido por la resonancia que ejerce el carbonilo en el sistema 4,6-dien-3-ona. (Figura 7.1.5), así mismo, esta señal presenta dos acoplamientos: el primero, es con el protón en la posición C-6 cuya constante de acoplamiento es de $^3J_1 = 9.6\text{ Hz}$ cuya magnitud es característica de una disposición cisoide, el segundo, es con el protón en la posición C-8, la magnitud de la constante de acoplamiento es de $^3J_2 = 2\text{ Hz}$.

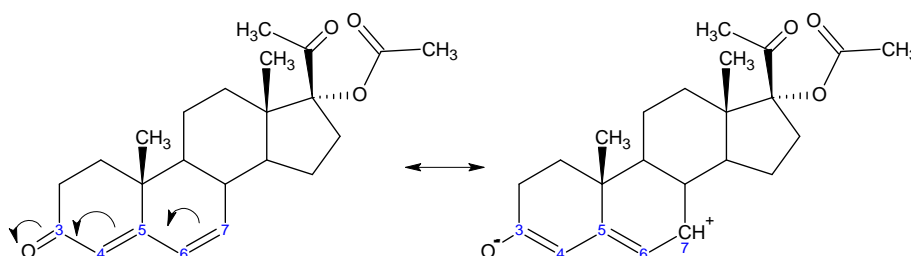


Figura 7.1.5. Estructuras resonantes del compuesto 2.

En el espectro de RMN ^{13}C aparecen las señales correspondientes a los carbonos C-7 y C-6 a 140.0 ppm y 128.3 ppm, mismas que al observar el espectro DEPT (Figuras 11.5 y 11.6, página 97-Espectroscopia), tanto por su desplazamiento químico como por presentar un solo átomo de hidrógeno unido, se confirma la extensión de la conjugación por medio de esta reacción de deshidrogenación. Nuevamente se observa el efecto resonante del sistema 4,6-dien-3-ona, debido a que la señal correspondiente al carbono C-7 se encuentra a campo bajo.

Por último, en el EMIE (Figura 11.3, Página 96-Espectroscopia) se confirma la estructura propuesta del compuesto deseado, ya que se obtuvo un ión molecular en 370 unidades m/z . Se aprecia la pérdida de 42 unidades m/z para la formación del ión de m/z 328, del cual se derivan los fragmentos de m/z 285 y m/z 310, de este último, por la pérdida de 43 unidades m/z , se forma el pico base del espectro de 267 unidades m/z . En las Figuras 7.1.6- 7.1.7 se muestra el diagrama de fragmentación del compuesto 2; así como los mecanismos de fragmentación propuestos.

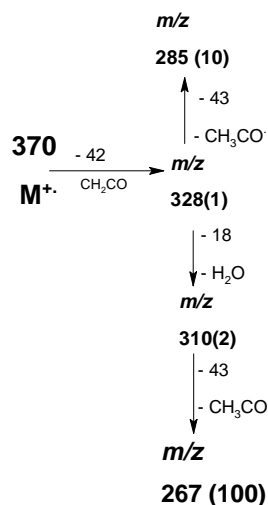


Figura 7.1.6. Diagrama de fragmentación del compuesto 2.

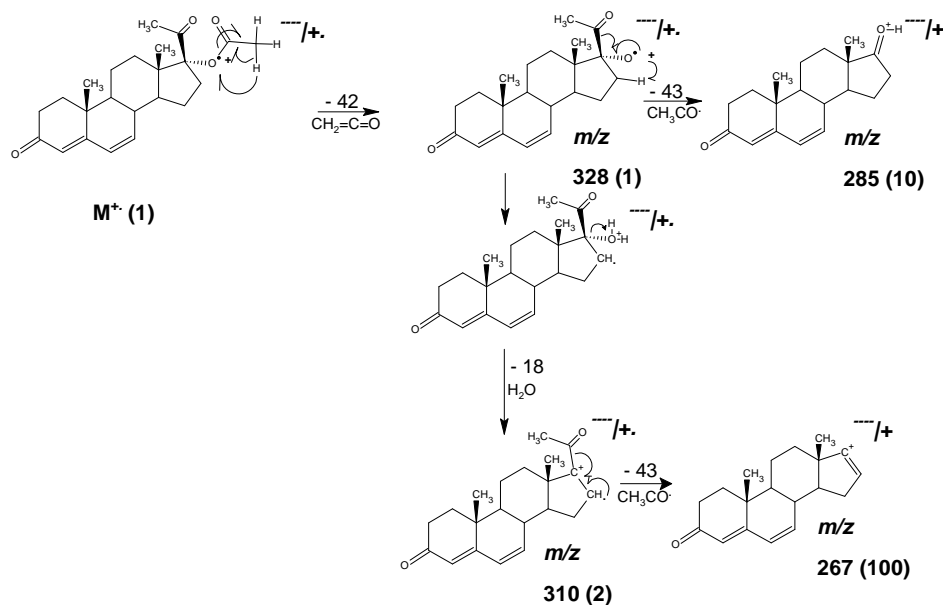


Figura 7.1.7. Mecanismos de fragmentación del compuesto 2 para explicar la formación de los picos m/z 328, m/z 310, m/z 285 y m/z 267.

También se logró obtener el espectro de difracción de rayos X (Figura 11.7, página 98-Espectroscopia) en el cuál se confirma la formación del doble enlace entre los carbonos C-6 y C-7 debido a que estos carbonos sólo presentan unidos un solo átomo de hidrógeno cada uno.

Una vez realizada la deshidrogenación entre los carbonos C-6 y C-7, para introducir un átomo de cloro en C-6 fue necesario hacer electrofílico al carbono C-6. Para ello se propuso la formación de un epóxido entre los carbonos C-6 y C-7. En la literatura se describe el uso de perácidos para la epoxidación de dobles ligaduras, se eligió la reacción con ácido *m*-cloroperbenzoico^{13,32} ya que permite formar el epóxido de forma

estereoselectiva entre los carbonos C-6 y C-7. A continuación se presenta el mecanismo de reacción propuesto:

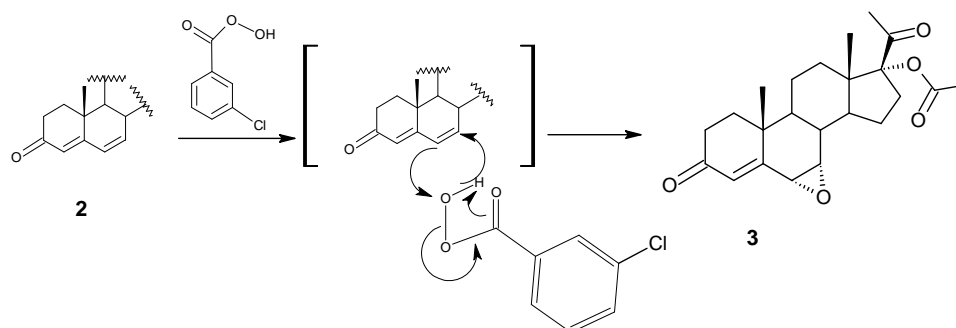


Figura 7.1.8. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 3.

La especie electrofílica se adicionó *syn* a la doble ligadura entre los carbonos C-6 y C-7; la orientación del époxido fue alfa (ver difracción de rayos X) debido al impedimento estérico del metilo angular en C-19; sin embargo, se reporta un rendimiento del époxido beta orientado en un 5%.⁶⁷ Otro procedimiento reportado para formar époxidos es con peróxido de hidrógeno en medio básico, pero debido a que se forma el ión hidroperóxido [OOH]⁻ que es de naturaleza nucleofílica, podría introducirse por una adición tipo Michael en el carbono C-5 o C-7, por lo que el resultado sería una mezcla de productos que disminuirían el rendimiento de la reacción.

El rendimiento de la reacción fue del 43.13%. El compuesto 3 se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de U.V. (Figura 12.2, Página 99-Espectroscopia) se observa una disminución en la λ máxima de absorción de 282.42 nm a 238.82 nm correspondiente a la cetona α,β insaturada entre los carbonos C-3 y C-4; por lo cuál se confirma que la formación del époxido se llevó a cabo en la doble ligadura entre los carbonos C-6 y C-7.

En el espectro de IR (Figura 12.1, Página 99-Espectroscopia) se observa la desaparición de la banda a 1624 cm^{-1} que indicaba la presencia del dieno conjugado. También se aprecian las bandas correspondientes al éster a 1726 cm^{-1} y a las cetonas en C-20 y C-3 a 1716 cm^{-1} y 1678 cm^{-1} , respectivamente. En general, no se observan cambios significativos en el espectro.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 12.4, Página 100-Espectroscopia) en la zona correspondiente a los protones vinílicos se observa una señal simple a 6.15 ppm que integra para un hidrógeno y que corresponde al hidrógeno en C-4, por lo cuál se corrobora que la formación del époxido fue en C-6 y C-7. Por otra parte aparecen dos señales a 3.38 ppm y 3.51 ppm que integran para un protón cada una; la primera señal se asignó al protón en C-6 debido a que la señal observada es doble y la segunda señal se asignó al protón al protón en C-7 debido a que señal observada es doble de doble. Ambas señales se encuentran acopladas

entre sí a través de una $^3J = 4$ Hz, que es característica de un acoplamiento vecinal de dos protones *cis* base de un anillo oxirano,⁸⁸ así mismo la segunda señal presenta un acoplamiento alílico con el protón el C-8.

En la espectroscopía de RMN ^{13}C y DEPT (Figuras 12.5 y 12.6, página 101-Espectroscopia) en la zona de los carbonos vinílicos se observan las señales correspondientes a C-4 en 131.3 ppm y C-5 en 161.9 ppm, por otra parte aparecen dos señales a 35.5 ppm y 40.3 ppm que en el espectro DEPT se observan como metinos y fueron asignadas a los carbonos base del épxido en C-6 y C-7 respectivamente. El resto del espectro permanece sin cambios significativos.

En el EMIE (Figura 12.3, página 100-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 386 unidades de m/z que corresponde al peso molecular esperado. Se aprecia la pérdida de 42 unidades m/z para la formación del pico de 344 m/z , del cuál se derivan los fragmentos de m/z 326 y m/z 283, siendo este último el pico base del espectro; así mismo, a partir del ión molecular se derivan los iones de m/z 343 y m/z 326 por la pérdida de 43 y 60 unidades m/z respectivamente. En las Figuras 7.1.9 - 7.1.12 se muestra el diagrama de fragmentación del compuesto **3**; así como los mecanismos de fragmentación propuestos.

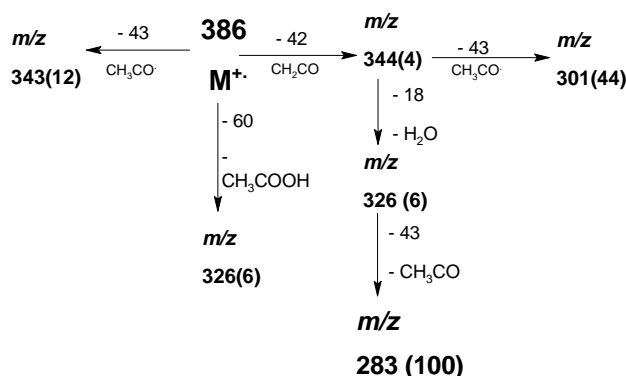


Figura 7.1.9. Diagrama de fragmentación del compuesto **3**.

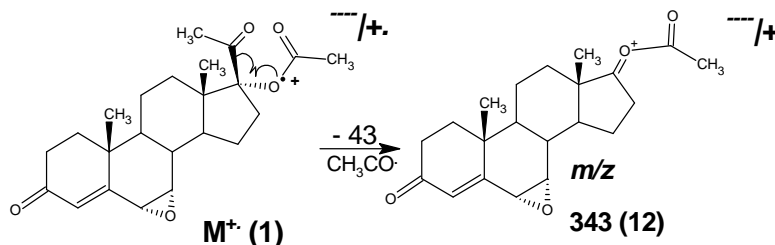


Figura 7.1.10. Mecanismo de fragmentación del compuesto **3** para explicar el pico m/z 343.

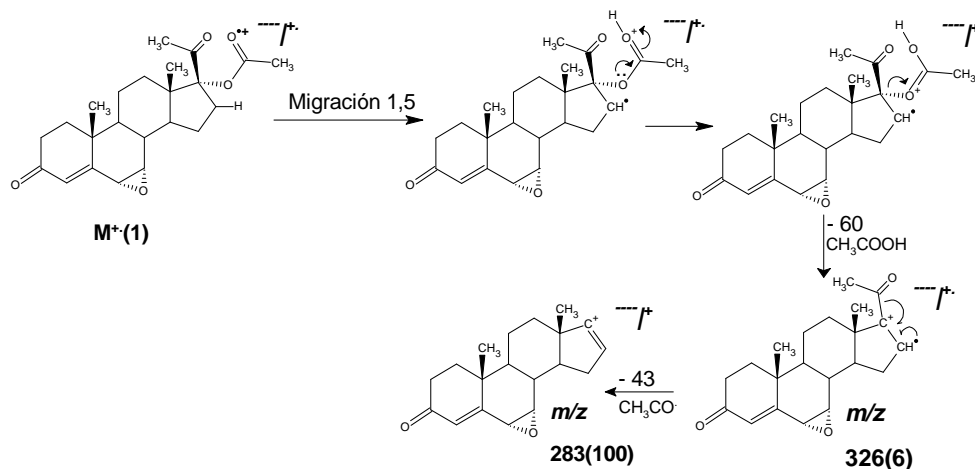


Figura 7.1.11. Mecanismo de fragmentación del compuesto 3 para explicar los picos m/z 326, m/z 283

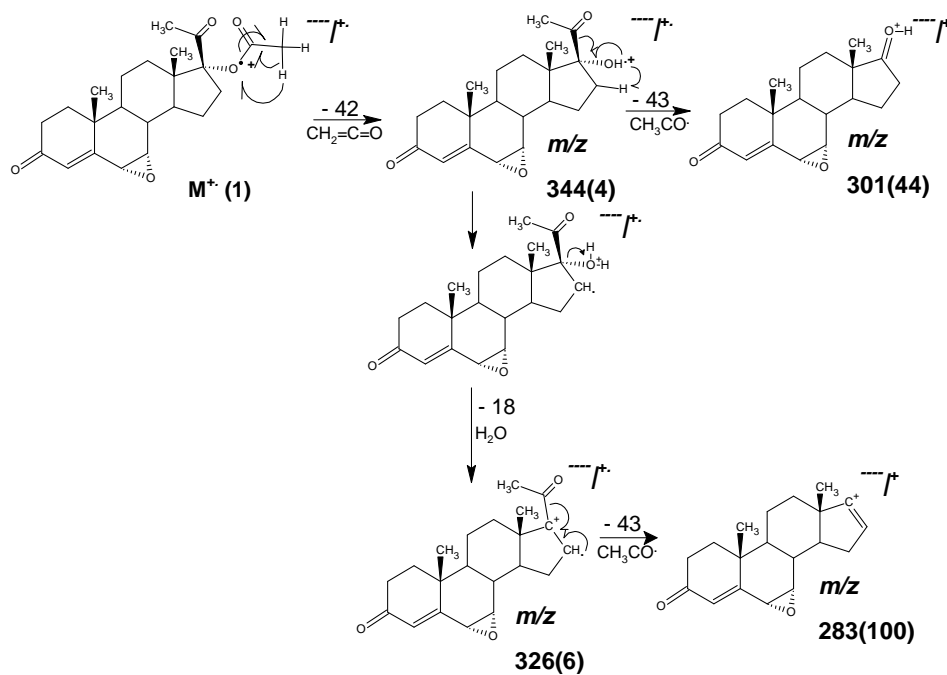


Figura 7.1.12. Mecanismo de fragmentación del compuesto 3 para explicar los picos m/z 344, m/z 326, m/z 301 y m/z 283.

En adición, en el espectro de difracción de rayos X (Figuras 12.7, página 102-Espectroscopia) se observa que la formación del éxido se llevo estereoespecíficamente entre los carbonos C-6 y C-7 y presenta una orientación alfa.

El siguiente paso de la secuencia sintética fue la inserción del átomo de cloro en el carbono C-6.⁸⁶⁻⁹⁰ Se utilizó una mezcla de ácido clorhídrico en anhídrido acético; el mecanismo de reacción propuesto implica en un inicio la formación de una halohídrida, que con su posterior acetilación se convierte en un buen grupo

saliente consiguiendo la obtención del compuesto **4**. A continuación se esquematiza el mecanismo de reacción propuesto:

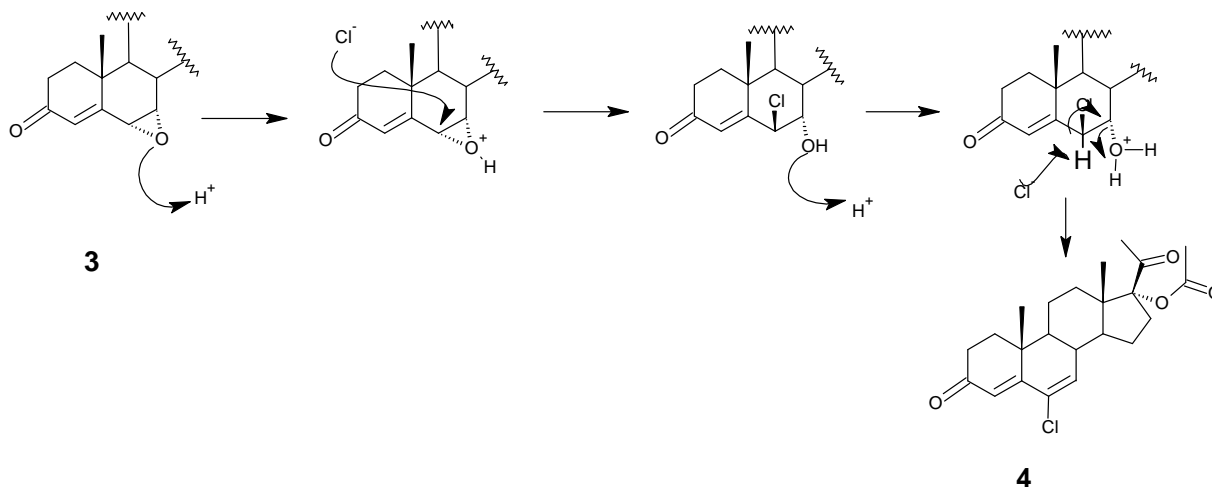


Figura 7.1.13. Mecanismo de reacción para el compuesto **4**.

El rendimiento de la reacción fue de 85.99%. El compuesto **4** se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 13.2, página 103-Espectroscopia) se confirma la regeneración del cromóforo 4,6-dien-3-ona, por la λ máxima de 283.21 nm (teórica 287 nm).

En el espectro de IR (Figura 13.1, página 103-Espectroscopia) se observan las bandas correspondientes al dieno conjugado a 1605 cm^{-1} y la señal correspondiente a la vibración de valencia C-Cl a 880 cm^{-1} del carbono en C-6.

En el espectro de RMN 1H (Figura 13.4, página 104-Espectroscopia) se observan dos señales a 6.32 ppm y 6.33 ppm que integran para un protón cada una que corresponden a los protones de los carbonos C-4 y C-7, ambos de naturaleza vinílica, para el caso de este último se observa el acoplamiento con el protón alílico en C-8 con una $^3J = 2.4\text{ Hz}$.

En el caso del espectro de RMN ^{13}C y DEPT (Figuras 13.5 y 13.6, Página 105-Espectroscopia) se observan las señales en la zona de carbonos vinílicos en 123.8 ppm y 137.9 ppm que corresponden a los carbonos C-4 y C-7 respectivamente, dichas señales en el espectro DEPT se observan como metinos; así mismo se observa una señal a 130.3 ppm que fue asignada al carbono en C-6 en el cual se adicionó el átomo de cloro.

En el EMIE (Figura 13.3, página 104-Espectroscopia) se observa el ión molecular de 404 en unidades de m/z que corresponde al peso esperado; se observa la contribución isotópica del 30% al $M+2$ en 406 m/z y en algunos otros fragmentos con lo cuál se corrobora la presencia de un átomo de cloro en la molécula. A partir del ión molecular se observa la pérdida de 60 unidades m/z para formar el ión de 344; que con la

subsiguiente pérdida de 43 unidades m/z se llega al pico base del espectro en 301 unidades m/z . Por otro lado, nuevamente a partir del ión molecular, se observa la pérdida de 42 unidades m/z para formar el fragmento de 362 unidades m/z , a partir de este pico se generan los iones de 344 unidades m/z y 319 unidades m/z por la pérdida de una molécula de agua y una molécula de $\text{CH}_3\text{CO}^\cdot$ respectivamente, esto se resume en el diagrama de fragmentación del compuesto **4** y los mecanismos de fragmentación propuestos (Figuras 7.1.14 – 7.1.16).

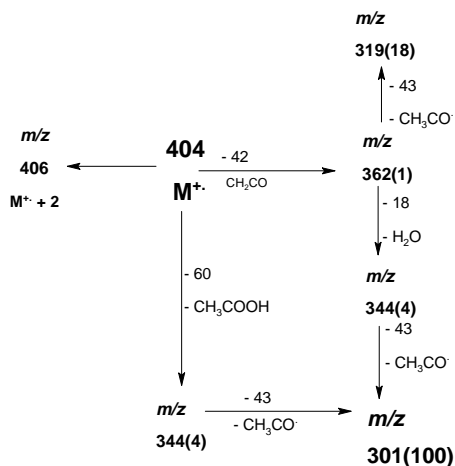


Figura 7.1.14. Diagrama de fragmentación del compuesto **4**.

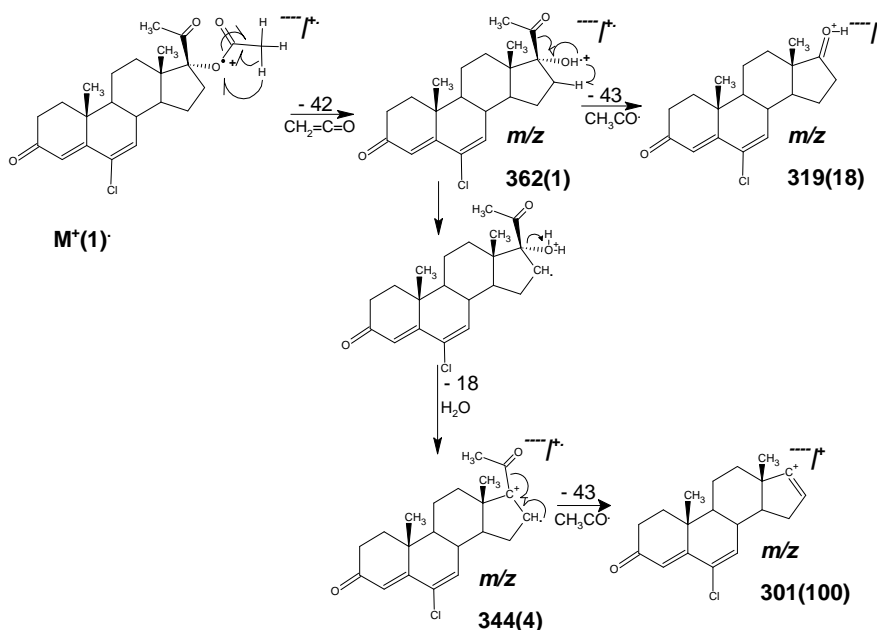


Figura 7.1.15. Mecanismo de fragmentación del compuesto **4** para explicar los picos m/z 344, m/z 301.

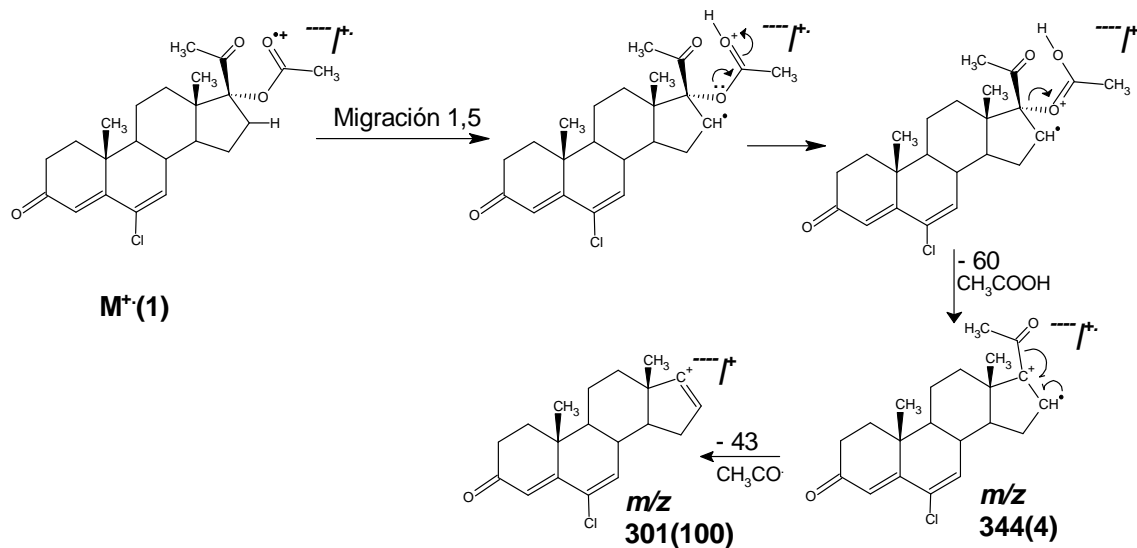


Figura 7.1.16. Mecanismo de fragmentación del compuesto 4 para explicar los picos m/z 344, m/z 301.

El penúltimo paso para obtener la primera parte de productos finales, fue necesario desproteger el alcohol⁷¹ en C-17 α , por medio de una reacción de hidrólisis básica, a continuación se presenta el mecanismo de reacción:

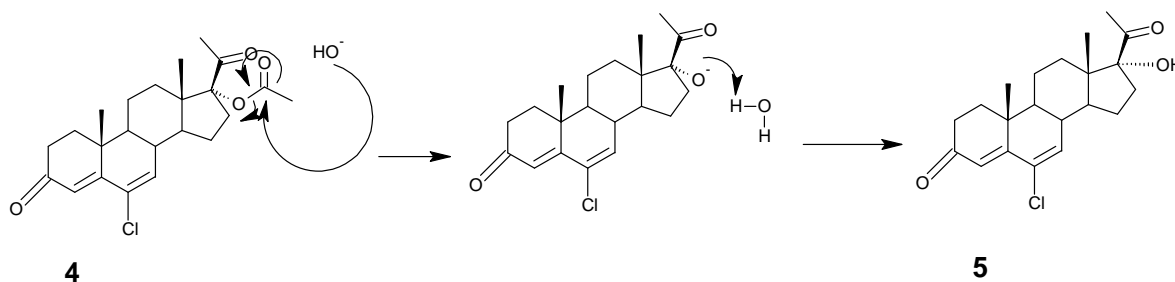


Figura 7.1.17. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 5.

El compuesto 5 se obtuvo con un rendimiento del 56.92%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 14.2, Página 106-Espectroscopia) no hubo cambios en la λ máxima de absorción debido a que en esta reacción no se hicieron cambios en el sistema 4,6-dien-3-ona.

En el caso de la espectroscopia de IR (Espectro 14.1, página 106-Espectroscopia) a 3467 cm^{-1} y 1160 cm^{-1} se observa las bandas correspondientes al estiramiento O-H confirmando así la presencia de un alcohol terciario en C-17. Las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos se observan en 2951 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} respectivamente así como sus correspondientes bandas de deformación a 1458 cm^{-1} y 1352 cm^{-1} ; en lo referente a las insaturaciones conjugadas se observa su banda a 1600 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=C y a 1704 cm^{-1} y a 1646 cm^{-1} se observan las bandas correspondiente a la cetonas en C-20 y C-3 respectivamente.

En el espectro de RMN ^1H (Figuras 14.4 y 14.5, Página 108-Espectroscopía) se observan tres señales a 0.79 ppm, 1.15 ppm y 2.29 ppm que integran para tres protones cada una y se asignaron a los metilos en C-18, C-19 y C-21, dicha asignación se confirma al analizar los espectros de HSQC y HMBC (Figura 14.8, Página 109, Figura 14.9, Página 110-Espectroscopia) en donde el metilo en C-19 correlaciona con el carbono C-5 que tiene un desplazamiento a 158.8 ppm, éste a su vez tiene correlación con los hidrógenos de los carbonos C-4 y C-7; mientras que el metilo en C-21 correlaciona con el carbono de cetona en C-20 en 210.7 ppm. Por otra parte se observa a 4.77 ppm una señal simple que intercambió con D_2O , la cual se asignó al protón del alcohol en C-17 α .

En el espectro de RMN ^{13}C y DEPT (Figura 14.6, Página 108, Figura 14.7, Página 109-Espectroscopía) se observa la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo del grupo acetoxi en C-17 α , el resto del espectro permanece sin cambios. En lo referente al análisis de los espectros HSQC y HMBC se observa la correlación entre el carbonilo en C-20 (210.7 ppm) con los protones del metilo en C-21 (2.29 ppm), para este mismos protones se observa la correlación existente con el carbono en C-17 (89.4 ppm). En el caso de los protones del metilo en C-18 (0.79 ppm) se observan las correlaciones existentes entre los carbonos en C-17 (89.4 ppm) y con el carbono cuaternario en C-13 (48.9 ppm) y con el carbono del metileno en C-12 (30.2 ppm). Para los protones del metilo en C-19 se observan las correlaciones existentes entre el carbono terciario en C-9 (49.9 ppm), con el carbono cuaternario en C-10 (37.9 ppm) y con el carbono secundario de C-1 (34.3 ppm). En lo referente al carbono vinílico en C-5 se observan las correlaciones entre los hidrógenos de los carbonos C-4 (6.32 ppm) y C-7 (6.33 ppm) y con los protones del metilo en C-19 (1.15 ppm).

En EMIE (Figura 14.3, página 107-Espectroscopía) se observa el ión molecular de 362 en unidades de m/z que corresponde al peso esperado; así como la contribución isotópica del 30% al $M+2$ en 364 m/z y en algunos otros fragmentos con lo cuál se corrobora la presencia de un átomo de cloro en la molécula. En el diagrama de fragmentación (Figura 7.1.18) se aprecian las pérdidas lógicas con las que se deduce la estructura del compuesto **5**. El fragmento diagnóstico para este compuesto es la pérdida de 18 unidades m/z correspondiente a la pérdida de agua que es característica de los alcoholes. En las Figuras 7.1.19 – 7.1.21 se muestran los mecanismos de fragmentación.

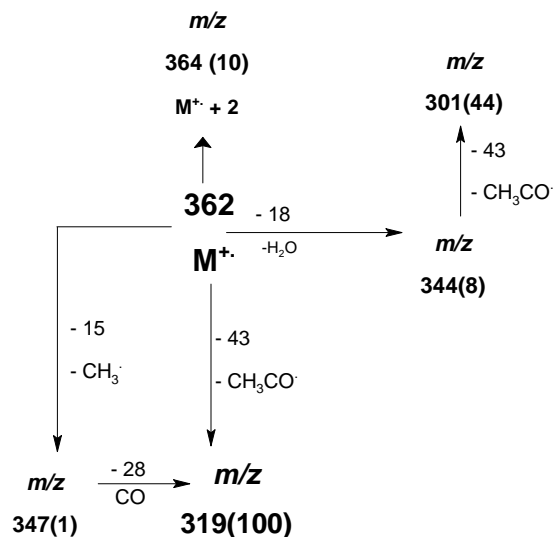
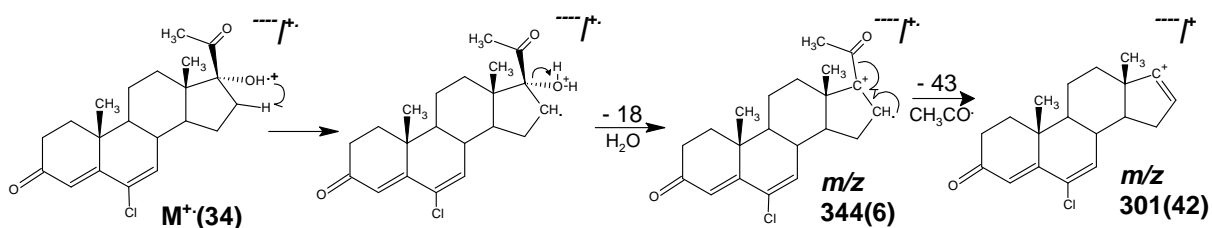
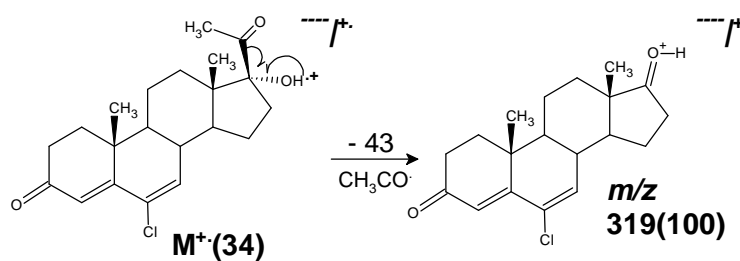
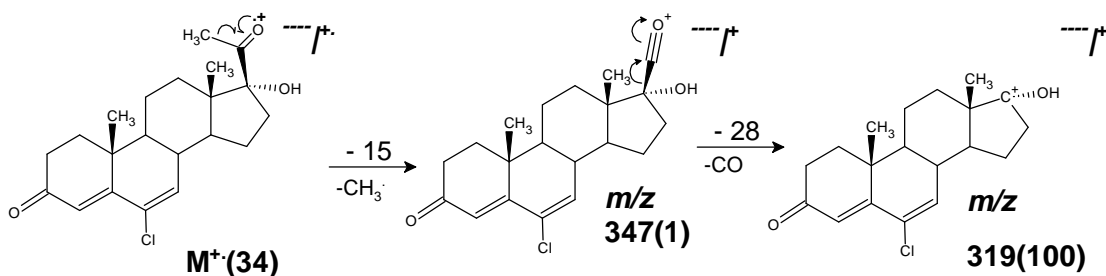


Figura 7.1.18. Diagrama de fragmentación del compuesto 5

Figura 7.1.19. Mecanismo de fragmentación del compuesto 5 para explicar los picos m/z 344, m/z 301Figura 7.1.20. Mecanismo de fragmentación del compuesto 5 para explicar el pico m/z 319Figura 7.1.21. Mecanismo de fragmentación del compuesto 5 para explicar los picos m/z 347 y m/z 319.

Como se indicó al inicio de este trabajo, dentro de los objetivos que se plantean en la ruta sintética propuesta es el aumento de la selectividad y potencia.⁹¹⁻⁹³ Es así que el siguiente paso involucró la esterificación del alcohol terciario en C-17 α con diferentes derivados del ácido benzoico^{94,95} En dicha reacción se formó primeramente el anhídrido mixto benzoiltrifluoroacético usando ácido benzoico, anhídrido trifluoroacético y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador. A continuación se ilustra el mecanismo:

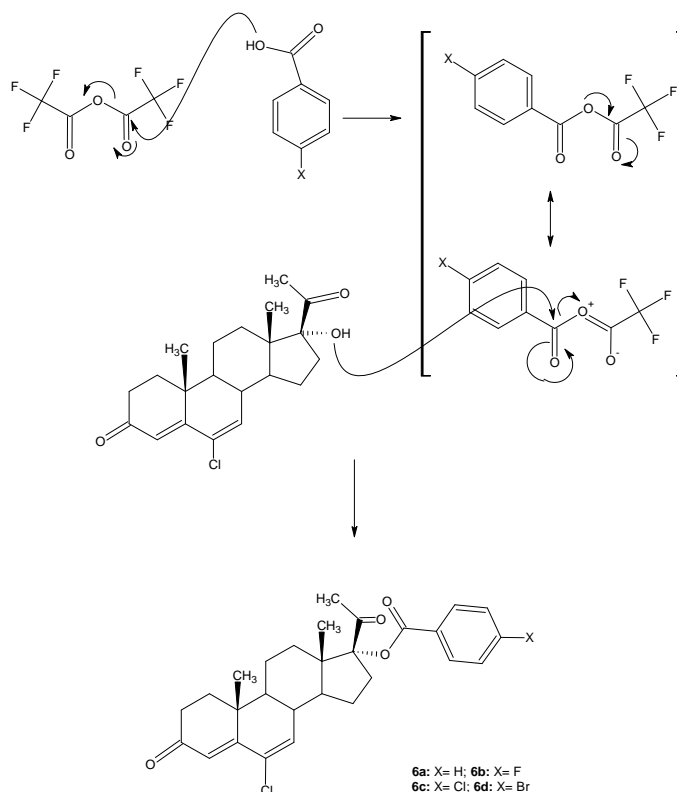


Figura 7.1.22. Mecanismo de reacción para la formación de los compuestos **6a-6d**.

Para el compuesto **6a** (X = H) el rendimiento de la reacción fue de 23.30%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 15.2, página 111-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona, debido a la λ máxima de 283.21 nm, que es congruente con la esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm (215+60+12); así mismo, se observa otro máximo de absorción a 230.47, el cuál confirma la presencia del éster benzoico introducido en C-17 α , el teórico para un cromóforo carbonílico aromático es de 230 nm.⁹⁶

Por otra parte, en el espectro de IR (Figura 15.1, Página 111-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3467 cm⁻¹ y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1738 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo del éster benzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1245 cm⁻¹ del mismo éster formado. Así mismo, se aprecian las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp² aromático y alquénico en 3056 cm⁻¹,

1602 cm^{-1} y 1581 cm^{-1} . El resto de las bandas de los grupos funcionales presentes en el esteroide permanecen constantes.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 15.4, Página 112-Espectroscopia) también se corrobora la formación del éster benzoico debido a la desaparición de protón del alcohol en C-17 α y a la presencia de las señales en 8.04 ppm, 7.63 ppm y 7.49 ppm que integran para 2, 1 y 2 hidrógenos y presentan una multiplicidad de doblete, triplete, triplete respectivamente, es así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2', 4' y 3' del éster benzoato; existen acoplamiento entre dichas señales, en la primera se observan dos acoplamiento, con constantes de magnitud $^3J = 8.4$ Hz que corresponde a un acoplamiento *orto*, y $^4J = 1.5$ Hz, que corresponde a un acoplamiento *meta*.

En RMN ^{13}C (Figura 15.5, Página 113-Espectroscopia) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17, puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales a 212.2 ppm y 198.9 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster benzoico en 163.1 ppm; adicionalmente se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp^2 tres de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 133.7 ppm, 129.8 ppm y 128.7 ppm correspondientes a los carbonos en las posiciones 4', 2' y 3' respectivamente y en 130.393 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura, así como la intensidad de las señales.

En el EMIE (Figura 15.3, Página 112-Espectroscopía) se observa un ión molecular de 466 unidades de m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **6a**. En la Figura 7.1.23 se muestra se diagrama de fragmentación, en donde se aprecian las pérdidas lógicas con las que se deduce la estructura del compuesto **6a**. El fragmento diagnóstico es el pico 344 unidades m/z que corresponde a la pérdida de ácido benzoico (-122 unidades m/z). En las Figuras 7.1.24 –7.1.26 se muestran los mecanismos de fragmentación del compuesto **6a**.

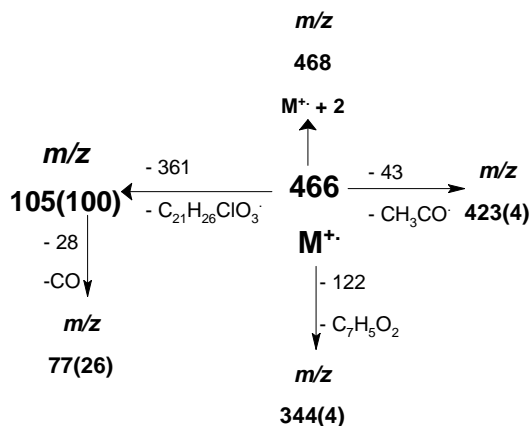


Figura 7.1.23. Diagrama de fragmentación del compuesto **6a**.

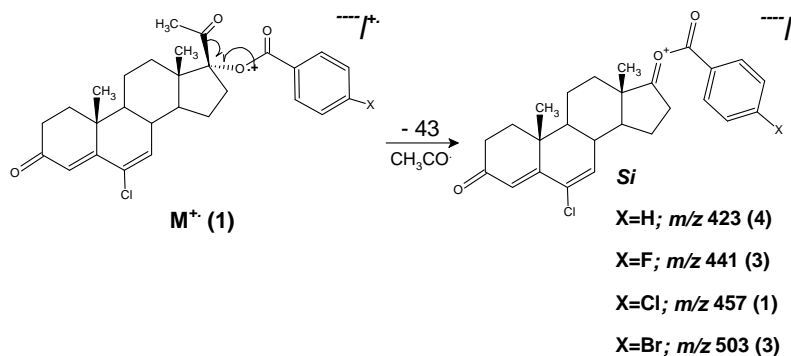


Figura 7.1.24. Mecanismo de fragmentación A del compuestos 6a-6d.

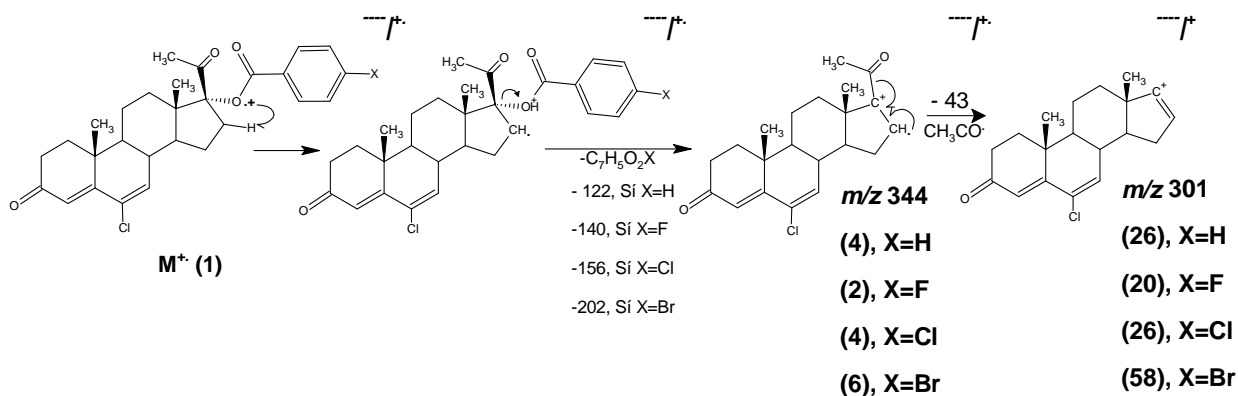


Figura 7.1.25. Mecanismo de fragmentación B del compuestos 6a-6d.

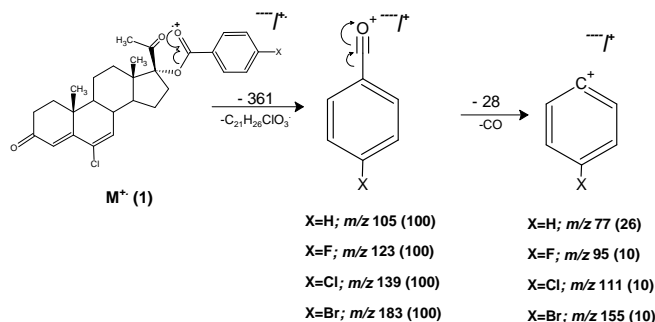


Figura 7.1.26. Mecanismo de fragmentación C del compuestos 6a-6d.

En el caso del compuesto **6b** (X = F) el rendimiento de la reacción fue de 18.66%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 16.2, página 114-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona, debido a la λ máxima de 281.88 nm, que es congruente con la esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm (215+60+12); así mismo, se observa otro máximo de absorción a 233.93 nm, el cual confirma la presencia del éster 4'-fluoro-benzoico introducido en C-17 α , el teórico para dicho cromóforo carbonílico aromático es de 230 nm.⁹⁶

Por otra parte, en el espectro de IR (Figura 16.1, Página 114-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3467 cm⁻¹ y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1716 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo del éster 4'-fluorobenzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1291 cm⁻¹. Así mismo, se aprecian las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp² aromático y alquénico en 3077 cm⁻¹, 1604 cm⁻¹ y 1508 cm⁻¹.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 16.4, Página 115-Espectroscopia) también se corrobora la formación del éster 4'-fluorobenzoico debido a la desaparición de la señal del protón del alcohol en C-17 α y a la presencia de las señales en 8.05 ppm y 7.16 ppm que integran para 2 hidrógenos cada una, así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2' y 3' respectivamente. Para la primera señal a 8.05 ppm se observan los acoplamiento entre el H₂ y H₃, los cuales presentan una constante de acoplamiento de ³J = 8.8 Hz que es cercana a la reportada en la literatura⁹⁶ ³J = 8.4 Hz; así mismo, se observa el acoplamiento que existe con el átomo de flúor el cuál presenta una constante de acoplamiento ⁴J = 5.2 Hz que concuerda nuevamente con el dato reportado en la literatura⁹⁶ ⁴J = 5.7 Hz; existe este acoplamiento debido a que en la naturaleza el átomo de flúor existe en un 100% de abundancia como ¹⁹F, el cuál tiene un número cuántico de espín I = 1/2, las señales de los átomos de ¹H son divididas por acoplamiento con este átomo a distancias de hasta 4 enlaces.⁹⁶ En el caso de las señales que aparecen a 7.16 ppm se observa que existe el acoplamiento entre el átomo H₃ y el átomo de flúor, así como el acoplamiento que existe entre los átomos H₂ y H₃; sin embargo, en el espectro se encuentran empalmadas las señales de dichos acoplamiento, presentando señal de una multiplicidad tipo triplete, pero que no sigue las reglas del triángulo de Pascal, es por esta razón que en el acoplamiento que presenta con una J = 9.6 Hz, se encuentran los acoplamiento con el átomo de flúor cuya magnitud de acoplamiento sería de ³J = 8.9 Hz⁹⁶ y el acoplamiento entre los átomos de hidrógeno H₂ y H₃ que presentaría una constante de acoplamiento de ³J = 8.4 Hz.⁹⁶

En RMN ¹³C (Figura 16.5, Página 116-Espectroscopia) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17 α , puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales a 210.6 ppm y 198.8 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster benzoico en 164.9 ppm; adicionalmente se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp² dos de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 132.3 ppm y 115.9 ppm correspondientes a los carbonos en las posiciones 2' y 3' respectivamente, ambas señales presentan una multiplicidad como doblete por su acoplamiento con el átomo de flúor, las constantes de acoplamiento son ³J_{C-F} = 7.097 Hz y ²J_{C-F} = 16.61 Hz, que son muy cercanas a las reportadas en la literatura (³J_{C-F} = 7.8 Hz y ²J_{C-F} = 21 Hz)⁹⁶. Adicionalmente en 130.5 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura, así como la intensidad de las señales. Para el caso del carbono que está unido el átomo de flúor en la posición 4' se asignó a 166.6 ppm, debido a que presenta una señal doble por el acoplamiento con dicho átomo con una constante de acoplamiento es ¹J_{C-F} = 242.959 Hz, que es muy cercana a la reportada en la literatura de ¹J_{C-F} = 245.1 Hz.

En el EMIE (Figura 16.3, Página 115-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 484 unidades de m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **6b**. En la Figura 7.1.27 se muestra se diagrama de fragmentación, en donde se aprecian las pérdidas lógicas con las que se deduce la estructura del compuesto **6b**. Los fragmentos diagnóstico son el pico de 344 unidades m/z que corresponde a la pérdida de ácido 4-fluorobenzoico (-140 unidades m/z) y el ión de 123 unidades m/z , que corresponde a la pérdida del esteroide (-361 unidades m/z). En las Figuras 7.1.24 –7.1.26 se muestran los mecanismos de fragmentación del compuesto **6b**, cuando $X = F$.

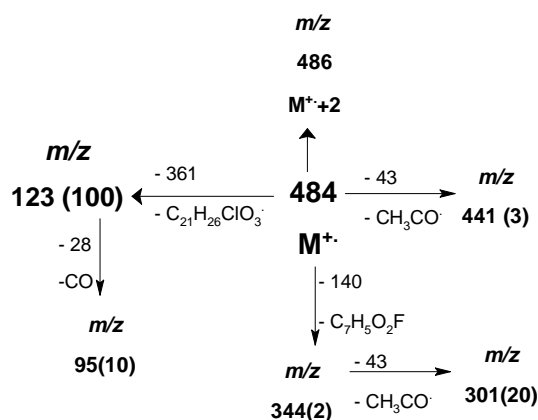


Figura 7.1.27. Diagrama de fragmentación del compuesto **6b**

En el caso del compuesto **6c** ($X = Cl$) el rendimiento de la reacción fue de 21.72%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 17.2, página 117-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona λ máxima de 282.30 nm, que es congruente con la esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm ($215+60+12$); así mismo, se observa otro máximo de absorción a 242.41 nm, el cuál confirma la presencia del éster 4'-clorobenzoico introducido en C-17 α .

Por otra parte, en el espectro de IR (Figura 17.1, Página 117-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3467 cm^{-1} y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1719 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster 4'-clorobenzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1280 cm^{-1} . Así mismo, se aprecian las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp^2 aromático y vinílico en 3079 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} y 1594 cm^{-1} .

En el espectro de RMN 1H (Figura 17.4, Página 118-Espectroscopia) también se corrobora la formación del éster 4'-clorobenzoico debido a la desaparición de la señal del protón del alcohol en C-17 α y a la presencia de las señales dobles en 7.96 ppm y 7.46 ppm que integran para 2 hidrógenos cada una, ambas con una constante de acoplamiento $^3J = 8.7\text{ Hz}$, así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2' y 3' respectivamente del ester 4'-clorobenzoico.

En RMN ^{13}C (Figura 17.5, Página 119-Espectroscopia) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17 α , puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales a 203.5 ppm y 199.1 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster benzoico en 165.3 ppm; adicionalmente se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp^2 , dos de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 131.2 ppm y 129.3 ppm correspondientes a los carbonos en las posiciones 2' y 3' respectivamente y en 130.7 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura, así como la intensidad de las señales. Para el caso del carbono que está unido el átomo de cloro en posición 4' se asignó a 140.5 ppm debido a la electronegatividad del átomo de cloro que lo desplaza a campo bajo.

En el EMIE (Figura 17.3, Página 118-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 500 unidades de m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **6c**, así como las contribuciones isotópicas de $M + 2$ y $M + 4$ en 502 unidades m/z y 504 unidades m/z debido a la presencia de dos átomos de cloro en la molécula. En la Figura 7.1.28 se muestra el diagrama de fragmentación del compuesto **6c** en donde se observan las pérdidas lógicas con las que se deduce la estructura del compuesto **6c**. Los fragmentos diagnósticos son los correspondientes a la pérdida del ácido 4-clorobenzoico y la pérdida del esteroide en 344 unidades m/z y 139 unidades m/z respectivamente. En las Figuras 7.1.24 – 7.1.26 se muestran los mecanismos de fragmentación cuando $X = \text{Cl}$.

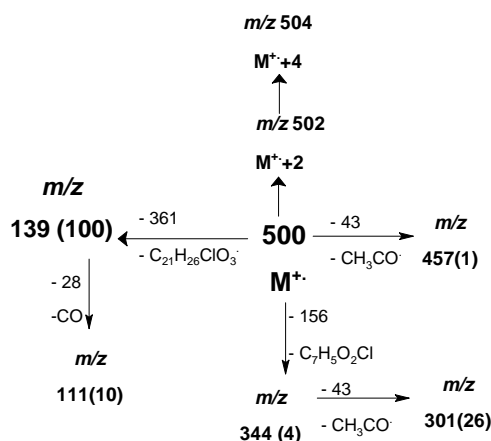


Figura 7.1.28. Diagrama de fragmentación del compuesto **6c**.

En el caso del compuesto **6d** ($X = \text{Br}$) el rendimiento de la reacción fue de 23.21%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 18.2, página 120-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona, debido a la λ máxima de 282.68 nm, que es congruente con la esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm ($215+60+12$); así mismo, se observa otro máximo de absorción a 248.20 nm, el cuál confirma la presencia del éster 4'-bromobenzoico introducido en C-17 α .

Por otra parte, en el espectro de IR (Figura 18.1, Página 120-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3467 cm⁻¹ y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1710 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo del éster 4'-bromobenzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1291 cm⁻¹.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 18.4, Página 121-Espectroscopia) también se corrobora la formación del éster 4'-bromobenzoico debido a la desaparición de la señal del protón del alcohol en C-17 α y a la presencia de las señales dobles en 7.88 ppm y 7.63 ppm que integran para dos hidrógenos cada una, ambas con una constante de acoplamiento ³J = 8.7 Hz, así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2' y 3' respectivamente.

En RMN ¹³C (Figura 18.5, Página 122-Espectroscopia) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17 α , puesto que en la zona de los carbonilos, además de las señales a 203.9 ppm y 198.9 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster benzoato en 165.2 ppm; adicionalmente, se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp² dos de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 132.1 ppm y 131.1 ppm correspondientes a los carbonos en las posiciones 2' y 3' respectivamente y en 130.4 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura, así como la intensidad de las señales. Para el caso del carbono que está unido el átomo de bromo en la posición 4' se asignó a 128.9 ppm.

En el EMIE (Figura 18.3, Página 121-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 546 unidades de *m/z* que corresponde al peso molecular del compuesto **6d**, complementariamente se observan las contribuciones isotópicas por la presencia de los átomos de cloro y bromo, en 548 y 550 unidades *m/z*. En la Figura 7.1.29 se presenta el diagrama de las fragmentaciones observadas, se aprecian las fragmentaciones lógicas por las cuales se deduce la estructura del compuesto **6d**. Se observan los picos diagnósticos de 344 unidades *m/z* que corresponde a la pérdida de ácido 4-bromobenzoico (-202 unidades) y el pico de 183 unidades *m/z* donde se observa claramente la presencia del átomo de bromo por su contribución isotópica en 185 unidades *m/z*. Las Figuras 7.1.24 – 7.1.26 muestran los mecanismos de fragmentación propuestos, cuando X = Br.

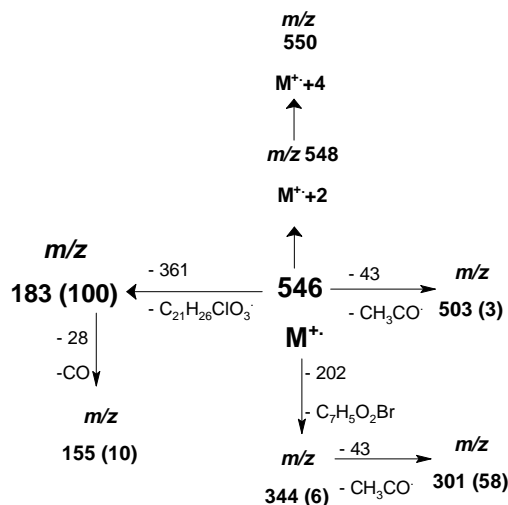


Figura 7.1.29. Diagrama de fragmentación del compuesto 6d.

Para observar el efecto del átomo de cloro en la actividad antiandrogénica del esteroide, se decidió preparar los mismos compuestos finales pero sin el átomo de cloro en C-6.⁷¹ Se utilizó el compuesto **2** que por una reacción de hidrólisis se obtuvo el compuesto **7**, con un rendimiento del 62.04% y se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de U.V. (Figura 19.2, Página 123-Espectroscopia) no hubo cambios en la λ máxima de absorción debido a que en esta reacción no se hicieron cambios en el sistema 4,6-dien-3-ona.

En el caso de la espectroscopia de IR (Figura 19.1, página 123-Espectroscopia) a 3413 y 1155 cm^{-1} se observa las bandas correspondientes al estiramiento O-H confirmando así la presencia de un alcohol terciario en C-17. Las bandas de vibración C-H de metilos y metilenos se observan en 2945 cm^{-1} y 2871 cm^{-1} respectivamente, así como sus correspondientes bandas de deformación a 1458 cm^{-1} y 1381 cm^{-1} ; en lo referente a las insaturaciones conjugadas se observa una banda a 1614 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=C. Por otra parte se observa la desaparición de la banda correspondiente al acetato en C-17 α .

En el espectro de RMN 1H (Figura 19.4 y 19.5, Páginas 124,125-Espectroscopia) se observan tres señales a 0.80 ppm, 1.12 ppm y 2.29 ppm que integran para tres protones cada una y se asignaron a los metilos en C-18, C-19 y C-21, dicha asignación se confirma al analizar los espectros de HSQC y HMBC. Así mismo se observa una señal simple que integra para un protón a 4.95 ppm que presenta intercambio con D_2O y fue designada para el protón del alcohol en C-17 α . A 5.69 ppm se observa una señal simple que integra para un protón, se asignó al protón en C-4. Por último, se observa una señal simple a 6.13 ppm que integra para dos protones, dicha señal se asignó a los protones en las posiciones C-6 y C-7.

En el espectro de RMN¹³C y DEPT (Figuras 19.6, 19.7, Páginas 125,126-Espectroscopía) se observa la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo del grupo acetoxi en C-17; adicionalmente, con la ayuda de los espectros HSQC y HMBC (Figuras 19.8, 19.9, Páginas 126,127-Espectroscopía) se pudieron comprobar las asignaciones anteriormente hechas debido a las correlaciones que se observan. Se aprecian las correlaciones entre el carbonilo en C-20 (211.2 ppm) con los protones del metilo en C-21 (2.294 ppm), para estos mismos protones se observa la correlación existente con el carbono en C-17 (89.5 ppm). En el caso de los protones del metilo en C-18 (0.800 ppm) se observan las correlaciones existentes entre el carbono en C-17 (89.5 ppm), el carbono cuaternario en C-13 (35.9 ppm) y con el carbono del metileno en C-12 (30.0 ppm). Para los protones del metilo en C-19 se observan las correlaciones existentes entre el carbono terciario en C-9 (50.2 ppm), el carbono cuaternario en C-10 (33.5 ppm) y con el carbono secundario de C-1 (33.8 ppm). En lo referente al carbono vinílico en C-5 se observan las correlaciones entre los hidrógenos de los carbonos C-4 (5.69 ppm), C-6 y C-7 (6.13 ppm) y con los protones del metilo en C-19 (1.12 ppm).

En el EMIE (Figura 19.3, página 124-Espectroscopía) se observa el ión molecular de 328 en unidades de m/z que corresponde al peso esperado; así como la contribución isotópica del átomo de oxígeno en 330 unidades m/z que corresponde al $M+2$. En la Figura 7.1.30 se muestra el diagrama de fragmentaciones lógicas con las cuales se deduce la estructura del compuesto **7**, siendo el pico diagnóstico la pérdida de 18 unidades m/z que corresponde a la pérdida de una molécula de agua, que es característica de los alcoholes. En las figuras 7.1.31 y 7.1.32 se muestran los mecanismos de fragmentación.

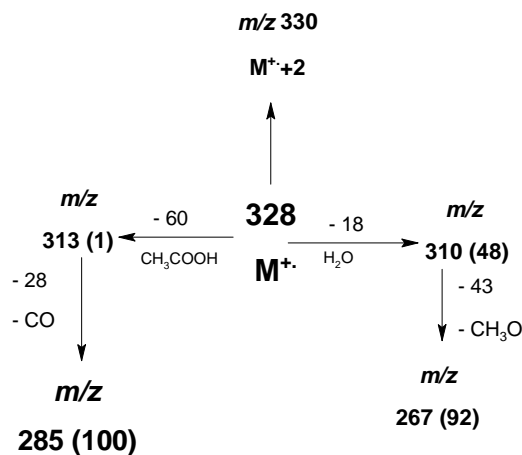


Figura 7.1.30. Diagrama de fragmentación del compuesto **7**.

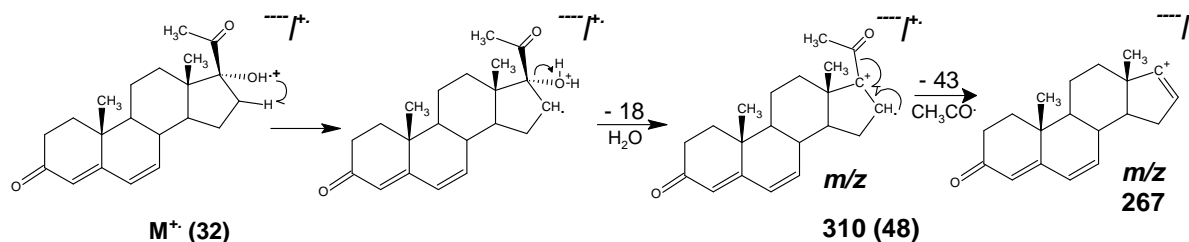


Figura 7.1.31. Mecanismo de fragmentación del compuesto 7 para explicar los picos m/z 310, m/z 267.

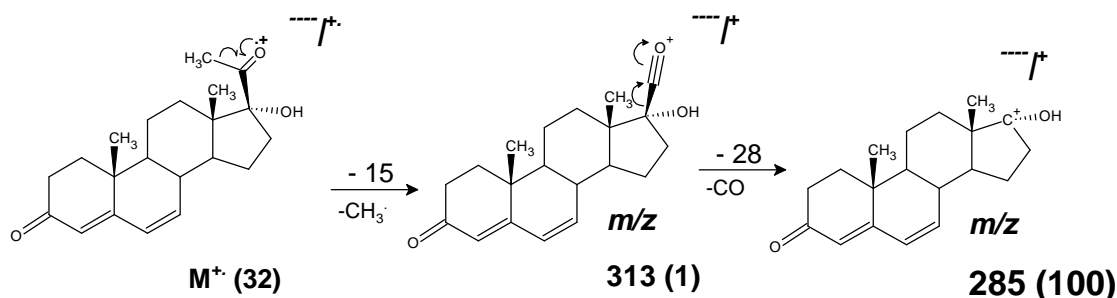


Figura 7.1.32. Mecanismo de fragmentación del compuesto 7 para explicar los picos m/z 313 y m/z 285.

El último paso de esta ruta alterna corresponde a una esterificación del alcohol en C-17 α , es así que se utilizó el mismo método con anhídrido trifluoroacético, ácido *p*-toluensulfónico y el correspondiente ácido benzoico; el mecanismo de reacción que se propone es el mismo que el propuesto anteriormente (Figura 6.1.22).

El compuesto **8a** (X = H) se obtuvo con un rendimiento del 37.96%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 20.2, página 128-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona, debido a la λ máxima de 282.41 nm, que es congruente con la esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm (215+60+12); así mismo se observa otro máximo de absorción a 231.97 nm, el cuál confirma la presencia del ester benzoico introducido en C-17 α , el teórico para un cromóforo carbonílico aromático es de 230 nm.⁹⁶

Por otra parte, en el espectro de IR (Figura 20.1, Página 128-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3412 cm^{-1} y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1713 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del ester benzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1288 cm^{-1} del mismo éster formado. Así mismo, se aprecian las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp^2 aromático y alquénico en 3056.78 cm^{-1} , 1980 cm^{-1} y 1617 cm^{-1} .

En el espectro de RMN ^1H (Figura 20.4, Página 129-Espectroscopia) también se corrobora la formación del éster benzoico debido a la desaparición de protón del alcohol en C-17 (4.951 ppm) y a la presencia de las señales en 8.04 ppm, 7.62 ppm y 7.49 ppm que integran para 2, 1 y 2 hidrógenos y presentan una multiplicidad de doblete, triplete, triplete respectivamente, es así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2', 4' y 3' del éster benzoico. Existen acoplamientos entre dichas señales, en la primera se observan dos acoplamientos, con constantes de magnitud $^3J_1 = 7.9$ Hz (en promedio) que corresponde a un acoplamiento *orto*, y $^4J_2 = 1.44$ Hz, que corresponde a un acoplamiento *meta*.

En RMN ^{13}C y DEPT (Figuras 20.5 y 20.6, Página 130-Espectroscopía) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17 α , puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales a 203.7 ppm y 199.4 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster benzoico en 165.9 ppm; adicionalmente, se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp^2 , tres de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 133.6 ppm, 129.7 ppm y 128.6 ppm correspondientes a los carbonos en las posiciones 4', 2' y 3' respectivamente y en 129.8 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura,^{83,88} así como la intensidad de las señales.

En el EMIE (Figura 20.3, Página 129-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 432 unidades de m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **8a**. En la Figura 7.1.42 se muestra el diagrama de fragmentación donde se aprecian las pérdidas lógicas con lo que se deduce la estructura del compuesto **8a**; como pico diagnóstico se observa la pérdida de ácido benzoico (-122 unidades m/z) por la formación del pico en 310 m/z . Las Figuras 7.1.43 – 7.1.45 muestran los mecanismos de fragmentación.

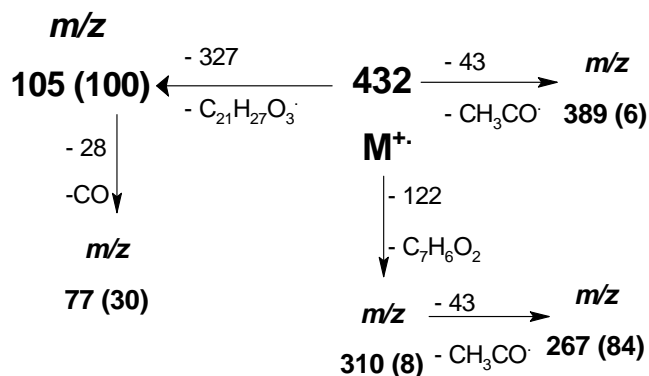


Figura 7.1.33. Diagrama de fragmentación del compuesto **8a**.

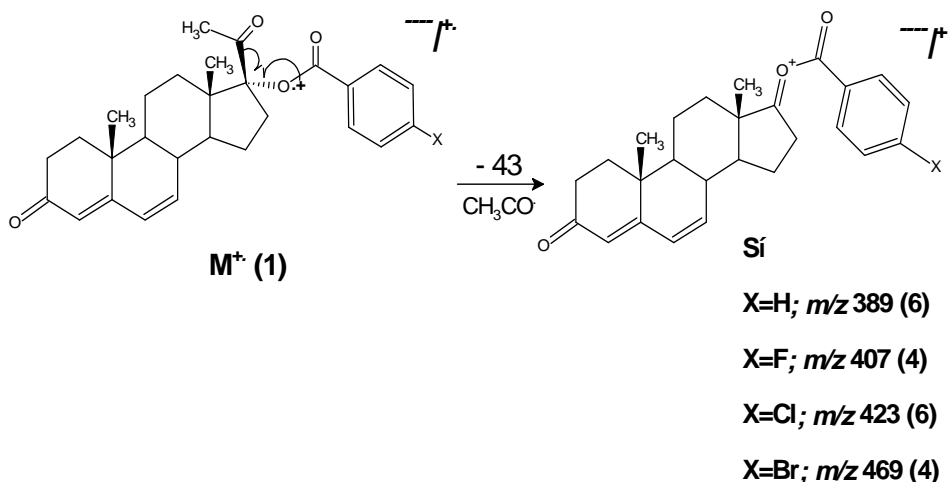


Figura 7.1.34. Mecanismo de fragmentación A del compuestos 8a-8d.

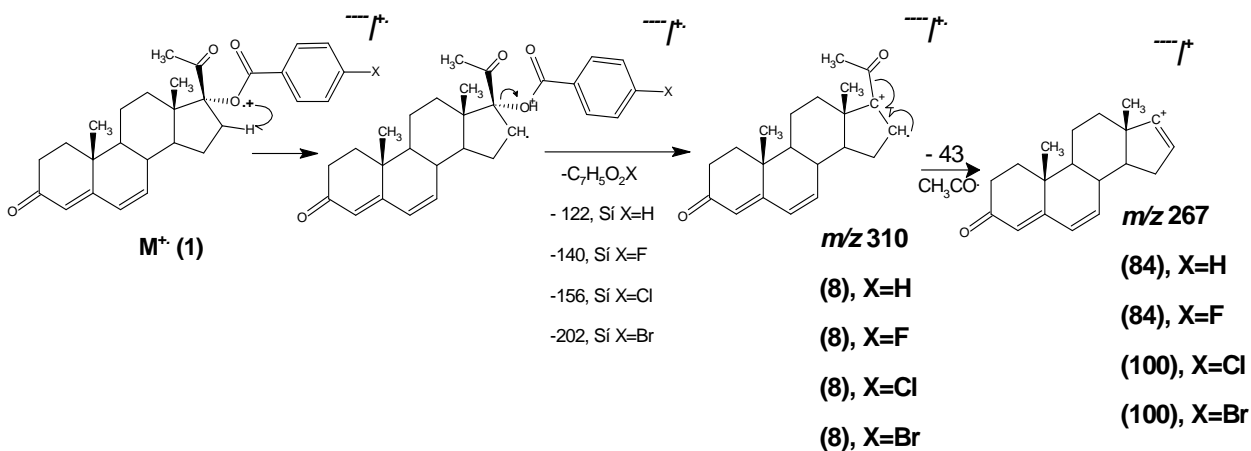


Figura 7.1.35. Mecanismo de fragmentación B del compuestos 8a-8d.

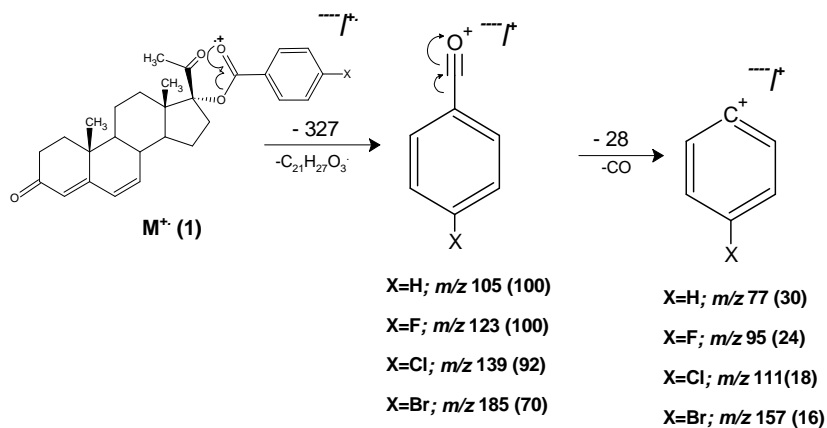


Figura 7.1.36. Mecanismo de fragmentación C del compuestos 8a-8d.

El compuesto **8b** ($X = F$) se obtuvo con un rendimiento del 32.80%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 21.2, página 131-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona, debido a la λ máxima de 282.36 nm, que es congruente con la esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm ($215+60+12$); así mismo, se observa otro máximo de absorción a 233.73, el cuál confirma la presencia del éster benzoico introducido en C-17 α , el teórico para un cromóforo carbonílico aromático es de 230 nm⁹⁶

Por otra parte, en el espectro de IR (Figura 21.1, Página 131-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3412 cm⁻¹ y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1718 cm⁻¹, correspondiente al carbonilo del éster 4'-fluorbenzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1292 cm⁻¹ del mismo éster formado. Así mismo, se aprecian las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp² aromático y vinílico en 3080 cm⁻¹, 1603 cm⁻¹ y 1508 cm⁻¹.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 21.4, Página 132-Espectroscopía) también se corrobora la formación del éster 4'-fluorbenzoico debido a la desaparición de la señal del protón del alcohol (4.951 ppm) en C-17 y a la presencia de las señales en 8.05 ppm y 7.14 ppm que integran para 2 hidrógenos cada una, así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2' y 3' respectivamente. Para la primera señal a 8.05 ppm se observan los acoplamiento entre el H_{2'} y H_{3'}, los cuales presentan una constante de acoplamiento de ³J = 8.8 Hz que es cercana a la reportada en la literatura⁹⁶ ³J = 8.4 Hz, así mismo se observa el acoplamiento que existe con el átomo de flúor, el cuál presenta una constante de acoplamiento ³J = 5.6 Hz que concuerda nuevamente con el dato reportado en la literatura⁹⁶ J = 5.7 Hz⁹⁶. En el caso de las señales que aparecen a 7.136 ppm se observa que existe el acoplamiento entre el átomo H_{3'} y el átomo de flúor así como el acoplamiento que existe entre los átomos H_{2'} y H_{3'}; sin embargo, en el espectro se encuentran empalmadas las señales de dichos acoplamiento, presentando señal de una multiplicidad tipo triplete, pero que no sigue las reglas del triángulo de pascal, es por esta razón que en el acoplamiento que presenta con una J = 9.6 Hz, se encuentran empalmados los acoplamiento con el átomo de flúor cuya magnitud de acoplamiento sería de J = 8.9 Hz⁹⁶ y el acoplamiento entre los átomos de hidrógeno H_{2'} y H_{3'}, que presentaría una constante de acoplamiento de J = 8.4 Hz⁹⁶. A 6.14 ppm se observa la señal que presenta dos acoplamiento con constantes de acoplamiento de ³J₁ = 8.8 Hz, ⁴J₂ = 2.4 Hz, que corresponden a un acoplamiento vinílico con una conformación tipo *cis* y a un acoplamiento alílico, es así que esta señal fue asignada al protón de la posición C-7; por último la señal que aparece a 6.13 ppm con una constante de acoplamiento ³J = 8.8 Hz que coincide con la encontrada al protón en C-7, dicha señal se asignó al protón de la posición C-6.

En RMN ¹³C y DEPT (Figuras 21.5 y 21.6, Página 133-Espectroscopia) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17 α , puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales a 203.6

ppm y 199.4 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster 4'-fluorobenzoico en 165.0 ppm; adicionalmente, se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp^2 dos de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 132.4 ppm y 116.1 ppm correspondientes a los carbonos en las posiciones 2' y 3' respectivamente, ambas señales presentan una multiplicidad como doblete por su acoplamiento con el átomo de flúor; las constantes de acoplamiento son $^3J_{C-F} = 9.1$ Hz y $^2J_{C-F} = 21.9$ Hz. Adicionalmente, la señal en 126.2 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura, así como la intensidad de las señales. Para el caso del carbono que está unido el átomo de flúor en la posición 4' se asignó a 166.2 ppm, debido a que presenta una señal doble por el acoplamiento con dicho átomo cuya constante de acoplamiento es $^1J_{C-F} = 253.3$ Hz.

En el EMIE (Figura 7.1.3, Página 132-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 450 unidades de m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **8b**, como pico diagnóstico se observa la pérdida de ácido 4'-fluorobenzoico (-140 unidades) por la formación del pico en 310 m/z . Las Figuras 7.1.34-7.1.36 muestran el diagrama de fragmentación así como los mecanismos de fragmentación, cuando X = F.

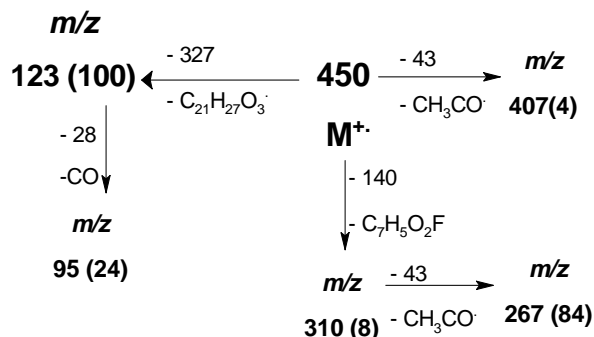


Figura 7.1.37. Diagrama de fragmentación del compuesto **8b**.

En el caso del compuesto **8c** (X = Cl) el rendimiento de la reacción fue de 28.15%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 22.2, página 134-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona, debido a la λ máxima de 281.48 nm, que es congruente con la esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm ($215+60+12$); así mismo, se observa otro máximo de absorción a 241.54 nm, el cuál confirma la presencia del éster 4'-clorobenzoico introducido en C-17.

En el espectro de IR (Figura 22.1, Página 134-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3412 cm^{-1} y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1717 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster 4'-clorobenzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1292 cm^{-1} y en 1280 cm^{-1} . Así mismo, se aprecian las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp^2 aromático y vinílico en 3078 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} .

En el espectro de RMN ^1H (Figura 22.4, Página 135-Espectroscopia) también se corrobora la formación del éster 4'-clorobenzoico debido a la desaparición de la señal del protón del alcohol en C-17 (4.951 ppm) y a la presencia de las señales dobles en 7.96 ppm y 7.46 ppm que integran para 2 hidrógenos cada una, ambas con una constante de acoplamiento $^3J = 8.6$ Hz (en promedio), así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2' y 3' respectivamente del éster 4'-clorobenzoico.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 22.5, Página 136-Espectroscopia) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17 α , puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales a 201.9 ppm y 199.0 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster 4'-clorobenzoico en 165.1 ppm; adicionalmente se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp^2 dos de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 131.0 ppm y 129.1 ppm en las posiciones 2' y 3' respectivamente y en 131.0 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura, así como la intensidad de las señales. Para el caso del carbono que está unido el átomo de cloro en posición 4' se asignó a 139.7 ppm debido a la electronegatividad del átomo de cloro que lo desplaza a campo bajo.

En el EMIE (Figura 22.3, Página 135-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 466 unidades de m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **8c**, se aprecia la contribución isotópica $M+2$ del átomo de cloro en 468 unidades m/z . En las Figuras 7.1.38 y 7.1.34 – 7.1.36 se muestra el diagrama de fragmentación así como los mecanismos de fragmentación (cuando $X = \text{Cl}$) con las pérdidas lógicas de las cuales se deduce la estructura del compuesto **8c**; como fragmento diagnóstico se aprecia la pérdida de ácido 4'-clorobenzoico (-156 unidades) por la formación del pico en 310 m/z .

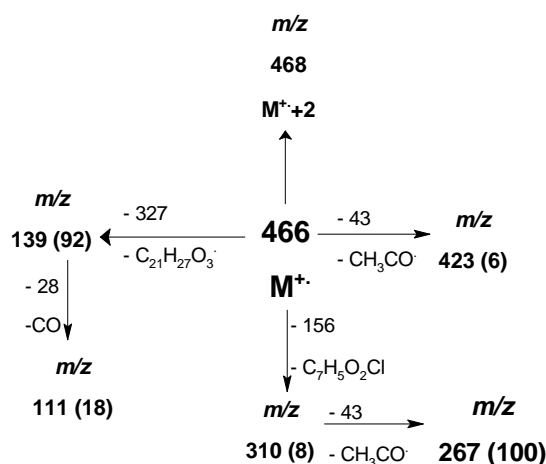


Figura 7.1.38. Diagrama de fragmentación del compuesto **8c**.

En el caso del compuesto **8d** ($X = \text{Br}$) el rendimiento de la reacción fue de 22.47%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. En el espectro de UV (Figura 23.2, página 137-Espectroscopia) se observa el sistema 4,6-dien-3-ona, debido a la λ máxima de 281.83 nm, que es congruente con la

esperada de acuerdo con las reglas de Woodward de 287 nm ($215+60+12$); así mismo, se observa otro máximo de absorción a 243.05 nm, el cuál confirma la presencia del éster 4'-bromobenzoico introducido en C-17.

Por otra parte, en el espectro de IR (Figura 23.1, Página 137-Espectroscopia) se corrobora la esterificación del alcohol en C-17 α por la desaparición de la banda de alargamiento O-H a 3412 cm^{-1} y la presencia de una nueva banda en la zona de carbonilos en 1720 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster 4'-bromobenzoico y la correspondiente al alargamiento C-O en 1292 cm^{-1} y 1276 cm^{-1} . Así mismo, se aprecian las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp^2 aromático y vinílico en 3061 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} y 1589 cm^{-1} .

En el espectro de RMN ^1H (Figura 23.4, Página 138-Espectroscopia) también se corrobora la formación del éster 4'-bromobenzoico debido a la desaparición de la señal del protón del alcohol en C-17 (4.951 ppm) y a la presencia de las señales dobles en 7.89 ppm y 7.63 ppm que integran para 2 hidrógenos cada una, ambas con constantes de acoplamiento $^3J_1 = 8.6\text{ Hz}$ y $^4J_2 = 2.15\text{ Hz}$ (en promedio), así que estas señales se asignaron a los protones en las posiciones 2' y 3' respectivamente.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 23.5, Página 139-Espectroscopia) se confirma nuevamente la esterificación del alcohol en C-17, puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales a 213.7 ppm y 197.2 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3, se observa la señal correspondiente al carbonilo del éster 4'-bromobenzoico en 165.9 ppm; adicionalmente se observan cuatro señales nuevas en la zona de carbonos sp^2 dos de ellas corresponden a los carbonos con hidrógeno en 132.1 ppm y 131.1 ppm correspondientes a los carbonos en las posiciones 2' y 3' respectivamente y en 129.075 ppm corresponde al carbono ípso; esta asignación se dedujo por los datos reportados en la literatura, así como la intensidad de las señales. Para el caso del carbono que está unido el átomo de bromo en la posición 4' se asignó a 139.8 ppm.

En el EMIE (Figura 23.3, Página 138-Espectroscopia) se observa un ión molecular de 512 unidades de m/z que corresponde al peso molecular del compuesto **8d**; así mismo, se observa la contribución isotópica M+2 del átomo de bromo presente en la molécula en 514 unidades m/z y en otros fragmentos del espectro. En la Figura 7.1.39 se muestra el diagrama de fragmentación donde se aprecian las pérdidas lógicas con las cuales se deduce la estructura del compuesto **8d**. Como pico diagnóstico se observa la pérdida de ácido 4'-bromobenzoico (-202 unidades) por la formación del pico en 310 m/z . Las figuras 7.1.34- 7.1.36 muestran los mecanismos de fragmentación cuando X = Br.

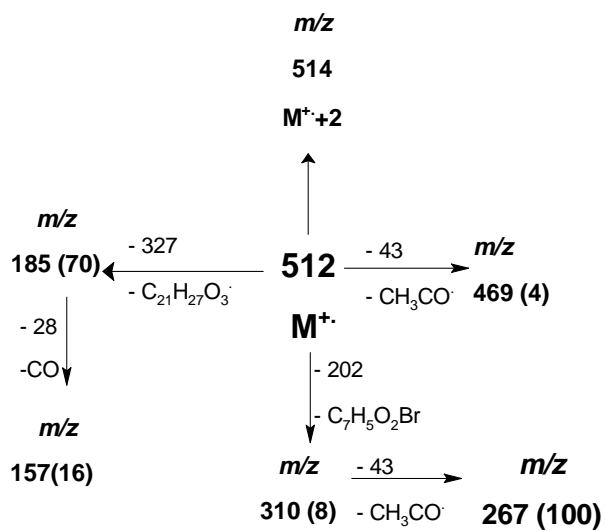


Figura 7.1.39. Diagrama de fragmentación del compuesto 8d.

7.2. PARTE BIOLÓGICA

7.2.1. ENSAYO *in vitro* CON LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA.

En la Tabla 6.2.2 se muestran los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* para la inhibición de la enzima 5 α -reductasa de próstata de cadáver humano por los compuestos **1-5**. Los resultados del ensayo indican que los intermediarios poseen actividad inhibitoria moderada significativa contra la enzima; sin embargo, no fue mayor de la capacidad inhibitoria de la finasterida; así mismo, se observa que en los compuestos como al ir modificando el farmacóforo de la molécula se va modificando la actividad biológica.^{80,81}

Al realizar un análisis de la actividad biológica con respecto al coeficiente de partición calculado, un parámetro que describe la lipofilia del compuesto (LogPc) (Figura 7.2.1), se observa una gráfica con forma de parábola cuyo máximo es 3.2, a partir del cual la actividad disminuye drásticamente (el valor teórico es LogP = 5), esto explica como a partir de los compuestos **6a-6d** cuyos valores LogPc son mayores que con los que se realizó la gráfica, no presentarán actividad inhibitoria con la enzima 5 α -reductasa.⁸² En la Tabla 7.2.1 se muestra los valores de LogPc para los compuestos **1-8d**.

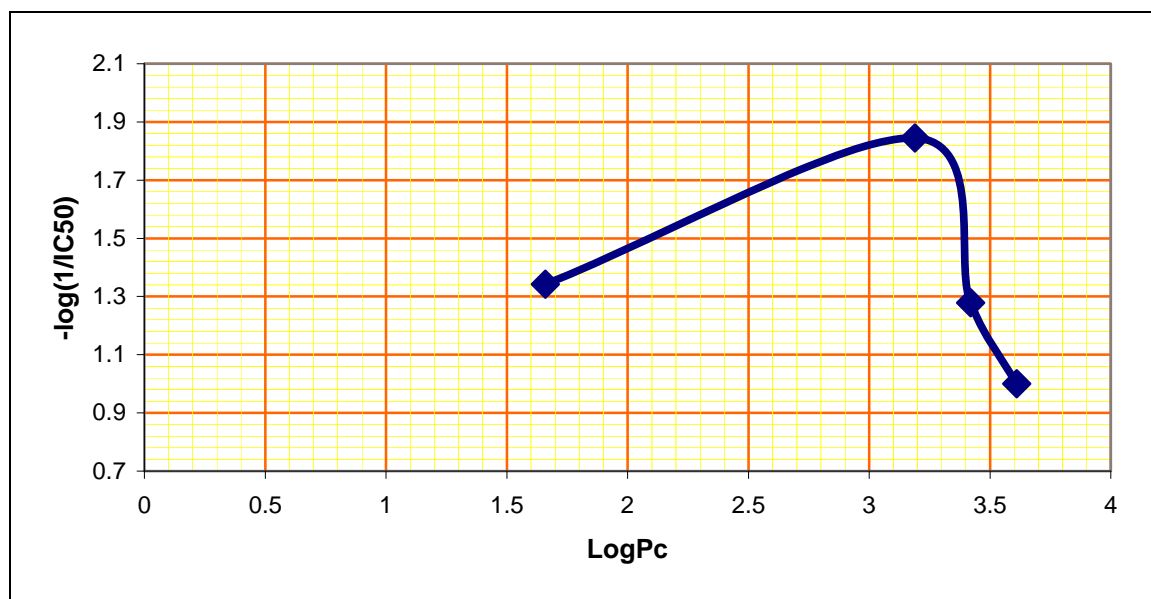
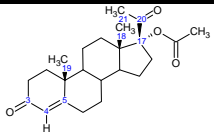
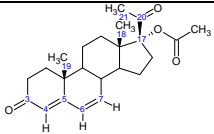
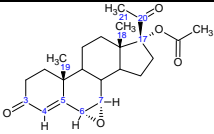
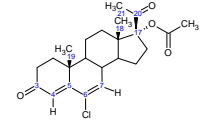
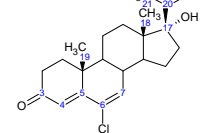
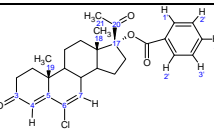
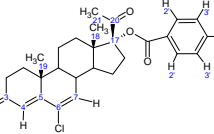
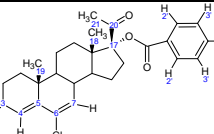
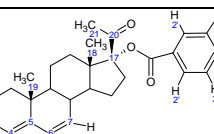


Figura 7.2.1. Relación entre el LogPc de los compuestos **1-4** y la inhibición de la enzima 5 α -reductasa

Tabla 7.2.1. LogPc de compuestos 1-6d.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	LogPc
(1)		3.61 ± 0.38
(2)		3.19 ± 0.41
(3)		1.66 ± 0.42
(4)		3.42 ± 0.41
(5)		2.66 ± 0.40
(6a)		5.44 ± 0.41
(6b)		5.52 ± 0.54
(6c)		6.01 ± 0.48
(6d)		6.10 ± 0.54

Dicha observación llevó a la búsqueda de la aplicación de las reglas de Lipinski, en la cuál los compuestos **6a-6d** y **8a-8d** presentan valores de LogPc mayores a 5, pero sólo los compuestos **6c**, **6d** y **8d** tienen valores de peso molecular mayor a 500, por lo que sólo en estos compuestos se esperaría problemas de solubilidad y de distribución en el organismo.⁸¹

De acuerdo con datos reportados en la literatura, la ubicación de las esterasas en el organismo es en la fracción microsomal, por lo cual estas posiblemente se encuentren en el pellet formado durante la extracción de la enzima 5α -reductasa en la próstata de cadáver humano. Si este fuera el caso los compuestos se hidrolizarían y en consecuencia el producto formado sería el compuesto **5** que no posee actividad inhibitoria de la enzima. En lo que se refiere a la actividad del compuesto **5** se observa que adicionalmente a los problemas relacionados con las propiedades fisicoquímicas de la molécula, existen ciertos parámetros estéricos o de densidad electrónica relacionados con la molécula que influyen en la actividad.^{81,82}

Para explicar el mecanismo de inhibición de la enzima 5α -reductasa por los intermediarios **1-5**, se propone un aducto que se forma irreversiblemente a partir de un ataque nucleofílico de la enzima por algún residuo nucleofílico de serina (-OH), cisteína (-SH) ó lisina (-NH₂) que pudiese estar en el sitio activo de ésta, al doble enlace conjugado del esteroide (C-4 o C-6, preferentemente en C-6 debido a una menor energía de activación del estado de transición) en una adición tipo Michael (Figura 7.2.2.)

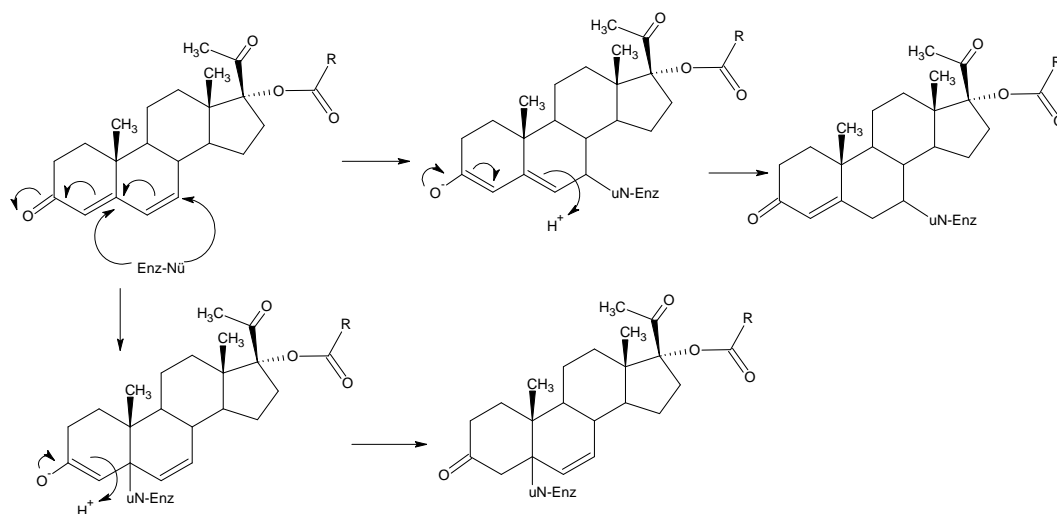


Figura 7.2.2. Mecanismo de inhibición irreversible propuesto de la enzima 5α -reductasa.

7.2.2. ENSAYO *in vitro* DE AFINIDAD POR EL RECEPTOR ANDROGÉNICO.

Los resultados para la unión máxima de miboleron- $[^3\text{H}]$ al receptor de andrógenos se muestran en la Figura 6.2. Para este ensayo se mantuvo constante la concentración de Miboleron- $[^3\text{H}]$ y se aumentó gradualmente la concentración de miboleron no radiactiva cuantificándose sólo la radioactividad generada por la unión del complejo miboleron- $[^3\text{H}]$ -receptor androgénico, observándose que conforme aumenta la concentración de miboleron no radiactiva, el porcentaje de miboleron- $[^3\text{H}]$ unida al receptor disminuye debido a que una menor concentración de esta última provoca que su probabilidad de ocupar los sitios de ésta sea menor.

En lo referente a la afinidad de los compuestos por el receptor androgénico se muestra en la Tabla 6.2.3 y ninguno de ellos presentó afinidad por este, ya que el porcentaje de miboleron- $[^3\text{H}]$ unida al receptor no

disminuyó cuando se aumentó gradualmente la concentración de los compuestos a probar; lo que implica que ningún compuesto presentó los requerimientos estructurales que permitieran tener afinidad por el receptor y remplazar a la mibolerona.

7.2.3. ENSAYO *in vitro* DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES

En la Tabla 6.2.4 se muestran los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* para la inhibición del crecimiento de líneas celulares cancerosas por los compuestos **6a-6d** y **8a-8d**, se observa que todos los compuestos tienen un porcentaje elevado de inhibición del crecimiento en la línea celular correspondiente al sistema nervioso central, dichos resultados se deben muy probablemente a su valor de LogPc y en consecuencia a la naturaleza lipofílica de estos compuestos. En lo referente a la línea celular de cáncer de próstata sólo el compuesto **8d** presentó un alto valor de inhibición del crecimiento para esta línea celular así como para las demás, lo cual convierte a **8d** en el candidato ideal para el desarrollo de antiandrógenos; sin embargo, como se había mencionado en el planteamiento del problema la posición C-6 es fácilmente oxidable, por lo que sería recomendable realizar un bloqueo metabólico en dicha posición con algún sustituyente que no modificara las propiedades fisicoquímicas de la molécula; por ejemplo, un átomo de flúor cuyas características hidrofóbicas y estéricas son semejantes a las del átomo de hidrógeno.⁹⁸

7.2.4. ENSAYO *in vivo* DEL PESO DE LA PRÓSTATA

Con la finalidad de determinar el efecto antiandrogénico *in vivo* de los intermediarios se empleó el ensayo del efecto sobre el peso de la próstata, ya que la enzima 5 α -reductasa tipo 2 se expresa principalmente en esta glándula, por lo que compuestos que presentan capacidad inhibitoria sobre esta enzima reducen su peso. En la Figura 6.1 se observa el efecto de los compuestos **1-5** en hámsteres castrados tratados con **T**, ésta ejerce su efecto androgénico al aumentar el peso de la próstata pero cuando se administra conjuntamente con finasterida, se observa un efecto antiandrogénico al disminuir el tamaño de ésta. Los compuestos **1-5** presentan un efecto antiandrogénico significativo pero no mayor al observado con finasterida, esto presumiblemente se deba a las propiedades fisicoquímicas de los compuestos que se ven reflejados en parámetros de biodisponibilidad y farmacocinéticos. El parámetro fisicoquímico, del cual se observa la misma tendencia explicada anteriormente con el ensayo de inhibición de la enzima 5 α -reductasa, es el LogPc (Figura 7.2.3).

Considerando todos los resultados obtenidos por las diferentes pruebas, se observa claramente que además del farmacóforo (4,6-dien-3-ona), el papel del sustituyente en la posición C-17 es clave para potenciar el efecto inhibitorio de las moléculas. No se logró establecer una relación por el reemplazo isostérico del átomo de hidrógeno por un átomo de flúor, cloro o bromo en el éster en C-17, ya que los compuestos sintetizados carecieron de actividad biológica; sin embargo, mediante el ensayo de citotoxicidad

en células prostáticas cancerosas, el derivado **8d** presentó un alto porcentaje de inhibición, por lo que servirá de prototipo en próximas investigaciones.

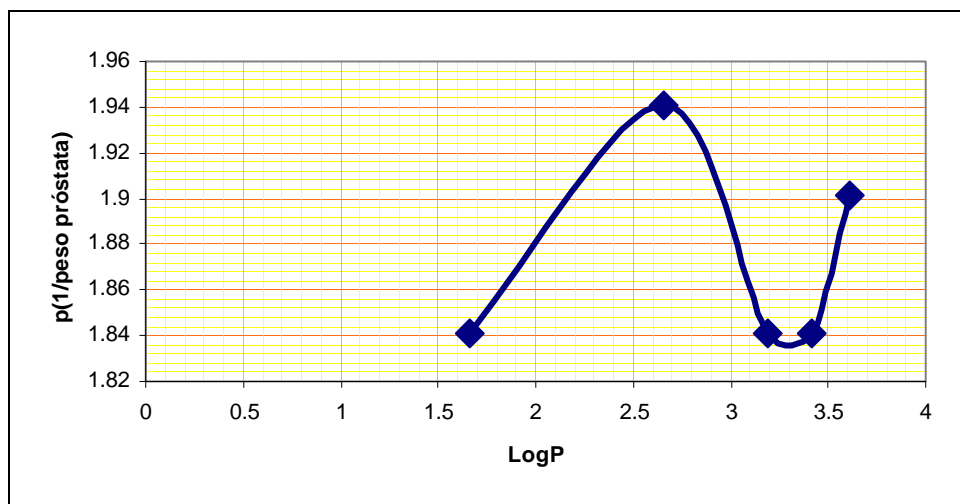


Figura 7.2.3. Relación entre el LogPc de los compuestos 1-5 y el peso de la próstata.

En la Tabla 7.2.2, a manera de resumen, se muestra el mapa de actividad biológica generado a partir de los compuestos sintetizados.

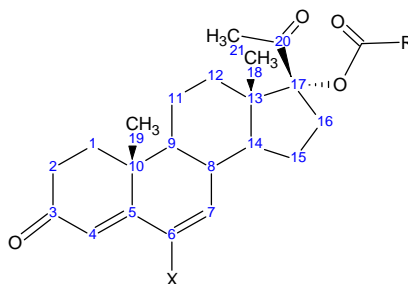


Tabla 7.2.2. Mapa de actividad biológica de los compuestos sintetizados.

Sitio de cambio	Modificación estructural	Comentarios
C-6	X= Cl	El reemplazo del átomo de hidrógeno por un átomo de cloro disminuye la actividad.
C-17	R= CH ₃	La hidrólisis del acetilo provoca una pérdida total de la actividad inhibitoria.
C-17	R= 4'-halo-fenil	Presentan porcentajes de inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento en líneas celulares, siendo la línea correspondiente al sistema nervioso central la que presenta mayores porcentajes de inhibición.
C-17	R= 4'-bromo-fenil	Presenta el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se concluye lo siguiente:

- Se comprueba la hipótesis de trabajo, ya que existe una clara modificación de la actividad biológica por la introducción un átomo de cloro en C-6 o un grupo benzoiloxi (sustituido en la posición 4') en la posición C-17 α .
- El efecto de valores elevados del coeficiente de partición afecta la actividad biológica por la alteración de parámetros biológicos como la biodisponibilidad y la farmacocinética.
- El derivado 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**) presentó una alta actividad inhibitoria sobre el crecimiento de células prostáticas cancerigenas, con una IC₅₀ = 13.65 μ M \pm 1.2.
- La relación estructura-actividad biológica indica que el incremento del volumen del sustituyente en la posición C-17 α provocan la pérdida total de la actividad biológica.
- Ningún compuesto presentó afinidad por el receptor androgénico.
- La información recabada en este estudio aporta nuevas herramientas sobre los requerimientos estructurales que son determinantes en el efecto antiandrogénico en derivados de progesterona, en el desarrollo de moléculas anticancerosas con posible uso en la terapéutica de padecimientos andrógeno-dependientes.

REFERENCIAS

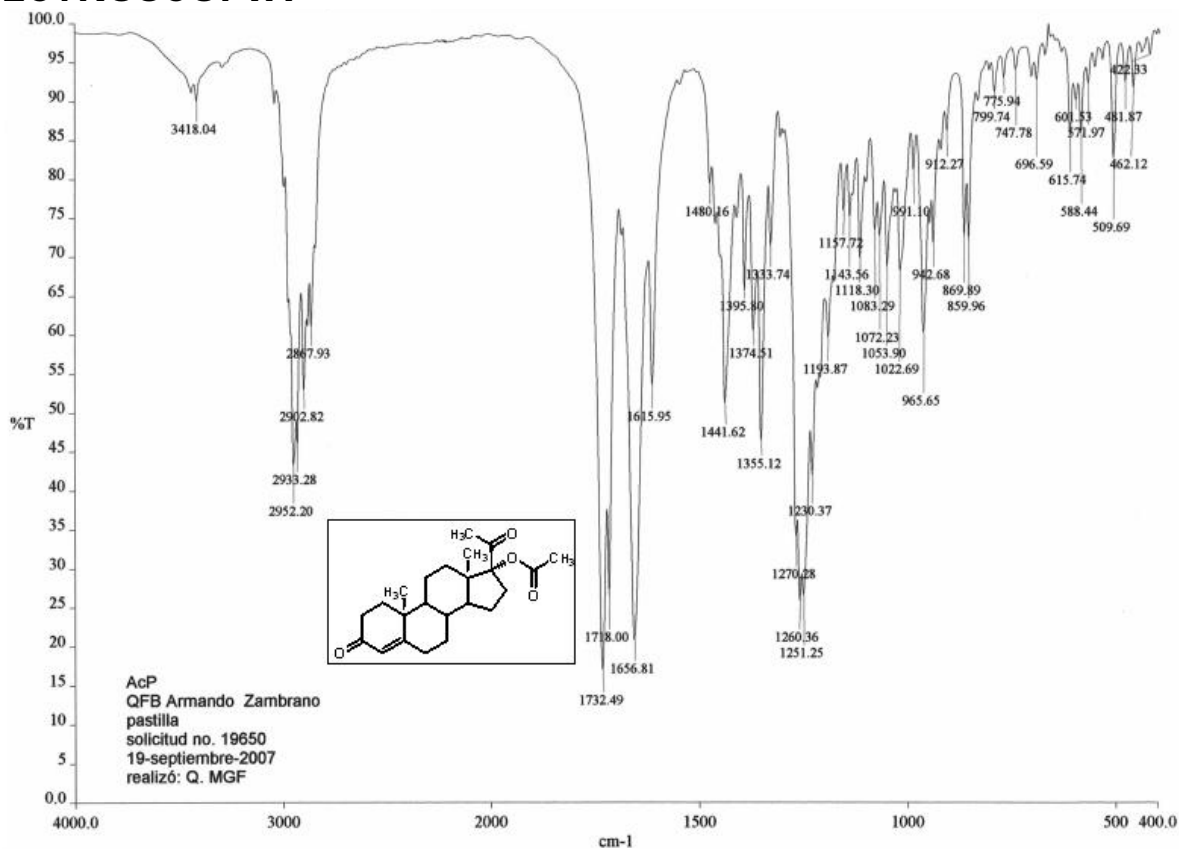
1. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>, 07-Abril-2008. 14:30 h.
2. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Global Action Against Cancer - Updated version. 2005.
3. Carcinogénesis Química. Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.
4. Damber, J.E.; Aus, G. Prostate cancer, *Lancet* **2008**, *371*: 1710-1721.
5. Garnick M.B., The dilemmas of prostate cancer. *Scientific American* **1994**, *275*: 32-40.
6. Teillac, P., Mongiat-Artus, P., Prostate Cancer : Highlights from 2006, *European Urol. Suppl.* **2007**, *6*: 728-736.
7. <http://infobase.who.int>. 20-Enero-2008. 09:00 h.
8. Berry, S. J., *et al.*, The development of human benign prostatic hyperplasia with age, *J. Urol.* **1984**, *132*: 474.
9. Schulman, C. Intérêt des inhibiteurs de la 5 α -reductase dans la prevencion du cancer de la prostate, *Annales d'urologie*, **2004**, *38* : S35-S42.
10. Garnick M.B., Fair, W.R., Combating prostate cancer, *Scientific American*, **1998**, *279*: 44-53.
11. Mirone V., *et al.*, Androgens and Benign Prostatic Hyperplasia, *European Urol. Suppl.* **2006**, *5*: 410-417.
12. McNicholas T., Mitchell, S., Benign Prostatic Hyperplasia, *Surgery Renal and Urol.*, **2008**, *26*(5): 218-222.
13. Zaridze D. G., Boyle P., Cancer of the prostate: Epidemiology and etiology, *J. Urol.* **1987**, *59*: 493-502.
14. Swallow, T., Kirby, R.S. Cancer of the prostate gland, *Surgery Renal and Urology*, **2008**, *26*(5): 213-217.
15. Rasmusson, G.H., Torrey, J.H. *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1994**, *29*: 225.
16. Programa de Acción: Cancer de Prostata. *Secretaria de Salud*, **2001**.
17. Guyton, A.C., Hall, J.E., *Tratado de Fisiología Médica*. Decima edición, McGraw-Hill Interamericana, México, **2001**. Capítulos 74, 80.
18. Brueggemeier, R.W., Male sex hormones, analogs and antagonists in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, John Wiley Inc, quinta edición, USA, **1996**, Capítulo 2.
19. Fieser, L.F., Fieser, M., *Steroids*. Reinhold Publishing Corporation, New York, **1959**.
20. Frairia, R., *et al.* Steroid-protein interactions : Basic aspects, *Ann. NY Academic. Science.*, **1988**, *XX*: 538.
21. Hiipalla, R.A., Liao, S., Molecular mechanism of androgen action, *Trends Endocrinology and metabolism*, **2001**, *86*: 3467-3477.
22. Debes, J.D. Tindall, D.J. The role of androgens an the androgen receptor in prostate cancer, *Cancer Letters*, **2002**, *187*:1-7.
23. Cadepond F., *et al.*, Heat Shock Protein 90 as a critical factor in monitoring glucocorticoid receptor in a nonfunctional state, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*: 5834-5641.
24. Platz, E.A., Giovannucci, E. The epidemiology of sex steroid hormones and their signaling and metabolic pathways in the etiology of prostate cancer, *J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.* **2004**, *92*: 237-257.
25. Goodman, G.A., Gilman, L.S., *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Novena edición, Vol, 2, McGraw-Hill- Interamericana, **1996**.
26. Yen, S., Jaffe, R., *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*, Tercera edición, Panamericana, España, **1993**.
27. Eric, R., *et al.* Human cancer syndromes : clues to the origin and nature of cancer. *Science*, **1997**, *279*: 1043-1050.
28. Rusell, D.W., Wilson, J.D. Steroid 5 α -reductase: Two genes/two enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*: 25-61
29. Jenkis, E.P., *et al.* Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase, *J. Clin. Invest*, **1992**, *131*: 1571-1573.
30. Wuttke, S.A., *et al.* Inhibition of 5 α -reductase in the rat prostate by *Cimicifuga racemosa*, *The European Menopause J.* **2006**, *55S*: S75-S82.

31. Bull G, et al. Mechanism-based inhibition of human steroid 5 α -reductase by finasteride : Enzyme-catalyzed formation of NADP-dihydrofinasteride, a potent bisubstrate analog inhibitor., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *118*: 2359-2365.
32. Thigpen, A.E., Rusell, D.W., *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*: 8577-8583.
33. Occhiato, E.G., et al. Selective non steroidal inhibitors of 5 α -reductase type 1. *J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.* **2004**, *88*: 1-16.
34. Guardana, A. et al. 19-Nor-10-Azasteroids: a novel class of inhibitors of human steroid 5 α -reductase 1 and 2, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*: 1112-1119.
35. Grisenti, P. et al. Substrate interaction with 5 α -reductase enzyme: influence of 17 β -chain chirality in the mechanism action of 4-azasteroids inhibitors. *Steroids*, **2001**, *66*: 803-810.
36. Bakken, G.A., Jurs, P.C., QSAR for 6-azasteroids as inhibitors of human type 1 5 α -reductase: prediction of binding affinity and selectivity relative to 3-BHSD, *Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*: 1255-1265.
37. Holt, D.A., et al. Inhibition of Steroid 5 α -reductase by unsaturated 3-carboxysteroids, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*: 943-950.
38. Holt, D.A., et al. Steroidal A ring aryl carboxylic acid : A new class of steroid 5 α -reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*: 937-942.
39. Jones, C.D. et al. Non steroidal inhibitors of human type 1 steroid 5 α -reductase. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*: 421-423.
40. Wikel, J.H., et al. QSAR study of benzoquinolinones as inhibitors of human type 1 5 α -reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*: 1157-1162.
41. Guarna, A. et al. Benzo[c]quinolizin-3-ones: A novel class of potent and selective non steroidal inhibitors of human steroid 5 α -reductase type 1. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*: 3718-3735.
42. Ferrali, A., et al. Synthesis and activity of substituted benzo[c]quinolizin-3-ones as dual inhibitors of human 5 α -reductase 1 and 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*: 145-148.
43. Abell, A.D. et al. A comparison of steroidal and non steroidal inhibitors of human steroid 5 α -reductase: new tricycles aryl acid inhibitors of the type 1 isozyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*: 481-484.
44. Igarashi, S., et al. A novel class of inhibitors for human steroids 5 α -reductase : synthesis and biological evaluation of indole derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*: 382-388.
45. Lesuisse, D., et al. Biphenyls as surrogates of the steroidal backbone part 2 : Discovery of novel family of substituted biphenyl-4-carboxylic acids. Synthesis and evaluation as inhibitors of steroid 5 α -reductase type 1 and 2., *Bioorg. And Med. Chem.*, **2001**, *11*: 1713-1716.
46. Picard, F., 5-Phenyl substituted 1-methyl-2-piridones and 4'-substituted biphenyl-4-carboxylic acids. Synthesis and evaluation as inhibitors of steroid 5 α -reductase type 1 and 2. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*: 437-448.
47. Lubahn, D.B., et al. The human androgen receptor : Complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol. Endocrinol.* **1988**, *2*: 1265-1275.
48. Lubahn, D.B., et al. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome., *Science*, **1988**, *240*: 327-340.
49. Van Laar, J.H. et al., The human androgen receptor is a 110 KDa protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1989**, *63*: 39-44.
50. Linja, M.J., et al. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.* **2004**, *92*: 225-264.
51. Chang, C., Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors, *Science*, **1988**, *240*: 324-326.
52. Neumann, F., The antiandrogen cyproterone acetate: discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Clin. Exp. Endocrinol.* **1994**, *102*: 1-32.
53. Neumann, F. Pharmacology of antiandrogens, *J. Steroid Biochem.* **1986**, *25*: 885-895.
54. Eri, L.M., Tveter, K.J. *J. Urol.* **1993**, *150*: 90
55. Li, X. et al. Synthesis and in vitro evaluation substituted N-(1,1-dimethyl)-3-oxo-4-androstene-17 β -carboxamides as reductase inhibitors and antiandrogens. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*: 1456-1461.
56. Guarna, A. et al. 19-Nor-10-azasteroids, a new class of steroid 5 α -reductase inhibitors. X-ray structure, molecular modeling, conformational analysis of 19-Nor-10-azasteroids and comparison with 4-azasteroids and 6-azasteroids. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*: 3466-3477.

57. Rasmusson, G.H., *et al.* Azasteroids : Structure activity relationships for inhibition of 5 α -reductase and androgen receptor binding. *J. Med. Chem.* **1986**, 29: 2298-2315.
58. Kurup, A., *et al.* Comparative QSAR analysis of 5 α -reductase inhibitors. *Chem. Rev.* **2000**, **100**: 909-924.
59. Rasmusson, G.H., *et al.* Azasteroids are inhibitors of rat prostatic 5 α -reductase. *J. Med. Chem.* **1984**, 27: 1690-1701.
60. Frye, S.V., *et al.* 6-Azasteroids : Structure-activity relationships for the inhibition of type 1 and 2 human 5 α -reductase and human adrenal 3 β -hidroxi- Δ^5 -steroid dehydrogenase / 3-keto- Δ^5 -steroid isomerase. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2352-2360.
61. Bakshi, R.K., *et al.* 4,7 β -Dimethyl-4-azacholestan-3-one (MK-386) and related 4-azasteroids as selective inhibitors of human type 1 5 α -reductase. *J. Med. Chem.* **1994**, 37: 3871-3874.
62. Frye, S.V., *et al.* 6-Azasteroids : potent dual inhibitors of human type 1 and 2 steroid 5 α -reductase. *J. Med. Chem.* **1993**, 36: 4313-4315.
63. Li, X., *et al.* Synthesis and in vitro activity of 17 β -(N-alkyl/arylformamide) and human 5 α -reductase and antagonist of the androgen receptor. *J. Med. Chem.* **1995**, 38: 1158-1173.
64. Bakshi, R.K., *et al.* 4-Aza-3-oxo-5 α -androst-1-ene-17 β -N-aryl-carboxamides as dual inhibitors of human type 1 and type 2 steroid 5 α -reductase : Dramatic effecto of N-aryl substituentes on type 1 and 2 5 α -reductase inhibitory potency, *J. Med. Chem.* **1995**, 38 : 3189-3192.
65. Frye, S.V. *et al.* Structure-activity relationships for inhibitions of type 1 and 2 human 5 α -reductase and human adrenal 3 β -Hidroxi- Δ^5 -steroid dehydrogenase / 3-keto- Δ^5 -steroid isomerase by 6-Azaandrost-4-en-3-ones. Optimization of the C-17 substituent. *J. Med. Chem.* **1995**, 38: 2621-2627.
66. Rojas, A. Síntesis de esteres halogenados de pregnadieno con un grupo metilo en C-16. Tesis de Maestría. Facultad de Química UNAM, **2006**.
67. Ramírez, E. Síntesis de 17 α -Aciloloxi derivados del pregnano con un sustituyente en C-16 β como antiandrógenos. Tesis de doctorado. Facultad de Química, UNAM **2002**.
68. Cabeza, M., *et al.* Androgenic and antiandrogenic effects of progesterone derivatives with different halogen as substituent of the C-6 position. *Steroids*, **1999**, 64: 413-421.
69. Shapiro, E., *et al.* 16-Alkylated progesterones. *J. Med. Chem.* **1962**, 5: 975-988.
70. Ramírez, E., *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives. *Chem. Pharm Bull.*, **2002**, 50: 15-20.
71. Morrison, R., Boyd, R., *Química Orgánica*. Quinta edición. Pearson Education, México, **1998**.
72. Thompson, T.N. Optimization of metabolic stability as a goal of modern drug design. *Med. Research Reviews*, **2001**, 5: 412-449.
73. Deghenghi, R. *et al.* New synthesis and structure-activity relationships in the 17-alkylated progesterone series. *J. Med. Chem.* **1963**, 6: 301-304.
74. Valencia, I.N. Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración β en C-16 como antiandrógenos potenciales para el tratamiento de cáncer de próstata. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, **1997**.
75. Chen, X., *et al.* The use of bioisosteric groups in lead optimization. *Annu. Rep. Med. Chem.*, **2003**, 38: 333-345.
76. Patani, G.A., *et al.* Bioisosterim : a rational approach in drug design. *Chem Rev.* **1996**, 96: 3147-3176.
77. Burguer, A. Isosterism and bioisosterim in drug design. *Prog Drug Res.* **1991**, 37: 287.
78. Korolkovas, A. *Essentials of molecular pharmacology: background for drug design*, John Wiley and Sons Inc., **1970**, Cap 4: 66.
79. Wermuth, C.G., *The practice of Medicinal Chemistry*, Segunda edición, Academic Press **2003**, Cap. 19: 301.
80. Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*, Segunda edición, McGraw-Hill-Interamericana, España, **2001**, pág. 2.
81. Silverman, R. *The Organic Chemistry of drug design and drug action*, Academic Press, Elsevier, **2004**: 17.
82. Denis, A.S. *et al.* *Pharmacokinetics and metabolism in drug design in Methods an principles in medicinal chemistry*, vol. 13, Wiley-VCH, Germany, **2001**: 2.
83. Pretsch, E., *et al.* *Structure determination of organic compounds*, USA, **2001**.

84. Agnello, E.J. *et al.* The dehydrogenation of corticosteroids with chloranil, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *20*: 4293-4299.
85. Brosa, C. Synthesis of 3-methoxyestra-1,3,5(10),6-tetraen-17-one, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*: 3984-3985.
86. Bratoeff, E. *et al.* Synthesis and pharmacological test of new 5α -reductase inhibitors. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **1997**, *28*:13-19.
87. Takegawa, S., Naoyuki, K., Antiandrogen. III. 11-Oxapregnane Steroids *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, *44*: 746.
88. Rahman, A. *Nuclear Magnetic Resonance*, Springer-Verlag, New York, **1986**.
89. Cabeza, M., Miranda, G., Bratoeff, E., Flores, G., Ramírez, E., Androgenic and anti-androgenic effects of progesterone derivatives with different halogens as substituents at the C-6 position, *Steroids*, **1999**, *64*:413-421.
90. Shibata, K., Takegama, *et al.* Physicochemical characteristics and antitumor activities of a highly branched fungal (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, OL-2, isolated from *omphalia lapidescens*, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *22*:14
91. Bratoeff, E., Flores, G., Ramirez, E., Valencia, N., The pharmacology of the antiandrogens, *Chimica OGGI*, **1997**, *8*: 67-69.
92. Bratoeff, E., Trejo, A., Hernández, J., Sánchez, P., Síntesis de derivados del pregnano con un grupo metilo en posición C-16. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **1992**, *22*: 14.
93. Calderón, D., Bratoeff, E., Ramírez, E. Antiandrógenos más usuales, reflexiones sobre la síntesis orgánica, *Rev. Mex. Cienc. Farm*, **1997**, *28*(1): 24-29.
94. Shapiro, E., *et al.* Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehidro-16-methylene-17 α -hydroxyprogesterones, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*: 716-720.
95. Murillo, C., Síntesis de derivados del pregnano con actividad antiandrogénica potencial, 17 α -Benzoiloxi-4-halo-pregnen-3,20-diona. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **1999**.
96. Pretsch, E., *et al.* *Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*, Springer-Verlag, second edition, USA, **1989**.
97. Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding, *Annal. Biochem.*, **1976**, *72*: 248
98. Cabeza, M., *et al.* New Progesterone derivatives as inhibitors of 5α -reductase enzyme and prostate cancer cell growth . *J. of Enzyme inhibition and Med. Chem.* **2006**, *2*(4): 371-378.

ESPECTROSCOPIA



d:\pel_data\spectra\farmacia\eugene bratos\faz19650.sp - USAI, Facultad de Química, UNAM

Figura 10.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).

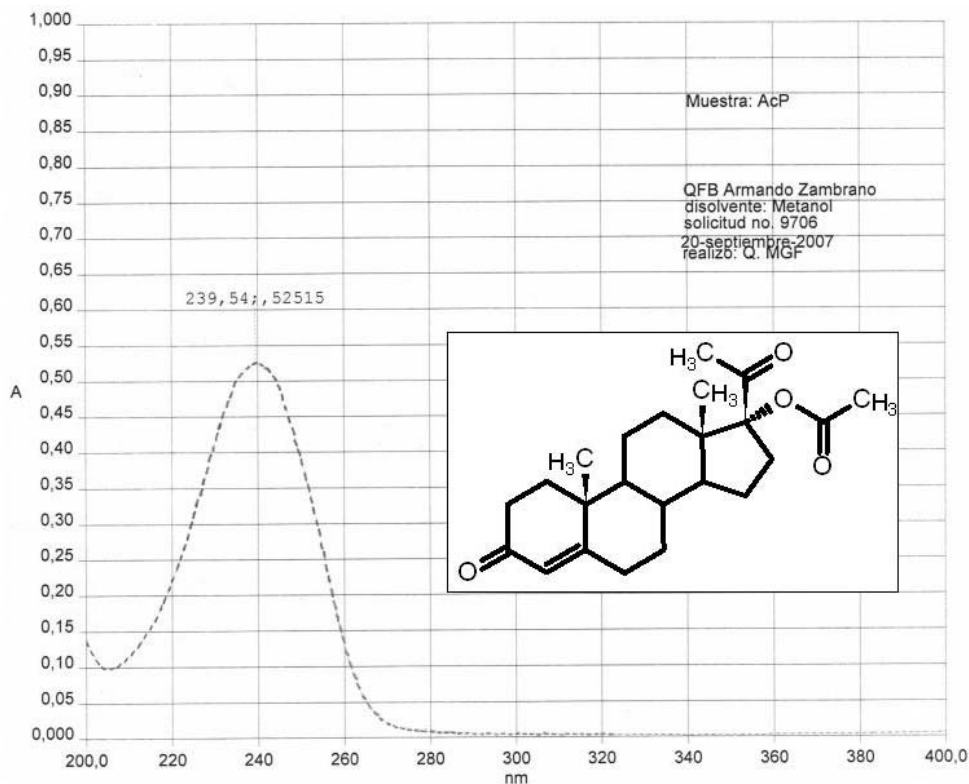


Figura 10.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).

OT856 1#8 RT: 1.44 AV: 1 SB: 4 1.85-2.46 NL: 3.04E7
T: +c EI Full ms [49.50-800.50]

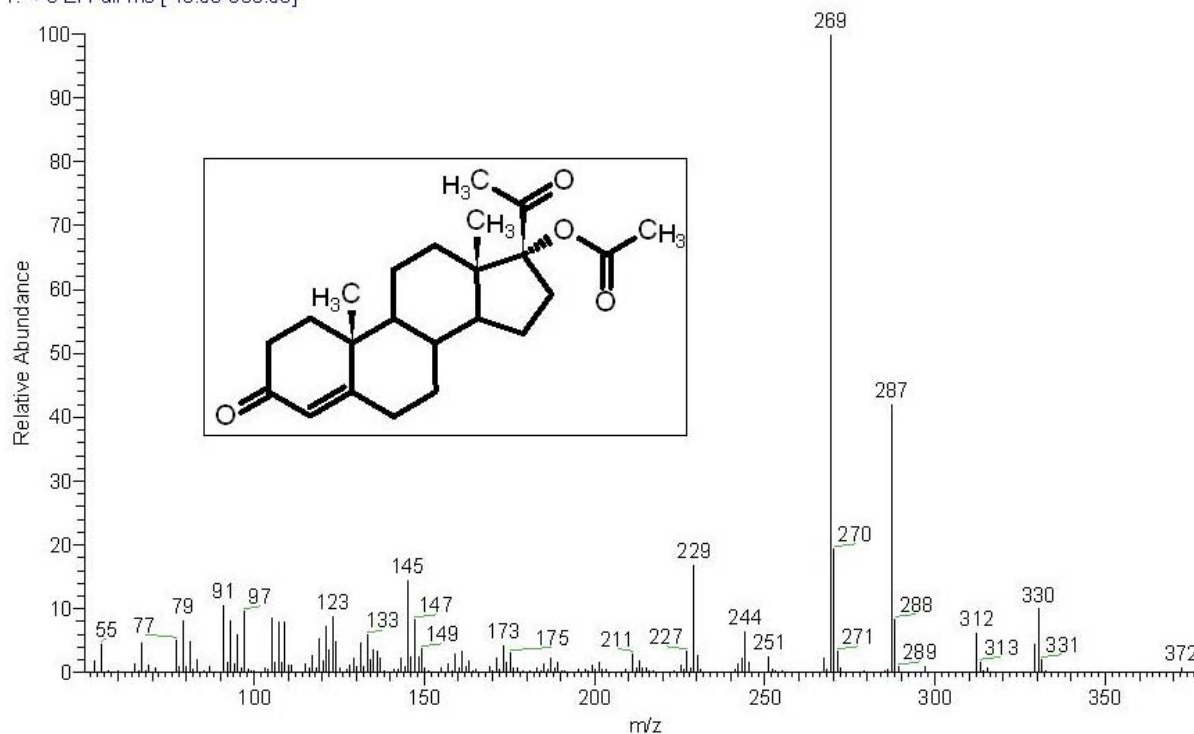


Figura 10.3. Espectro de masas de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).

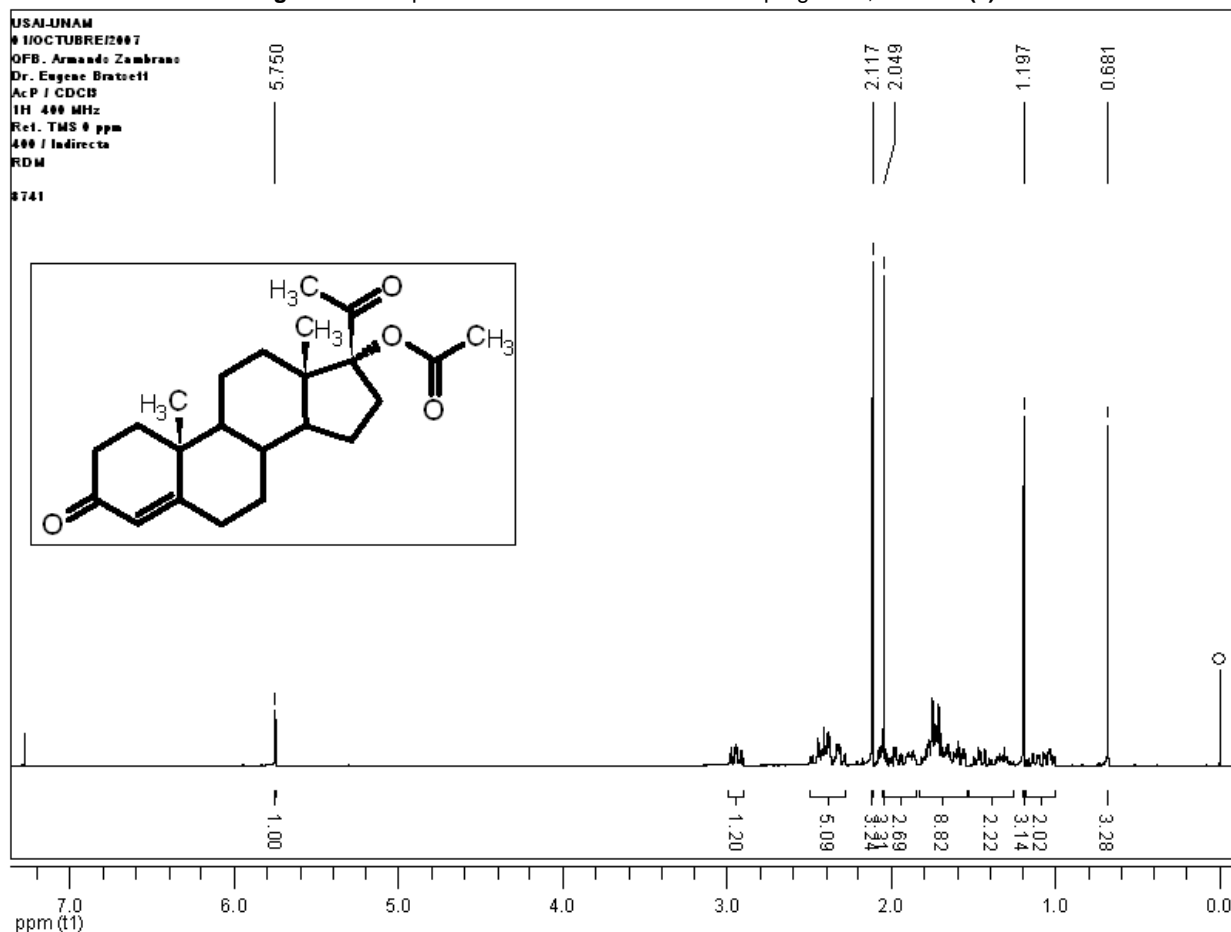


Figura 10.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).

USA1-UNAM
01/OCTUBRE/2007
Dr. Eugene Bratoeff / Armando Zambrano
ACP / CDC13
13C 100 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
400 / Indirecta
RDM
8741

Pulse Sequence: s2pu1

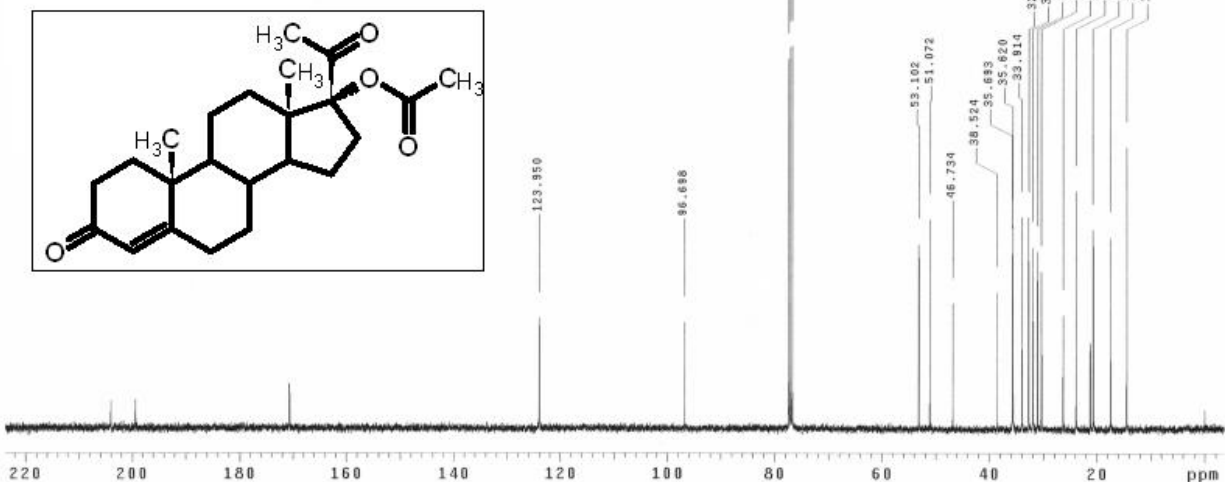


Figura 10.5. Espectro de RMN ¹³C de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).

USA1-UNAM
01/OCTUBRE/2007
Dr. Eugene Bratoeff / Armando Zambrano
ACP / CDC13
13C 100 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
400 / Indirecta
RDM
8741

Pulse Sequence: DEPT

CH3 carbons

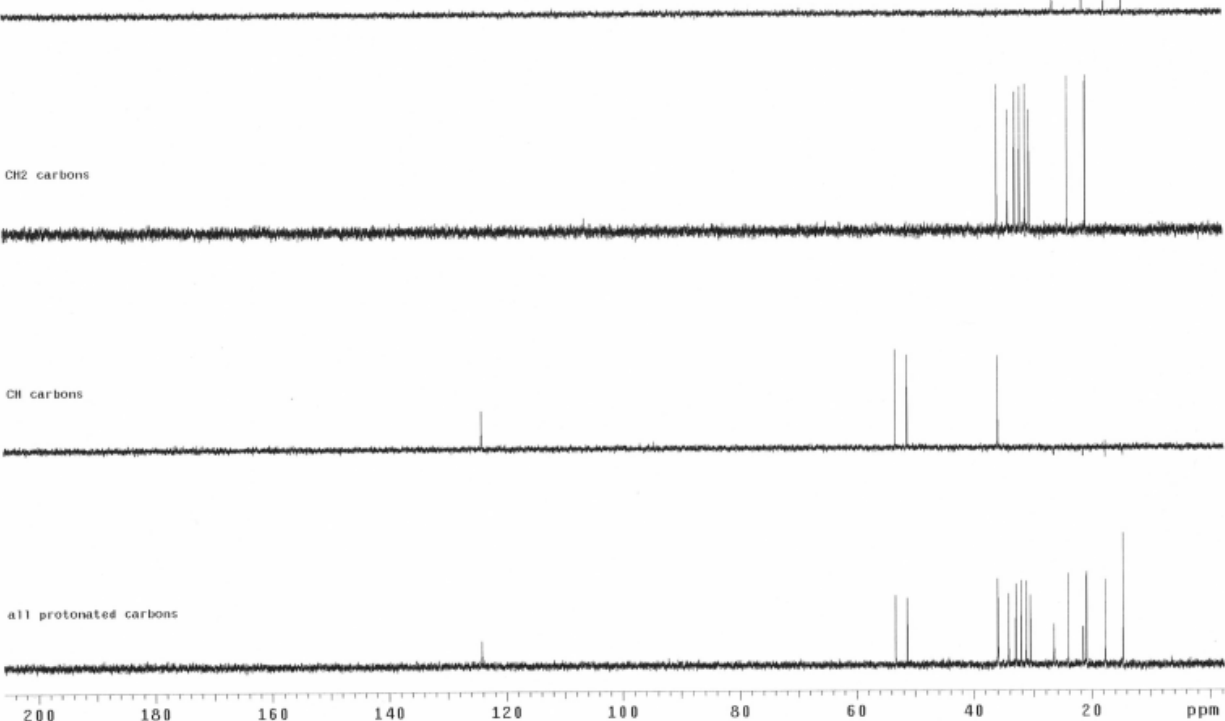
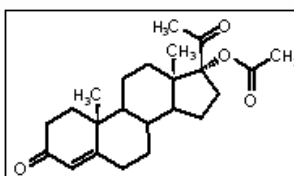


Figura 10.6. Espectro de RMN ¹³C DEPT de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (1).

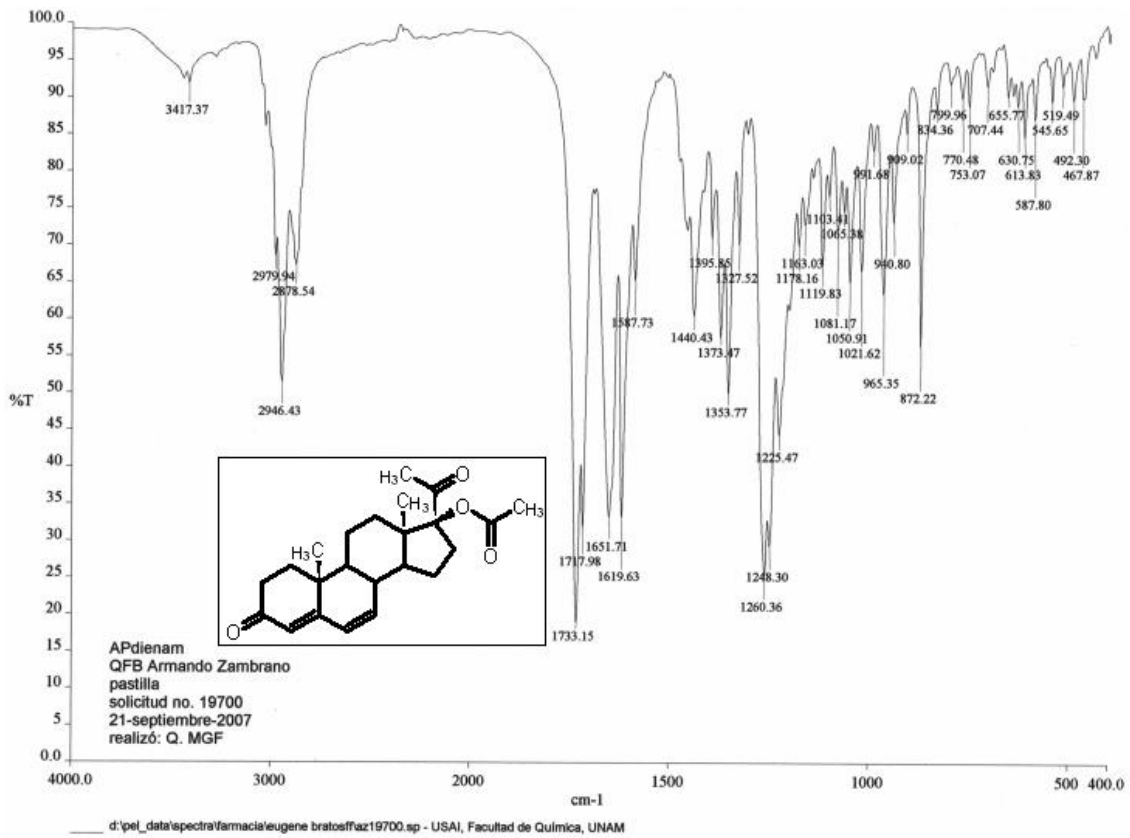


Figura 11.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).

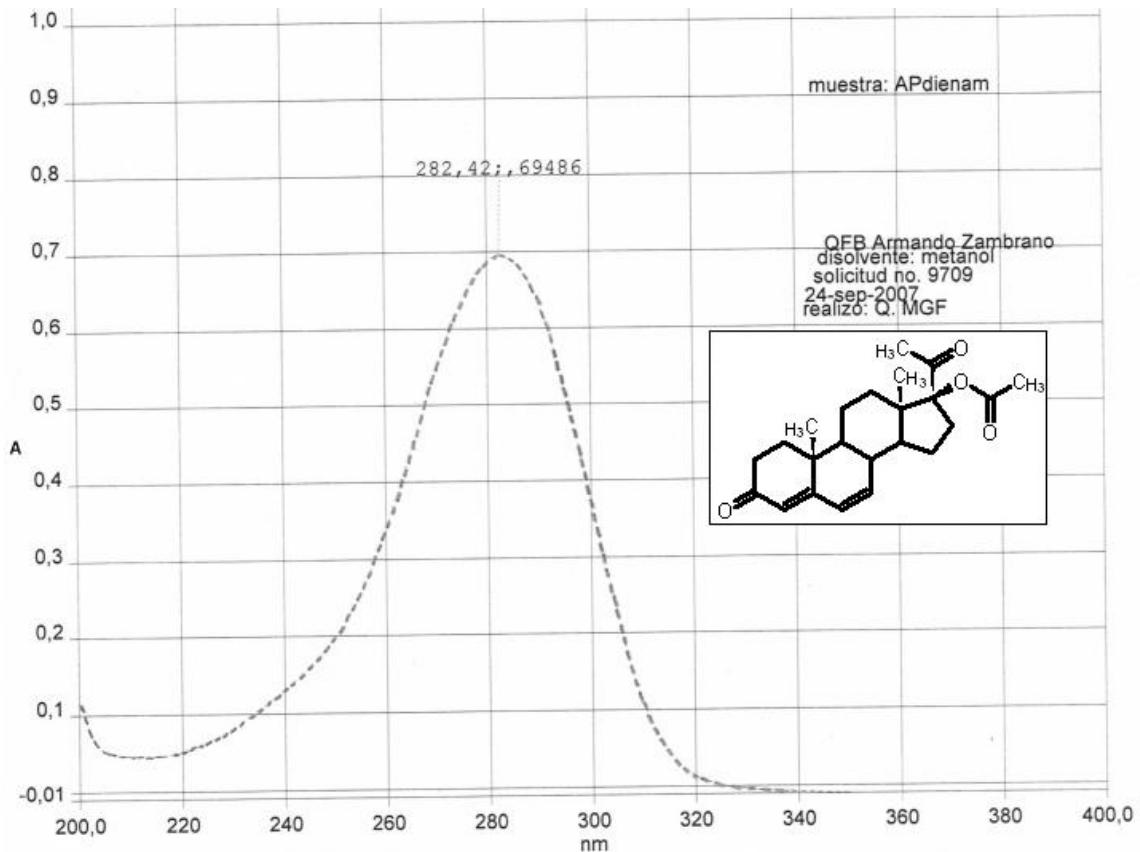


Figura 11.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).

D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT657_1

9/24/2007 3:14:15 PM

ACP-DIEN-AM

OT657_1 #5 RT: 0.82 AV: 1 SB: 27 5.33-10.65 NL: 1.74E7
T: +c EI Full ms [49.50-800.50]

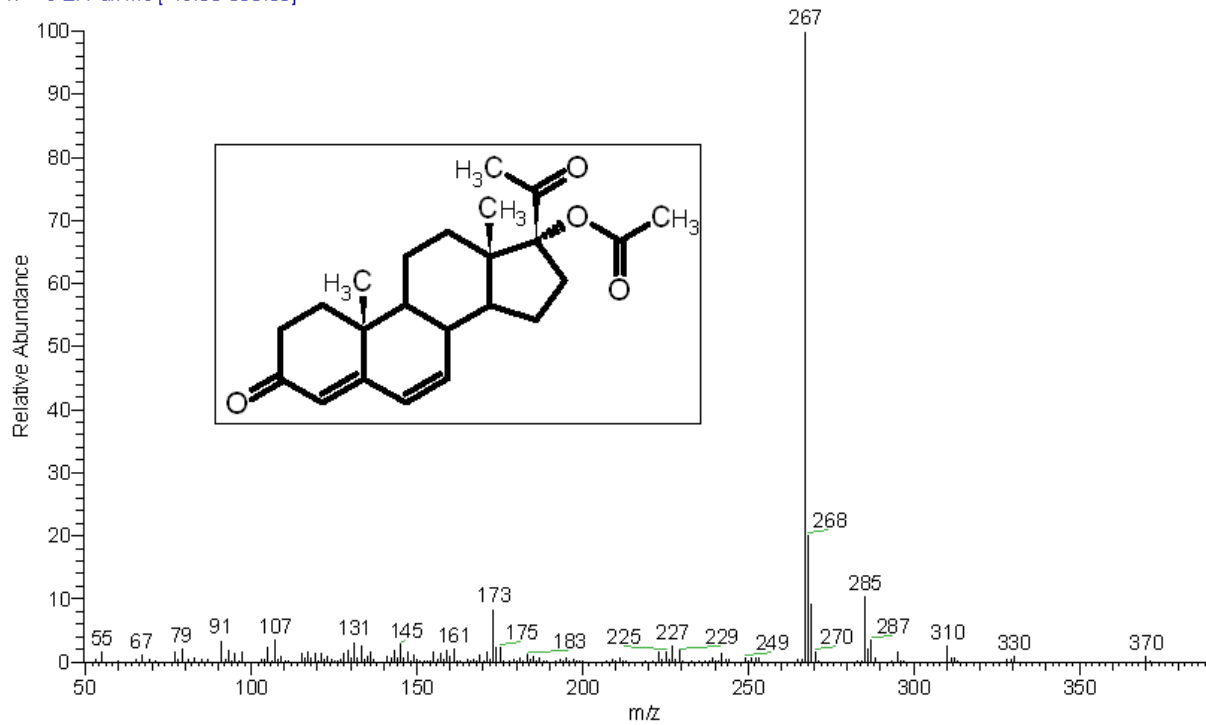


Figura 11.3. Espectro de masas de 17α-acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).

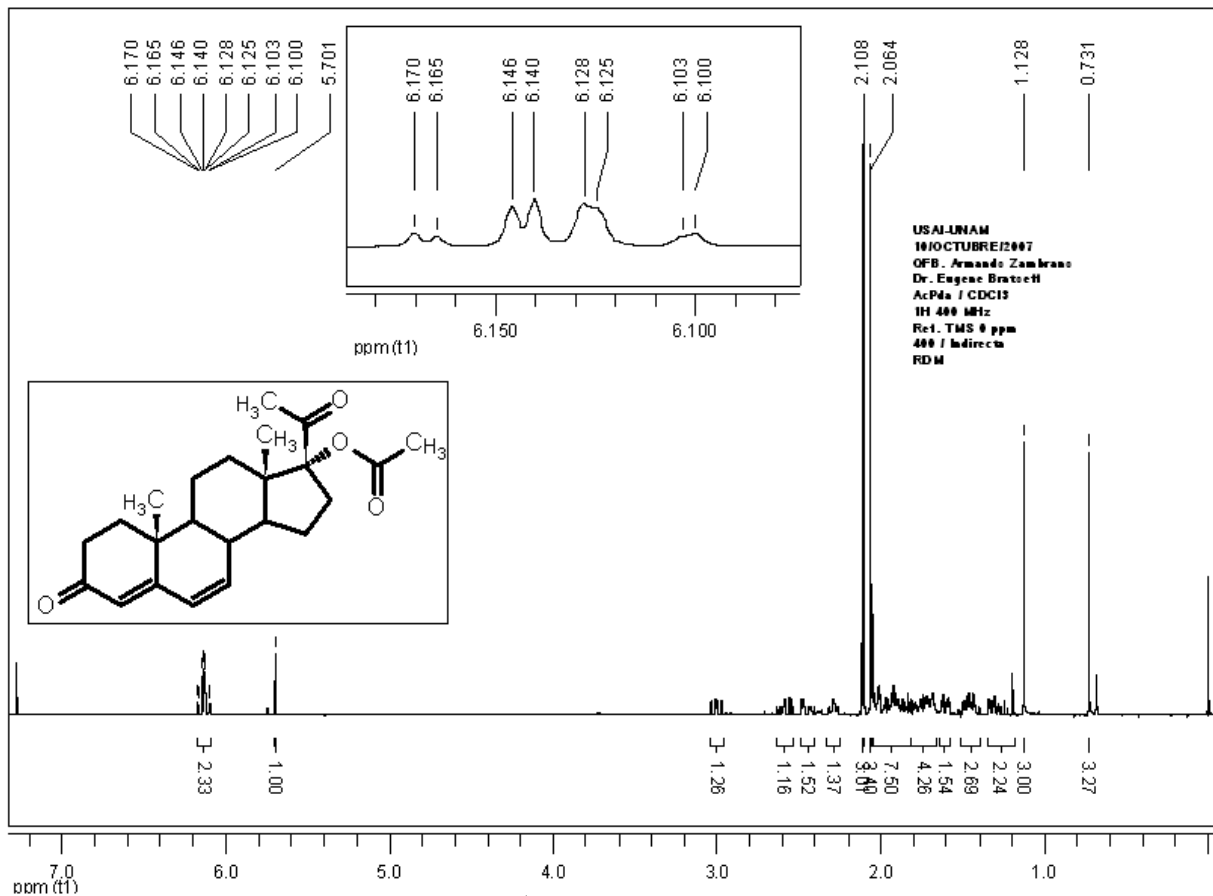


Figura 11.4. Espectro de RMN ¹H de 17α-acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).

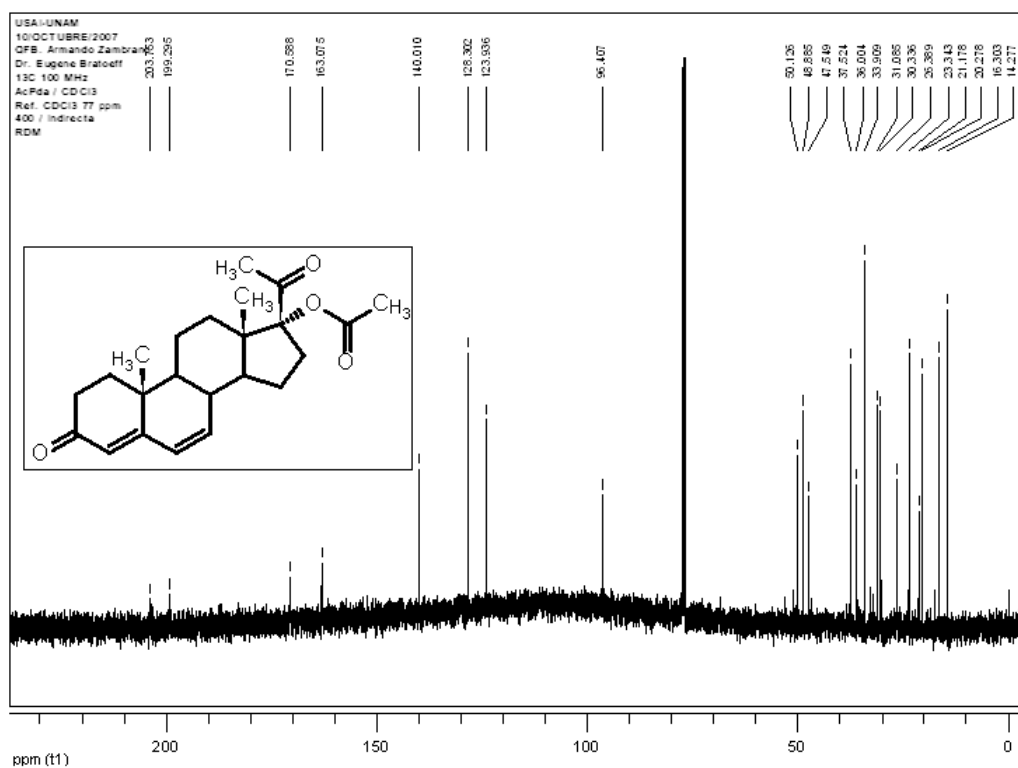


Figura 11.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**2**).

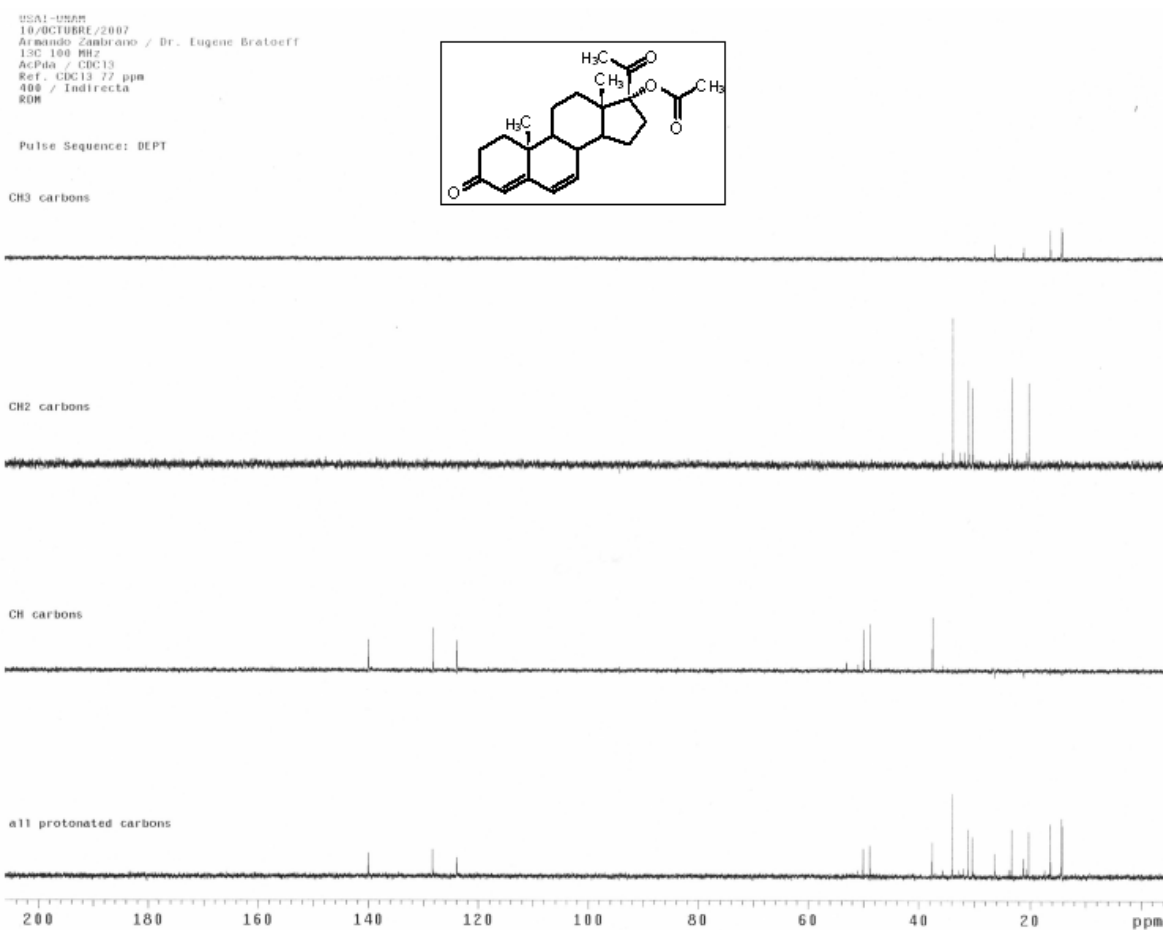


Figura 11.6. Espectro de RMN ^{13}C DEPT de 17α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**2**).

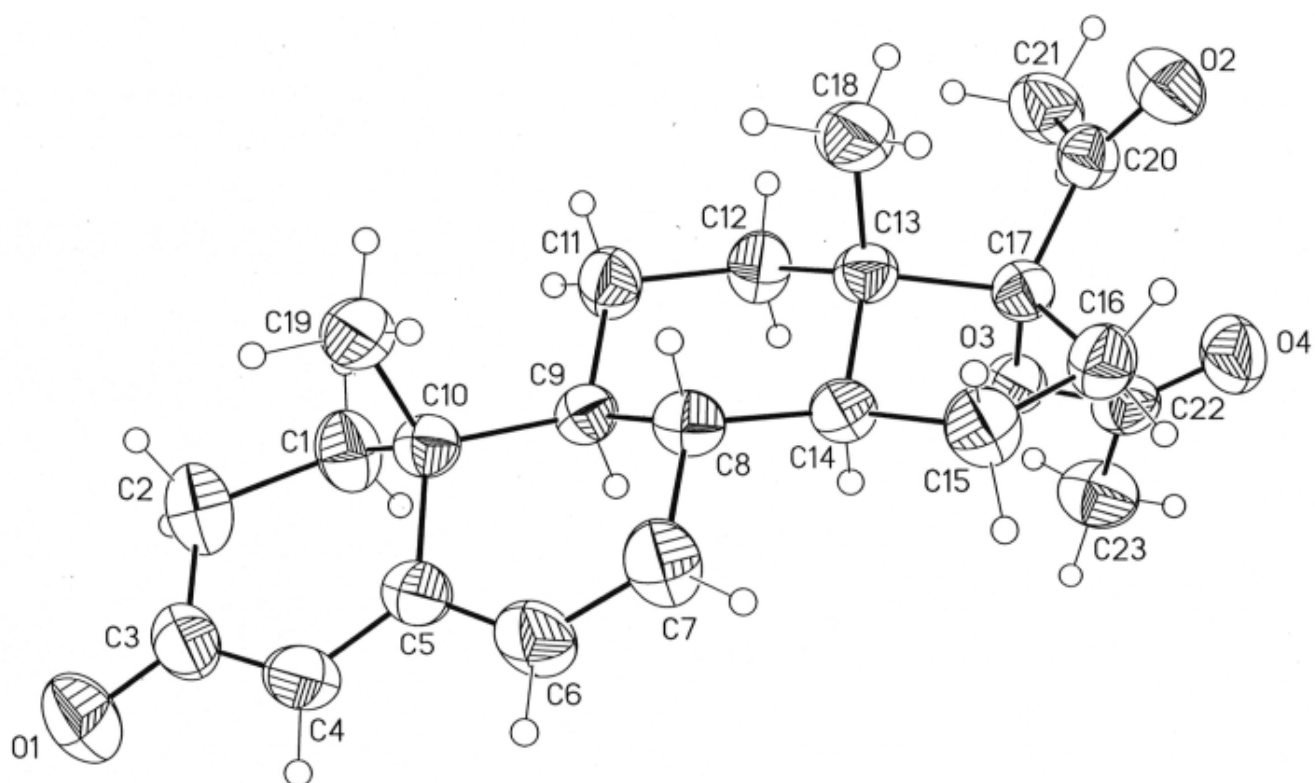


Figura 11.7. Difracción de rayos X de 17 α -acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (2).

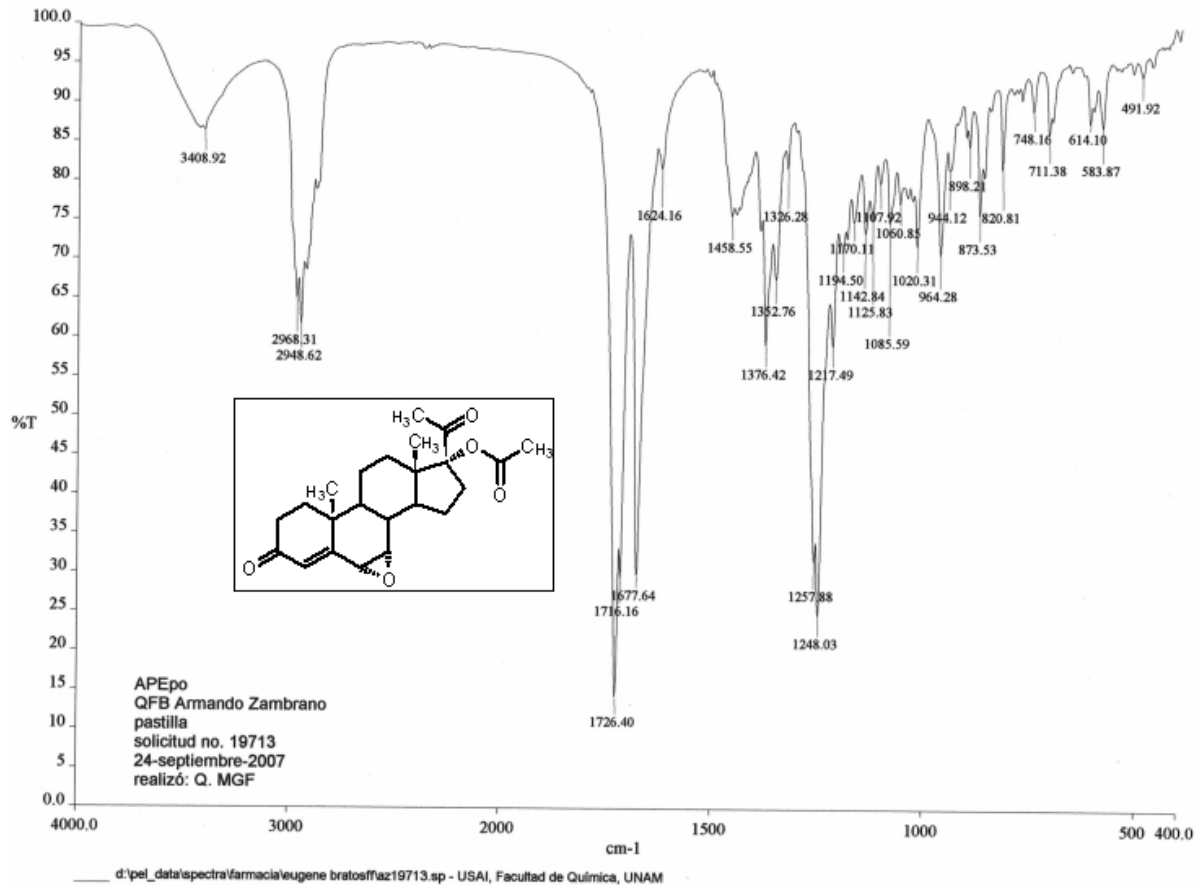


Figura 12.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3).

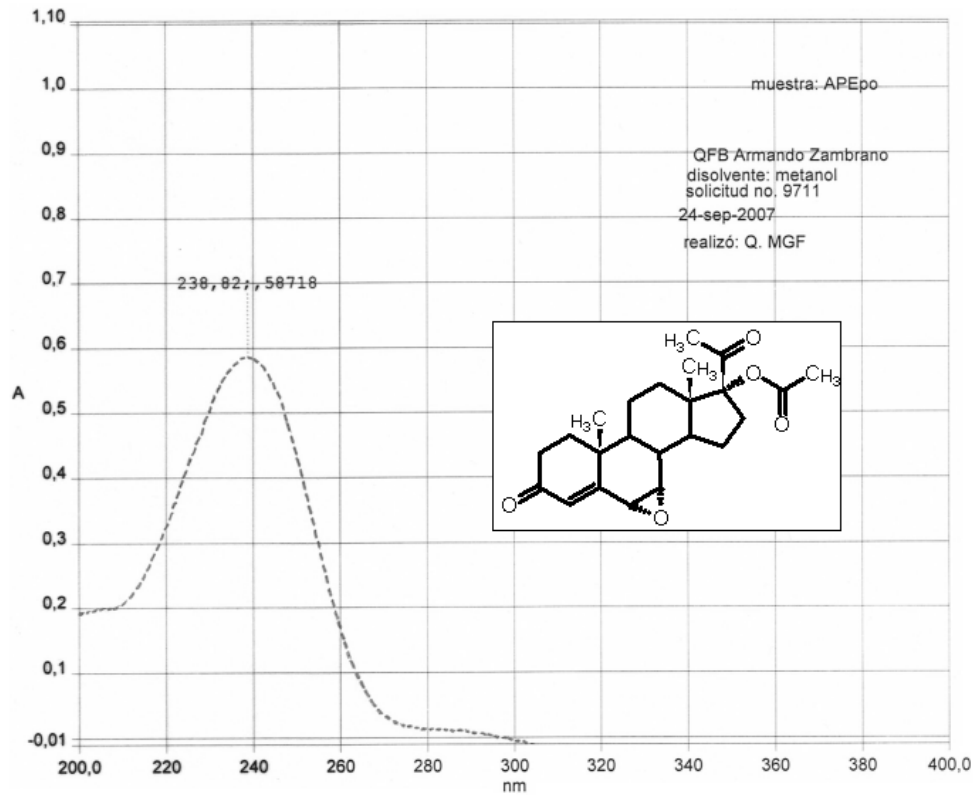


Figura 12.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (3)

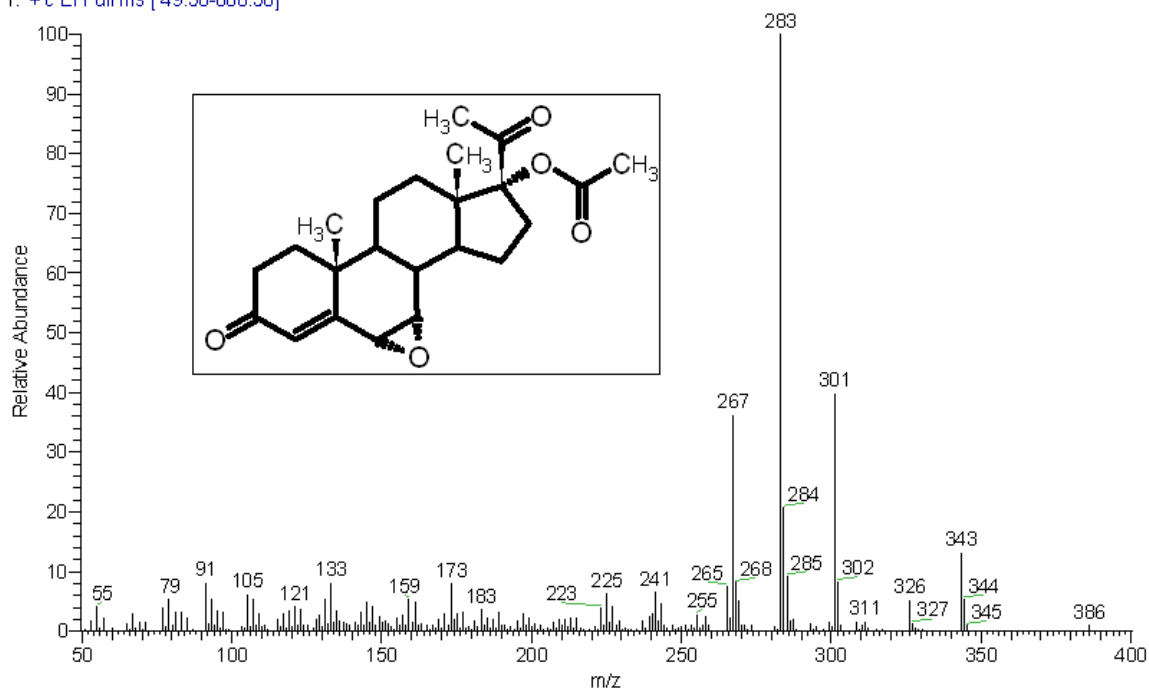
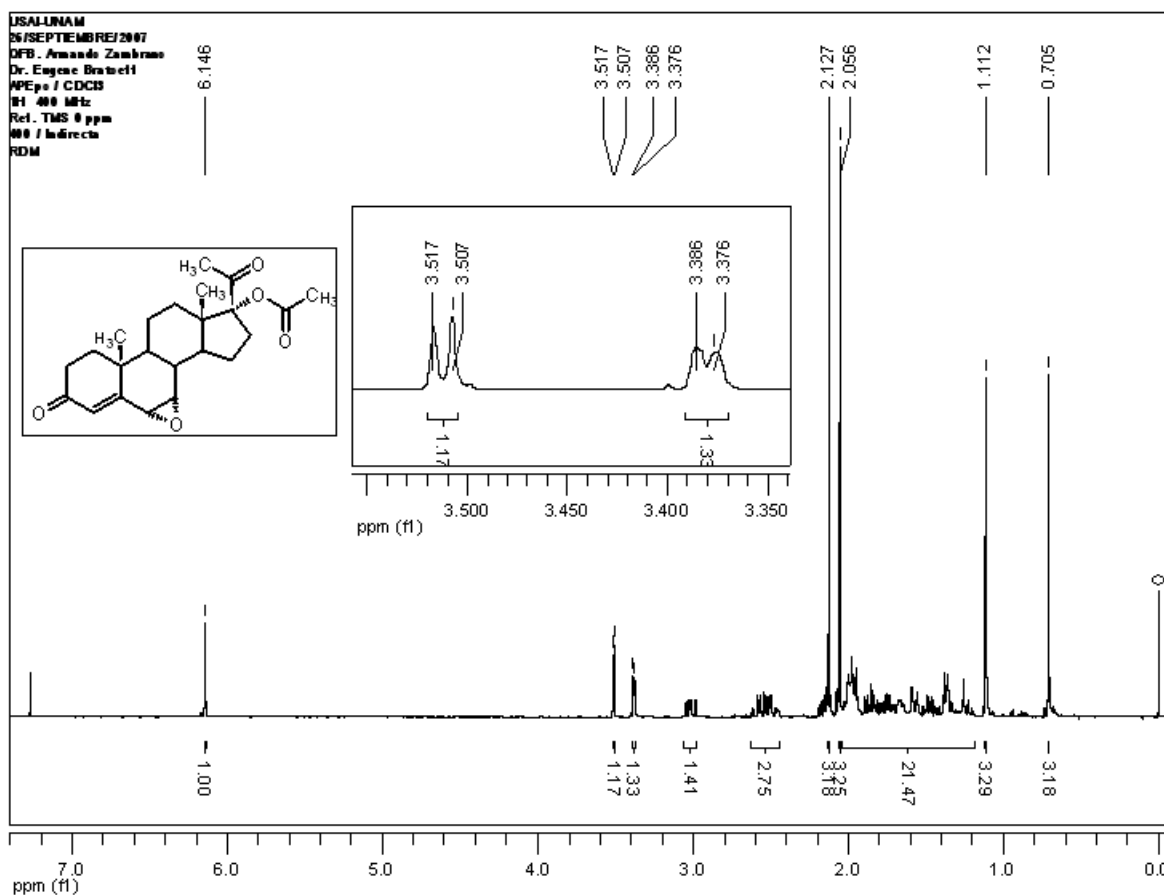
D:\Xcalibur\data\USA\ND\OT672_1

9/24/2007 3:49:57 PM

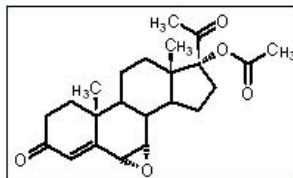
APEPO

OT672 1 #6 RT: 1.03 AV: 1 SB: 3 0.21-0.62 NL: 8.22E6

T: +c EI Full ms [49.50-800.50]

Figura 12.3. Espectro de masas de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**).Figura 12.4. Espectro de RMN ¹H de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**).

USA1-UNAM
26/SEPTIEMBRE/2007
Dr. Eugene Bratoeff / Armando Zambrano
APEpo / CDC13
13C 100 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
400 / Indirecta
RDM



Pulse Sequence: s2pu1

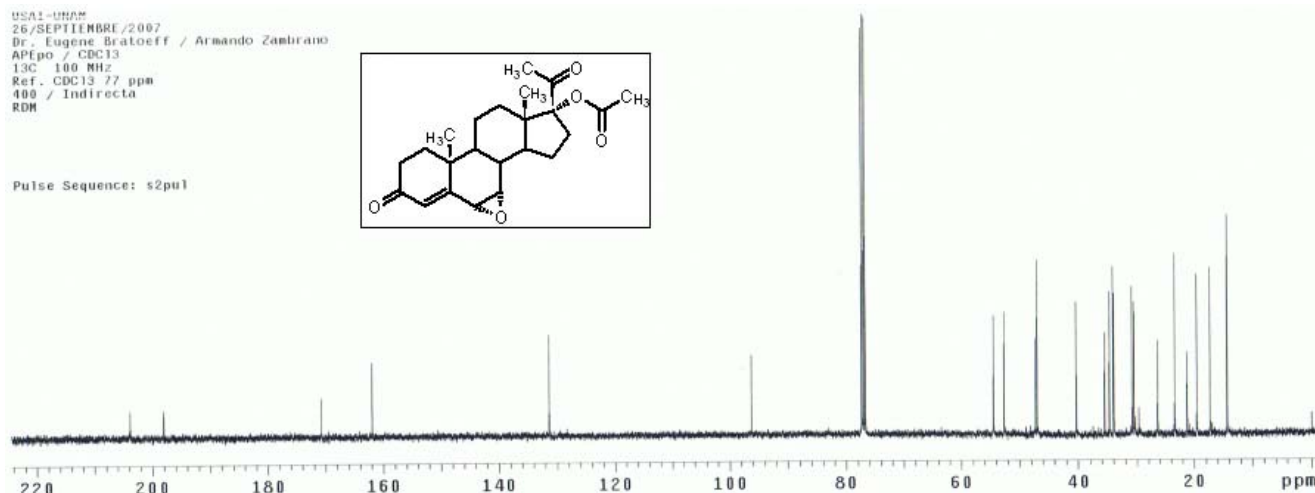


Figura 12.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**).

USA1-UNAM
26/SEPTIEMBRE/2007
Dr. Eugene Bratoeff / Armando Zambrano
APEpo / CDC13
13C 100 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
400 / Indirecta
RDM

Pulse Sequence: DEPT

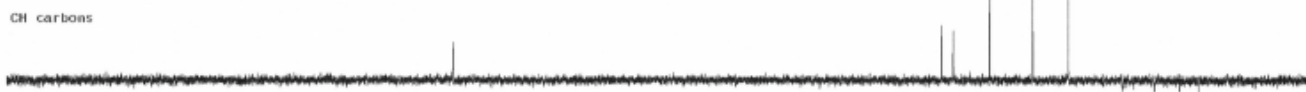
CH3 carbons



CH2 carbons



CH carbons



all protonated carbons

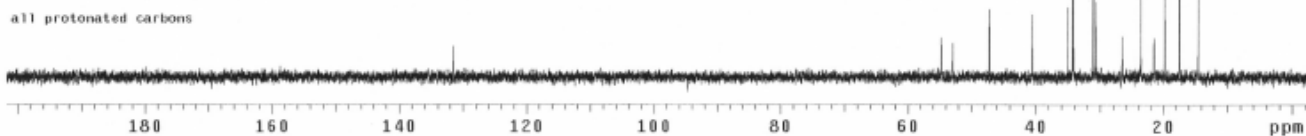


Figura 12.6. Espectro de RMN ^{13}C DEPT de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**).

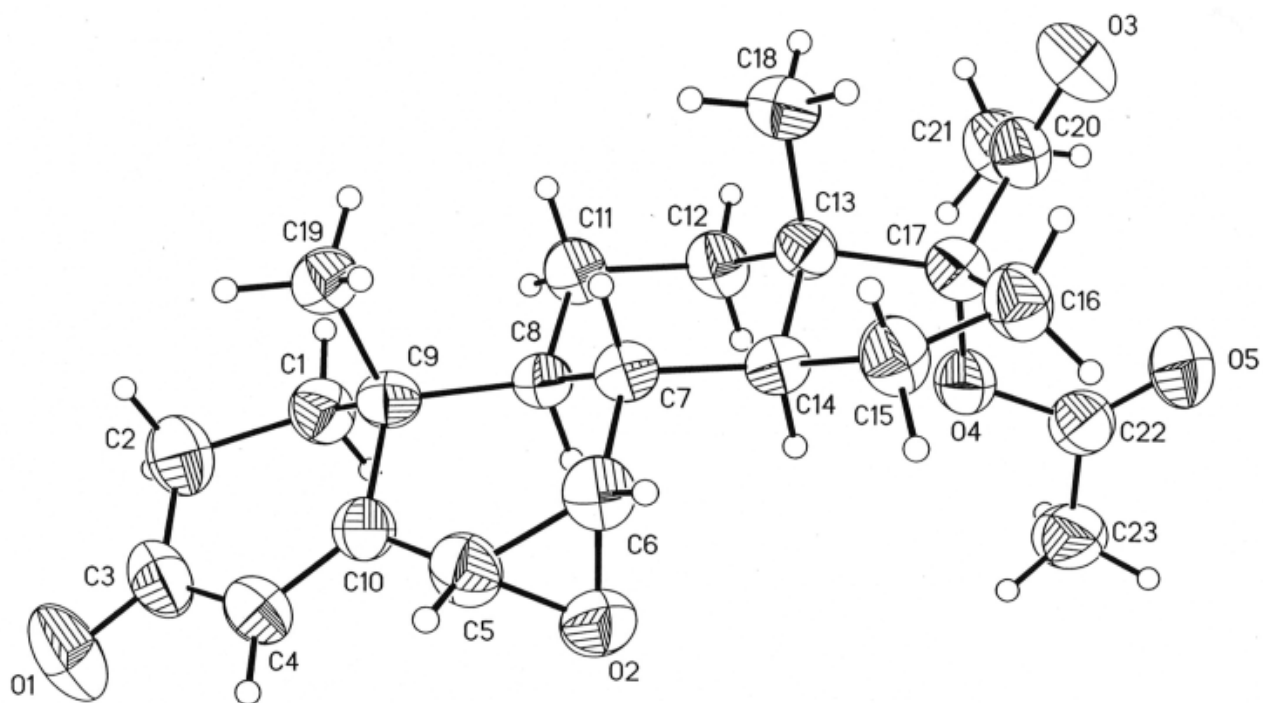


Figura 12.7. Difracción de rayos X de 17 α -acetoxi-6,7 α -epoxi-4-pregnen-3,20-diona (**3**).

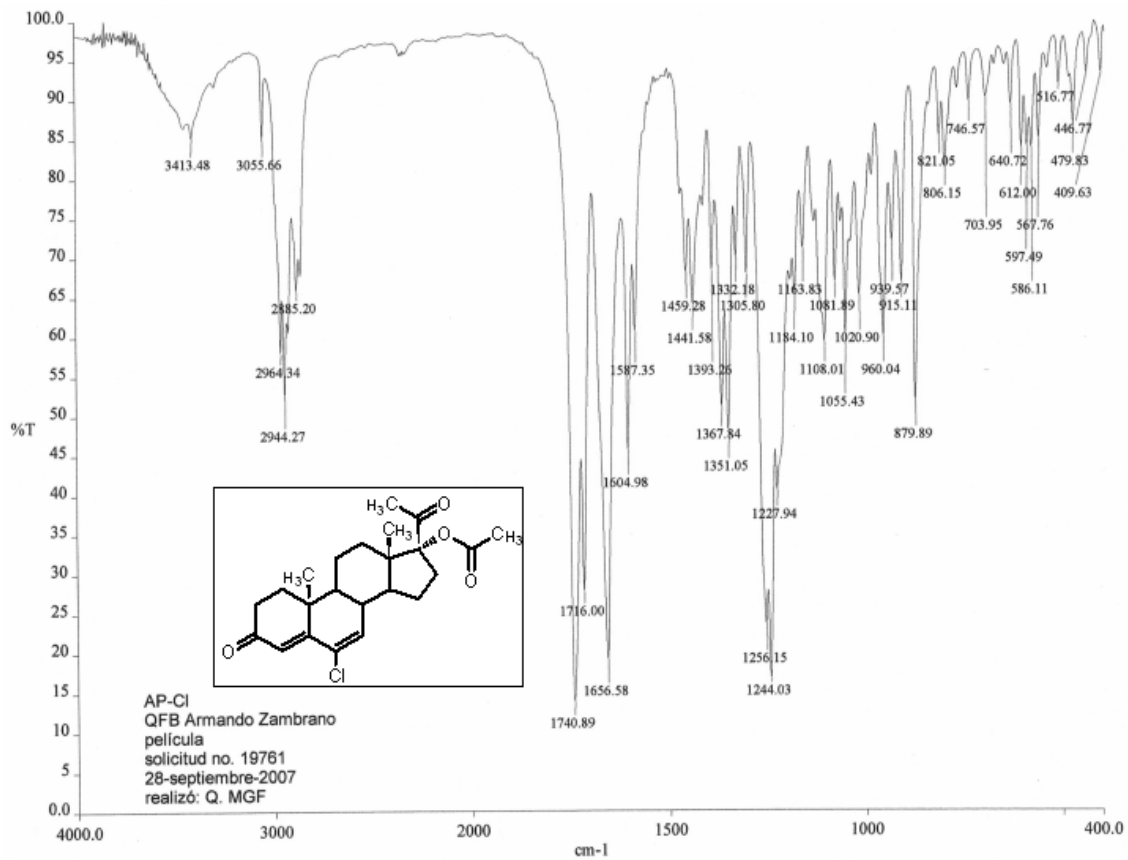


Figura 13.1. Espectro de IR de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).

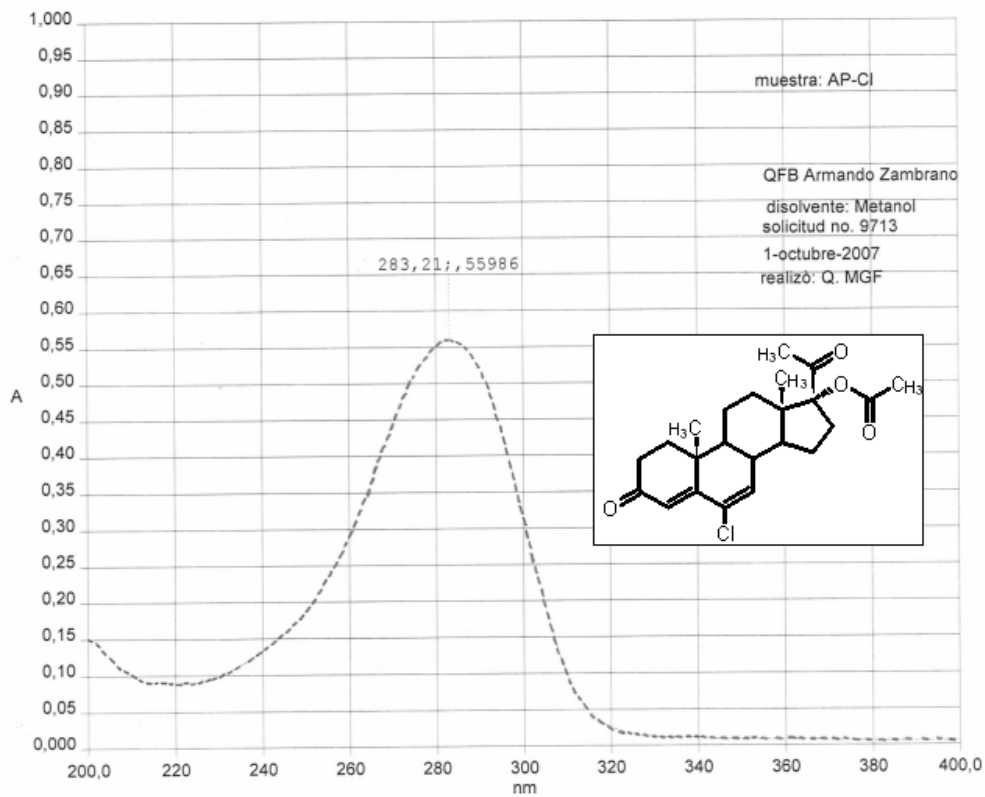


Figura 13.2. Espectro de UV de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).

D:\Xcalibur\data\USAIN\OT684_1

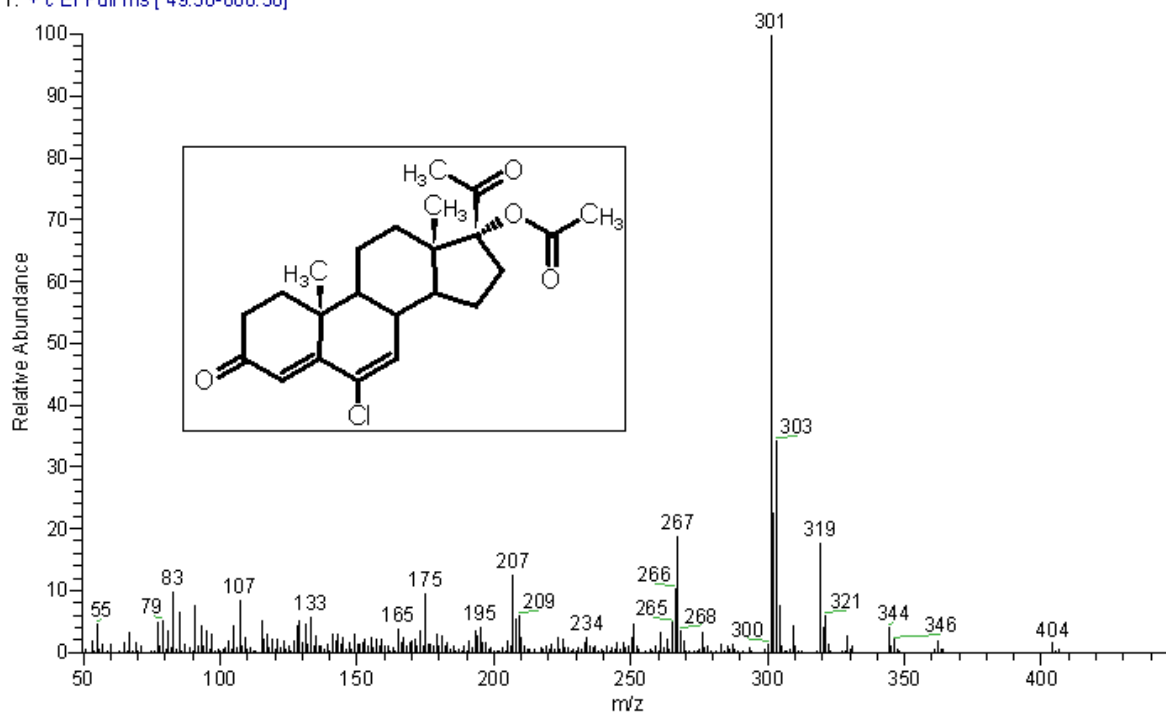
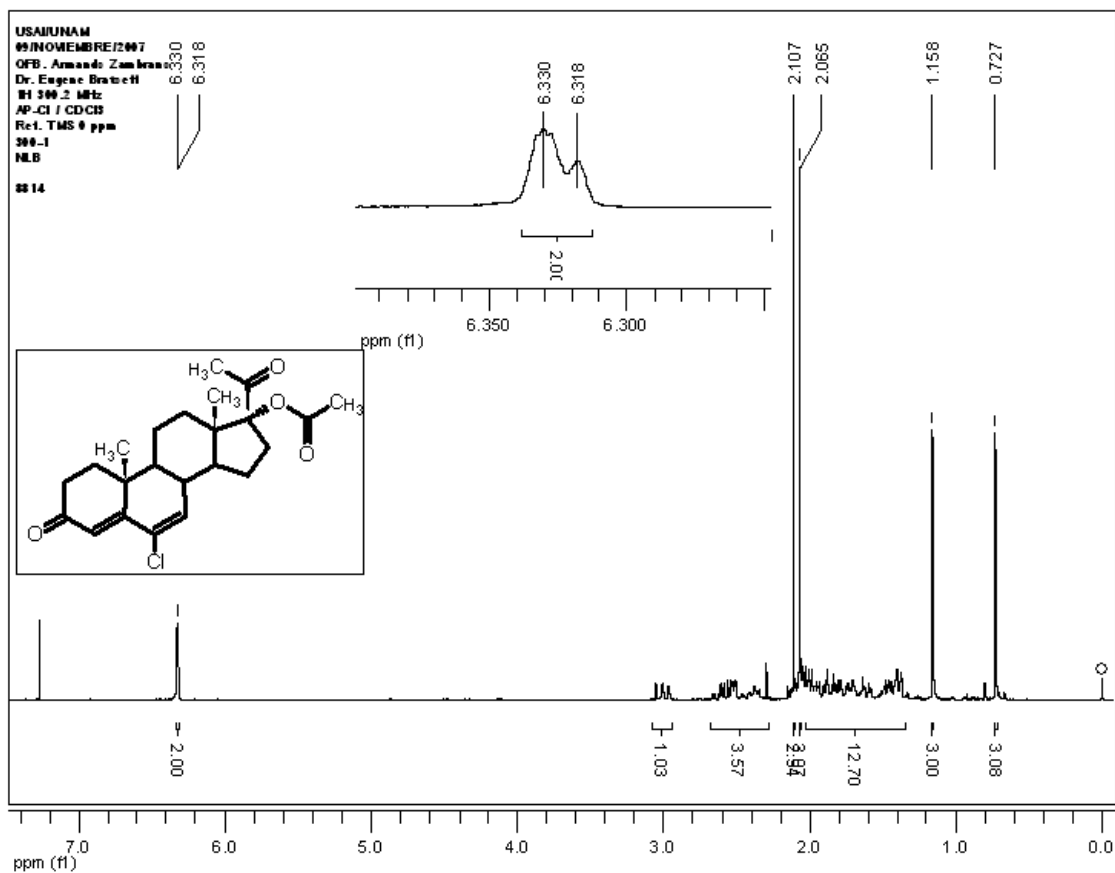
9/25/2007 3:51:29 PM

AP-CL

szComment

OT684_1 #6-7 RT: 1.03-1.23 AV: 2 NL: 1.16E7

T: + c EI Full ms [49.50-800.50]

Figura 13.3. Espectro de masas de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).Figura 13.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).

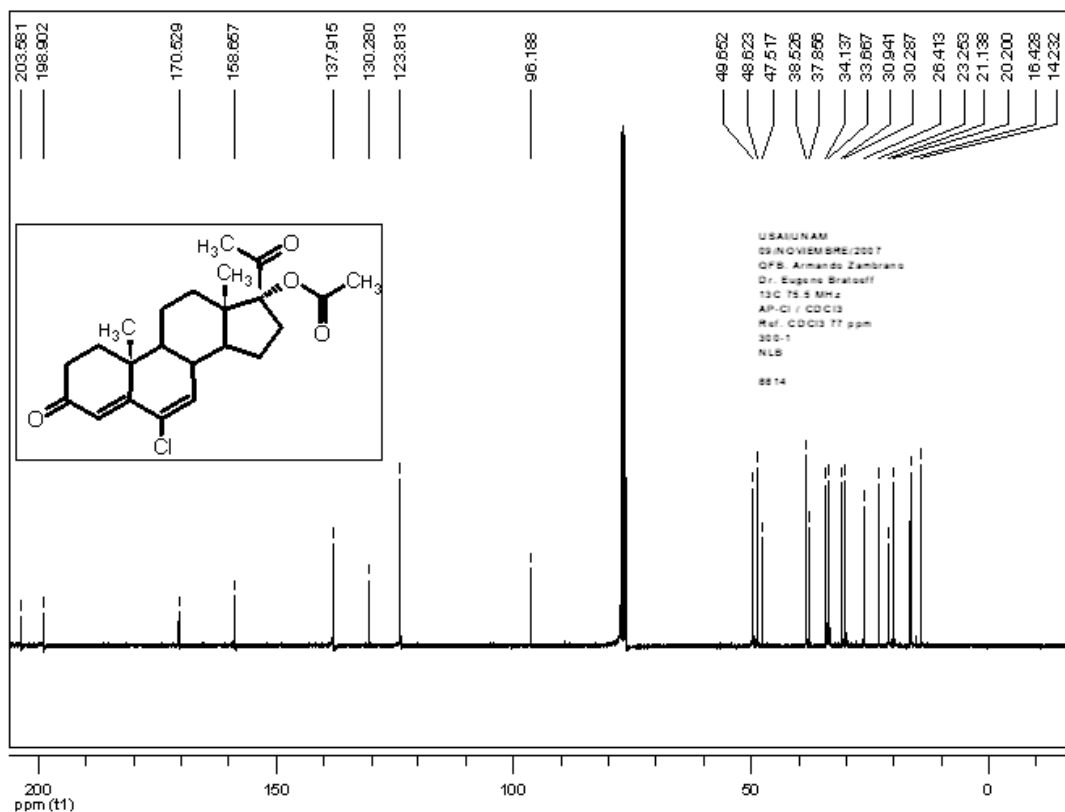


Figura 13.5. Espectro de RMN ¹³C de 17α-acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).

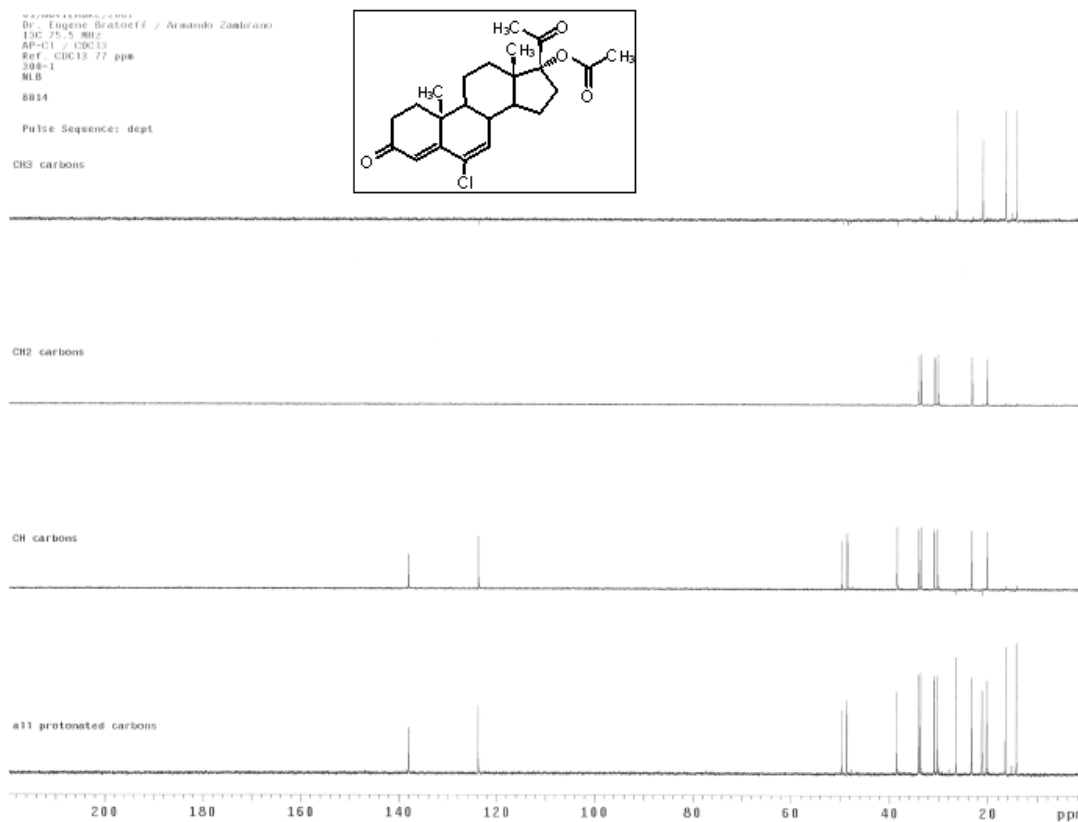


Figura 13.6. Espectro de RMN ¹³C DEPT de 17α-acetoxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (4).

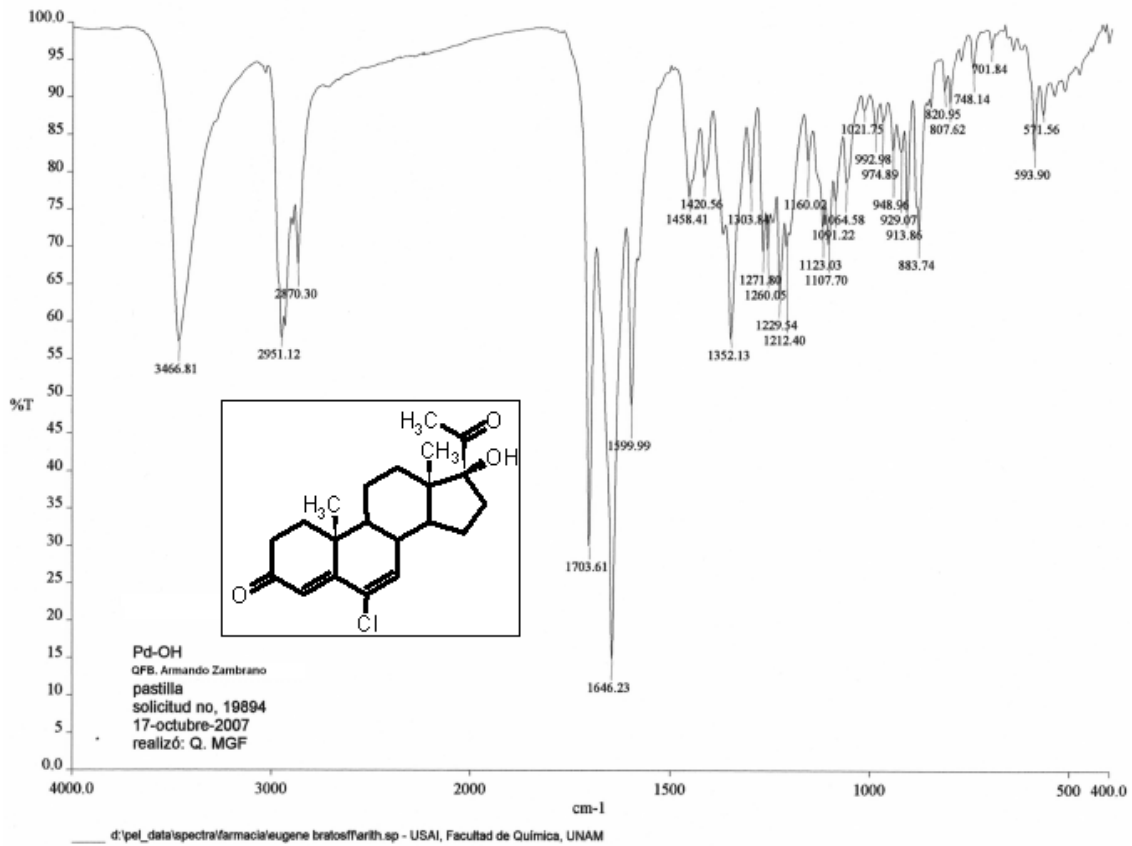


Figura 14.1. Espectro de IR de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).

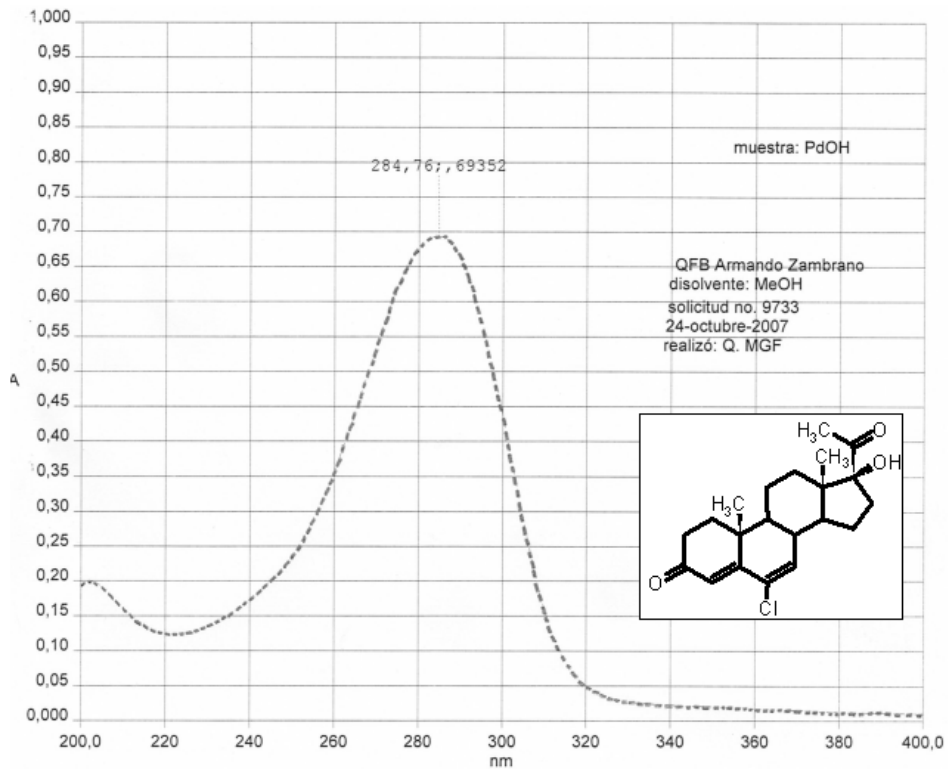


Figura 14.2. Espectro de UV de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).

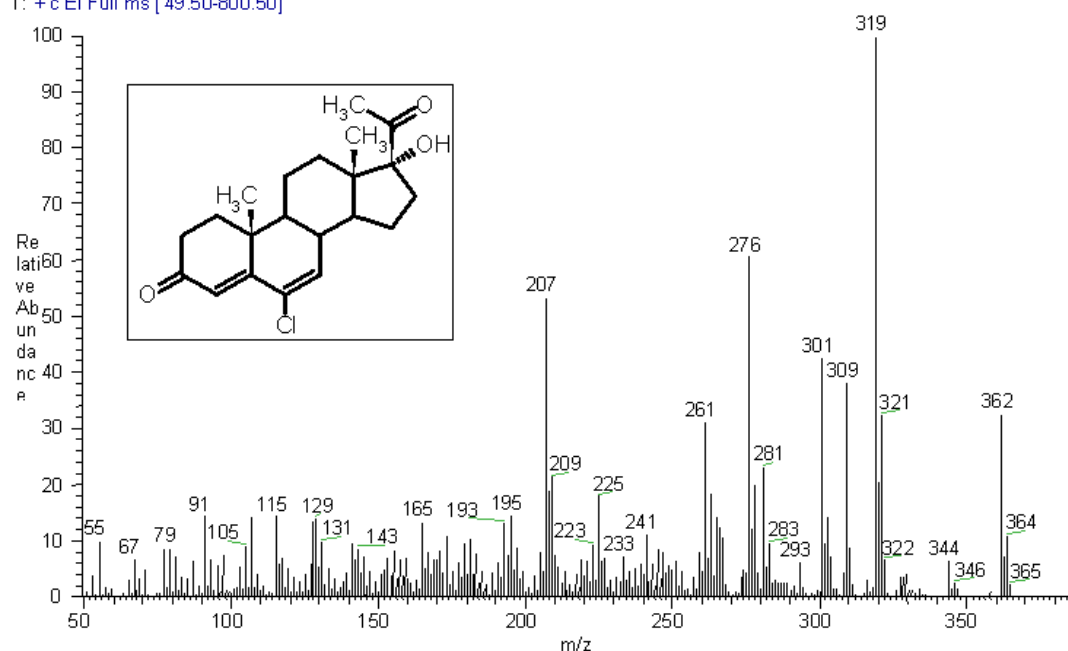
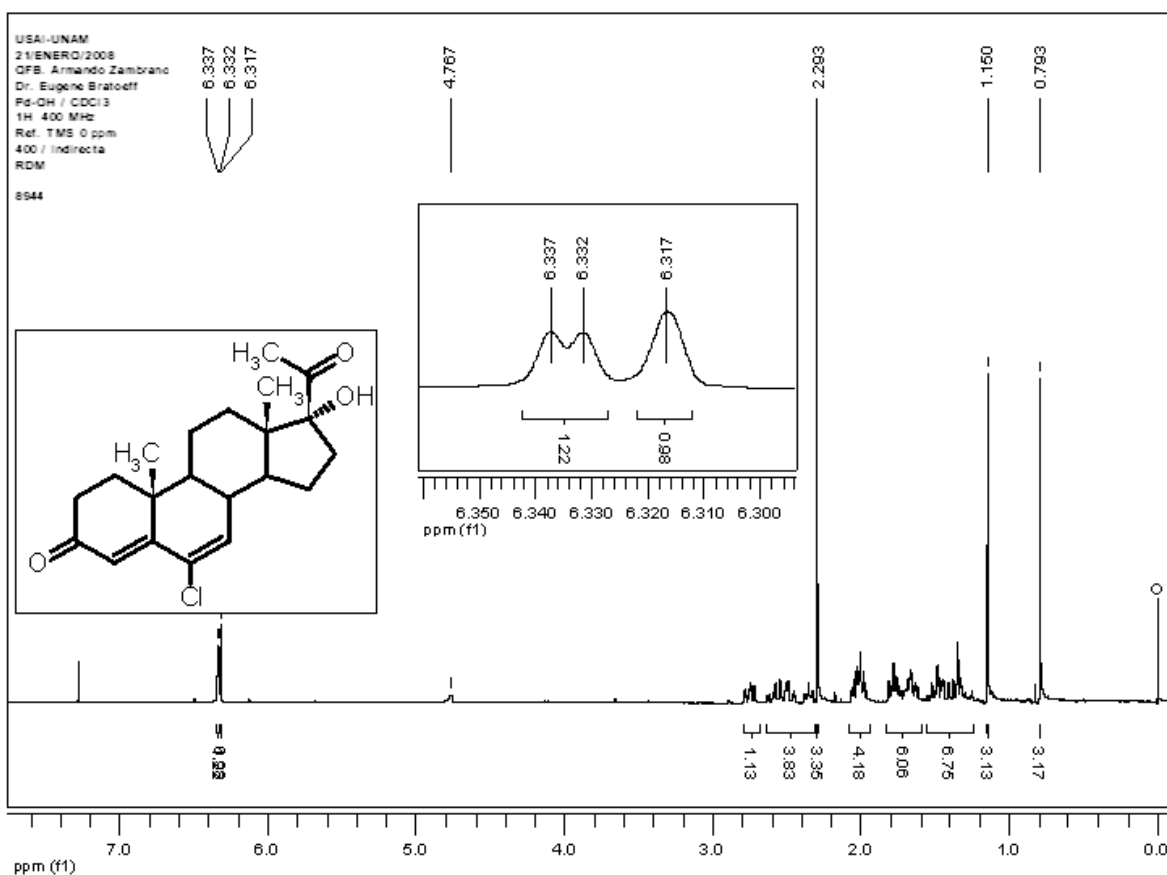
D:\Xcalibur\data\USAIND\OT790_1

10/12/2007 6:52:15 PM

PD-OH

OT790_1#6 RT: 1.03 AV: 1 NL: 1.36E7

T: +c EI Full ms [49.50-800.50]

Figura 14.3. Espectro de masas de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).Figura 14.4. Espectro de RMN ¹H de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).

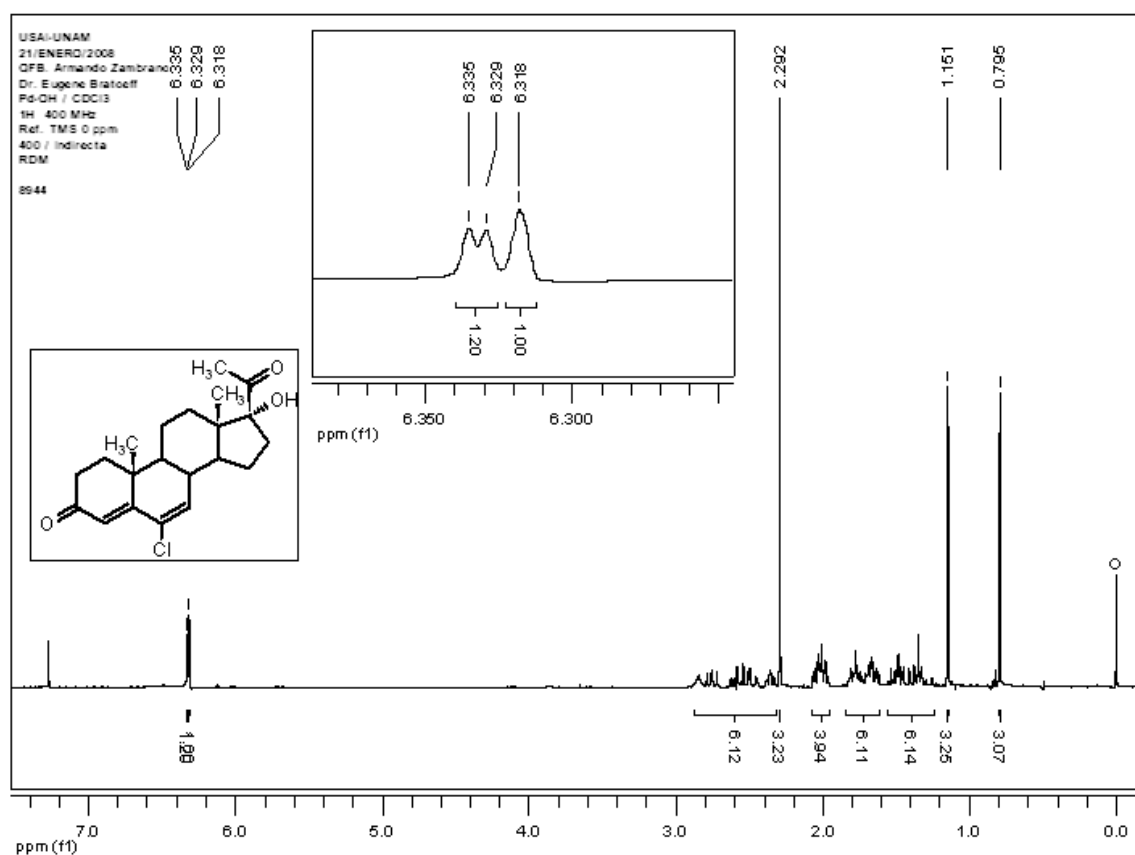


Figura 14.5. Espectro de RMN ¹H de 6-cloro-17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (Intercambio con D₂O) (5).

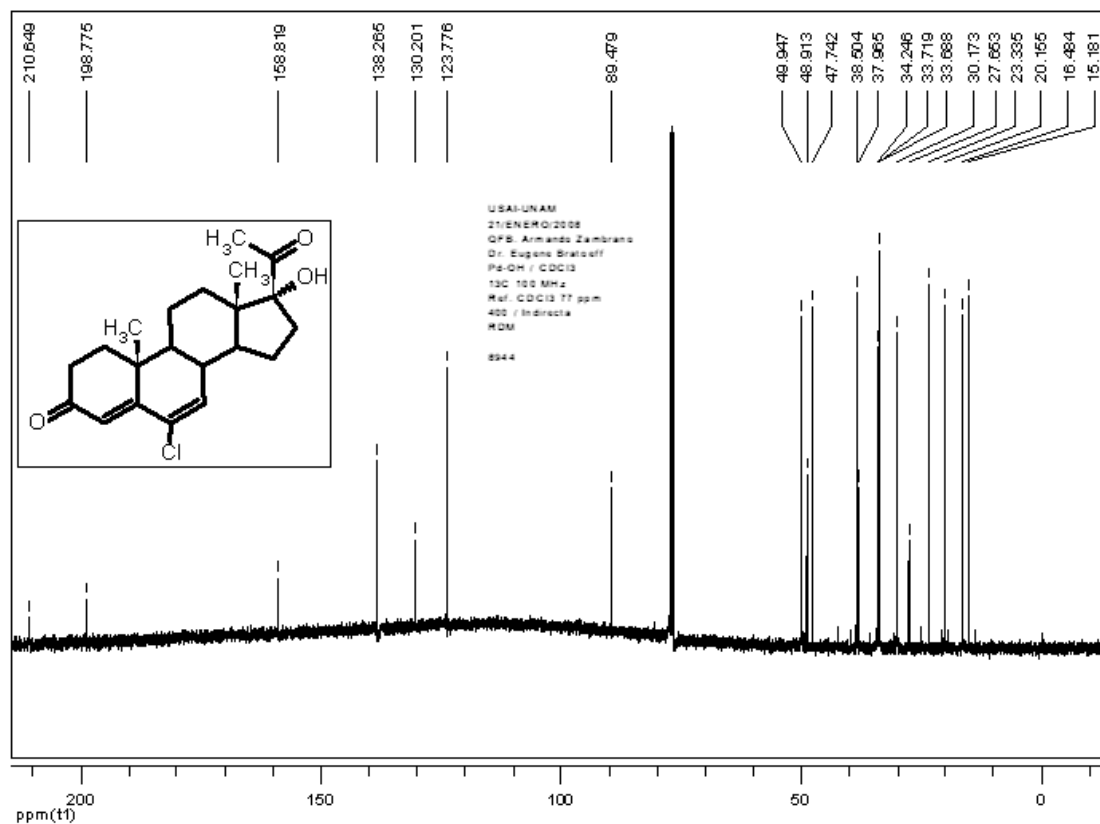


Figura 14.6. Espectro de RMN ¹³C de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).

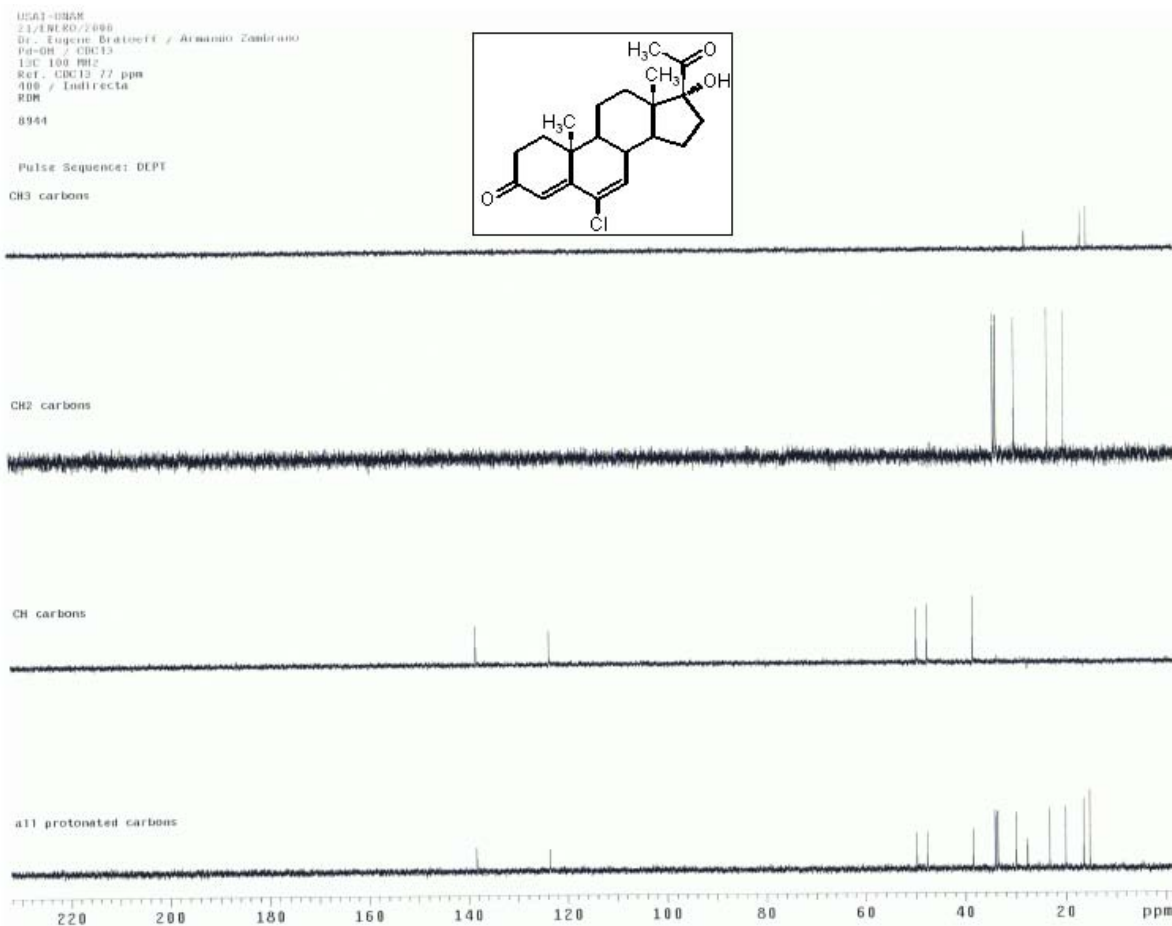


Figura 14.7. Espectro de RMN ¹³C DEPT de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5)

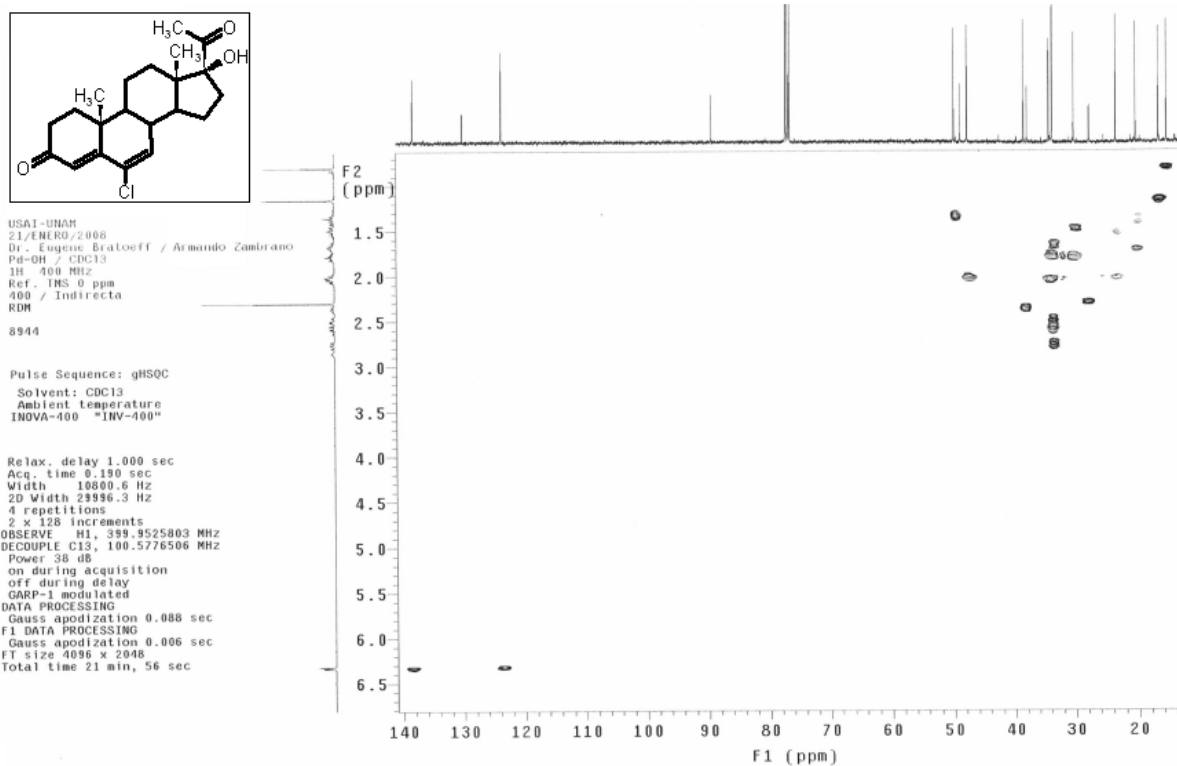


Figura 14.8. Espectro de RMN HSQC de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).

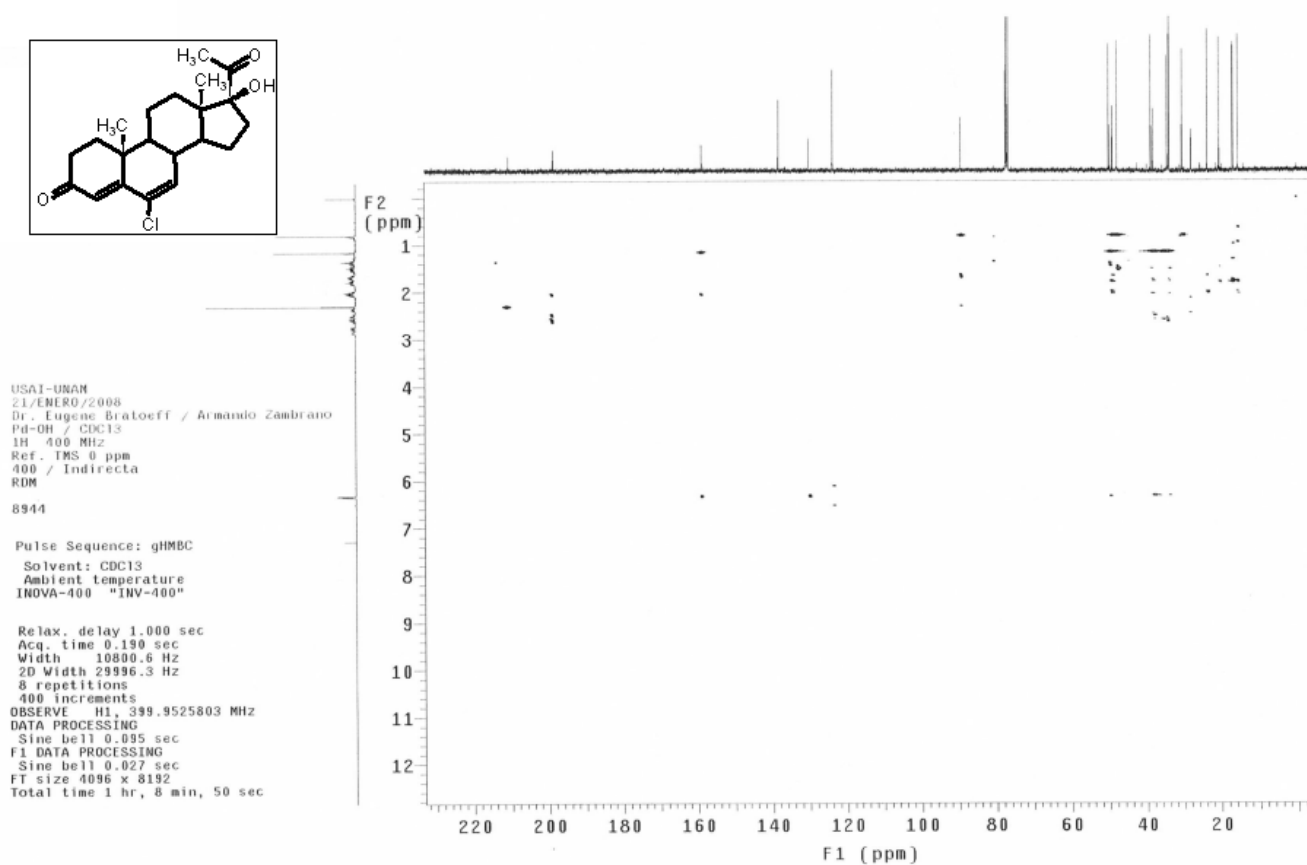
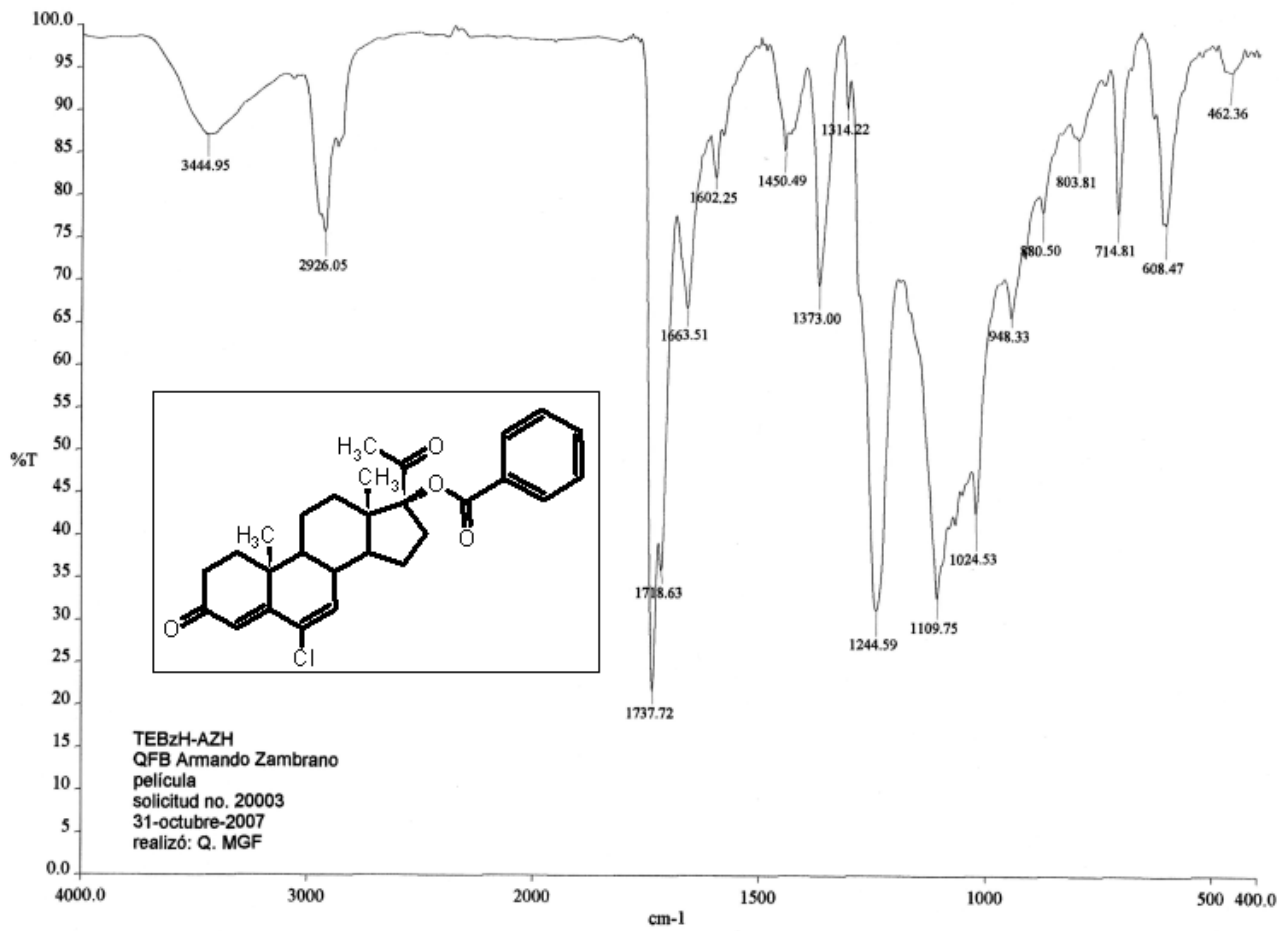


Figura 14.9. Espectro de RMN HMBC de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (5).



g:\espectros rx1\az20003.sp - USAI, Facultad de Química, UNAM

Figura 15.1. Espectro de IR de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).

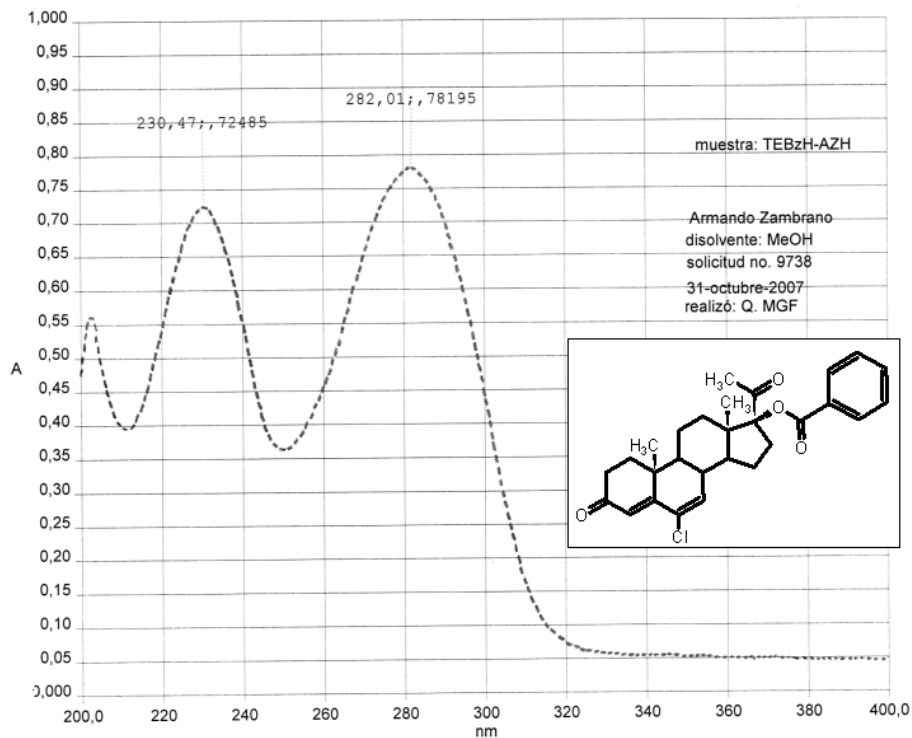


Figura 15.2. Espectro de UV de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).

D:\Xcalibur\data\USA\INDOT1139_1

1/24/2008 1:48:32 PM

EBZ-AZH

OT1139 1 #7-10 RT: 1.23-1.85 AV: 4 NL: 7.44E7

T: +c EI Full ms [49.50-800.50]

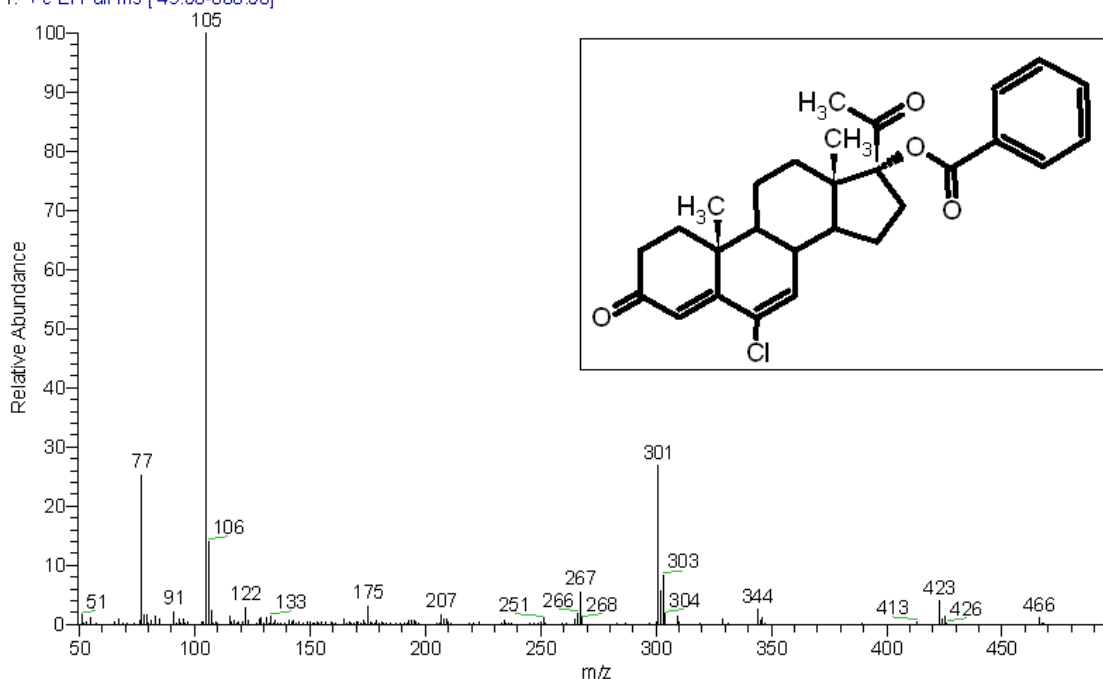


Figura 15.3. Espectro de masas de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6a**).

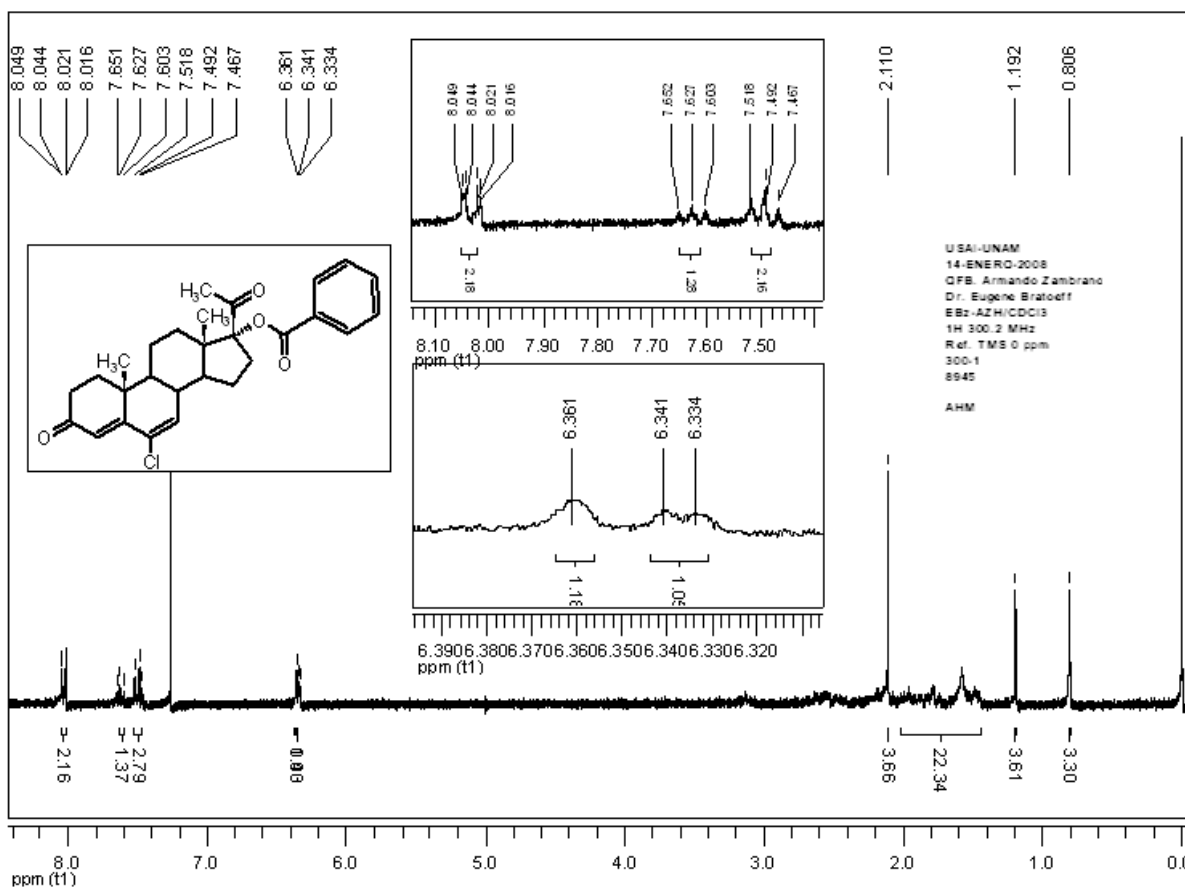


Figura 15.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6a**).

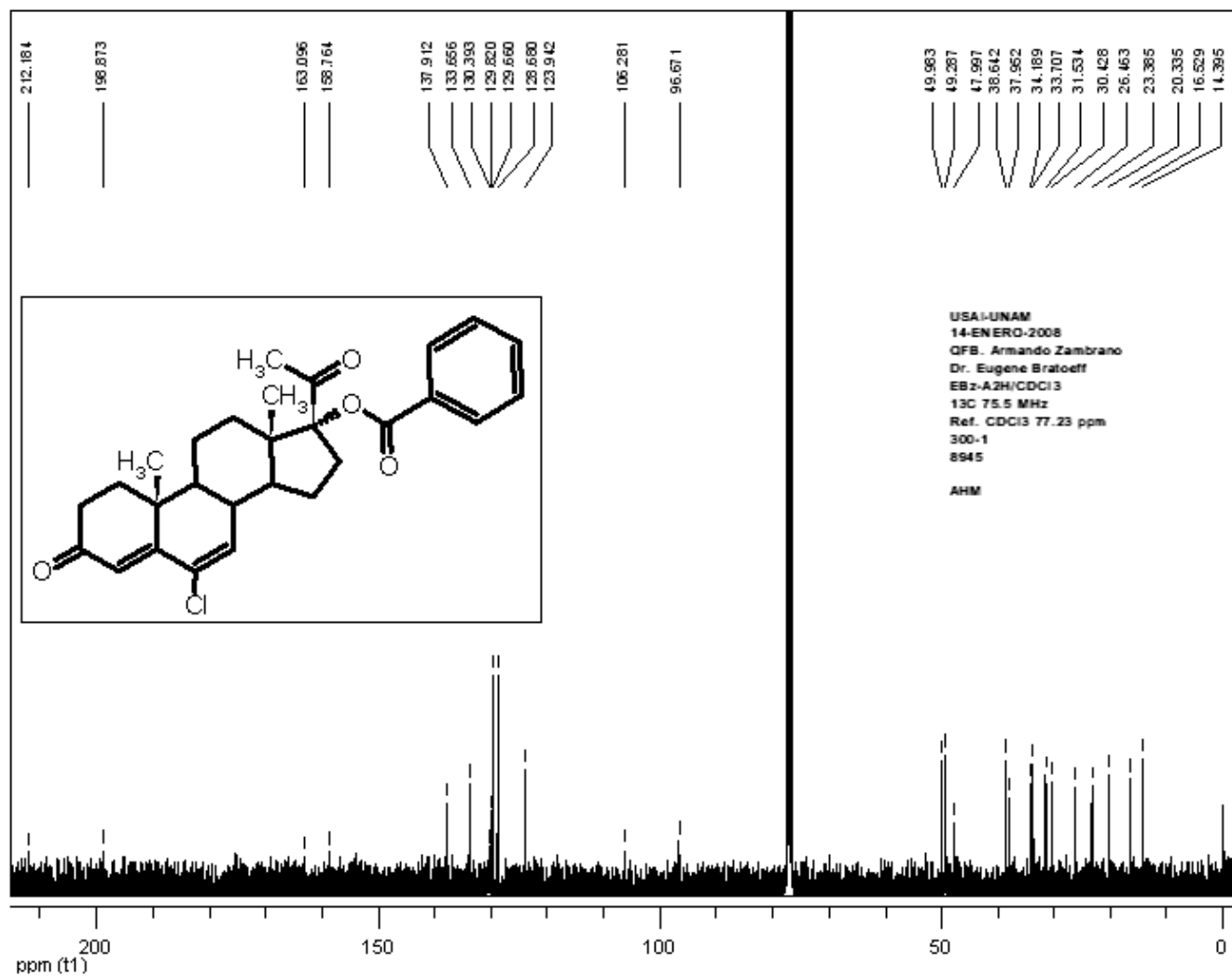
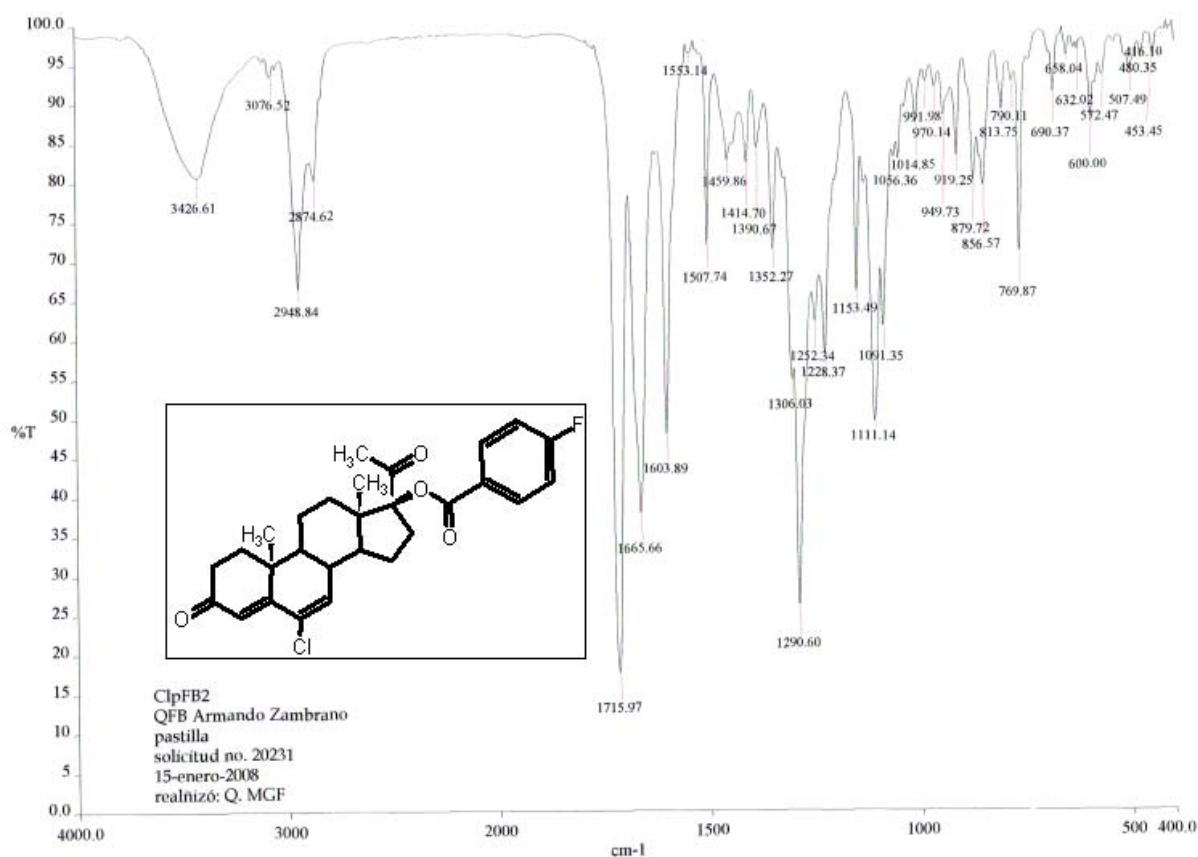


Figura 15.5. Espectro de RMN ¹³C de 17 α -benzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (6a).



d:\pel_data\spectra\farmacia\eugene bratof\az20231.sp - USAI, Facultad de Química, UNAM

Figura 16.1. Espectro de IR de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6b**).

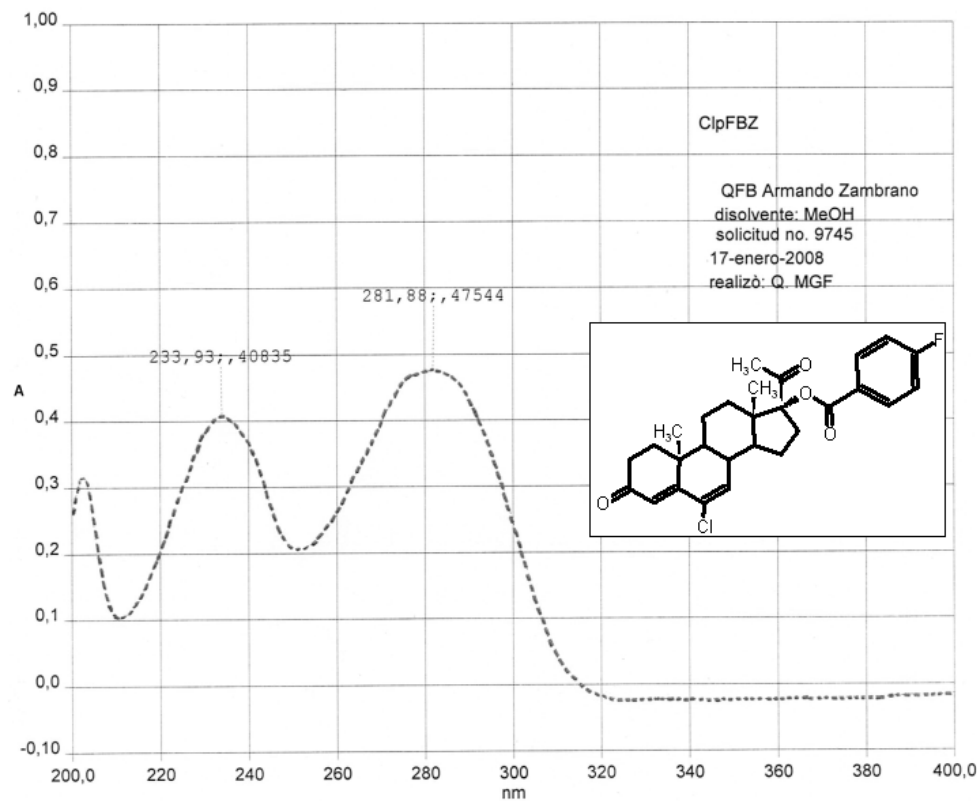
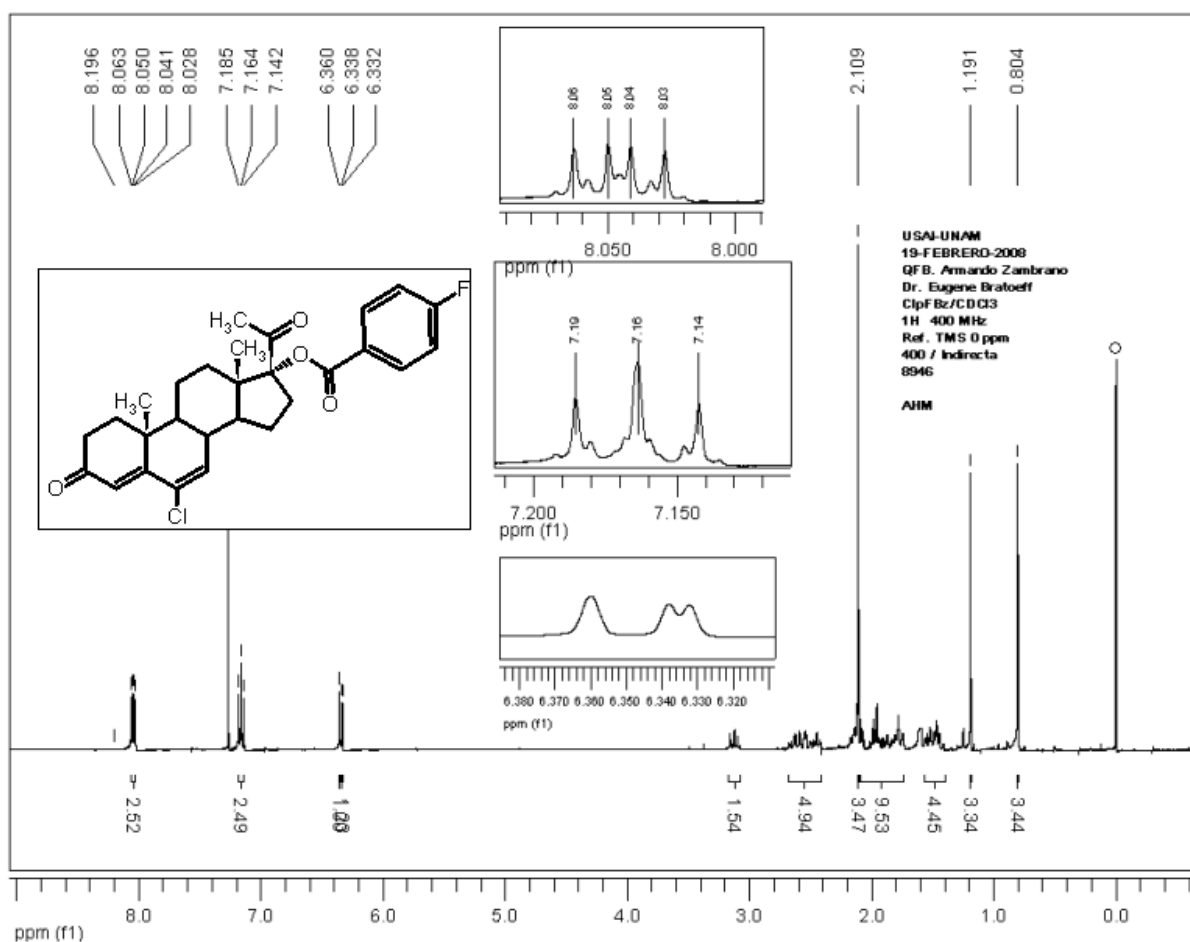
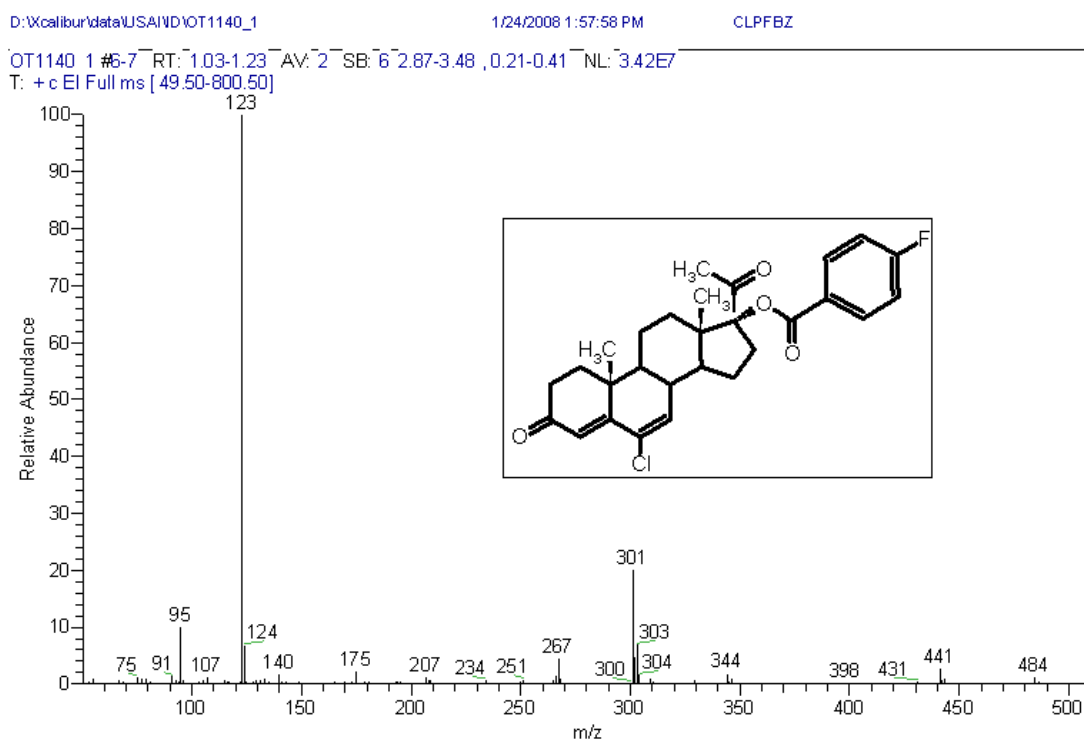


Figura 16.2. Espectro de UV de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6b**).



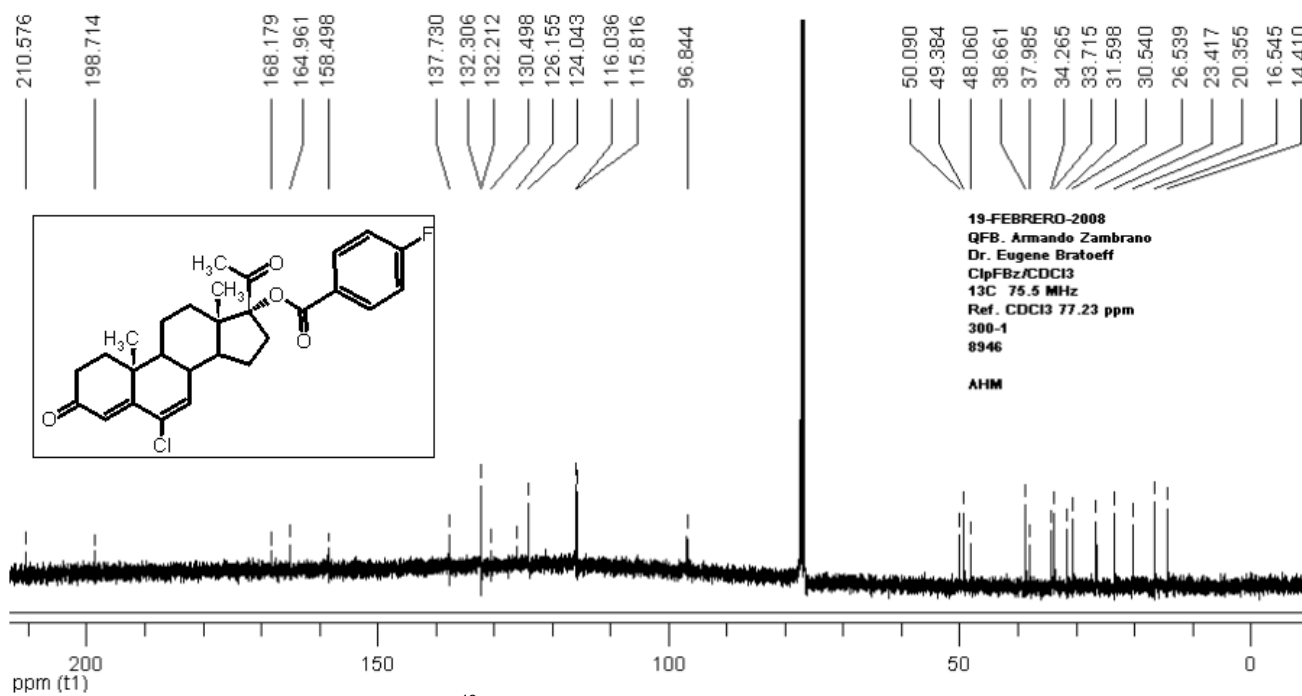
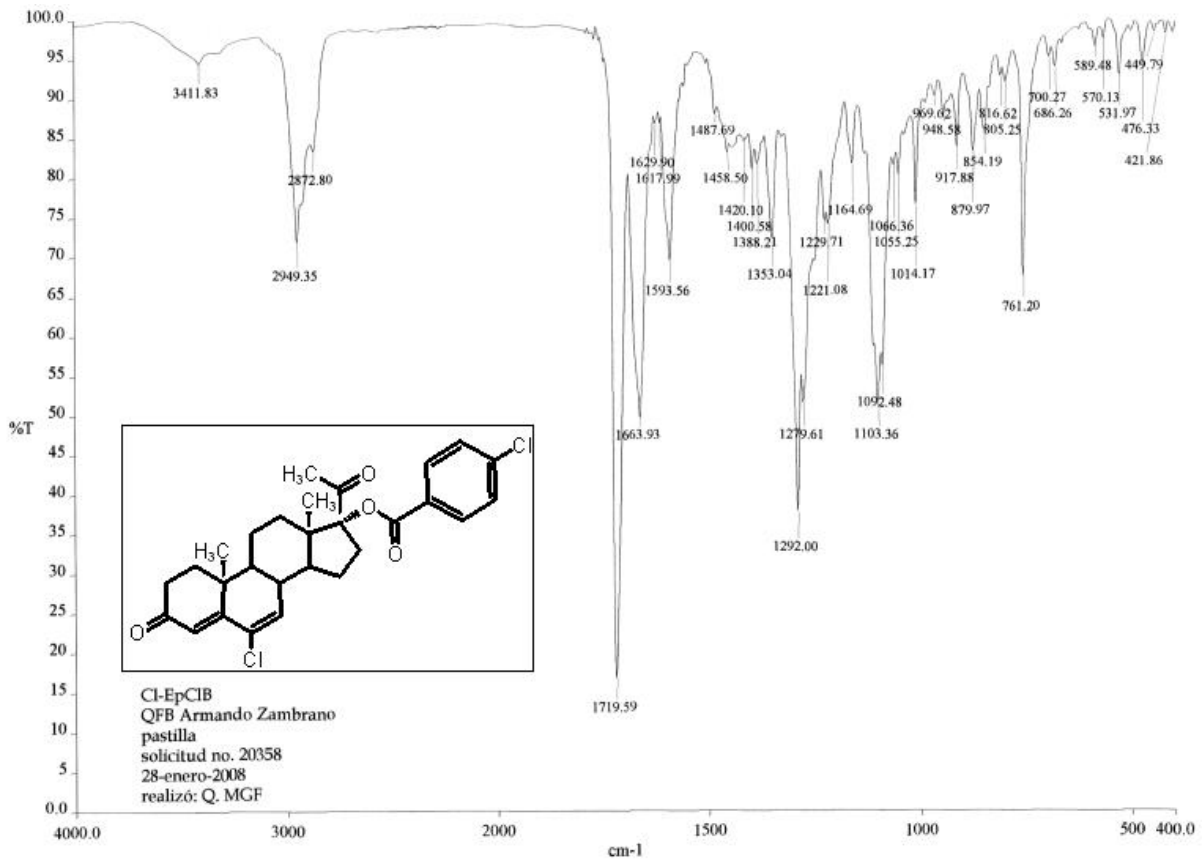


Figura 16.5. Espectro de RMN ^{13}C de 6-cloro-17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6b).



d:\pel_data\spectra\farmacia\eugene bratosff\az20358.sp - USAI, Facultad de Química, UNAM

Figura 17.1. Espectro de IR de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).

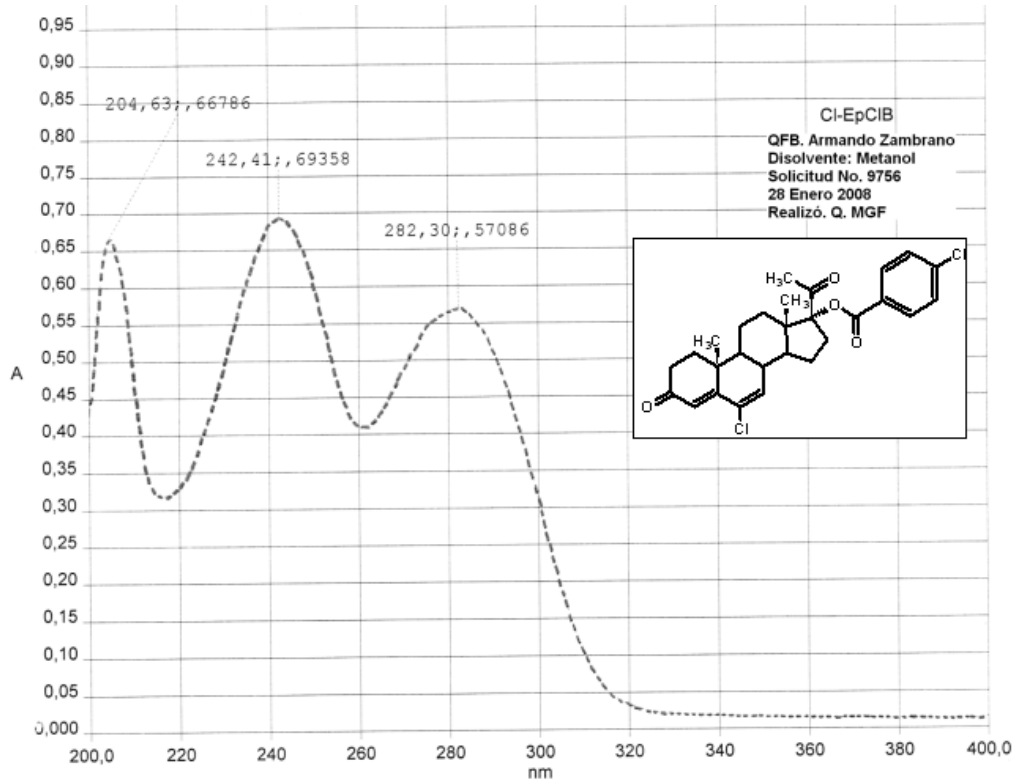


Figura 17.2. Espectro de UV de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (6c).

D:\xcalibur\data\USA\IND\OT1141_1

1/24/2008 2:06:35 PM

CLEPCLB

OT1141_1 #13 RT: 2.46 AV: 1 SB: 5 3.28-3.48 , 1.03-1.44 NL: 1.69E6

T: +c EI Full ms [49.50-800.50]

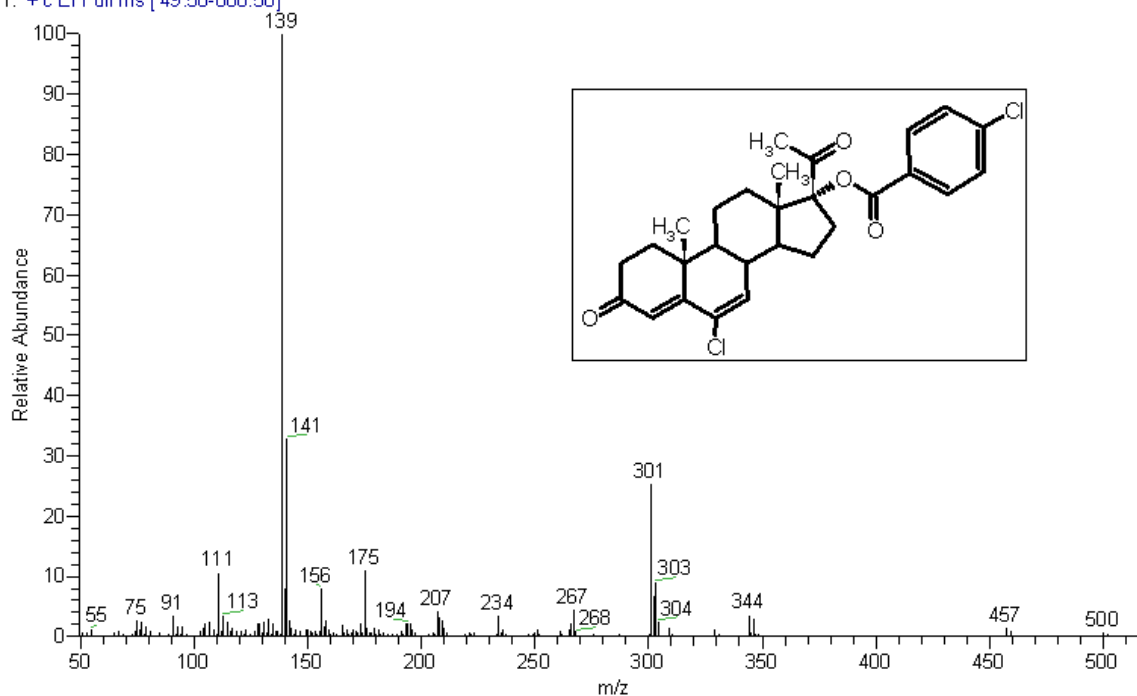


Figura 17.3. Espectro de masas de 6-cloro-17 α -(4'-clorobenzoiloxi)-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6c**).

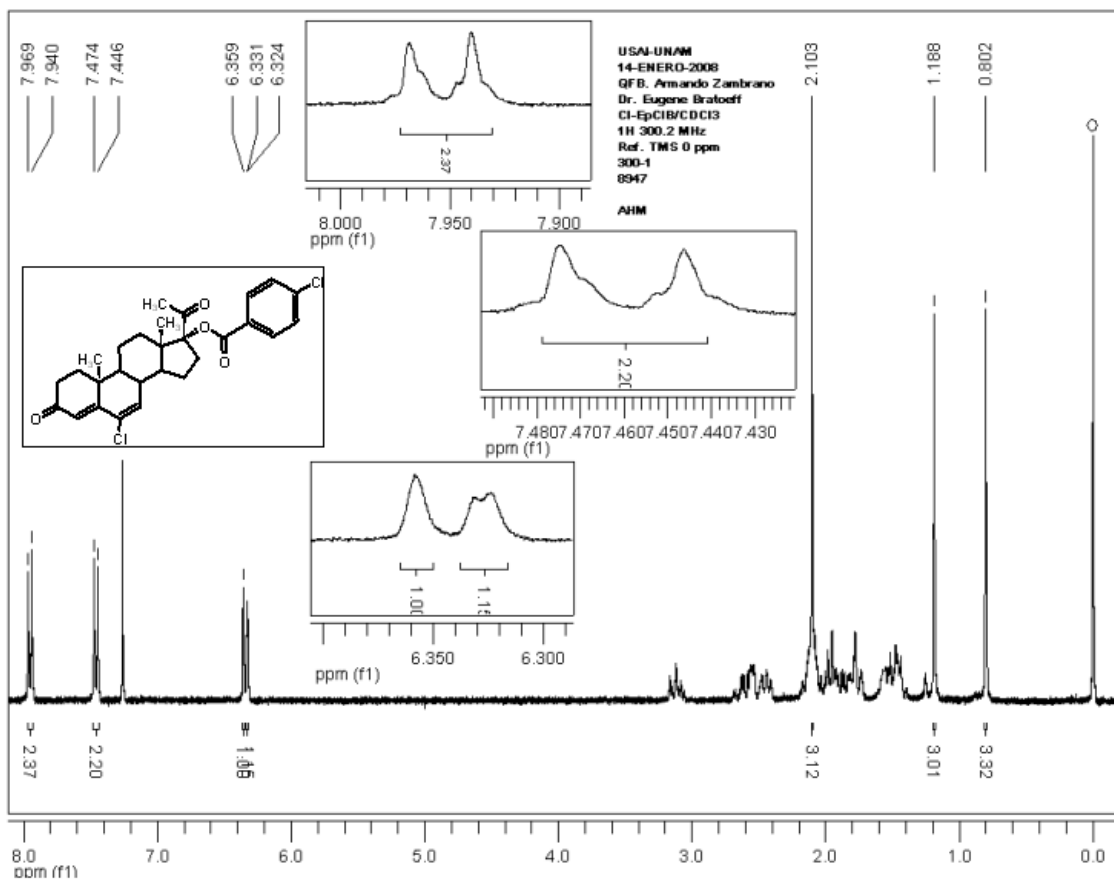


Figura 17.4. Espectro de RMN ¹H de 6-cloro-17 α -(4'-clorobenzoiloxi)-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6c**).

USA1-UNAM
14-ENERO-2008
Dr. Braisoff/Araujo Zambrano
C1-1pC1B/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77.23 ppm
300-1
8947

ABN

Pulse Sequence: s2pu1

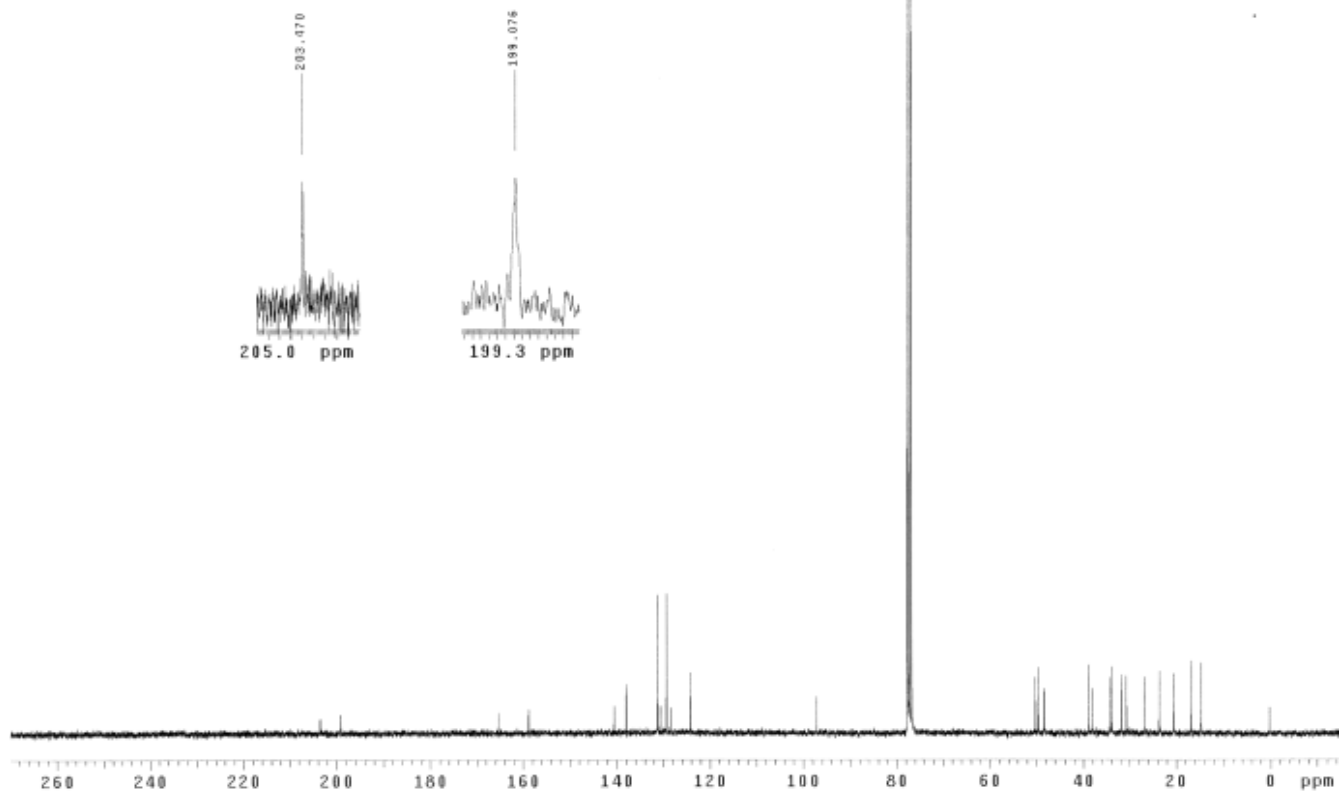


Figura 17.5. Espectro de RMN ^{13}C de 6-cloro-17 α -4'-clorobenzoyloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6c**).

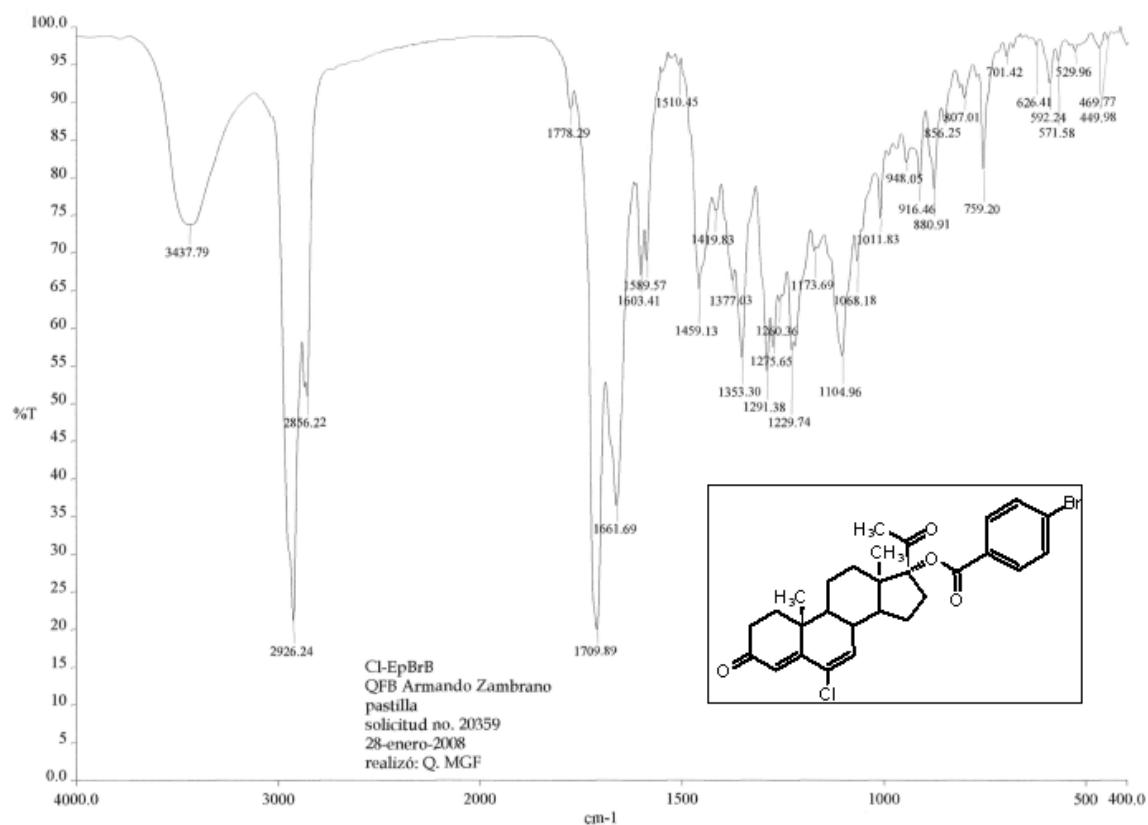


Figura 18.1. Espectro de IR de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**).

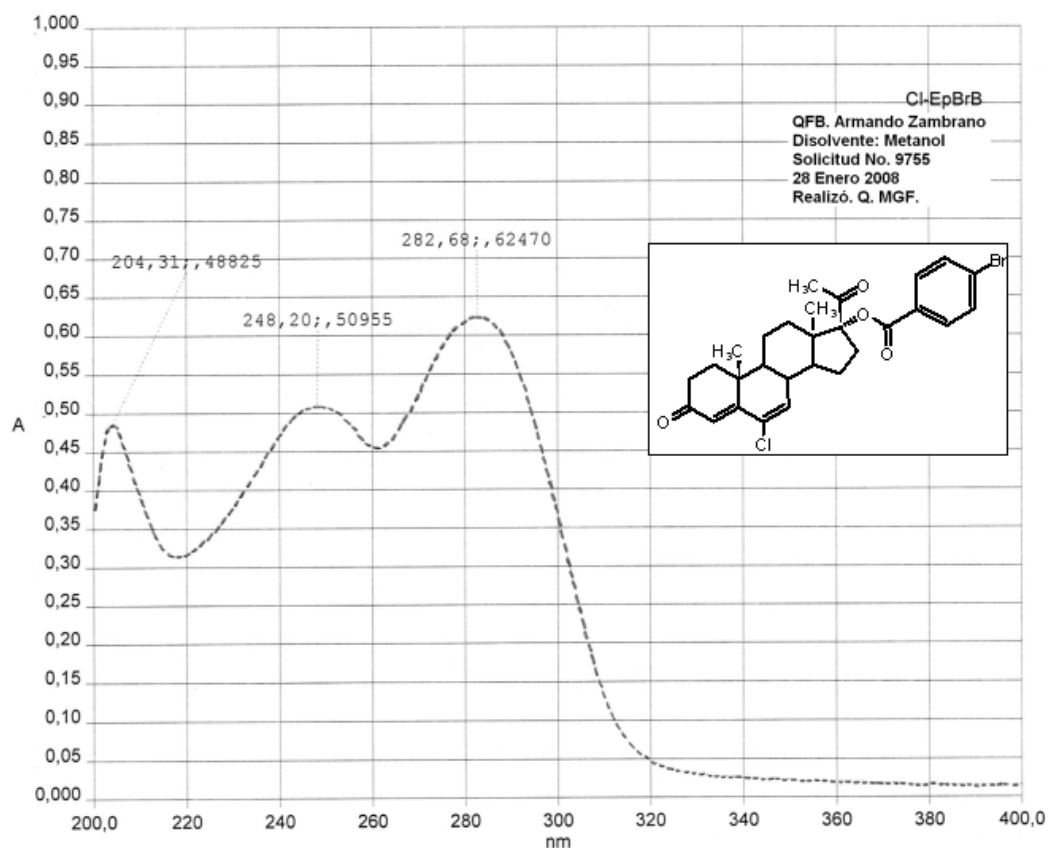


Figura 18.2. Espectro de UV de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**).

D:\Xcalibur\data\USA\ND\OT1142_1

1/24/2008 2:13:32 PM

CLEPBRB

OT1142 1#7 RT: 1.23 AV: 1 SB: 5 3.28-3.69, 0.00-0.21 NL: 1.12E8
T: +c EI Full ms [49.50-800.50]

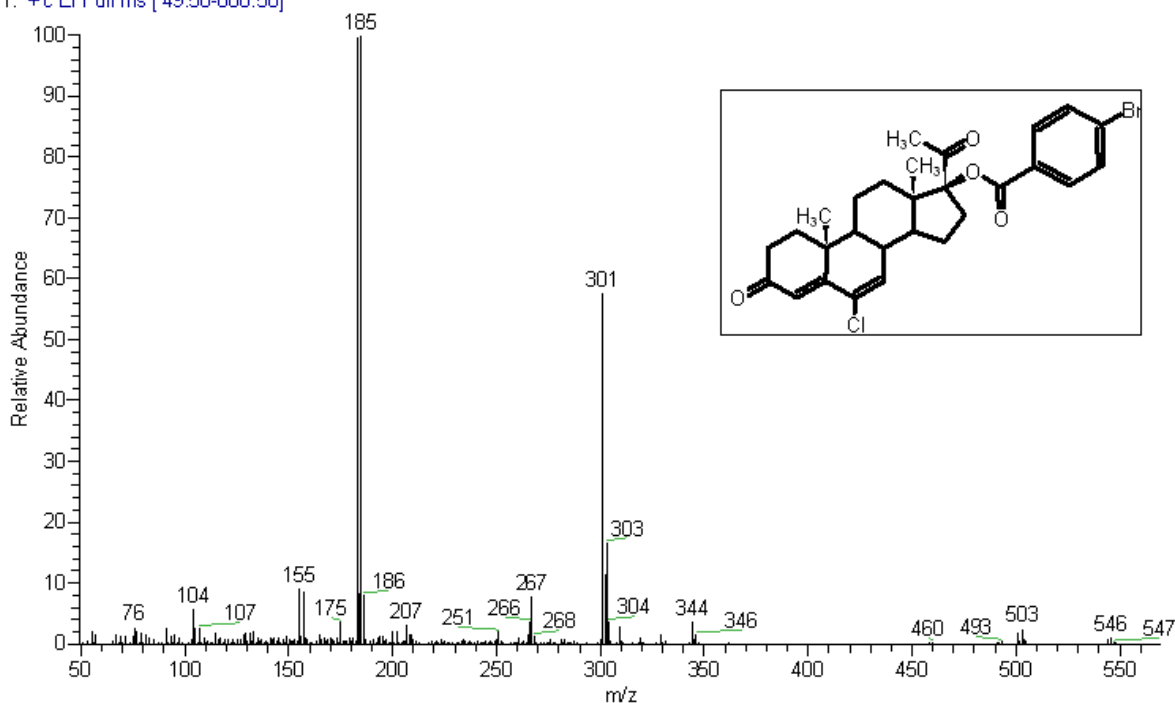


Figura 18.3. Espectro de masas de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**).

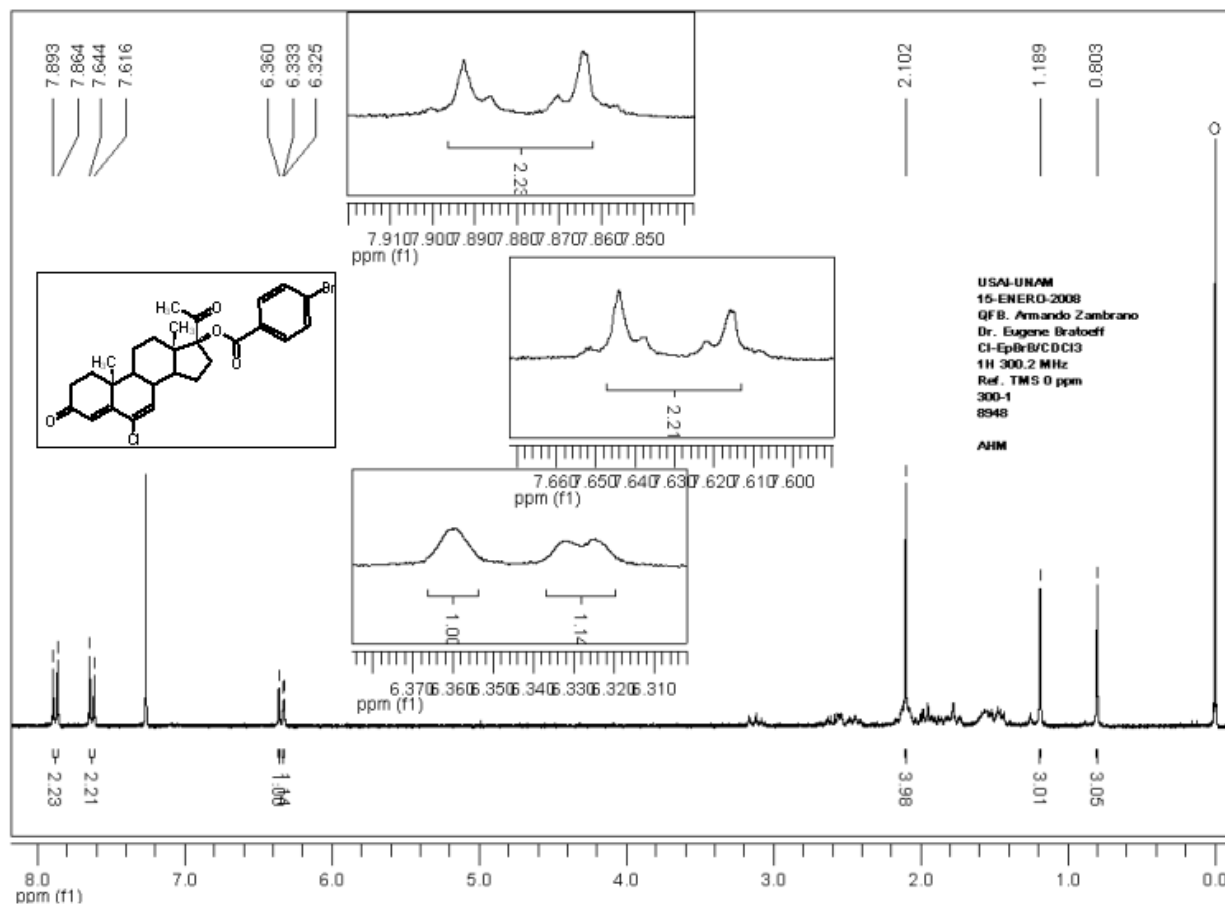


Figura 18.4. Espectro de RMN ¹H de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**).

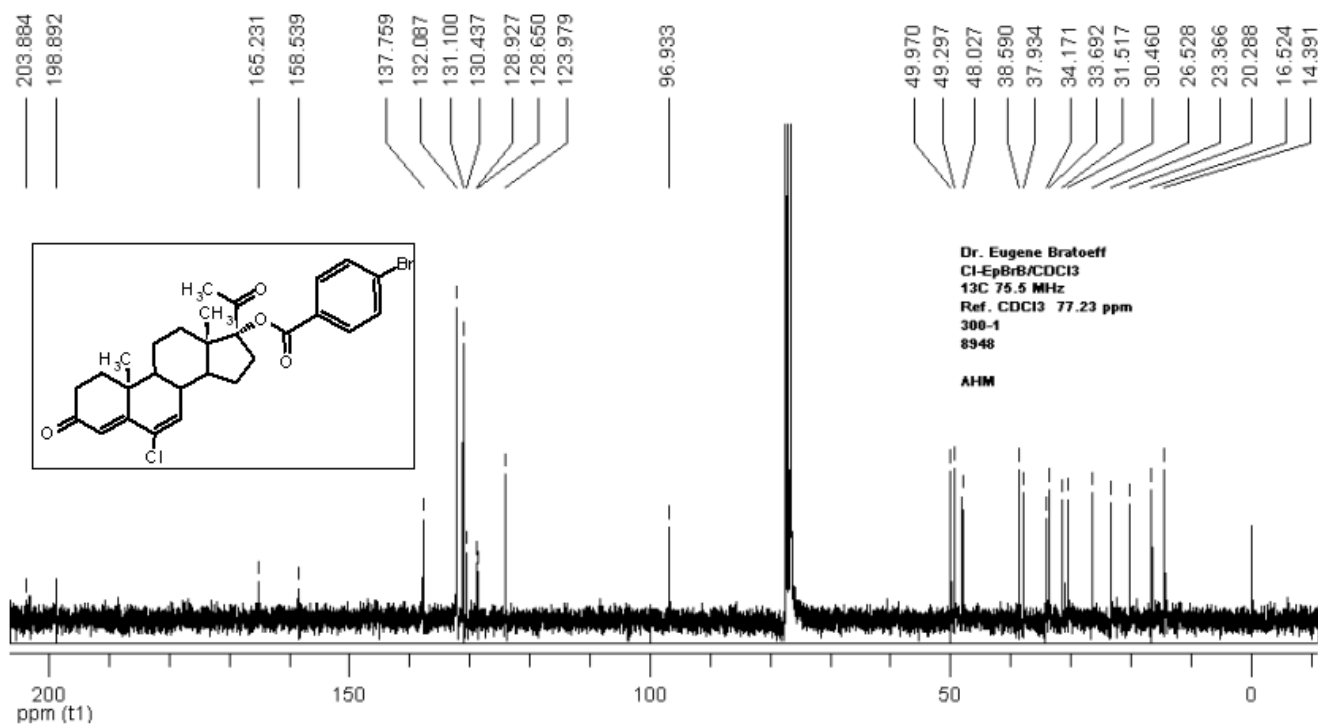


Figura 18.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -(4'-bromobenzoyloxi)-6-cloro-4,6-pregnadien-3,20-diona (**6d**).

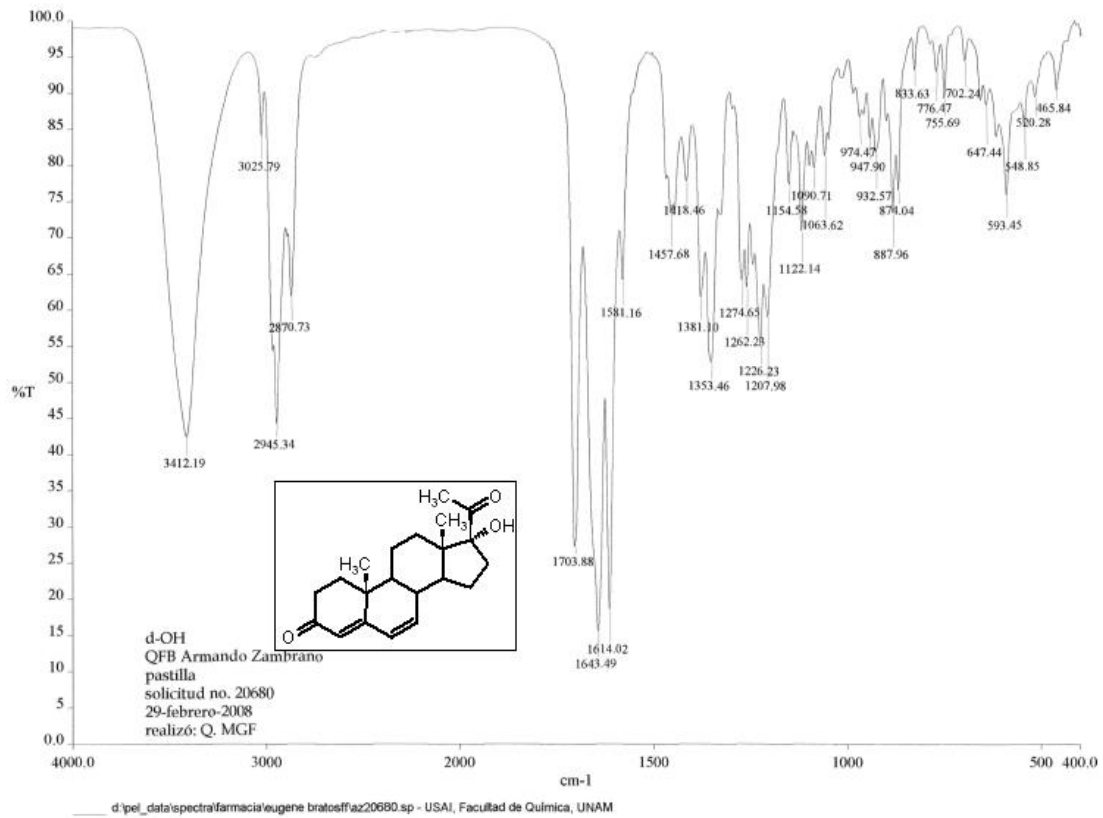


Figura 19.1. Espectro de IR de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

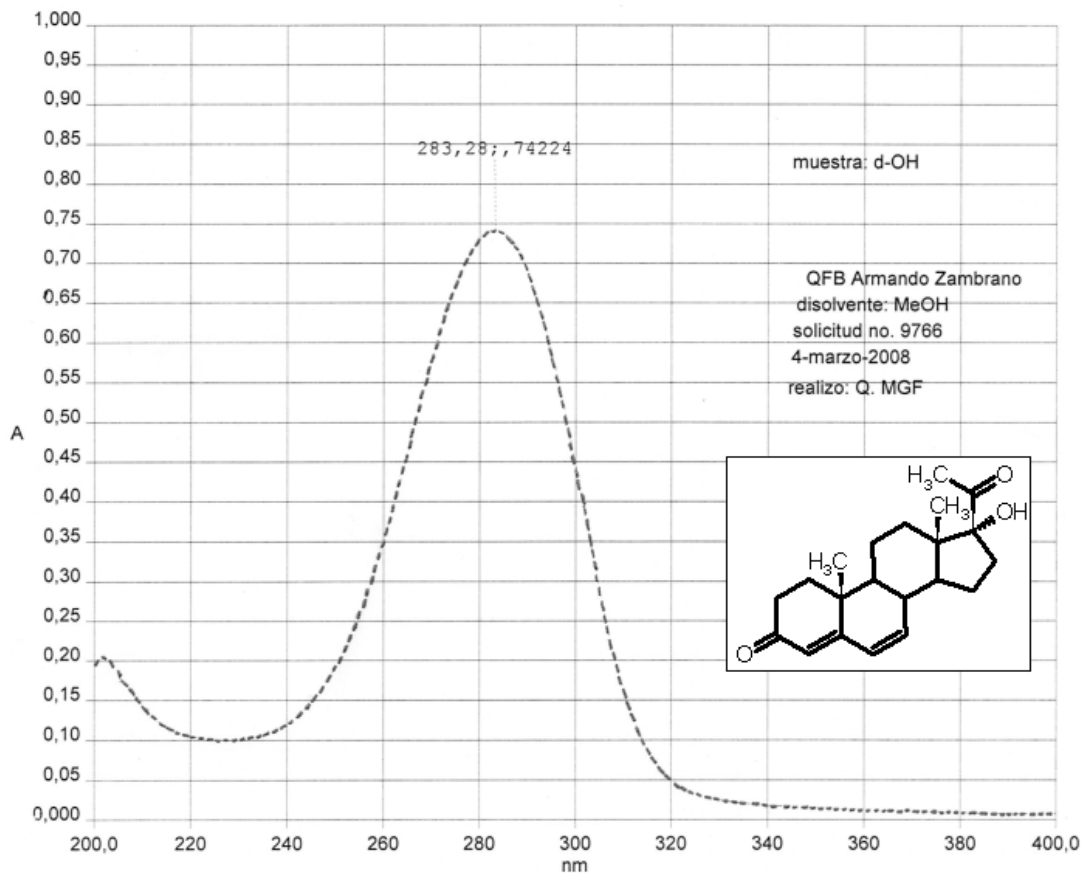


Figura 19.2. Espectro de UV de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

D:\xcalibur\data\USA\IND\OT1280_1

3/4/2008 4:24:30 PM

D-OH

OT1280_1 #68-78 RT: 1.37-1.57 AV: 11 SB: 18 2.00-2.34 NL: 3.76E7

T: +c EI Full ms [49.50-600.50]

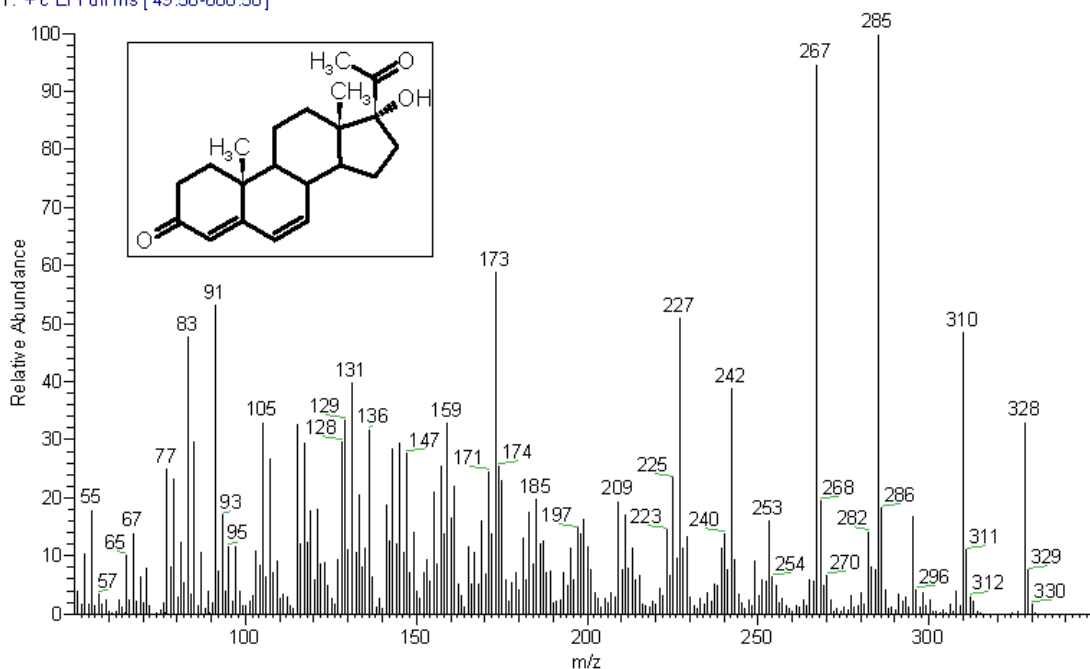


Figura 19.3. Espectro de masas de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

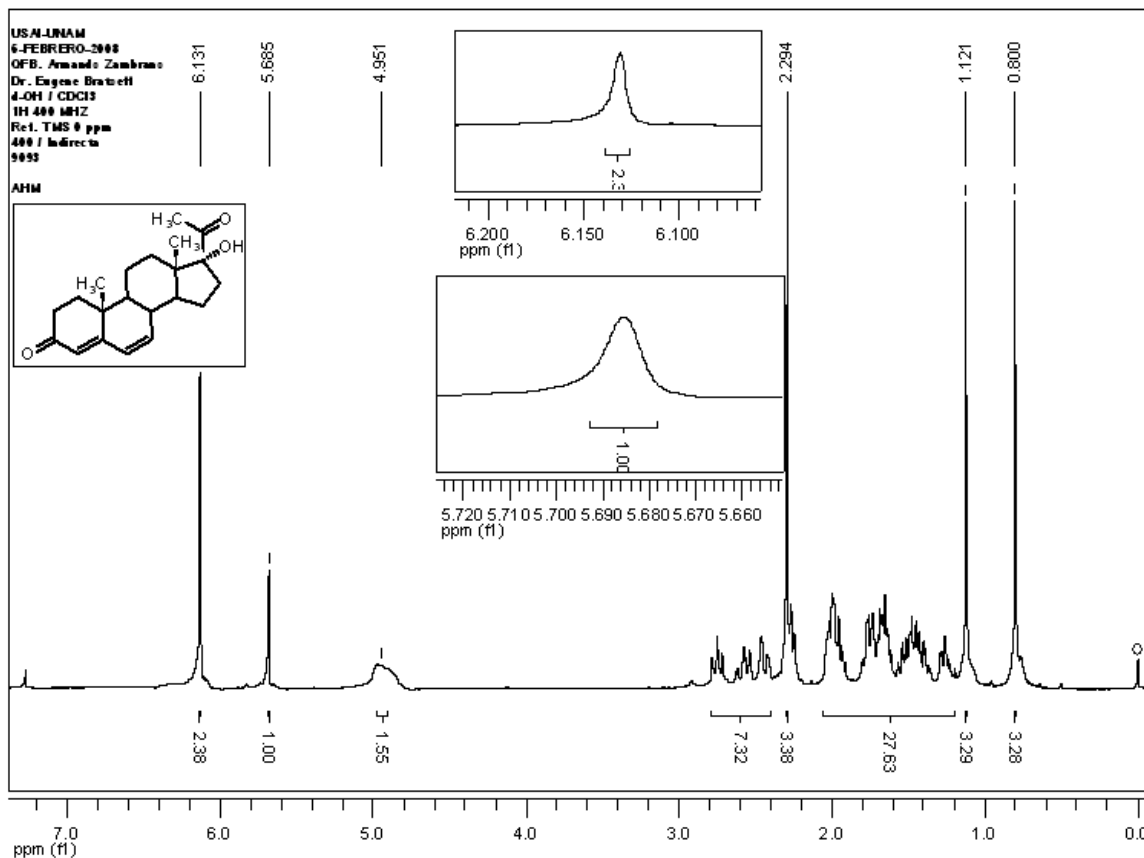


Figura 19.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

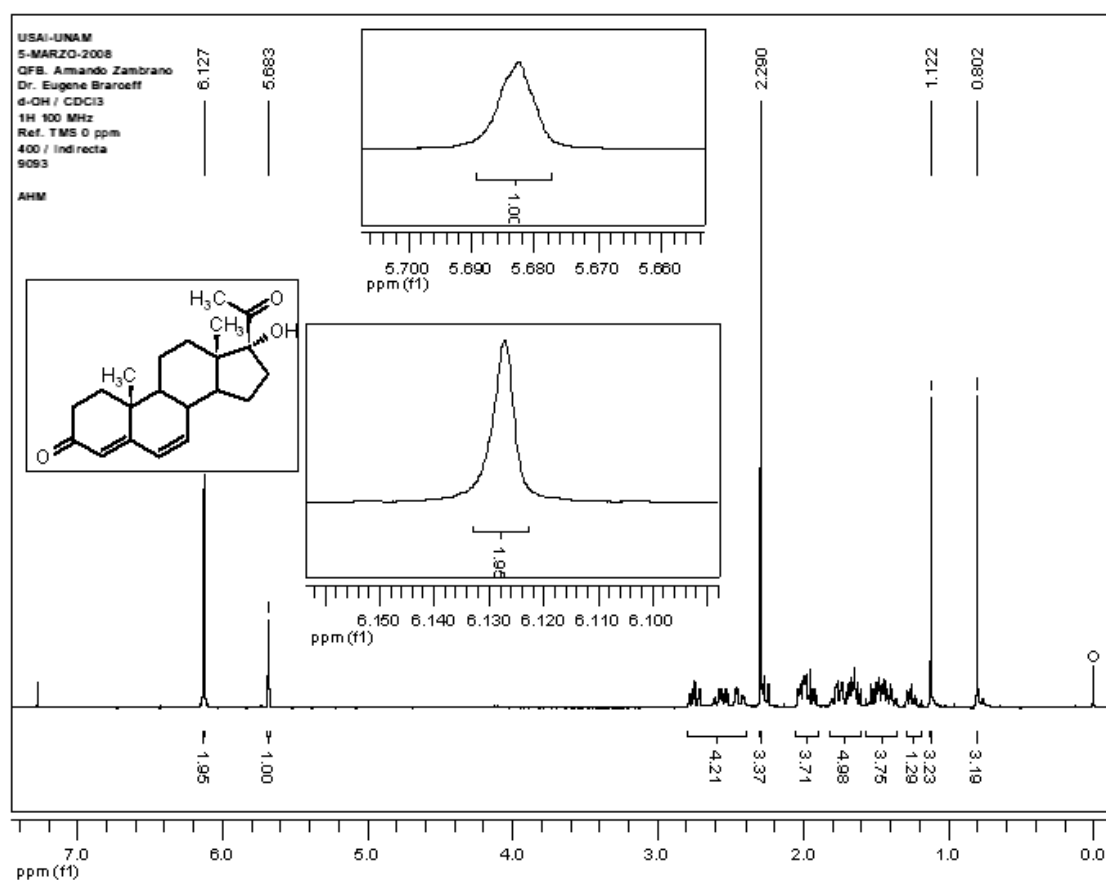


Figura 19.5. Espectro de RMN ^1H de 17α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (Intercambio con D_2O) (7).

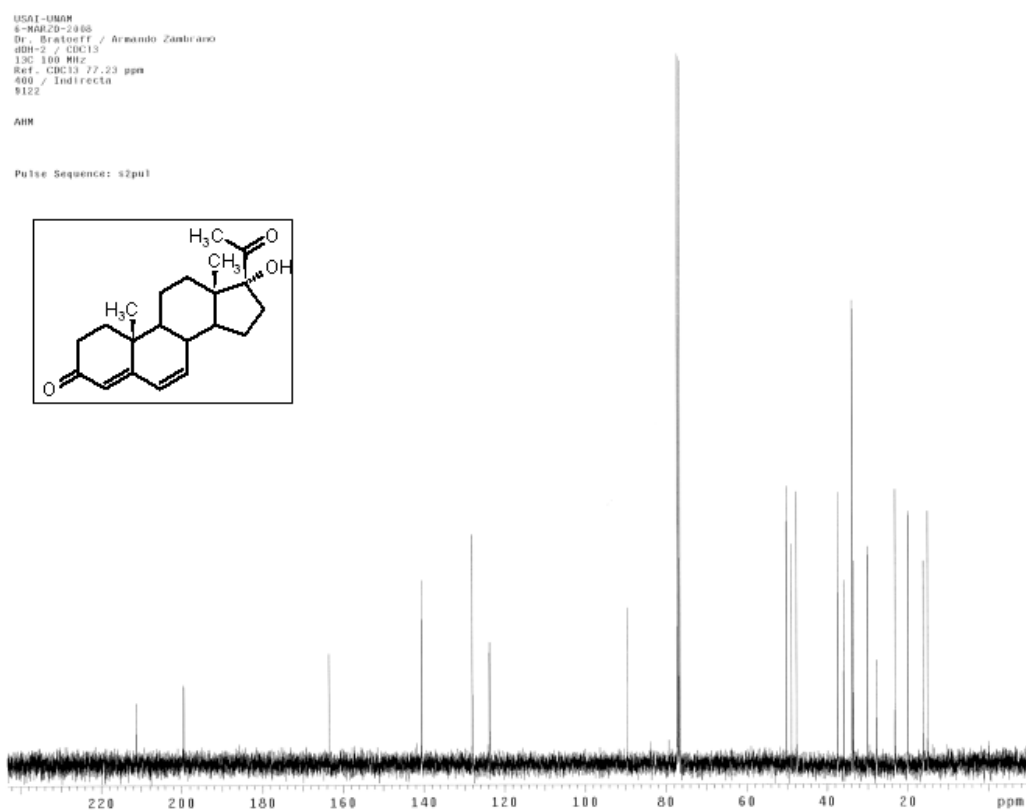


Figura 19.6. Espectro de RMN ^{13}C de 17α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

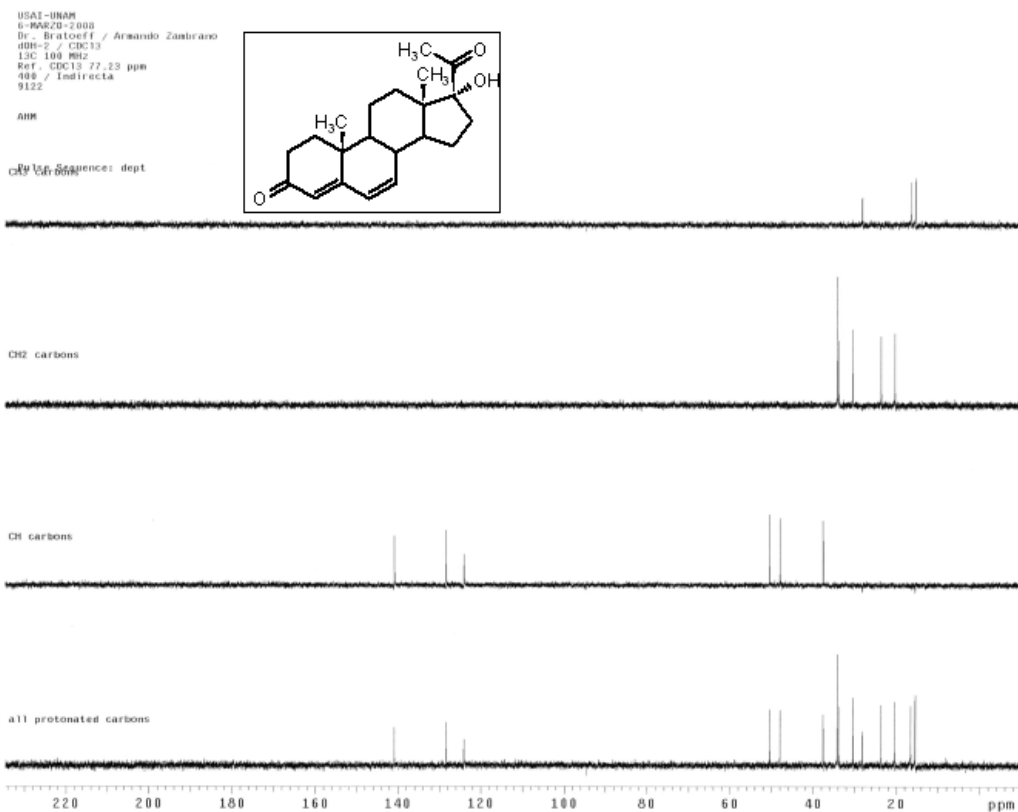


Figura 19.7. Espectro de RMN ¹³C DEPT de 17α-hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

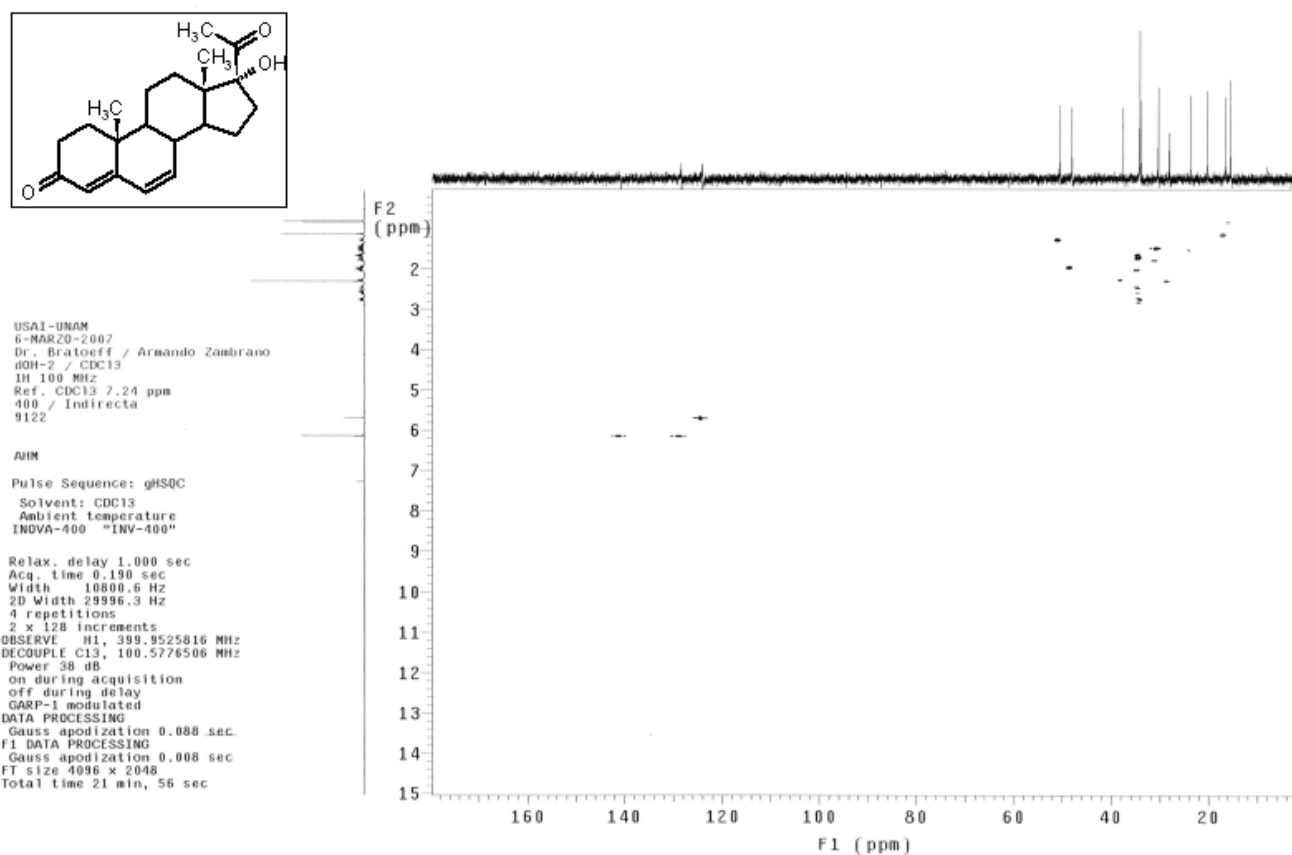


Figura 19.8. Espectro de RMN HMQC de 17α-hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

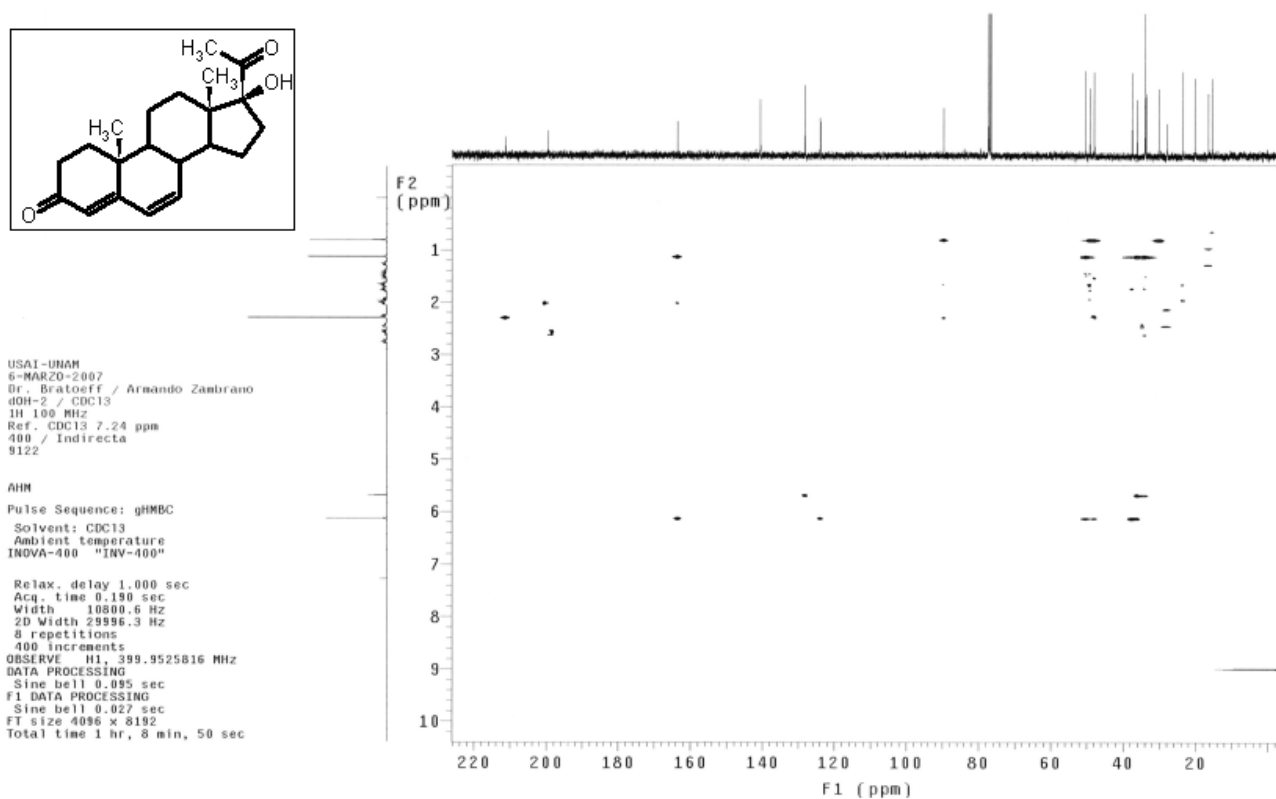


Figura 19.9. Espectro de RMN HMBC de 17 α -hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (7).

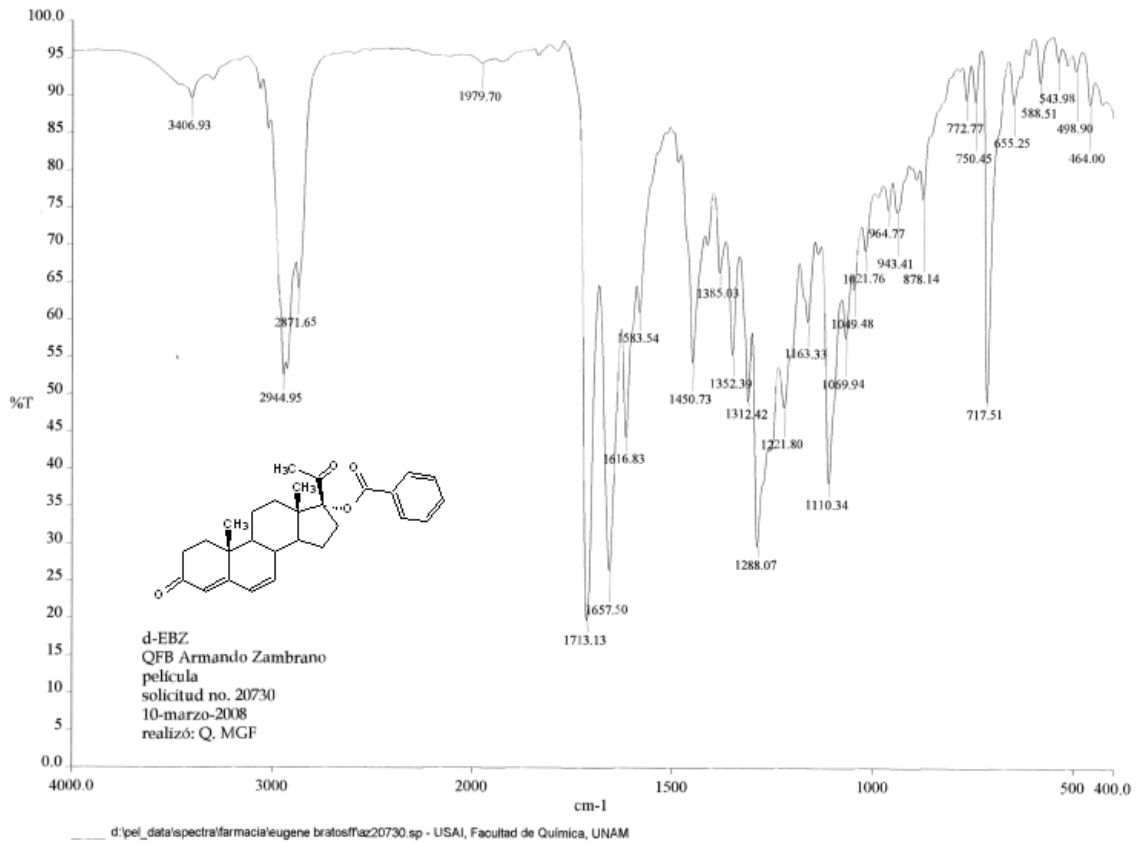


Figura 20.1. Espectro de IR de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).

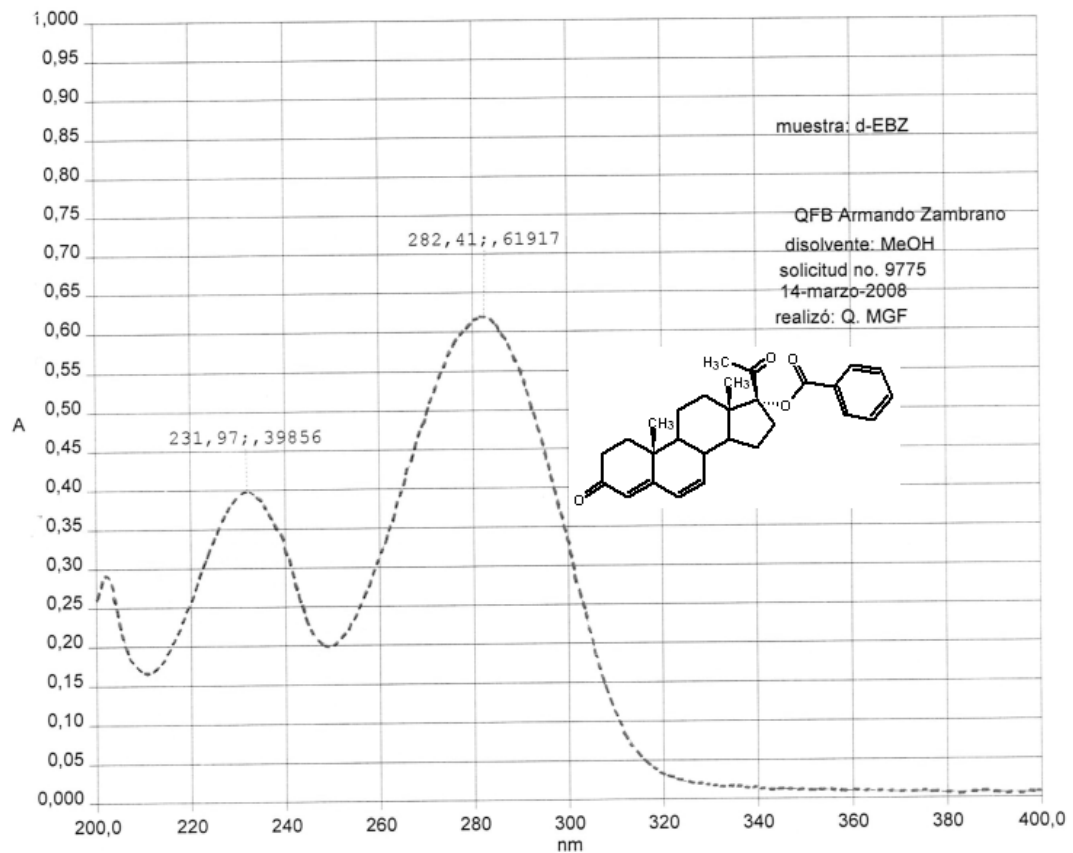


Figura 20.2. Espectro de UV de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).

D:\Xcalibur\data\USA\DIOT1373_1

4/9/2008 5:44:25 PM

D-EBZ

szComment

OT1373_1 #61-67 RT: 1.39-1.53 AV: 7 SB: 29 0.23-0.88 NL: 2.40E6

T: +c EI Full ms [32.50-600.50]

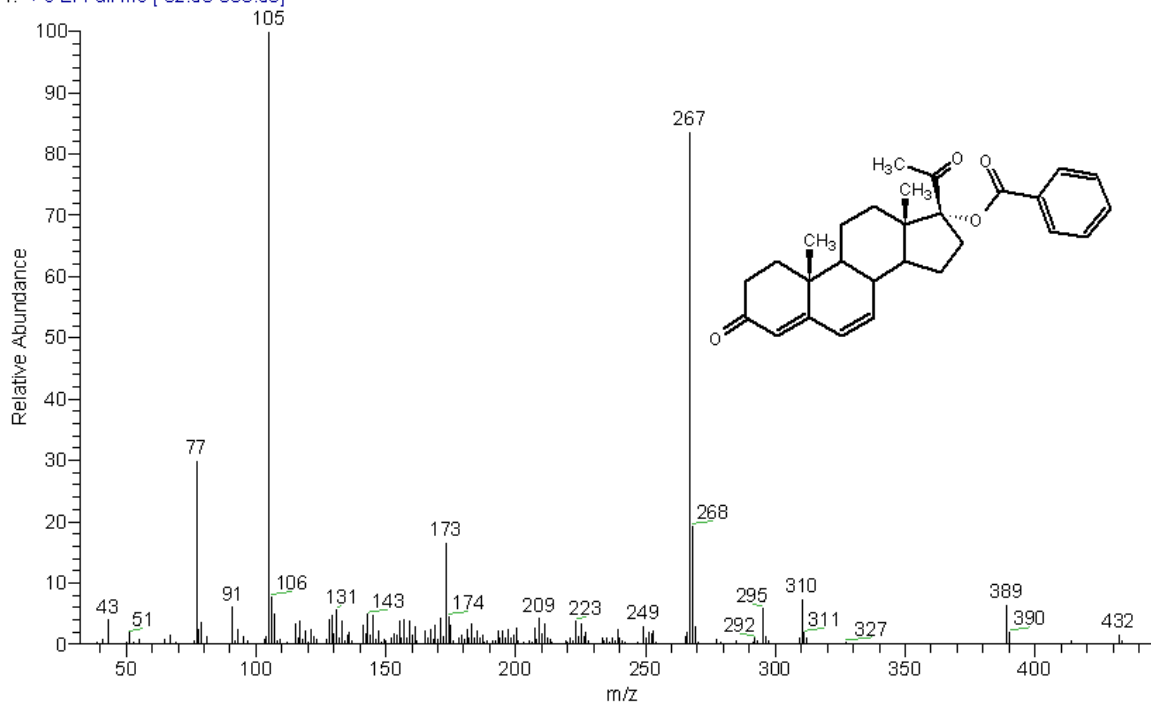


Figura 20.3. Espectro de masas de 17α-benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).

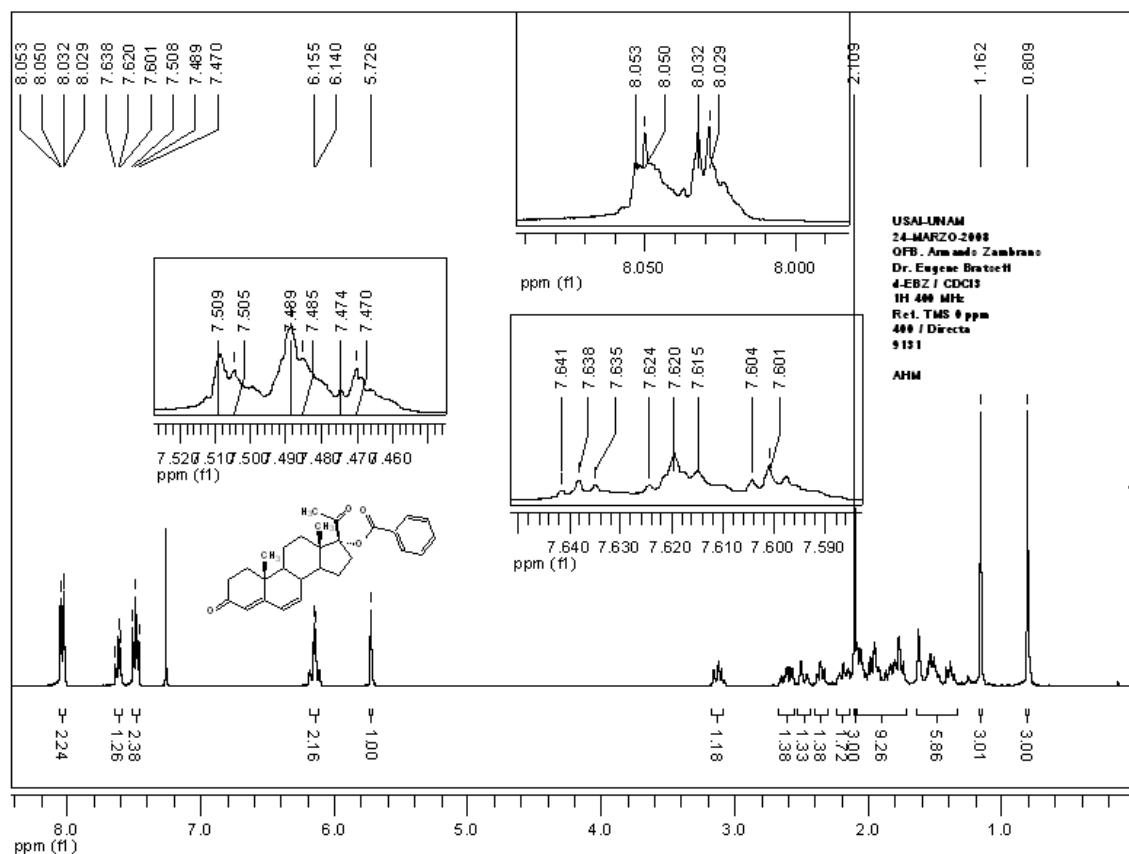


Figura 20.4. Espectro de RMN ¹H de 17α-benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).

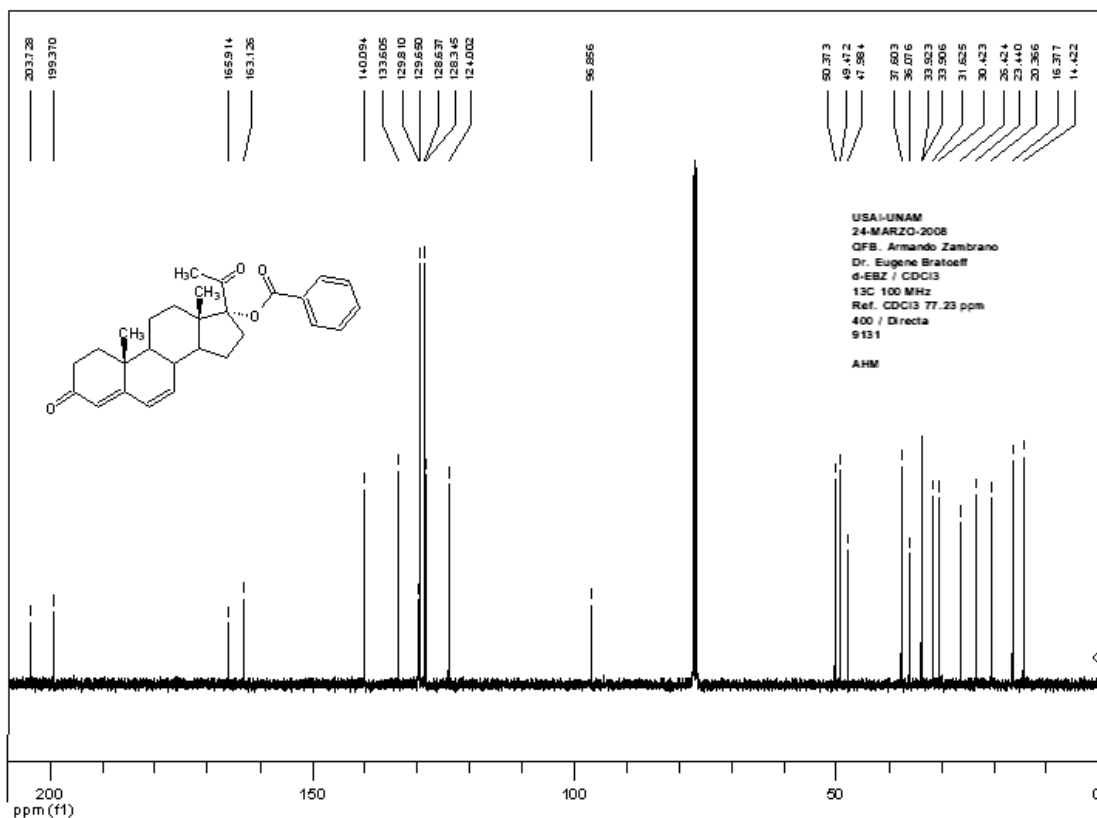


Figura 20.5. Espectro de RMN ¹³C de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).

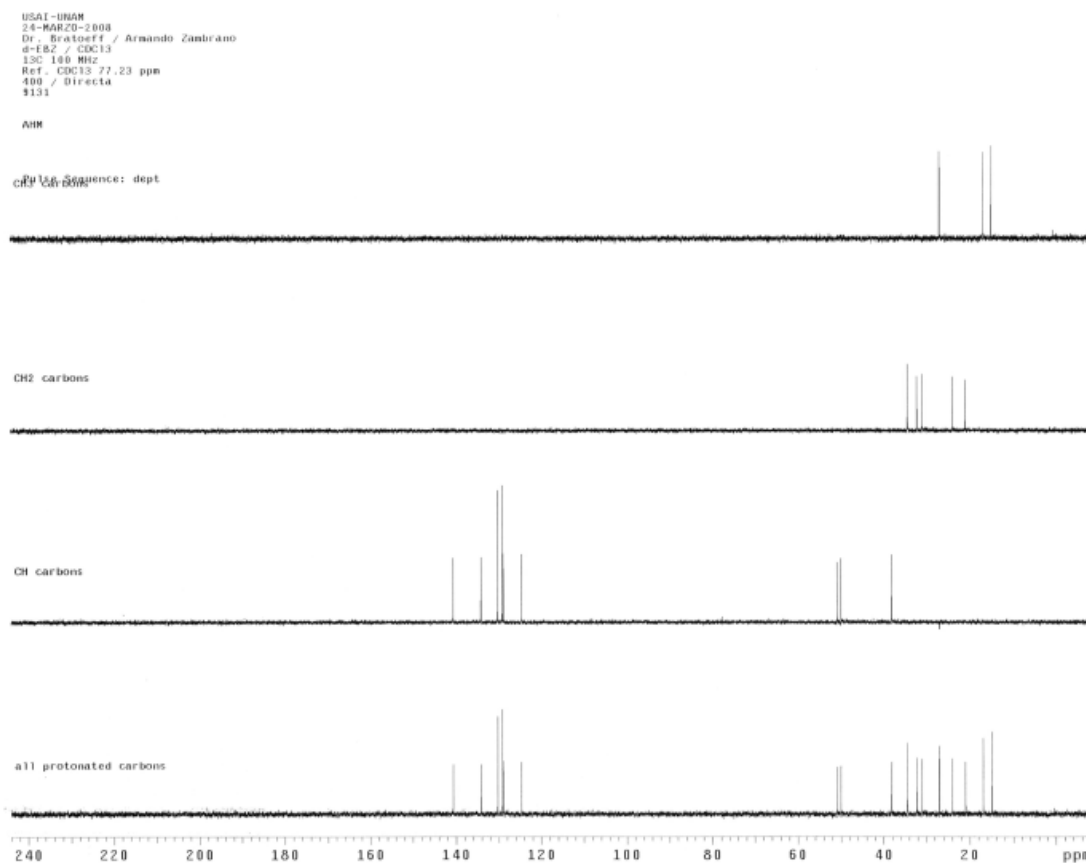


Figura 20.6. Espectro de RMN ¹³C DEPT de 17 α -benzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8a).

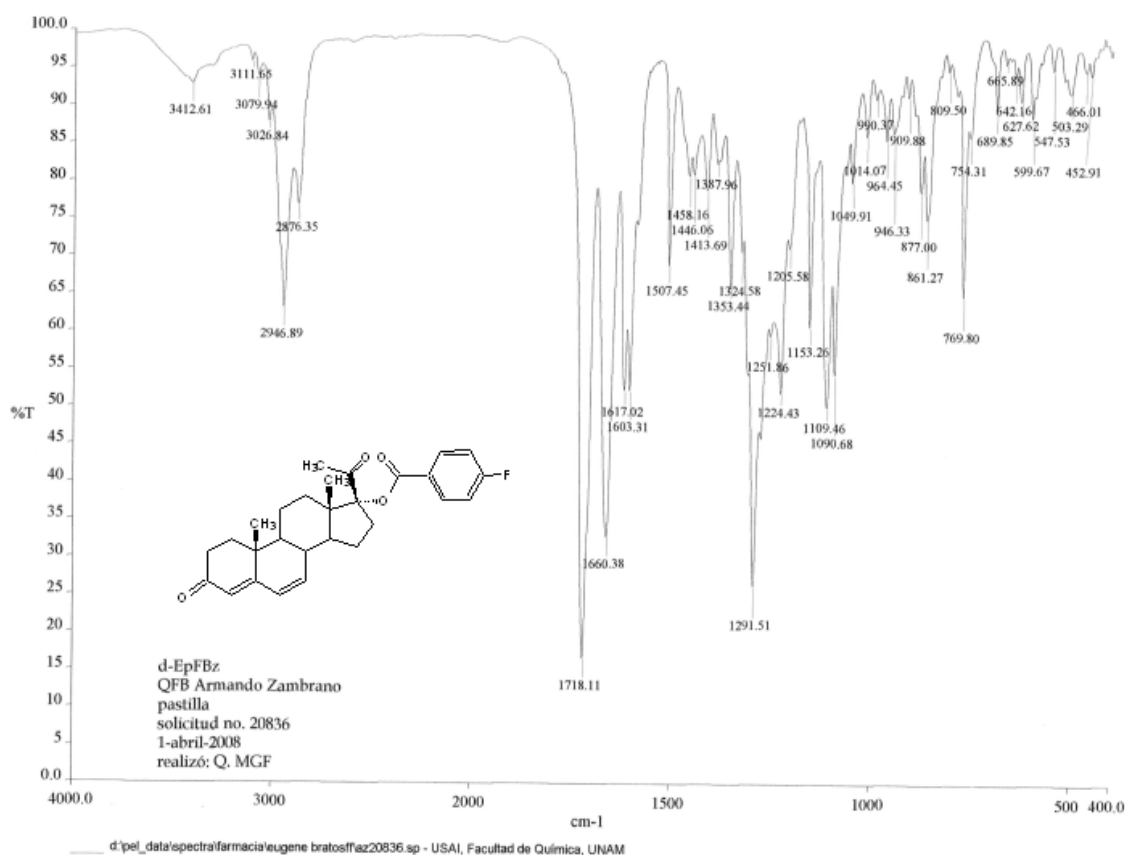


Figura 21.1. Espectro de IR de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).

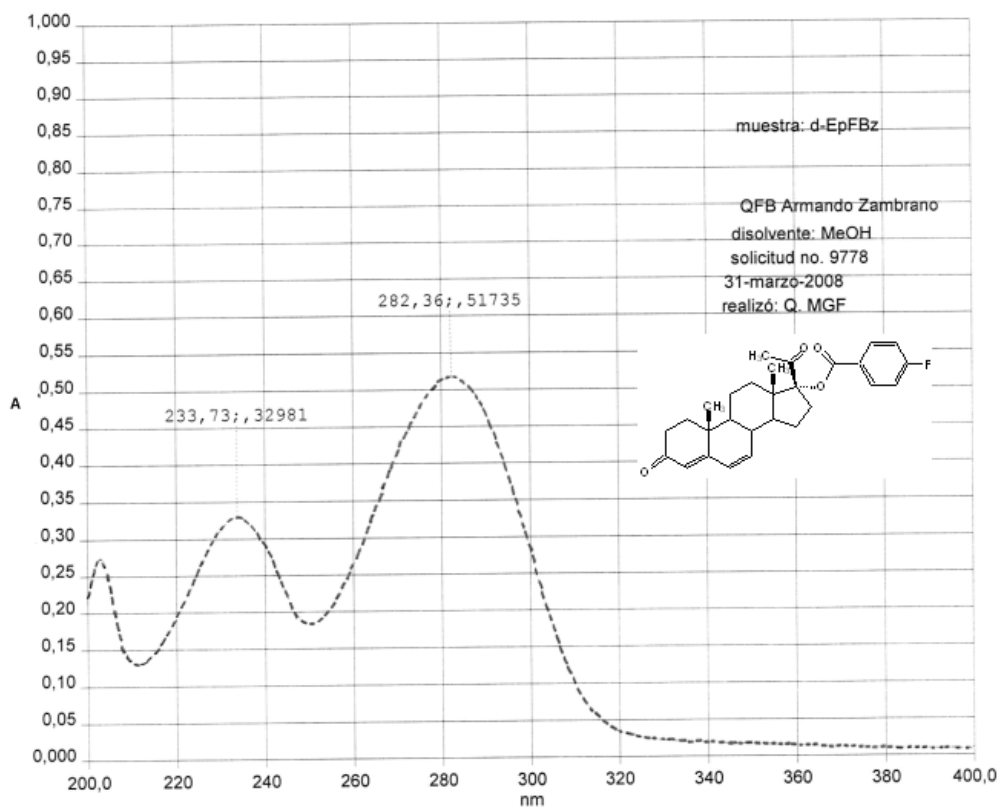


Figura 21.2. Espectro de UV de 17 α -4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).

D:\calib\data\USA\ND\OT1374_1

4/9/2008 5:51:20 PM

D-EPFBZ

szComment

OT1374 1#66-72 RT: 1.50-1.64 AV: 7 SB: 30 0.28-0.95 NL: 2.62E6

T: + c EI Full ms [32.50-600.50]



Figura 21.3. Espectro de RMN ¹H de 17α-4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).

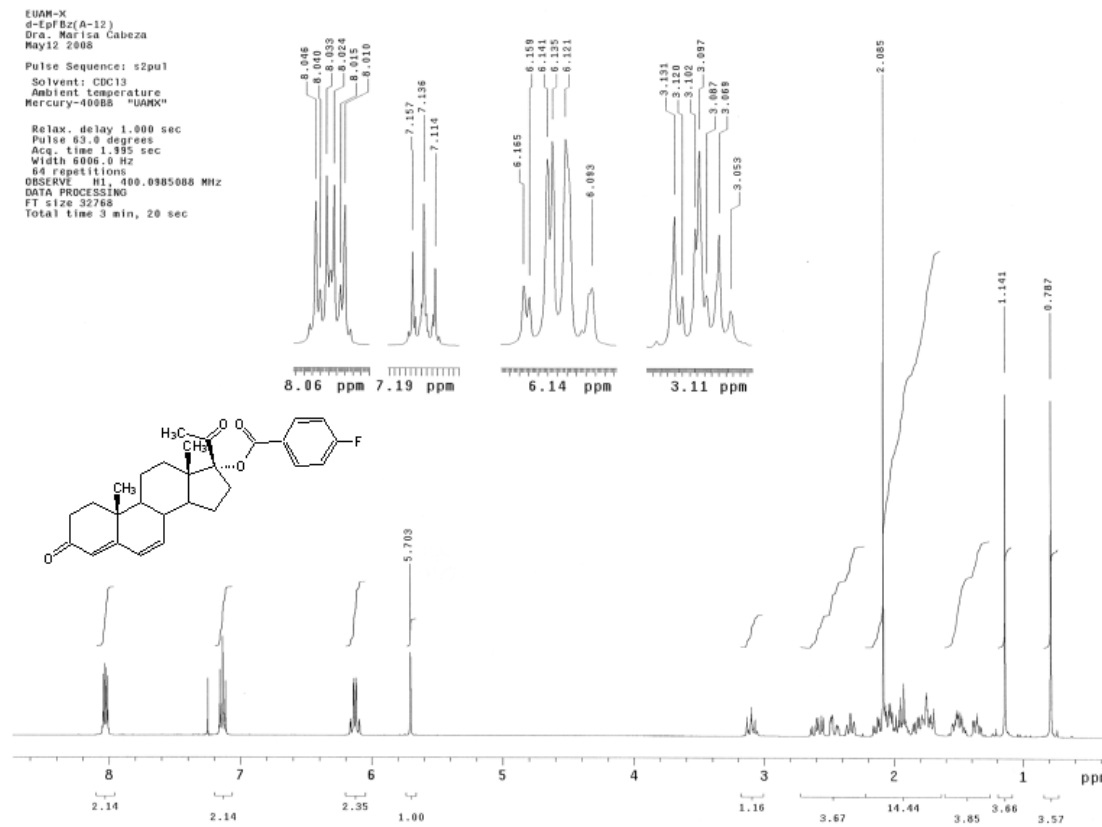


Figura 21.4. Espectro de RMN ¹H de 17α-4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8b).

d-EpFBz(A-12)
 Dra. Marisa Cabeza
 May12 2008
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDC13
 Ambient temperature
 Mercury-400BB "UARK"
 Relax. delay 0.500 sec
 Pulse 23.7 degrees
 Acq. time 0.700 sec
 Width 25000.0 Hz
 1168 repetitions
 OBSERVE C13, 100.6048260 MHz
 DECOUPLE H1, 400.1005098 MHz
 Power 40 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 1 hr, 10 min, 24 sec

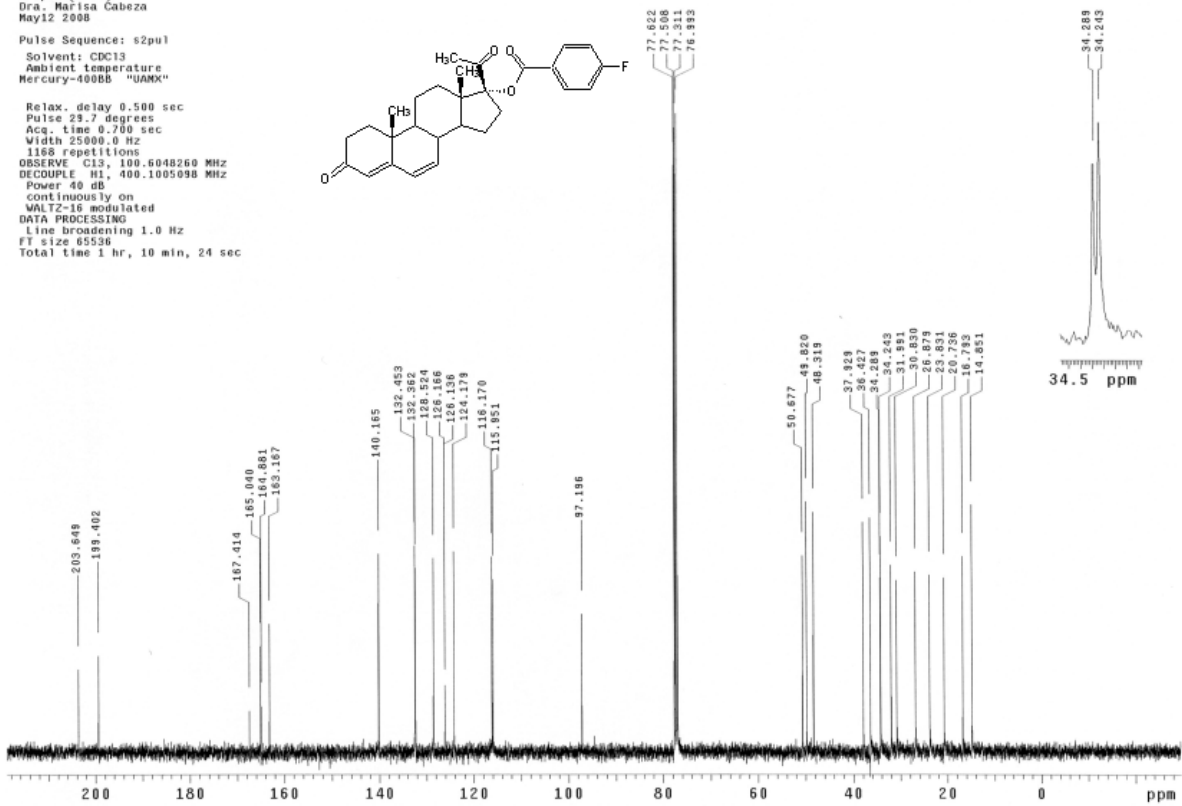


Figura 21.5. Espectro de RMN ¹³C de 17α-4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**).

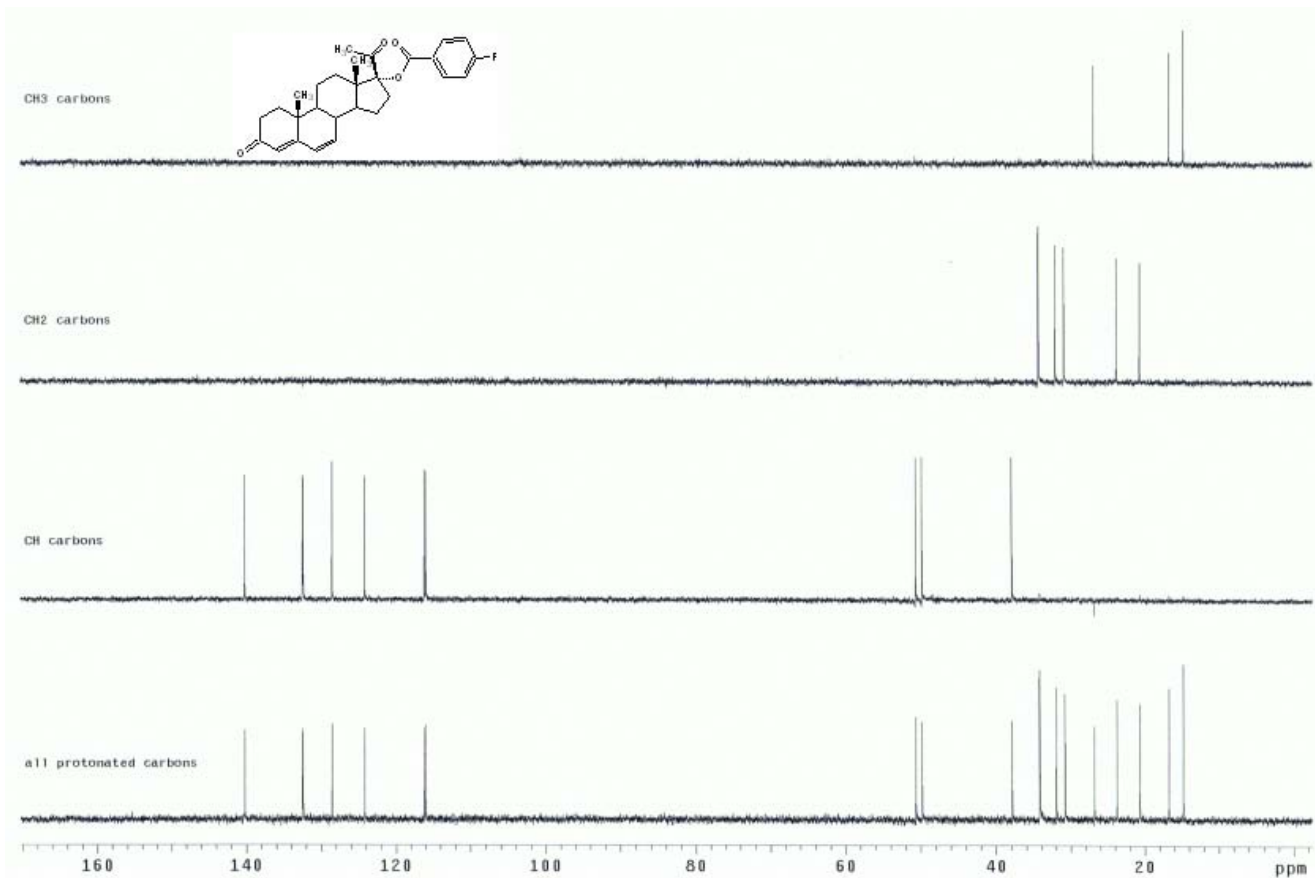


Figura 21.6. Espectro de RMN ¹³C DEPT de 17α-4'-fluorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8b**).

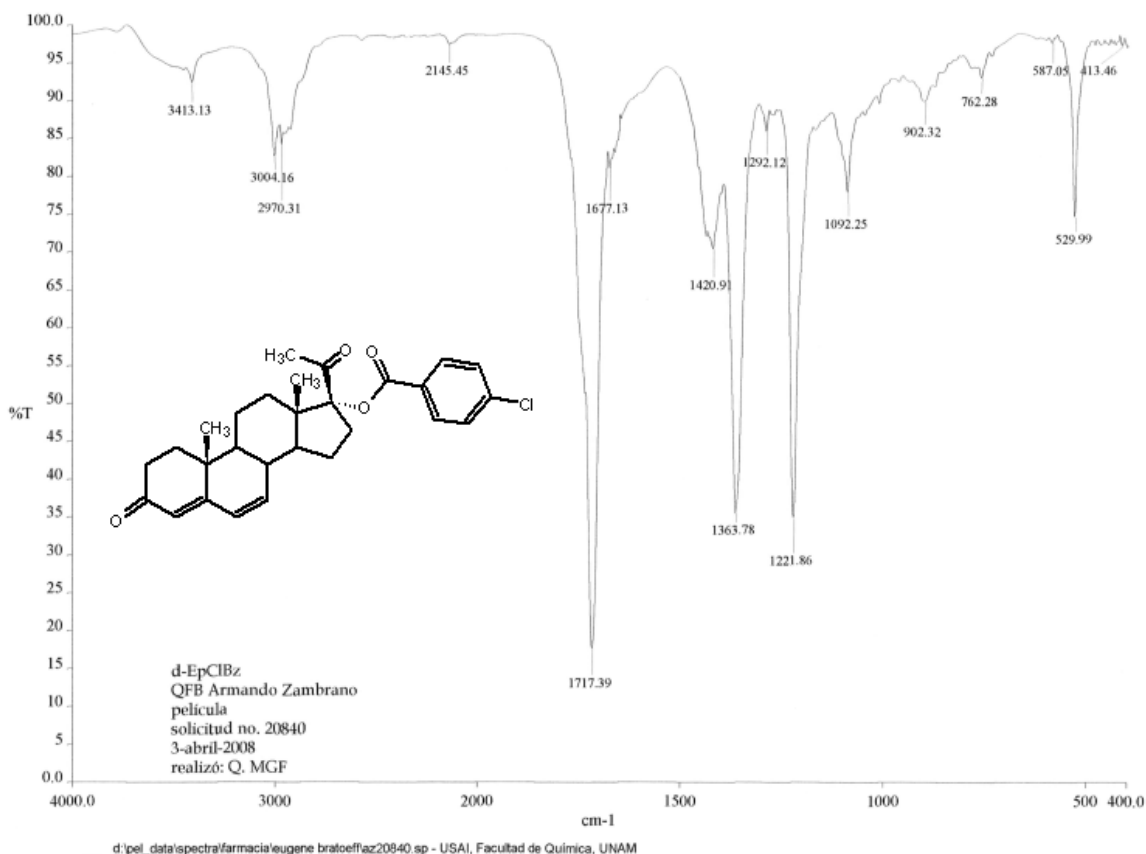


Figura 22.1. Espectro de IR de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).

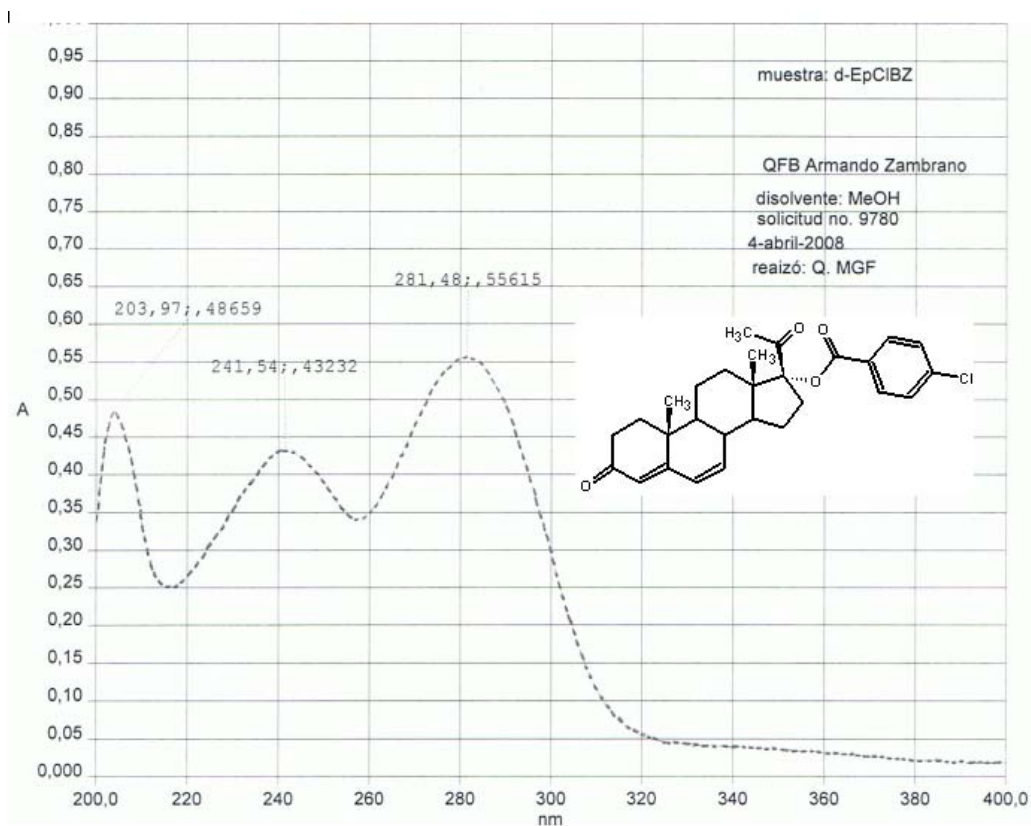


Figura 22.2. Espectro de UV de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).

D:\Xcalibur\data\USA\ND\OT1375_1

4/9/2008 5:57:08 PM

D-EPCLBZ

szComment

OT1375_1 #60-66 RT: 1.37-1.50 AV: 7 SB: 30 0.16-0.83 NL: 9.19E5

T: +c EI Full ms [32.50-600.50]

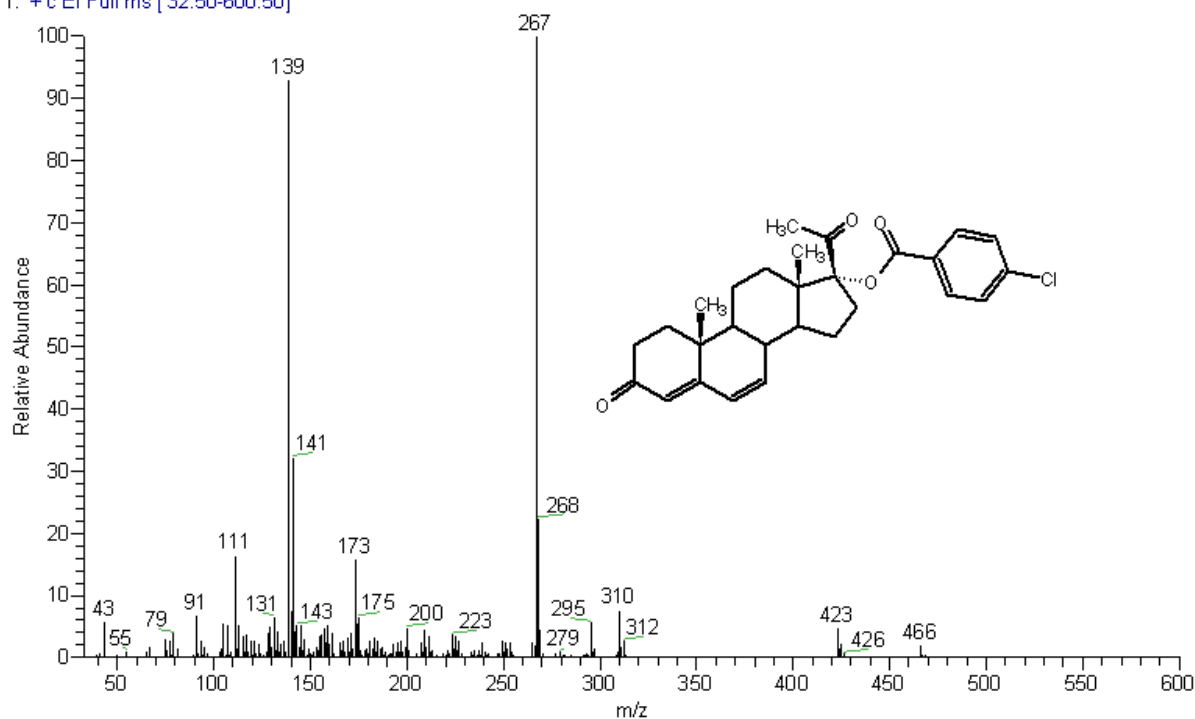


Figura 22.3. Espectro de masas de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**).

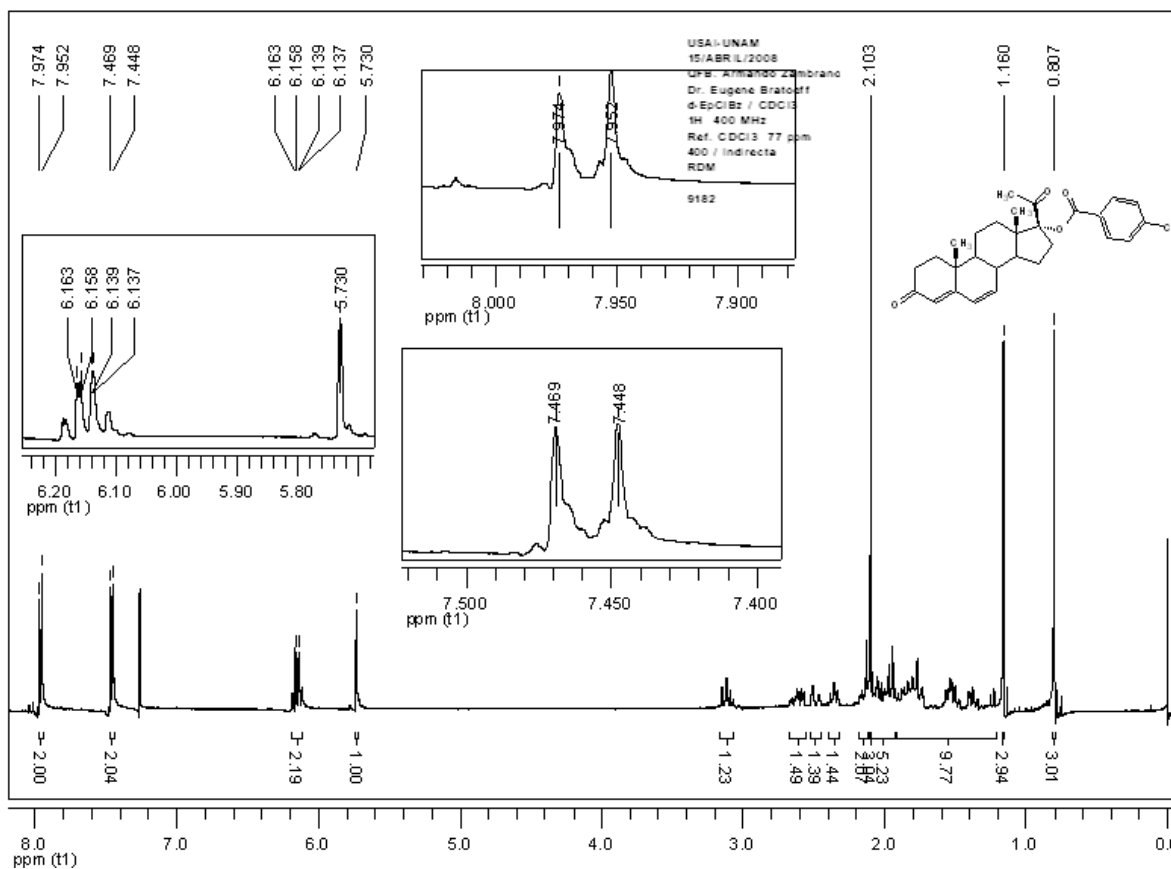


Figura 22.4. Espectro de RMN ¹H de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8c**).

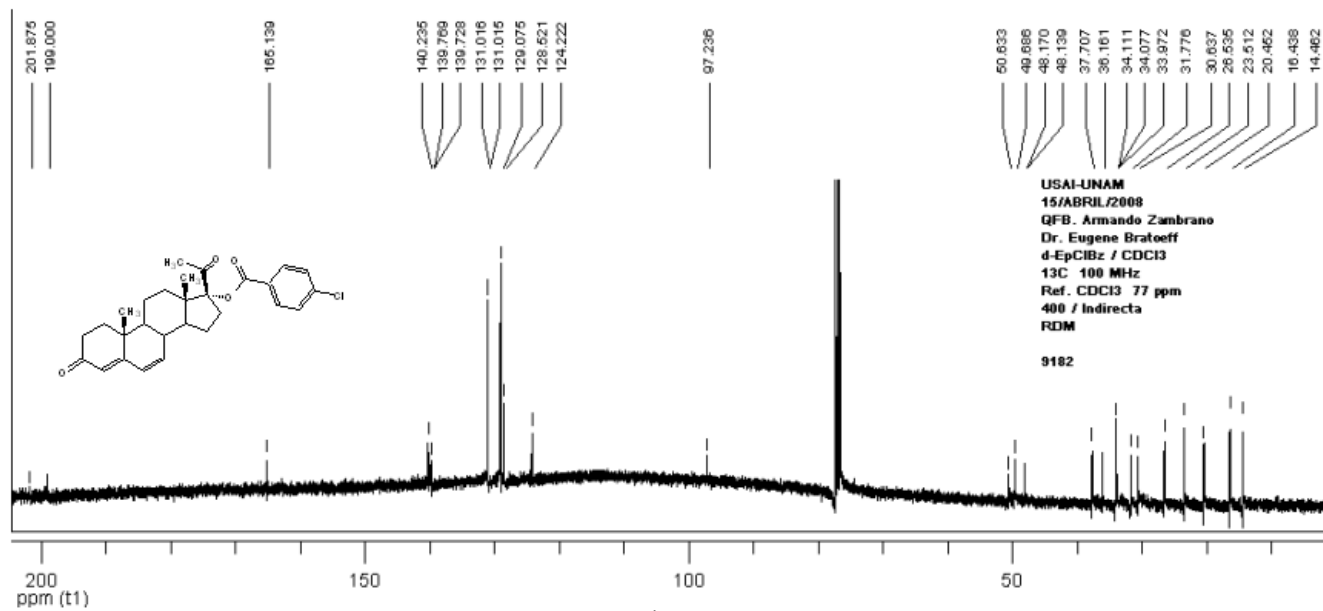


Figura 22.5. Espectro de RMN ¹³C de 17 α -4'-clorobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8c).

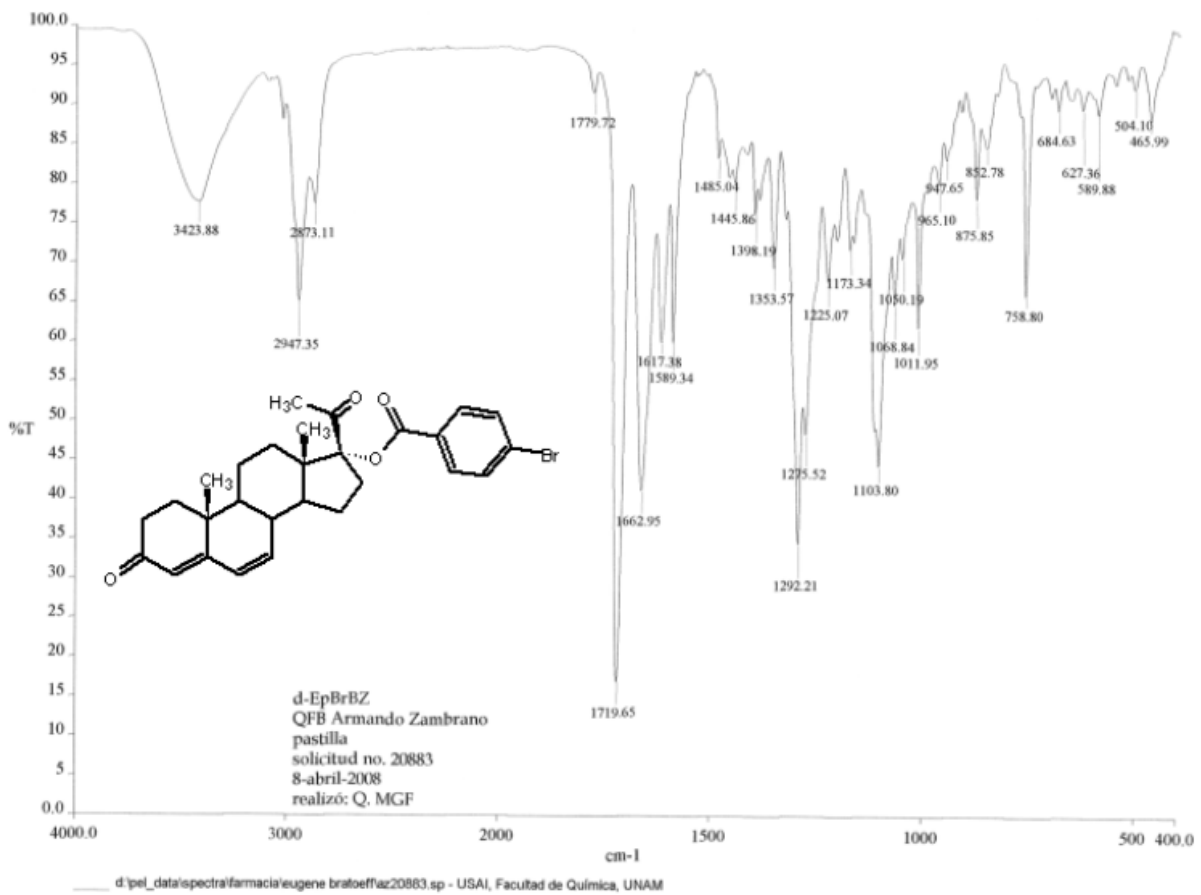


Figura 23.1. Espectro de IR de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).

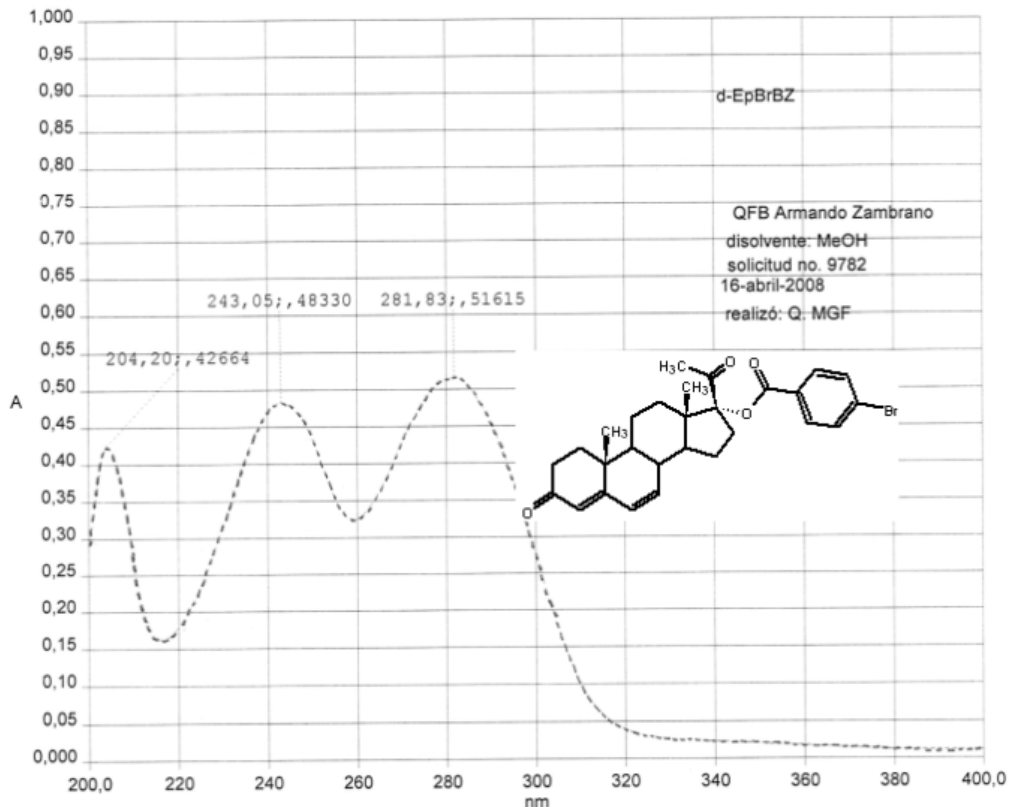


Figura 23.2. Espectro de UV de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).

D:\Xcalibur\data\USAND\OT1376_1

4/9/2008 6:02:08 PM

D-EPBRBZ

szComment

OT1376_1 #70-75 RT: 1.60-1.71 AV: 6 SB: 21 2.17-2.31 , 0.58-0.88 NL: 1.96E6

T: + c EI Full ms [32.50-600.50]

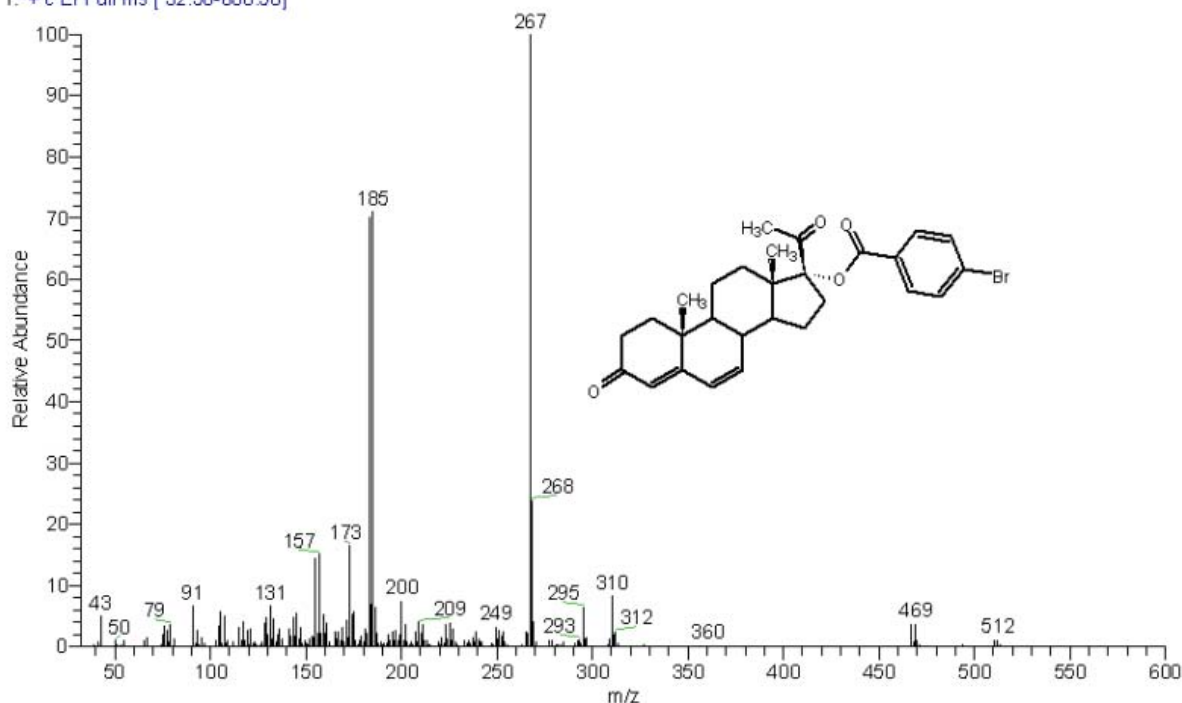


Figura 23.3. Espectro de masas de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).

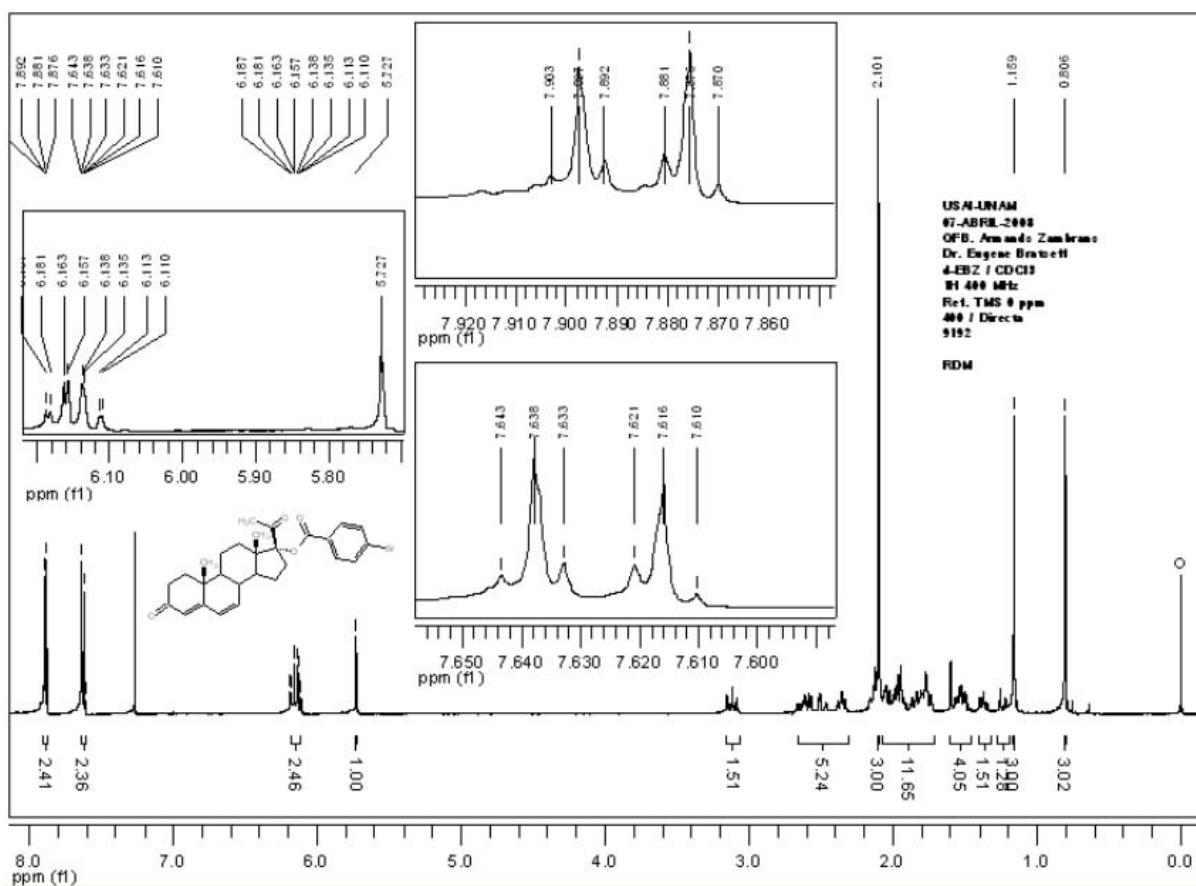


Figura 23.4. Espectro de RMN ^1H de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (8d).

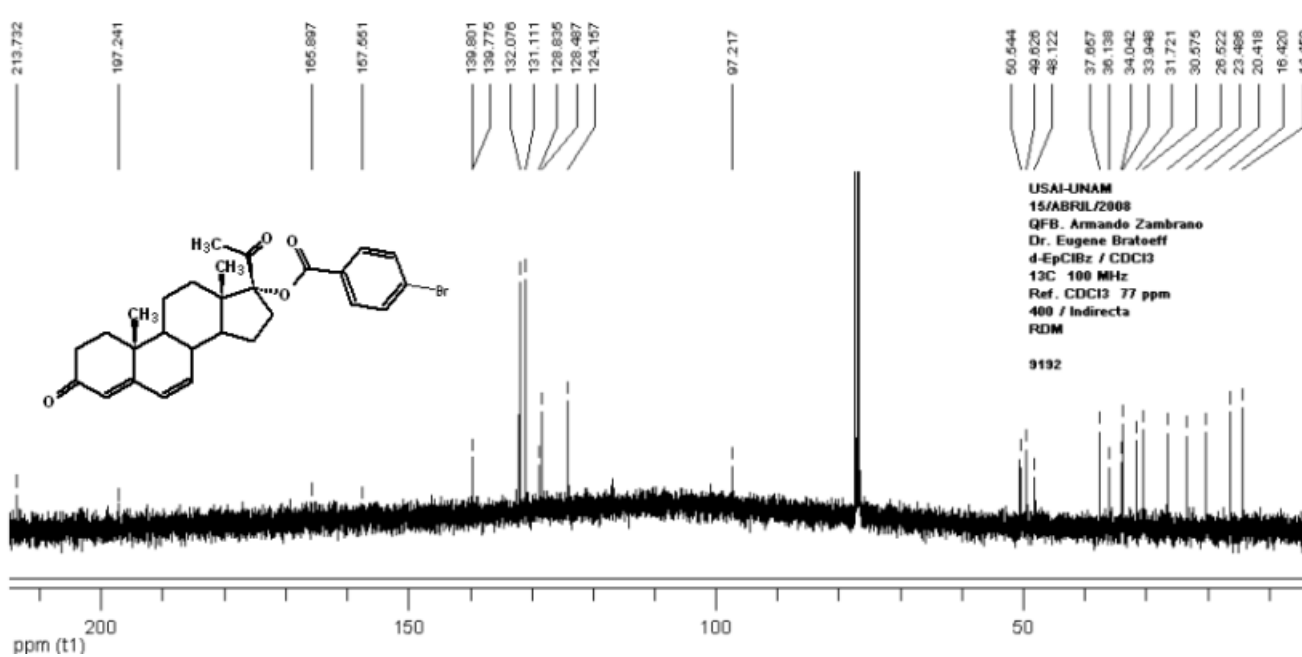


Figura 23.5. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -4'-bromobenzoiloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**8d**).

PBA 2008



PBA 2008

19th International Symposium
on Pharmaceutical & Biomedical Analysis

Certificate of attendance

This is to certify that

Armando Zambrano

from

*National Autonomous University of Mexico, Mexico,
Mexico*

has attended the 19th International Symposium
on Pharmaceutical and Biomedical Analysis
(PBA 2008) from 8 to 12 June 2008
in Gdańsk, Poland

On behalf of the Organizing Committee

Roman Kaliszan
Chairman
Gdańsk, 8 June 2008