



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE
DESHIDROEPIANDROSTERONA CON UN CARBAZOL Y UN TRIAZOL EN C-17
COMO POSIBLES ANTIANDRÓGENOS”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. AYLIN VIVIANA SILVA ORTIZ

TUTOR: EUGENE A. BRATOEFF T
LABORATORIO 125, EDIFICIO “E”, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F., 2013



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. Rafael Castillo Bocanegra
VOCAL:	Dr. Jesús Sandoval Ramírez
VOCAL:	Dr. Benjamín Ortiz Mendoza
VOCAL:	M. en C Baldomero Esquivel Rodríguez
SECRETARIO:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents

SITIO 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.
- Unidad de pruebas biológicas, Edificio “B”, Instituto de Química, UNAM, bajo la dirección de la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTE PROYECTO FUERON PRESENTADOS EN:

3° Congreso de Alumnos de Posgrado, UNAM, 2013

Unidad de Posgrado, UNAM, México, D.F., del 24 al 26 de abril de 2013.

“Síntesis y evaluación biológica de derivados de deshidroepiandrosterona con un carbazol y un triazol en c-17 como posibles antiandrógenos”.

Aylin Viviana Silva Ortiz¹, Eugene Bratoeff¹, Marisa Cabeza Salinas². ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México. ²Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100. México, D.F., C.P. 04960, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de México por la oportunidad brindada para realizar mis estudios y adquirir nuevos conocimientos.

Al Dr. Eugene Bratoeff, por su paciencia, por todo el tiempo brindado y por compartir conmigo un poco de todo su conocimiento, por aceptarme en su grupo de trabajo y permitirme realizar este proyecto bajo su asesoría. Mil gracias.

Al proyecto DGAPA IN211312 por el apoyo económico brindado.

A la Dra. Marisa Cabeza y a la M. en C. M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan por su colaboración con la realización de las pruebas biológicas.

Al personal de la USAI, por la realización de los experimentos de IR, UV, RMN y Masas.

A los miembros del jurado, por las correcciones y aportes realizados a este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca asignada durante mis estudios de Maestría, sin su apoyo no hubiera sido posible desarrollar este trabajo (numero de becario 258067)

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por todas las bendiciones recibidas, porque: “De nada sirve la inteligencia sin Dios pues Él es quien me da la victoria”.

A mi madre, Nelcy Ortiz, mi ejemplo, mi inspiración, mi fuerza y mi motivo para seguir adelante, eres una mujer excepcional, te admiro con todo mí ser, tu eres mi más grande bendición, mi vida entera te la debo y siempre estaré agradecida por qué me diste la oportunidad de vivir, de crecer y de formarme como persona y académicamente.

A mis abuelos Leonor Ospina y Julio Ortiz, sus enseñanzas estarán conmigo el resto de mis días, gracias por el apoyo, la paciencia y el amor, ustedes me enseñaron que la humildad convierte al hombre más pequeño en el ser más grande.

A mi familia porque siempre están conmigo aun en la distancia.

A mis tías, Gloria Ortiz, Melva Ortiz, Dora Ortiz, Rosa Ortiz, Rubiela Ortiz por todas sus oraciones, fueron mi apoyo en momentos de debilidad y de tristeza, son una bendición. A mi tía Lorena Ortiz por ser la alegría de la casa por robarse mis sonrisas con su inocencia.

A mis primos Angélica Giraldo, Diego Giraldo, Sara Cortes, Felipe Cortes y Carolina Benjumea, por estar siempre conmigo, por cada risa y lagrima compartida, por todos esos momentos con los que hemos crecido juntos. Gracias por que con ustedes jamás conocí la soledad.

A mis compañeros, mis amigos del laboratorio 125, gracias a todos por brindarme su amistad y un lugar en sus vidas

A la Dra. Elena Ramírez, por todo el apoyo, por recibirme y orientarme con todos los consejos y la ayuda brindada, la admiro grandemente.

A Gustavo Guerrero, gracias por estos últimos meses, han sido muy gratos, divertidos y especiales para mí.

A mi pequeño Bruno, aunque no estés yo siempre te recordare, gracias por la compañía y la eterna fidelidad que me brindaste. Te buscare en la eternidad.

A mis amigos Jennifer García, Andrés Sánchez y Héctor Cortes. Gracias por estar siempre pendientes de mí, por su amistad y por su apoyo incondicional.

A mis amigos del laboratorio 100 de la Facultad de Química.

A todos aquellos que aportaron para la realización de este proyecto.

*A mi madre y Bruno
gracias por creer en mí*

ÍNDICE	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	5
1.1. El cáncer	5
1.2. Generalidades sobre la próstata	6
1.3. Hiperplasia prostática y cáncer de próstata	7
1.3.1. Detección temprana del cáncer de próstata	9
1.3.2. Tratamientos comunes sobre el cáncer de próstata	10
1.3.2.1. Terapia hormonal	10
1.4. Esteroides	13
1.4.1. Hormonas sexuales	14
1.5. Enzima 5 α -Reductasa	15
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo general	18
2.2. Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
3.1. Desarrollo químico	19
3.1.1. Ruta sintética	21
3.1.2. Propiedades físicas y espectroscópicas de la (3 β)-hidroxi-androst-5-en-17-ona (I)	23
3.1.3. Síntesis de la (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa).	24
3.1.4. Síntesis de la (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb).	24
3.1.5. Síntesis de (3 β)-alquiloiloxi-androst-5-en-17-ona (IIc-IIf).	25
3.1.6. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-androst-5-en-17-ona (IIc-IIf).	25
3.1.7. Síntesis de (3 β)-alquiloiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIa-IIIf).	28

3.1.8. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-17-cloro-16-formil-androsta-5,16-dieno (IIIa-IIIc).	29
3.1.9. Síntesis de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa-IVf).	32
3.1.10. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa-IVf).	33
3.1.11. Síntesis de (3 β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).	37
3.1.12. Síntesis de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va-Vf).	39
3.1.13. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va-Vf).	39
3.1.14. Síntesis de (3 β)-hidroxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).	43
3.2. Desarrollo biológico	44
3.2.1. Material biológico	44
3.2.2. Equipos	44
3.2.3. Sustancias	45
3.2.4. Ensayo <i>in vitro</i> , citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas	45
3.2.5. Ensayo <i>in vitro</i> , inhibición de la enzima 5 α -reductasa	49
3.2.5.1. Extracción de la enzima 5 α -reductasa	49
3.2.5.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50% (CI ₅₀) de la enzima 5 α -reductasa en glándulas prostáticas humanas	49
3.2.5.3. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) de la enzima 5 α -reductasa en vesículas de hámster	50
3.2.5.4. Ensayo de inhibición de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD).	51
CAPÍTULO 4. ANALISIS DE RESULTADOS	
4.1. Parte química	54

ÍNDICE

4.2. Parte biológica	58
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	67

 ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1: Ejemplo de antiandrógenos comerciales de tipo no esterooidal	11
Tabla 1.2: Ejemplo de antiandrógenos de tipo esterooidal	12
Tabla 1.3: Diferencias entre las isoformas 1 y 2 de la enzima 5 α -reductasa	15
Tabla 3.1. Compuestos finales sintetizados.	19
Tabla 3.2. Propiedades físicas de la materia prima.	23
Tabla 3.3. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas	23
Tabla 3.4. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos IIa-IIIf.	26
Tabla 3.5. Señales características de IR (IIa-IIIf).	26
Tabla 3.6. Señales características de RMN ^1H y RMN ^{13}C (IIa-IIIf).	27
Tabla 3.7. Fragmentos más comunes en EM FAB $^+$ (m/z) (IIa-IIIf)	28
Tabla 3.8. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos IIIa-IIIIf.	29
Tabla 3.9. Señales características de IR y UV (IIIa-IIIIf).	30
Tabla 3.10. Señales características de RMN ^1H y RMN ^{13}C (IIIa-IIIIf).	30
Tabla 3.11. Fragmentos más comunes en EM FAB $^+$ (m/z) (IIIa-IIIIf).	31
Tabla 3.12. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos finales IVa-IVf.	33
Tabla 3.13. Señales características de IR y UV (IVa-IVf).	33
Tabla 3.14. Señales características de RMN ^1H y RMN ^{13}C (IVa-IVf).	34
Tabla 3.15. Fragmentos más comunes en EM FAB $^+$ (m/z) (IVa-IVf)	36
Tabla 3.16. Propiedades físicas de VI.	37
Tabla 3.17. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de VI.	37
Tabla 3.18. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos Va-Vf.	40
Tabla 3.19. Señales características de IR y UV (Va-Vf).	40
Tabla 3.20. Señales características de RMN ^1H y RMN ^{13}C (Va-Vf).	41
Tabla 3.21. Fragmentos más comunes en EM FAB $^+$ (m/z) (Va-Vf).	42
Tabla 3.22. Propiedades físicas de VII.	43
Tabla 3.23. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de VII.	43
Tabla 3.24. Resultados de pruebas <i>in vitro</i> en cultivo celular en líneas cancerosas humanas.	46
Tabla 3.25. Resultados de inhibición de la enzima 17 β - hidroxisteroide deshidrogenasa.	52
Tabla 4.1. Valores calculados de Log P para los compuestos finales sintetizados.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura R.1. Finasterida	2
Figura I.1: Diferencia entre células sanas y células cancerígenas benignas y malignas.	3
Figura 1.1. Diez Principales Tipos de Cáncer de los casos de cáncer nuevos y defunciones estimadas por sexo, Estados Unidos, 2013.	6
Figura 1.2. Esquema del sistema reproductor masculino.	7
Figura 1.3. Abiraterona	12
Figura 1.4. Sistema del cicloperhidrofenantreno	13
Figura 1.5: Esteroidogénesis en los humanos	14
Figura 1.6. Reacción de la enzima 5α -reductasa sobre la testosterona.	15
Figura 1.7. Mecanismo de reducción de la testosterona a la dihidrotestosterona por acción de la enzima 5α -reductasa.	16
Figura 1.8. Mecanismo de reducción de la finasterida a la dihidrofinasterida por acción de la enzima 5α -reductasa.	17
Figura 3.1. Ruta sintética	21
Figura 3.2. Síntesis de VI y VII.	22
Figura 3.3. Deshidroepiandrosterona.	23
Figura 4.1. Fragmentos más comunes para los esteroides con un éster en C-3	55
Figura 4.2. Fragmento más común para un esteroide con un éster en C-3 y un grupo carbazol en C-17	57
Figura 4.4. Gráfica de resultados de pruebas in vitro para los compuestos finales de carbazol (IVa-IVf, VI) Vs % inhibición.	58
Figura 4.5. Gráfica de resultados de pruebas in vitro para los compuestos finales de triazol (Va-Vf, VII) Vs % inhibición.	59
Figura 4.6. Gráfica de resultados de pruebas sobre la enzima 17β -HSD para los compuestos finales de triazol (Va-Vf, VII) Vs % IC_{50} .	60
Figura 4.7. Vías metabólicas para la biosíntesis de la DHT en la próstata.	60

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
A.1. Espectros de (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa).	67
A.2. Espectros de (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb).	69
A.3. Espectros de (3 β)-propioniloxi-androst-5-en-17-ona (IIc).	71
A.4. Espectros de (3 β)-butiriloxi-androst-5-en-17-ona (IId).	73
A.5. Espectros de (3 β)-valeriloxi-androst-5-en-17-ona (IIe).	75
A.6. Espectros de (3 β)-hexaniloxi-androst-5-en-17-ona (IIIf).	77
A.7. Espectros de (3 β)-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIa).	79
A.8. Espectros de (3 β)-acetiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIb).	81
A.9. Espectros de (3 β)-propioniloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIc).	84
A.10. Espectros de (3 β)-butiriloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIId).	86
A.11. Espectros de (3 β)-valeriloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIe).	89
A.12. Espectros de (3 β)-hexaniloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIIf).	91
A.13. Espectros de (3 β)-formiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa).	94
A.14. Espectros de (3 β)-acetiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno- (IVb).	96
A.15. Espectros de (3 β)-propioniloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVc).	99
A.16. Espectros de (3 β)-butiriloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVd).	101
A.17. Espectros de (3 β)-valeriloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVe).	104
A.18. Espectros de (3 β)-hexaniloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVf).	106
A.19. Espectros de (3 β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).	109
A.20. Espectros de (3 β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va).	111
A.21. Espectros de (3 β)-acetiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vb).	114
A.22. Espectros de (3 β)-propioniloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vc).	116
A.23. Espectros de (3 β)-butiriloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vd).	119
A.24. Espectros de (3 β)-valeriloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Ve).	121
A.25. Espectros de (3 β)-hexaniloxi-17-(1H-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vf).	124
A.26. Espectros de (3 β)-hidroxi--17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).	126

ABREVIATURAS**SIMBOLOS**

HPB	Hiperplasia prostática benigna
DHT	Dihidrotestosterona
DHEA	Deshidroepiandrosterona
T	testosterona
IR	Infrarrojo
UV	Ultravioleta
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
EM	Espectrometría de masas
ADN	Acido desoxirribonucleico
NADPH	Nicotinamida de adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NADP ⁺	Nicotinamida de adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
CCF	Cromatografía en capa fina
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	Dimetilaminopiridina
uma	Unidad de masa atómica
J	Constante de acoplamiento
s	Señal simple en RMN ¹ H
d	Señal doble en RMN ¹ H
t	Señal triple en RMN ¹ H
m	Señal multiple en RMN ¹ H
ppm	Partes por millón
m/z	Relación masa carga en EM
nm	Nanómetros
MHz	MegaHertz
mL	Mililitros
mg	Miligramos
mmol	Milimoles
DMF	Dimetilformamida
μL	Microlitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar

RESUMEN

En la actualidad el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna (HPB) son dos grandes padecimientos que afectan a la población masculina, de edad avanzada (mayores de 45 años), ambos padecimientos están directamente relacionados con el exceso de andrógenos en el organismo.

Los principales andrógenos producidos por el organismo son la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT), siendo el primero el andrógeno más conocido. A partir de éste y por medio de la enzima 5α -reductasa se genera la DHT, un andrógeno más potente, proceso que afecta el cáncer de próstata y la HBP, convirtiendo este estudio de inhibición en un campo atractivo para la generación de nuevos antiandrógenos.

Debido a que la DHT presenta mayor afinidad por el sitio receptor de andrógenos, se ha buscado disminuir la concentración de éste en el organismo, constituyendo un blanco para el diseño y desarrollo racional de fármacos antiandrógenos, ya que al inhibir la enzima encargada de esta transformación, solo se detienen las acciones androgénicas, mas no las fisiológicas de la testosterona, causando efectos secundarios despreciables.

En este trabajo se describe la síntesis y evaluación biológica de varios compuestos derivados de la deshidroepiandrosterona (DHEA), con ésteres lineales en C-3; una serie con un heteroátomo de carbazol y otra con 1,2,4-triazol, ambos en C-17. Las estructuras químicas se caracterizaron por medio de análisis espectroscópicos como IR, UV, RMN¹H y RMN¹³C y espectrometría de masas.

El análisis de evaluación biológica se llevó a cabo en tres partes, primero *in vitro* donde se evaluó la citotoxicidad en líneas celulares cancerosas, el segundo se evaluó el porcentaje de inhibición de la enzima 5α -reductasa de próstata de cadáver humano y de hámster, y la tercera parte consistió en la evaluación *in vivo*, teniendo en cuenta el crecimiento de la próstata en hámsteres castrados, comparado con la Finasterida (Proscar[®]) (figura R.1.), que es el fármaco de preferencia en el mercado.

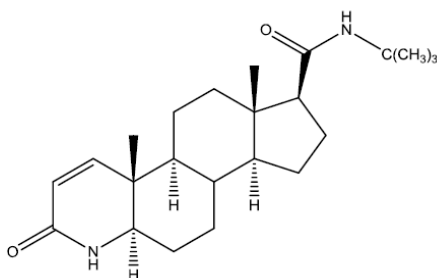


Figura R.1. Finasterida

En el ensayo *in vitro* sobre líneas celulares cancerosas (PC-3, MCF-7, SKLU-1), fueron evaluados las dos series de compuestos, donde solo los compuestos que contenían en C-17 el grupo 1,2,4-triazol (Va-Vf, VII) presentaron una gran actividad inhibitoria, sin embargo, para los ensayos sobre la enzima 5 α - reductasa no se observó ningún tipo de actividad. Estos compuestos también fueron evaluados sobre la enzima 17 β - hidroxisteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) presentando una gran actividad inhibitoria sobre esta, la cual se encarga de transformar la androstenediona en testosterona, presentando así un nuevo campo de evaluación y estudio para este tipo de compuestos derivados de la DHEA.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el Cáncer de próstata y la Hiperplasia Benigna Prostática (HBP) constituyen un problema de entorno nacional y mundial, debido a su alta incidencia en hombres maduros (mayor de 45 años), esto como resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), que produce la degeneración de las células, causando como consecuencia tumores malignos, los cuales pueden migrar de y desplazarse a otros tejidos (metástasis).

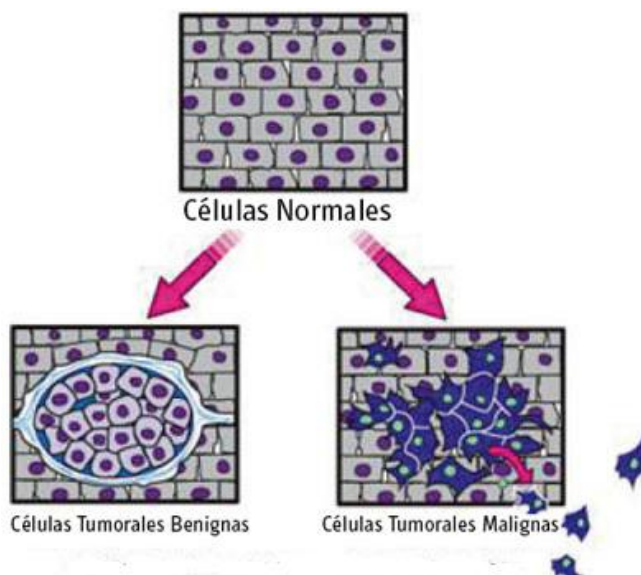


Figura I.1. Diferencia entre células sanas y células cancerígenas benignas y malignas.

El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar mundial entre los tumores causantes de la muerte en varones mayores de 60 años, mientras que la hiperplasia prostática benigna representa la segunda causa de cirugía en países como Estados Unidos. Conforme el hombre envejece su próstata va aumentando en tamaño, lo que puede dar lugar a una hiperplasia. Los métodos preventivos de estas enfermedades comprenden el Examen Digital Rectal (EDR) y el Antígeno Prostático Específico (PSA), la cirugía es el método más aceptado para el tratamiento de estas enfermedades, sin embargo afecta la calidad de vida del paciente.¹

En la actualidad existen otras alternativas terapéuticas como el uso de antiandrógenos de naturaleza esterooidal o no esterooidal, que por diversos mecanismos modifican la producción de andrógenos.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo es sintetizar y evaluar biológicamente nuevos compuestos antiandrogénicos de tipo esteroidal que puedan ser usados para el tratamiento contra el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna, para el mejoramiento de la calidad de vida de la población masculina.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. El cáncer

El cuerpo está compuesto por billones de células vivas. Las células normales del cuerpo crecen, se dividen y mueren de manera ordenada. Durante los primeros años de vida de una persona, las células normales se dividen más rápidamente para facilitar el crecimiento de la persona. Una vez se llega a la edad adulta, la mayoría de las células solo se dividen para reemplazar las células desgastadas o las que están muriendo y para reparar lesiones.

El cáncer se origina cuando las células de cualquier parte del organismo comienzan a crecer de manera descontrolada existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan debido al crecimiento sin control de células anormales.

El crecimiento de las células cancerosas es diferente al crecimiento de las células normales. En lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y forman nuevas células anormales. Estas células también pueden invadir o propagarse a otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. El hecho de que crezcan sin control e invadan otros tejidos es lo que hace que una célula sea cancerosa.

Las células se transforman en cancerosas debido a una alteración en el ADN, este se encuentra en cada célula y dirige todas sus actividades. En una célula normal, cuando se altera el ADN, la célula repara el daño o muere. Por el contrario, en las células cancerosas el ADN dañado no se repara, y la célula no muere como debería. En lugar de esto, esta célula persiste en producir más células que el cuerpo no necesita. Todas estas células nuevas tendrán el mismo ADN dañado que tuvo la primera.

En la mayoría de los casos, las células cancerosas forman un tumor. Algunos tipos de cáncer, como la leucemia, rara vez forman tumores. En su lugar, estas células cancerosas afectan la sangre, así como los órganos hematopoyéticos (productores de sangre) y circulan a través de otros tejidos en los cuales crecen.

No todos los tumores son cancerosos. A los tumores que no son cancerosos se les llama tumores *benignos*. Los tumores benignos pueden causar problemas, ya que pueden crecer mucho y ocasionar presión en los tejidos y órganos sanos. Sin embargo, estos tumores no

pueden crecer hacia otros tejidos o invadirlos. Debido a que no pueden invadir otros tejidos, tampoco se pueden propagar a otras partes del cuerpo (metástasis). Estos tumores casi nunca ponen en riesgo la vida de una persona.²

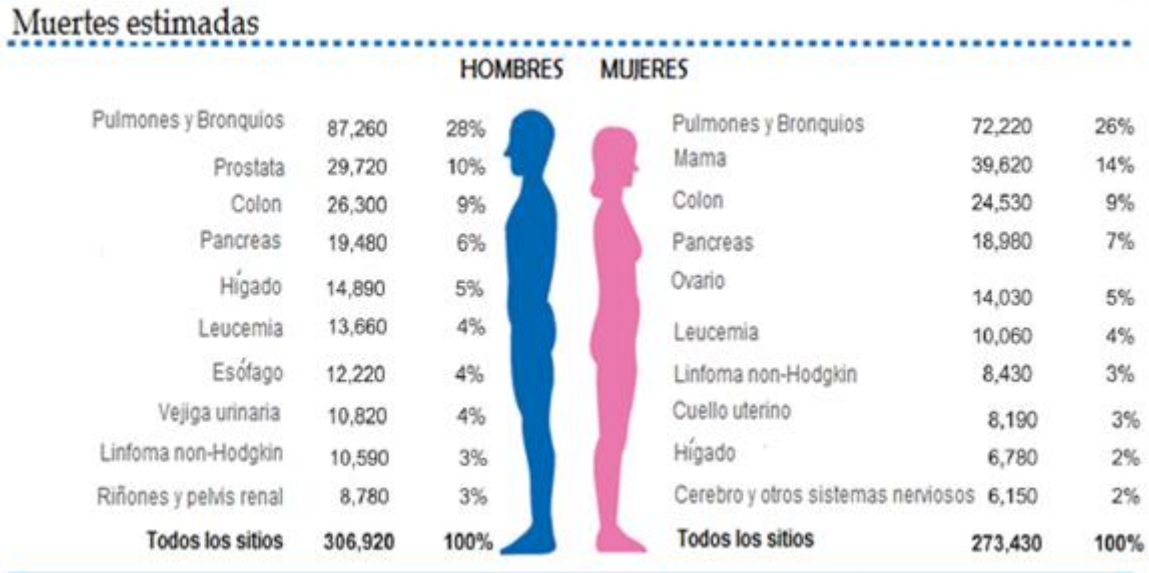


Figura 1.1. Diez Principales Tipos de Cáncer de los casos de cáncer nuevos y defunciones estimadas por sexo, Estados Unidos, 2013.³

1.2. Generalidades sobre la próstata

La próstata es una glándula que se encuentra presente solo en hombres. Se encuentra delante del recto y debajo de la vejiga. El tamaño de la próstata varía con la edad. En los hombres más jóvenes, la próstata es del tamaño de una nuez aproximadamente. Sin embargo puede ser mucho más grande en hombres de más edad.

La función de la próstata consiste en producir cierta cantidad de líquido que protege y nutre a los espermatozoides presentes en el semen. Esto causa que el semen sea más líquido.

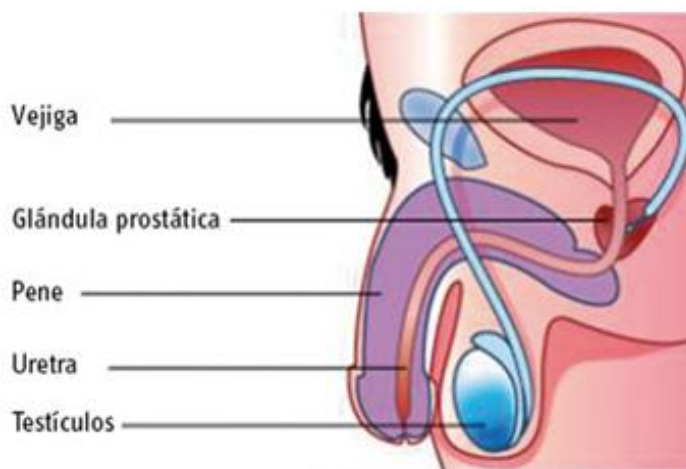


Figura 1.2. Esquema del sistema reproductor masculino.⁴

La próstata comienza a desarrollarse antes del nacimiento y su crecimiento se acelera en la pubertad ya que es promovido por hormonas masculinas (llamadas andrógenos). El andrógeno principal es la Testosterona, la enzima 5α -reductasa transforma la testosterona en Dihidrotestosterona (DHT) que es la hormona principal que envía señal a la próstata para que crezca.

1.3. Hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata.

A medida que el hombre envejece, la parte interior de la próstata a menudo sigue creciendo lo que puede causar una condición llamada Hiperplasia prostática benigna (BPH). Cuando se presenta esta afección, el tejido de la próstata puede presionar la uretra, lo que causa problemas al pasar la orina.

La BPH no es cáncer, ni se convierte en cáncer, aunque puede ser un problema de salud grave para algunos hombres. Si requiere tratamiento, a menudo se pueden usar medicinas para reducir el tamaño de la próstata o para relajar los músculos que se encuentran en éste, si las medicinas no son útiles, puede que sea necesario emplear algún tipo de cirugía.

En la próstata se encuentran varios tipos de células, pero casi todos los casos de cáncer de próstata se desarrollan a partir de las células glandulares. Las células glandulares producen el líquido de la próstata que se agrega al semen. El término médico para un cáncer que comienza en las células glandulares es *adenocarcinoma*.

Otros tipos de cáncer también pueden comenzar en la glándula prostática, incluyendo sarcomas, carcinomas de células pequeñas, y carcinomas de células de transición. Pero estos tipos de cáncer de próstata no son frecuentes.

Algunos cánceres de próstata pueden crecer y propagarse rápidamente, pero la mayoría crece lentamente. De hecho, los estudios realizados en algunas autopsias muestran que muchos hombres de edad avanzada (e incluso algunos hombres más jóvenes) que murieron de otras enfermedades también tenían cáncer de próstata que nunca les afectó durante sus vidas. En muchos casos, ellos no sabían, y ni siquiera sus médicos, que tenían cáncer de próstata.

Aunque aún no se entiende completamente las causas del cáncer de próstata, se han encontrado varios factores que pueden cambiar el riesgo de padecer esta enfermedad:

- **Edad:** el cáncer de próstata ocurre en muy pocas ocasiones en hombres menores de 40 años, pero la probabilidad de padecerlo aumenta rápidamente después de los 50 años.
- **Raza/grupo étnico:** el cáncer de próstata ocurre con más frecuencia en los hombres de raza negra que en los hombres de otras razas. Este ocurre con menos frecuencia en los hombres asiáticos-americanos y en los hispanos/latinos que en los hombres blancos. No están claras las razones de estas diferencias raciales y étnicas.
- **Nacionalidad:** el cáncer de próstata es más común en Norteamérica y en la región noroeste de Europa, Australia y en las islas del Caribe, es menos común en África, Centroamérica y Sudamérica. Las razones para esto no están claras.
- **Antecedentes familiares:** parece que el cáncer de próstata afecta más algunas familias, lo cual sugiere que en algunos casos puede haber un factor hereditario o genético. Si el padre o el hermano de un hombre padecen cáncer de próstata, se duplica el riesgo de que este hombre padezca la enfermedad. Asimismo, el riesgo es mucho mayor en el caso de los hombres que tienen varios familiares afectados, particularmente si tales familiares eran jóvenes en el momento en que se les encontró el cáncer.

- **Genes:** Los científicos han descubierto varios cambios genéticos heredados que parecen aumentar el riesgo de cáncer de próstata, pero probablemente son sólo responsables de un pequeño número de casos en general. Todavía no están disponibles las pruebas genéticas para la mayoría de estos cambios genéticos.
- **Alimentación:** No está claro cuál es el papel exacto que desempeña la alimentación en el desarrollo del cáncer de próstata. Los hombres que comen muchas carnes rojas o productos lácteos altos en grasa parecen tener una probabilidad ligeramente mayor de cáncer de próstata. Estos hombres también tienden a comer menos alimentos de origen vegetal como frutas, ensaladas y verduras. Los médicos no están seguros cuál de estos factores es responsable del aumento en el riesgo.
- **Tabaquismo:** La mayoría de los estudios no han encontrado una asociación entre el hábito de fumar y el riesgo de padecer cáncer de próstata. Algunas investigaciones recientes han vinculado el fumar con un posible aumento pequeño en el riesgo de morir a causa de cáncer de próstata, aunque este nuevo hallazgo necesitará ser confirmado por otros estudios.

1.3.1. Detección temprana del cáncer de próstata

La detección temprana se refiere a las pruebas que se realizan para encontrar una enfermedad, como el cáncer, en personas que no presentan síntomas de esa enfermedad. Para algunos tipos de cáncer, las pruebas de detección pueden ayudar a encontrar cánceres en una etapa cuando son más fáciles de curar.

Frecuentemente se puede encontrar el cáncer de próstata en sus etapas tempranas mediante el análisis de la cantidad del antígeno prostático específico (*prostate-specific-antigen*, PSA) en la sangre de un hombre.

Prueba prostática del antígeno específico (PSA): El antígeno prostático específico (PSA) es una sustancia producida por las células en la glándula prostática (es producido por células normales y cancerosas). El PSA se encuentra principalmente en el semen, aunque también se puede encontrar en pequeñas cantidades en la sangre. La mayoría de los hombres saludables tiene una concentración menor a 4 nanogramos por mililitro de sangre (ng/mL). La probabilidad de tener cáncer de próstata aumenta a medida que el nivel de PSA sube.

Examen digital del recto (DRE): Durante el examen digital del recto (DRE), el médico introduce un dedo cubierto con un guante en el recto a fin de palpar cualquier abultamiento o área firme en la próstata que pudiese ser cáncer. La glándula prostática se encuentra inmediatamente delante del recto y la mayoría de los cánceres comienzan en la parte posterior de la glándula.

1.3.2. Tratamientos comunes sobre el cáncer de próstata

Una vez que se haya diagnosticado su cáncer de próstata y que se haya determinado su grado y etapa, dependiendo de la situación, las opciones de tratamiento para los hombres con cáncer de próstata pueden incluir:

- Terapia expectante (espera en observación) o vigilancia activa.
- Cirugía.
- Radioterapia.
- Criocirugía (crioterapia).
- Quimioterapia.
- Tratamiento con vacunas.
- Terapia hormonal.

1.3.2.1. Terapia hormonal: A la terapia hormonal también se le llama *terapia de privación de andrógenos* (ADT) o *terapia supresora de andrógenos*. El objetivo de este tratamiento es reducir los niveles de las hormonas masculinas, llamadas andrógenos, en el cuerpo, o prevenir que estas hormonas alcancen las células cancerosas de la próstata.

Se pueden emplear varios tipos de terapia hormonal para tratar el cáncer de próstata.

Orquiectomía (castración): A pesar de que es un tipo de cirugía, su principal efecto es como una forma de terapia hormonal. En esta operación, el cirujano extirpa los testículos, que es donde se produce la mayor parte de los andrógenos (testosterona y DHT). Al eliminar esta fuente, la mayoría de los cánceres de próstata dejan de crecer o se reduce su tamaño por un tiempo.

Análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH): Estos medicamentos reducen la cantidad de testosterona producida por los testículos. El tratamiento con estos medicamentos algunas veces se le llama *castración química*, ya que reducen los niveles de andrógenos tan bien como la orquiectomía.

Antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH): Los antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (antagonistas LHRH) funcionan como los agonistas LHRH, pero reducen más rápidamente los niveles de testosterona y no causa exacerbación del tumor como lo hacen los agonistas LHRH.

Antiandrógenos: Los antiandrógenos bloquean la capacidad del cuerpo para utilizar cualquier andrógeno. Aun después de la orquiectomía, o durante el tratamiento con los análogos de la LHRH, las glándulas suprarrenales continúan produciendo pequeñas cantidades de andrógenos. Existen dos tipos de antiandrógenos, los esteroidales y los no esteroidales.

Los medicamentos de este tipo, no esteroidal, como la flutamida (Eulexin®), bicalutamida (Casodex®) y nilutamida (Nilandron®), vienen en forma de píldoras que se toman diariamente.

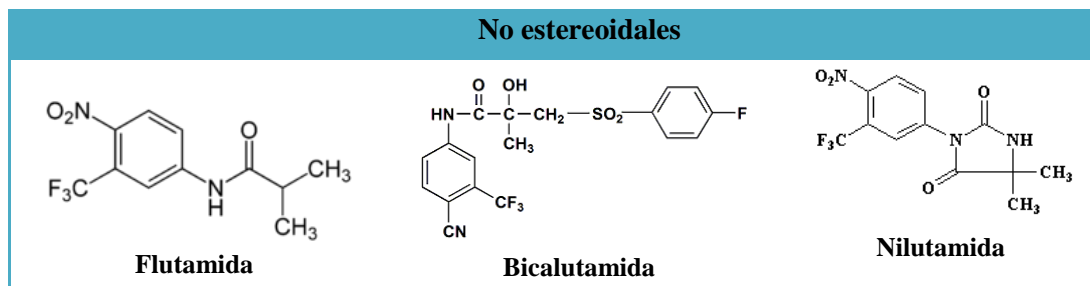


Tabla 1.1. Ejemplo de antiandrógenos comerciales de tipo no esteroidal

Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa: la 5 α -reductasa es la enzima que en el organismo transforma la testosterona a dihidrotestosterona (DHT), la hormona principal que causa el crecimiento de la próstata. Los medicamentos llamados inhibidores de la 5 α -reductasa bloquean la enzima y previenen la formación de DHT.

En la actualidad se usan dos inhibidores de la 5 α -reductasa para tratar la hiperplasia prostática benigna (HPB):

- Finasterida (Proscar®).
- Dutasterida (Avodart®).

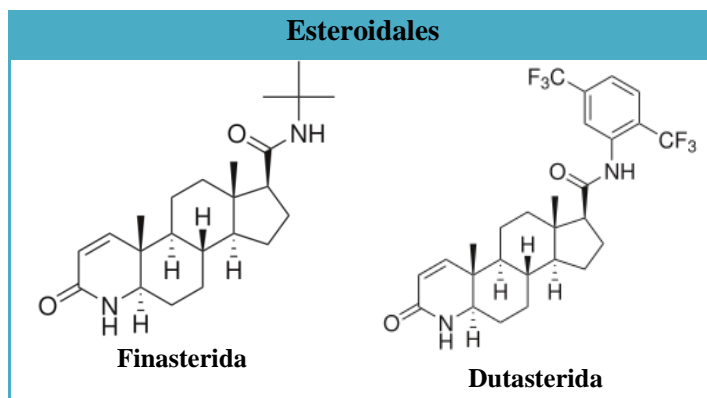


Tabla 1.2. Ejemplo de antiandrógenos de tipo esteroidal

Estos medicamentos pueden causar efectos secundarios relacionados con la sexualidad tal como disminución en el deseo sexual e impotencia. No obstante, puede ayudar con los problemas urinarios, tal como la dificultad para orinar y las fugas de orina (incontinencia).

Métodos de terapia hormonal más recientes: En los últimos años, los investigadores han desarrollado nuevos métodos de administrar terapia hormonal que pudieran probar ser más eficaces que los usados actualmente.⁵

Abiraterona (Zytiga®): los medicamentos, como los agonistas de la LHRH puede hacer que los testículos dejen de producir andrógenos, aunque otras células en el cuerpo, incluyendo las mismas células cancerosas de la próstata, pueden continuar con la producción de pequeñas cantidades, lo que puede estimular el crecimiento del cáncer. La abiraterona bloquea una enzima llamada CYP17, lo cual ayuda a que las glándulas suprarrenales dejen de producir andrógenos.

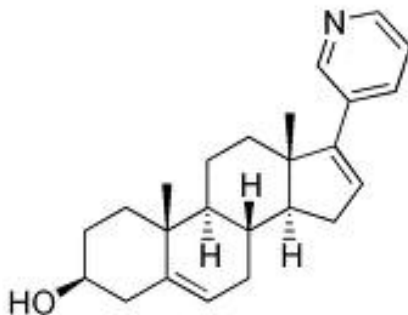


Figura 1.3. Abiraterona

1.4. Esteroides

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (También llamados agliconas esteroides), como ésteres o como glicósidos.⁶

Los esteroides son triterpenoides modificados que contienen el sistema tetracíclico del ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 1.4).

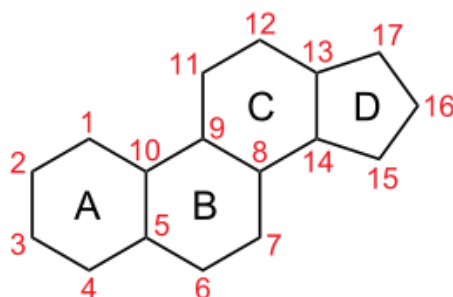
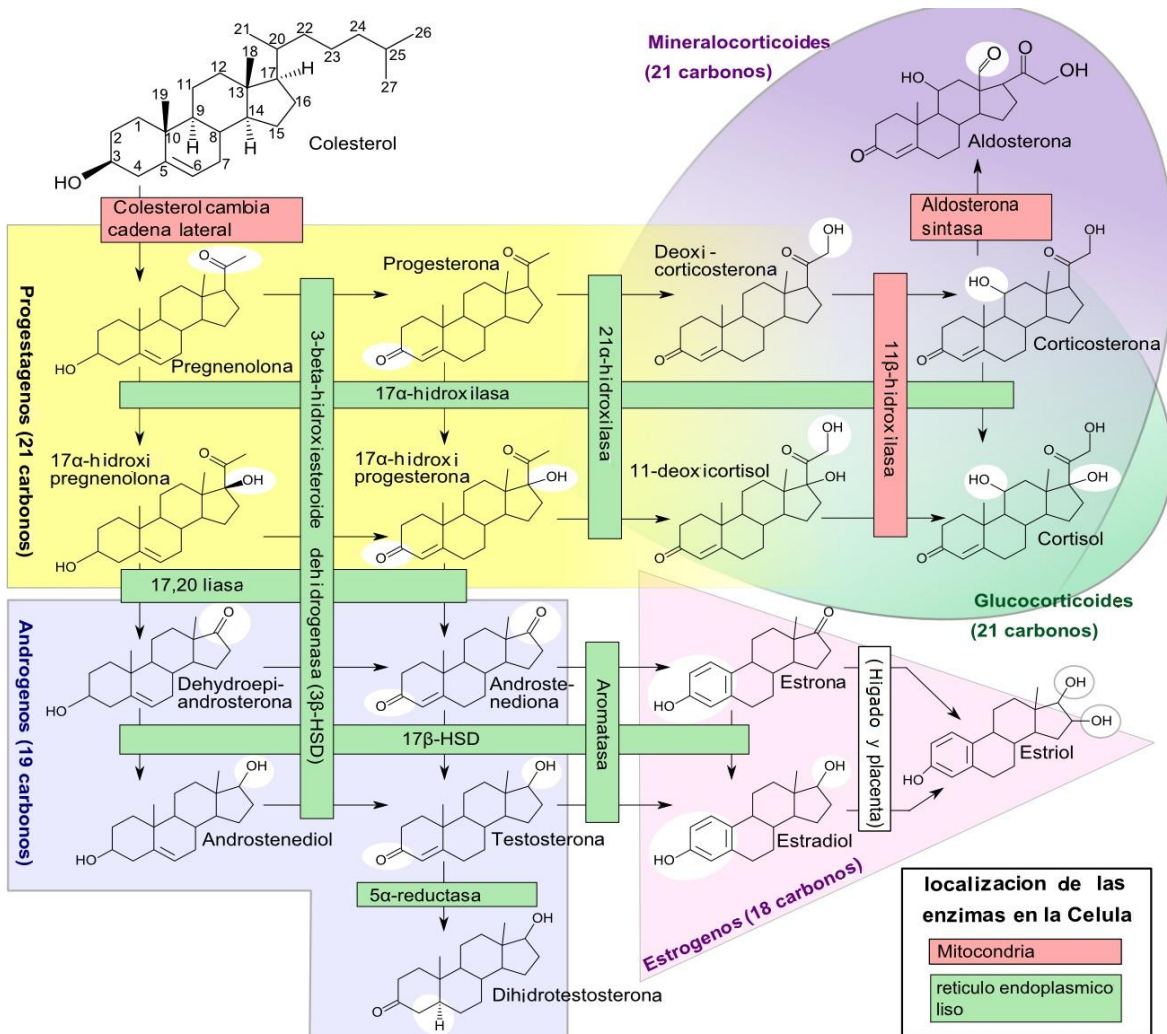


Figura 1.4. Sistema del ciclopenta[a]perhidrofenantreno.

En el hombre la mayor parte de los esteroides funcionan como hormonas, mensajeros químicos que son secretados por las glándulas endocrinas y llevados a través del torrente sanguíneo a los tejidos que son su destino.

El colesterol es el precursor para todos los esteroides producidos en el cuerpo humano. El colesterol libre, independientemente de su origen, debe ser transportado al interior mitocondrial donde ocurre la conversión a pregnenolona, esta migra de la mitocondria al citosol, donde ocurren el resto de las reacciones que llevan la síntesis de los esteroides.⁷



1.4.1. Hormonas sexuales

La estrona y el estradiol son las dos hormonas sexuales femeninas o estrógenos más importantes, estas hormonas se sintetizan en los ovarios a partir de la testosterona son responsables del desarrollo de las características sexuales secundarias en la mujer y en la regulación del ciclo menstrual.

La testosterona y la androsterona son las dos hormonas sexuales masculinas o andrógenos más importantes. Los andrógenos son responsables del desarrollo de las características sexuales secundarias en los hombres, cuando éstos se encuentran en la pubertad, y desarrollan tejidos y los músculos.⁹

1.5. Enzima 5 α -Reductasa

La enzima 5 α -reductasa cataliza la reducción de la testosterona y otros 4-eno-3-ceto esteroides a los correspondientes dihidrotestosterona DHT o 5-dihidro-3 ceto- esteroides utilizando como cofactor de esta reducción el NADPH (forma reducida). Existen dos tipos de esta enzima cronológicamente identificadas como isoforma tipo 1 y la isoforma tipo 2, las cuales fueron halladas de próstata humana.¹⁰

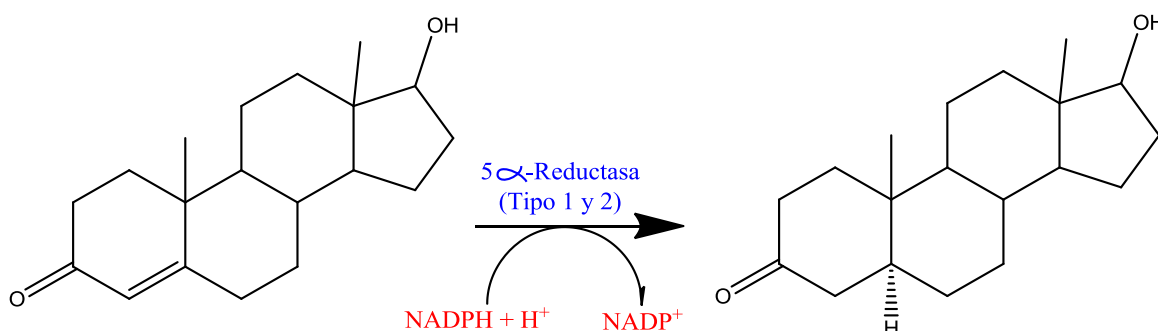


Figura 1.6. Reacción de la enzima 5 α -reductasa sobre la testosterona.¹¹

La ubicación de estas isoenzimas en el organismo varía dependiendo el tipo, la isoforma tipo 1 se encuentra principalmente en el hígado, cerebro y en el cuero cabelludo, mientras que la isoforma tipo 2 se encuentra principalmente en la próstata, las vesículas seminales y en la piel de los genitales.¹²

Estas dos isoformas tienen una similitud del 60% entre ellas y se pueden distinguir claramente por:

	Isoforma 1	Isoforma 2
pH óptimo	Alcalino 6 – 8.5	Acido ~5
Peso molecular	~23.000	~29.000
Constantes cinéticas (Km)	1 - 5 μ M	0.1 - 1 μ M
Numero de aminoácidos	259	254
Gen que codifica la enzima	Cromosoma 5 (SRD5A1)	Cromosoma 2 (SRD5A2)

Tabla 1.3. Diferencias entre las isoformas 1 y 2 de la enzima 5 α -reductasa.

El mecanismo de acción propuesto para la enzima 5α -reductasa en la reducción irreversible de la testosterona a DHT se encuentra involucrada la formación de un complejo binario entre la enzima y el cofactor NADPH, seguido por la formación de un complejo terciario con la testosterona.

Entonces ocurre una activación del sistema enonico mediante la interacción fuerte con un residuo electrofilico presente en el sitio activo de la enzima, generando un carbocation con carga deslocalizada, el cual es reducido selectivamente en el C-5 por la cara α , debido a la transferencia de un hidruro proveniente del NADPH.

Finalmente el enol formado, por medio de un tautomerismo ceto-enol, permite la liberación de dihidrotestosterona regenerando el complejo binario inicial NADP^+ -enzima, que con la liberación del NADP^+ , deja la enzima libre para un nuevo ciclo catalítico.¹³⁻¹⁷

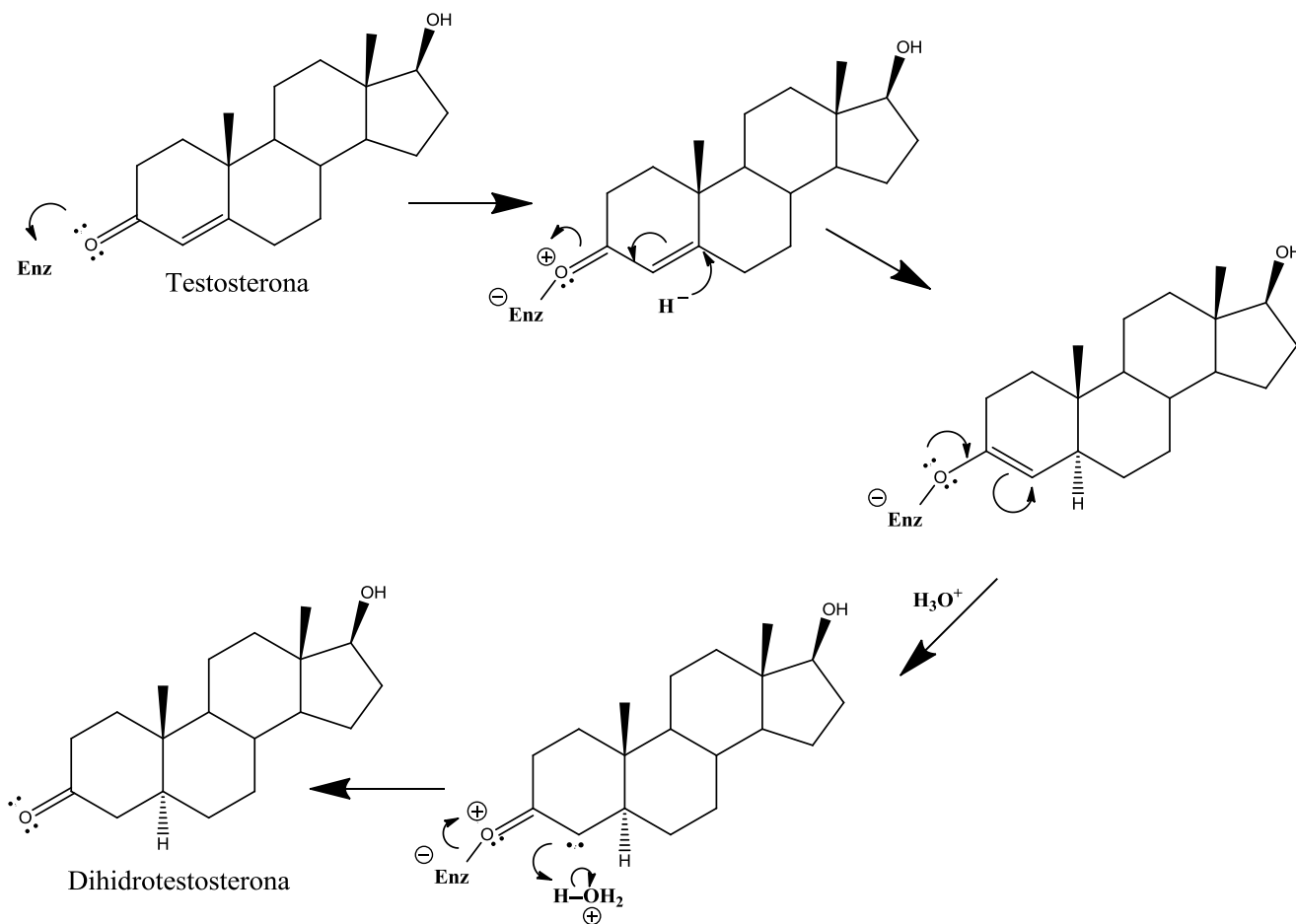


Figura 1.7. Mecanismo de reducción de la testosterona a la dihidrotestosterona por acción de la enzima 5α -reductasa.

El mecanismo de inhibición de la enzima 5α -reductasa con la Finasterida es el mismo con la testosterona, dando como producto la dihidrofinasterida, las dos reacciones divergen por que en la finasterida ya no se lleva a cabo la transferencia de protón al carbanión, lo que promueve la formación de un aducto entre el NADPH y el anillo lactámico.¹⁸

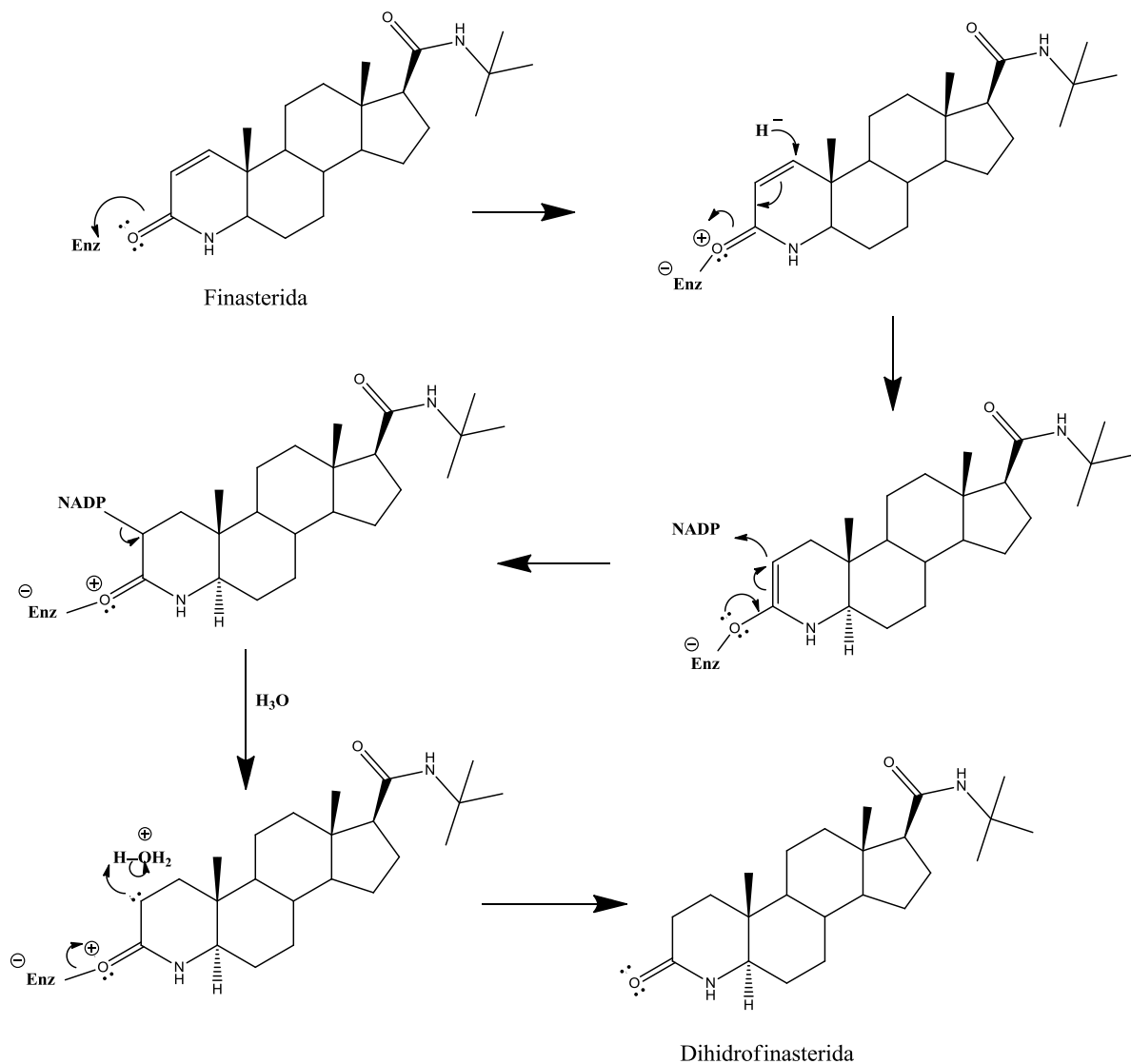


Figura 1.8. Mecanismo de reducción de la finasterida a la dihidrofinasterida por acción de la enzima 5α -reductasa.

CAPITULO 2

HIPOTESIS

En el transcurso de los últimos años en nuestro laboratorio se han sintetizado muchos derivados de la Progesterona o de la Deshidroepiandrosterona DHEA, los cuales han mostrado una alta actividad anticancerígena y también como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa. Con base en estos resultados, en este trabajo se describe la síntesis y evaluación de algunos nuevos derivados de la DHEA.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nuevos antiandrógenos esteroidales con un grupo carbazol o 1,2,4-triazol en el carbono 17 y ésteres lineales en el carbono 3 del esqueleto de la deshidroepiandrosterona, esperando que estas moléculas nuevas presenten una alta actividad biológica como antiandrógenos o una alta actividad anticancerígena.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nuevos derivados de la DHEA con una molécula de carbazol o 1,2,4-triazol en C-17, un grupo formilo en C-16 conjugado con una doble ligadura en C-16 y una función éster en C-3 que brinde características lipofílicas a la molécula.
- Purificar e identificar por métodos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos obtenidos con cada reacción.
- Evaluar *in vitro* la actividad anticancerígena en tres líneas celulares de cáncer: próstata (PC-3), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1).
- Evaluar *in vitro* el porcentaje de inhibición de la enzima 5 α -reductasa, de afinidad por el receptor androgénico y la citotoxicidad en líneas de células cancerosas.
- Evaluar la actividad antiandrogénica *in vivo* de los compuestos finales, comparando con la Finasterida como fármaco de uso convencional para el cáncer de próstata, por medio del ensayo de las vesículas seminales, peso de la próstata y prueba del órgano flanco.

CAPITULO 3

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este proyecto se dividió en dos partes. La primera consistió en la síntesis, purificación, caracterización física y espectroscópica de los compuestos finales e intermediarios.

La segunda parte consistió en la evaluación biológica, la cual se llevó a cabo mediante pruebas *in vitro*, por medio del ensayo de inhibición de la enzima 5 α -reductasa de próstata en células cancerígenas y afinidad por el receptor androgénico. Las pruebas *in vivo* basadas en el análisis del crecimiento de la próstata en hámsteres, vesículas seminales y pruebas del órgano flanco.

3.1. Desarrollo químico

Se realizó la síntesis química de los siguientes derivados de deshidroepiandroterona:

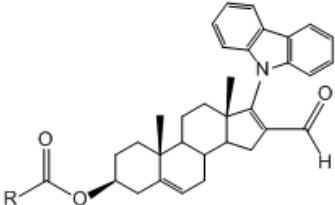
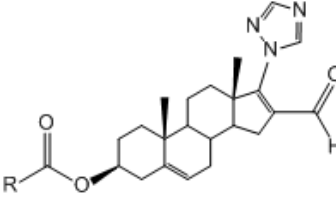
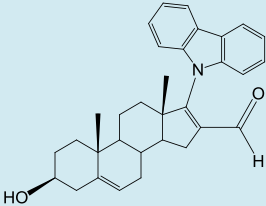
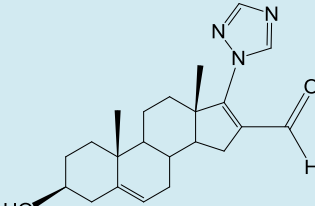
	
IVa-IVf	Va-Vf
R	R
a) H	a) H
b) CH ₃	b) CH ₃
c) CH ₃ CH ₂ -	c) CH ₃ CH ₂ -
d) CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	d) CH ₃ CH ₂ CH ₂ -
e) CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	e) CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -
f) CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	f) CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -
	
VI	VII

Tabla 3.1. Compuestos finales sintetizados.

Cada uno con su respectiva caracterización espectroscópica, tanto de los compuestos finales como de los compuestos intermediarios.

Para determinar el avance y la pureza de los productos de cada reacción se usó la cromatografía en capa fina (CCF) en cromatoplasmas de gel de sílice (69F 254, Merck) y diferentes sistemas de elución, utilizando como revelador una solución de CoCl_2 al 2% en $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (1:4) y lámpara de luz UV ($\lambda=254$ nm), de igual forma se determinó el punto de fusión de cada uno con un aparato de Fisher-Johns (no corregidos).

Para la caracterización de los compuestos se tuvieron en cuenta los siguientes equipos de análisis espectroscópico:

- Para la Espectrofotometría de absorción en el Infrarrojo (IR) un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer 1605 utilizando la técnica de la pastilla de bromuro de potasio (KBr).
- Para el análisis de espectrofotometría de absorción en el Ultravioleta (UV) se utilizó un equipo UV- VIS Perkin Elmer modelo Lambda 2, utilizando como disolvente metanol.
- Para la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y Carbono (RMN ^{13}C) se utilizaron equipos Inova Varian, de 400 y 300 MHz, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, donde el 0 en desplazamiento (δ) con base en tetrametilsilano (TMS). Para ambos análisis las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz.
- Para el análisis espectrométrico de masas se utilizó un equipo Thermo-Electron modelo DFS (Double Focus Sector) con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa), empleando la técnica FAB, utilizando una matriz de alcohol *m*-nitrobencílico que fue irradiada con átomos de cesio a temperatura menor de 50 °C, detectando los iones positivos.

3.1.1. Ruta sintética

La síntesis para los compuestos IIa-IIf, IIIa-IIIf, IVa-IVf y Va-Vf se llevo a cabo por medio de la siguiente ruta.¹⁹⁻²⁰

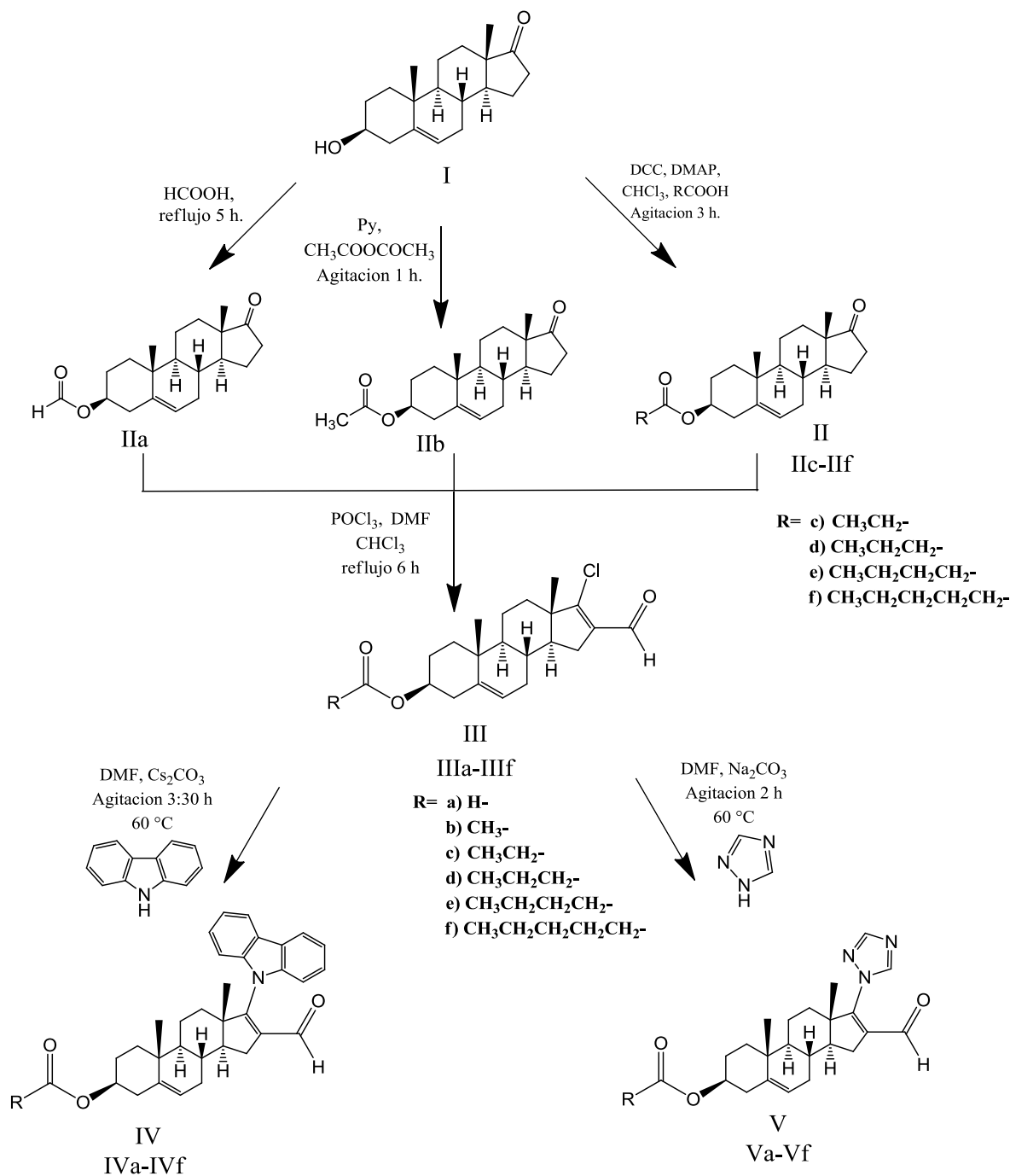


Figura 3.1. Ruta sintética

Para la síntesis de VI y VII se partió de IVb y Vb, a los cuales se les realizó una hidrólisis básica con hidróxido de sodio, metanol en cloroformo.

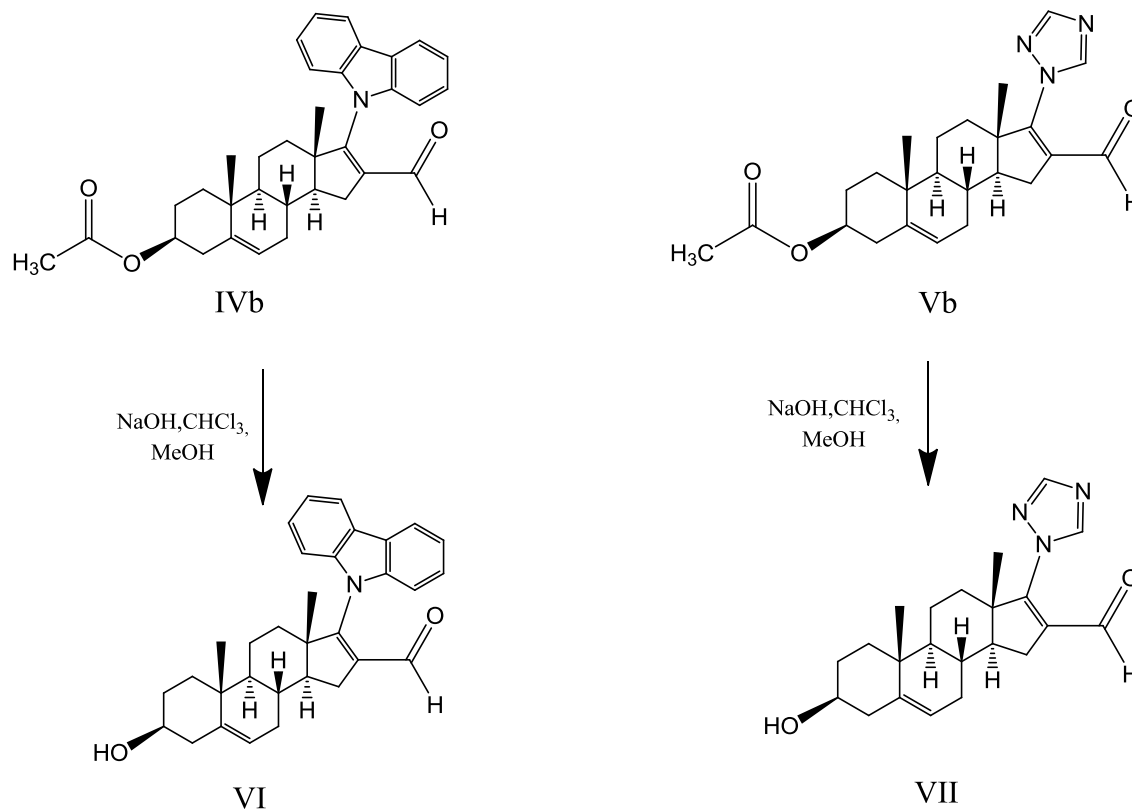


Figura 3.2. Síntesis de VI y VII.

3.1.2. Propiedades físicas y espectroscópicas de la 3 β -hidroxi-androst-5-en-17-ona (I)

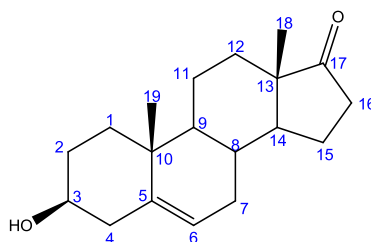


Figura 3.3. Deshidroepiandrosterona.

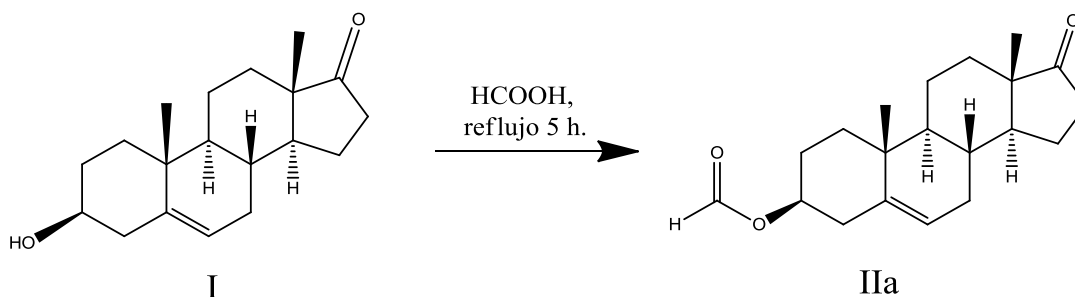
Tabla 3.2. Propiedades físicas de la materia prima.

Propiedades físicas	Valor
Formula molecular	C ₁₉ H ₂₈ O ₂
Peso molecular (uma)	288.42
Punto de fusión (°C)	136-137

Tabla 3.3. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas

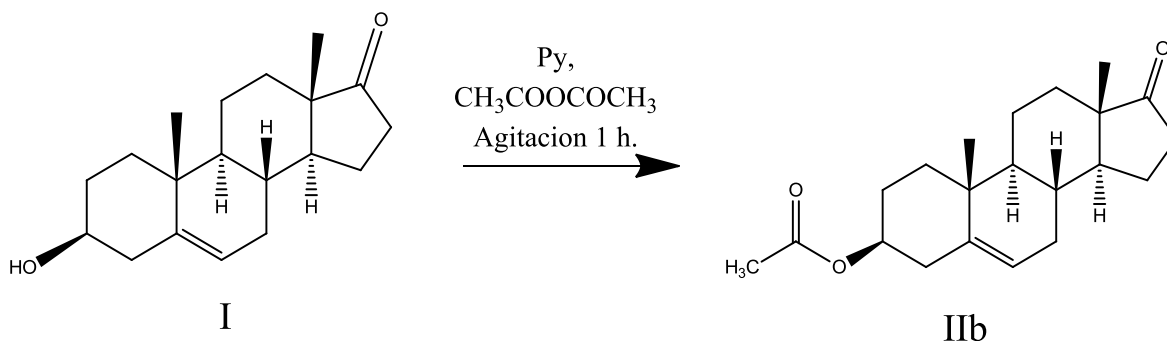
Valor	Asignación
IR(cm⁻¹)	
3425	O-H en C-3
2931	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
1742	C=O de cetona en C-17
1646	C=C en C-5
RMN ¹H (ppm)	
0.87 (s, 3H)	C-18
1.02 (s,3H)	C-19
3.51 (m, 1H)	H base de OH en C-3
5.37 (d, J=5.0 Hz, 1H)	C=CH en C-6
RMN ¹³C (ppm)	
13.53	C-18
19.41	C-19
71.58	C-3 base del OH
120.89	C-6 vinílico
141.01	C-5 vinílico
221.15	C=O de cetona en C-17
EM FAB⁺ (m/z)	
289	[MH] ⁺ pico base

3.1.3. Síntesis de la (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa)



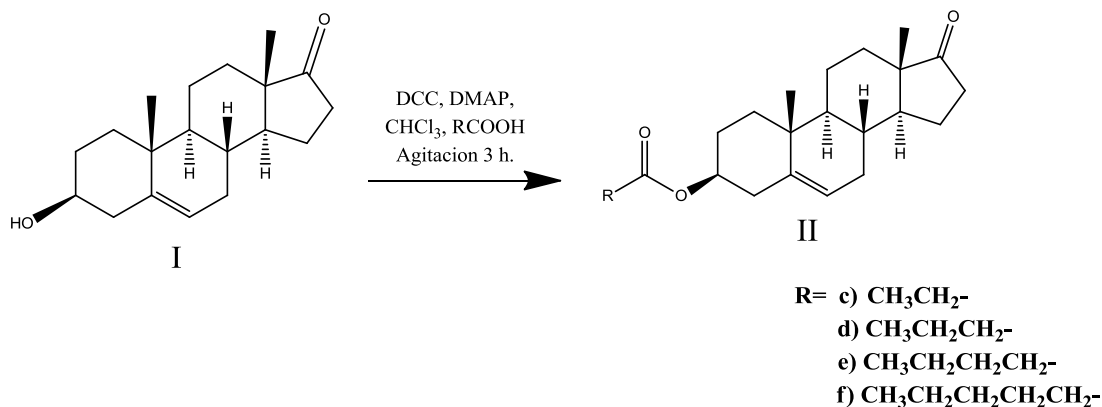
En un matraz de bola de 50 mL se colocaron 200 mg del esteroide I (0.694 mmol), ácido fórmico (10mL), se agitó con reflujo por 6 horas. Concluida la reacción se neutralizó con bicarbonato de sodio en solución saturada y se realizaron extracciones con cloroformo (3x100 mL), la fase orgánica se lavó con agua destilada (3x100 mL) y se secó con sulfato de sodio anhidro, se removió el solvente por destilación a presión reducida en un rotaevaporador. El producto se purificó por columna con sistema de fase móvil de hexano-acetona (90:10) en gel de sílice como fase estacionaria. El producto final fue un sólido de color amarillento con un rendimiento del 75 % y un punto de fusión de 143-145 °C.

3.1.4. Síntesis de la (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb)



En un matraz de bola de 50 mL se adicionaron 500 mg del esteroide I (1.73mmol), piridina (2 mL) y anhídrido acético (2 mL), se dejó en agitación por 1 hora hasta que la reacción se completó, se adicionó sobre una mezcla hielo-H₂O-NaCl formando un precipitado de color blanco, se filtró y se lavó con agua destilada (3x100 mL), el compuesto se dejó secar obteniéndose un sólido blanco con un rendimiento del 98%.

3.1.5. Síntesis de (3 β)-alquiloiloxi-androst-5-en-17-ona (IIc-IIf)



En un matraz de bola se colocaron 500 mg del esteroide I (1.735mmol) se disolvió en cloroformo (8 mL), se adicionaron 1,3 g de DDC, 2,15 g de DMAP y 2 equivalentes del ácido carboxílico correspondiente, se dejó en agitación por 3 horas, culminada la reacción se adicionaron 150 mL de acetato de etilo para precipitar dicitclohexilurea (DCU), se dejó reposar durante la noche en el refrigerador, se filtró el sólido blanco, el filtrado se lavo con una solución de HCl al 10 % (3x50 mL), después con una solución de bicarbonato de sodio saturada (3x50 mL), finalmente con agua destilada (3x50 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se eliminó el disolvente en un rotaevaporador.

El producto obtenido se purificó por recristalización en metanol-cloroformo (1:1), obteniéndose un sólido blanco cristalino.

3.1.6. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa-IIf)

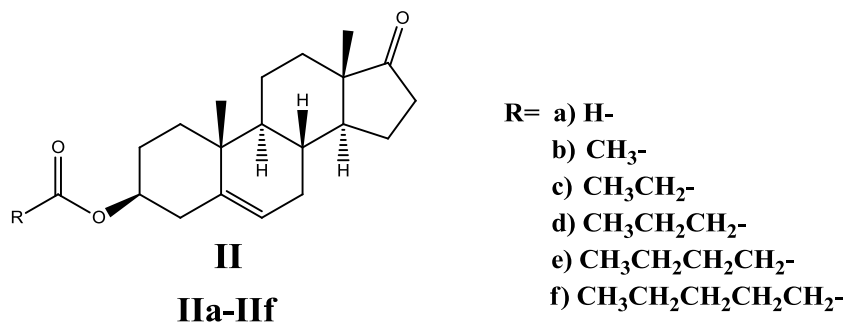


Figura 3.4. Estructura de (3 β)-alquiloiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa-IIf).

Tabla 3.4. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos IIa-IIf

Propiedades físicas	Valor/ Aspecto					
	a	b	c	d	e	f
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	C ₂₅ H ₃₈ O ₃
Peso molecular (uma)	316.43	330.46	344.48	358.51	372.54	386.57
Punto de fusión (°C)	143-145	170-1172	150-153	157-160	100-102	70-72
Rendimiento	75%	98%	95%	93%	90%	85%
Aspecto físico	Sólido de color amarillo claro	Sólido blanco cristalino	Sólido blanco cristalino	Sólido blanco cristalino	Sólido blanco cristalino	Sólido blanco cristalino

Tabla 3.5. Señales características de IR (IIa-IIf)

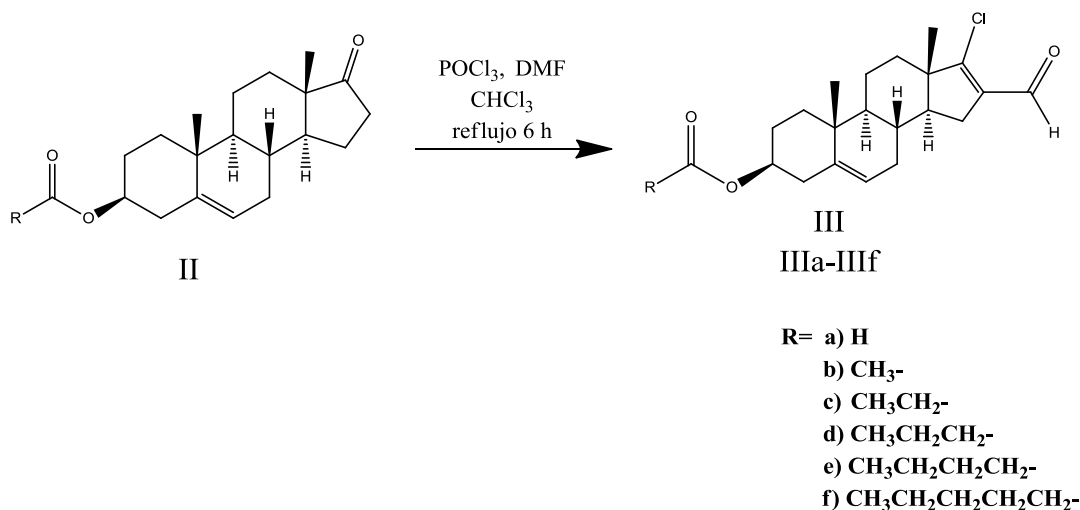
IR (cm ⁻¹)						Asignación
A	b	c	d	e	f	
2940.67	2947.35	2952.93	2933.25	2946.47	2927.21	CH de -CH ₃ y CH ₂
1736.03	1737.84	1735.81	1739.59	1731.38	1731.21	C=O de éster C-3
1701.74	1724.21	1735.81	1727.63	1731.38	1623.17	C=O de cetona C-17
1670.96	1665.71	1665.07	1664.96	1625.54	1436.12	C=C en C-5
1371.63	1374.86	1373.41	1301.19	1338.18	1345.53	CH de CH ₃
1171.43	1234.00	1178.30	1177.90	1267.52	1241.97	C-O de R-CO en C-3 de éster
1059.41	1021.78	1020.87	1020.40	1173.73	1086.74	C-O de R-COO en C-3 de éster

Tabla 3.6. Señales características de RMN ^1H y RMN ^{13}C (IIa-IIf)

RMN ^1H (ppm)						Asignación
A	b	c	d	e	f	
1.05	0.87 (s, 3H)	0.88 (s, 3H)	0.88 (s, 3H)	0.87 (s, 3H)	1.05 (s, 3H)	CH ₃ de C-18
1.05	1.03 (s, 3H)	1.04 (s, 3H)	1.04 (s, 3H)	1.04 (s, 3H)	1.05 (s, 3H)	CH ₃ de C-19
0.88*	2.02 (s, 3H)	1.33 (t, 2H)	0.94 (t, 2H)	0.90 (t, 2H)	0.89 (t, 2H)	CH ₃ del éster (*H del éster)
---	---	2.30 (q, 3H)	2.25 (q, 3H)	2.32 (q, 3H)	2.27 (q, 3H)	-CH ₂ C=O del éster
4.73 (m, 1H)	4.69 (m, 1H)	4.61 (m, 1H)	4.61 (m, 1H)	4,62 (m, 1H)	4,62 (m, 1H)	H de C3 base éster
5.42 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.40 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.39 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.39 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.40 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.40 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	C=CH en C-6
RMN ^{13}C (ppm)						
---	20.46	9.32	18.67	13.68	13.69	CH ₃ de éster
17.70	13.68	13.69	13.68	13.86	14.06	C-18
19.47	19.47	19.49	19.49	19.48	19.49	C-19
73.82	73.85	73.63	73.55	73.54	73.56	C-3 base de éster
122.36	121.99	121.94	121.93	121.92	121.94	C-6 vinílico
139.73	140.06	140.35	140.33	140.33	140.34	C-5 vinílico
160.71	170.61	174.06	173.23	173.40	173.43	C=O de éster
221.06	221.09	221.34	221.32	221.09	221.14	C=O de cetona en C-17

Tabla 3.7. Fragmentos más comunes en EM FAB⁺ (m/z) (IIa-IIf)

Compuesto	EM FAB ⁺ (m/z)	
	Valor	Asignación
a	317	[MH] ⁺
	271	[MH] ⁺ -46 Pérdida de [HCOOH]
b	331	[MH] ⁺
	271	[MH] ⁺ -60 Pérdida de [CH ₃ COOH]
c	345	[MH] ⁺
	271	[MH] ⁺ -74 Pérdida de [CH ₃ CH ₂ COOH]
d	359	[MH] ⁺
	271	[MH] ⁺ -88 Pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH]
e	373	[MH] ⁺
	271	[MH] ⁺ -102 Pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH]
f	387	[MH] ⁺
	271	[MH] ⁺ -116 Pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH]

3.1.7. Síntesis de (3β)-alquiloiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIa-IIIf)

En un matraz de dos bocas se adaptó un refrigerante, en baño de hielo y agitación, se selló bien y se adicionaron 3 mL de POCl₃ y 3 mL de DMF gota a gota, se dejó agitar por 5 minutos, se retiró el baño de hielo y se adicionó el esteroide previamente esterificado II (IIa-IIf) y disuelto en CHCl₃ y se adicionó gota a gota al balón, se cerró completamente el sistema y se retiró el baño de hielo, se dejó en reflujo con atmósfera de N₂ durante 6 horas. Terminada la reacción se vertió la mezcla sobre 150 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio con agitación vigorosa, se llevó a un embudo de separación y se extrajo con CHCl₃ (3x100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el

disolvente en el rotaevaporador, obteniéndose un sólido amarillo, el cual se purificó por columna usando como fase estacionaria gel de sílice y se eluyó con una mezcla hexano-acetato de etilo (95:5), se obtuvo un sólido blanco cristalino.

3.1.8. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIa-III f)

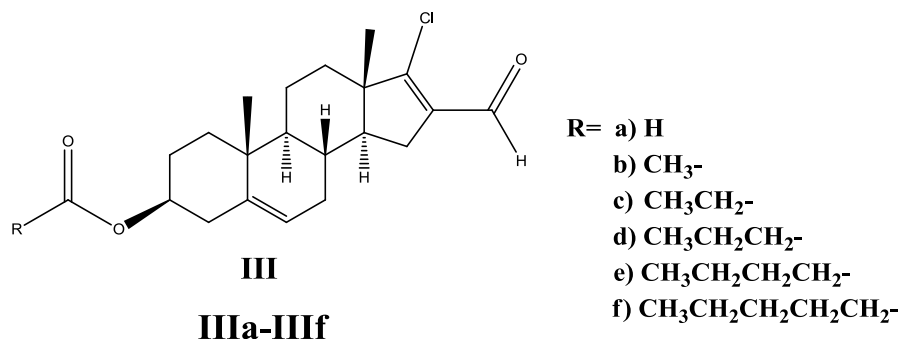


Figura 3.5. Estructura de (3 β)-alquiloiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIa-III f).

Tabla 3.8. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos IIIa-III f.

Propiedades físicas	Valor/ Aspecto					
	a	b	c	d	e	f
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₇ O ₃ Cl	C ₂₂ H ₂₉ O ₃ Cl	C ₂₃ H ₃₁ O ₃ Cl	C ₂₄ H ₃₃ O ₃ Cl	C ₂₅ H ₃₅ O ₃ Cl	C ₂₆ H ₃₇ O ₃ Cl
Peso molecular (uma)	362.89	376.92	390.94	404.97	418.99	433.02
Punto de fusión (°C)	159-161	167-170	110-113	115-116	99-101	90-93
Rendimiento	84%	72%	67%	69%	60%	58%
Aspecto físico	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco

Tabla 3.9. Señales características de IR y UV (IIIa-III f)

IR (cm ⁻¹)						Asignación
a	b	c	d	e	F	
2952.57	2923.35	2936.82	2924.17	2932.29	2934.35	CH de -CH ₃ y CH ₂
1712.25	1731.87	1724.41	1732.35	1730.91	1732.84	C=O de éster C-3
1665.41	1673.81	1672.30	1668.20	1673.89	1671.21	C=O aldehído en C-16
---	1236.19	1166.95	1175.04	1168.22	1168.75	C-O de R-CO en C-3 de éster
---	1032.19	1011.00	1009.99	1007.23	1010.59	C-O de R-COO en C-3 de éster
UV (nm)						
260.83	260.86	260.92	260.85	260.99	260.64	Aldehído α-β insaturado en C-16

Tabla 3.10. Señales características de RMN ¹H y RMN ¹³C (IIIa-III f)

RMN ¹ H (ppm)						Asignación
a	b	c	d	e	f	
0.99 (s, 3H)	0.99 (s, 3H)	0.99 (s, 3H)	0.99 (s, 3H)	0.98 (s, 3H)	0.99 (s, 3H)	CH ₃ de C-18
1.07 (s, 3H)	1.06 (s, 3H)	1.06 (s, 3H)	1.06 (s, 3H)	1.06 (s, 3H)	1.06 (s, 3H)	CH ₃ de C-19
8.03 (s, 1H)*	2.03 (s, 3H)	1.13 (t, 3H)	0.94 (t, 3H)	0.90 (t, 3H)	0.90 (t, 3H)	CH ₃ del éster (*H del éster)
9.98 (s, 1H)	9.99 (s, 1H)	9.99 (s, 1H)	9.99 (s, 1H)	9.98 (s, 1H)	9.98 (s, 1H)	H-C=O de C-16
4.74 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	4.61 (m, 1H)	4.61 (m, 1H)	4.61 (m, 1H)	4.62 (m, 1H)	H base de RCOO- en C3
5.40 (dd, 1H; J ₁ =4 Hz y J ₂ =2Hz)	5.39 (dd, 1H; J ₁ =4 Hz y J ₂ =2Hz)	5.38 (dd, 1H; J ₁ =4 Hz y J ₂ =2Hz)	5.38 (dd, 1H; J ₁ =4 Hz y J ₂ =2Hz)	5.37 (dd, 1H; J ₁ =4 Hz y J ₂ =2Hz)	5.38 (dd, 1H; J ₁ =4 Hz y J ₂ =2Hz)	C=CH en C-6
RMN ¹³ C (ppm)						
---	20.47	9.32	13.79	13.85	14.05	CH ₃ del éster

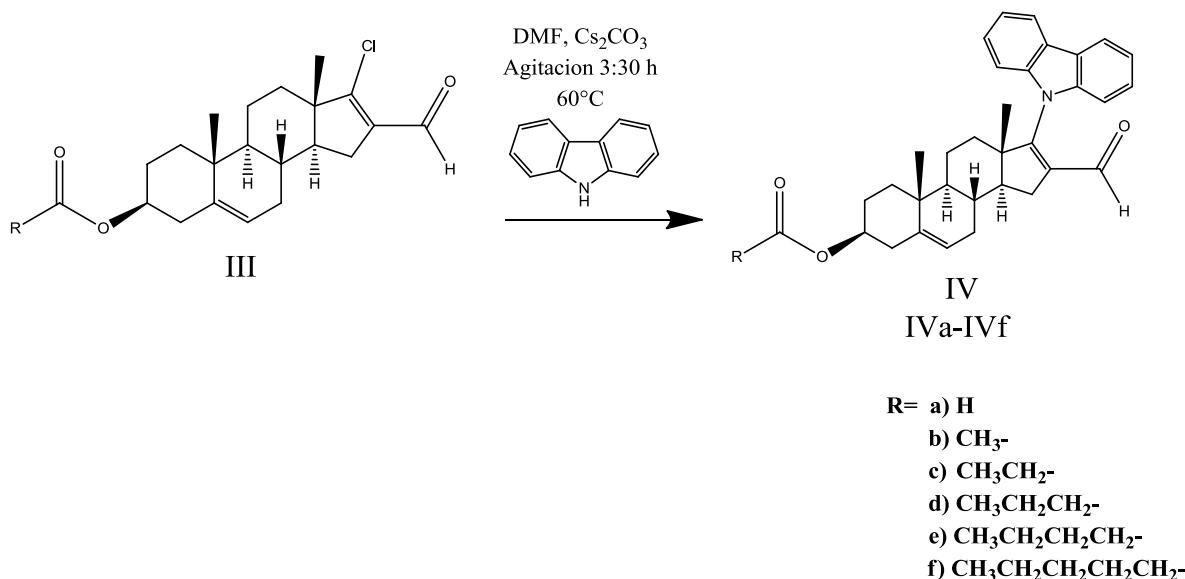
15.43	15.13	15.13	15.32	15.09	15.11	CH ₃ en C-18
19.66	19.37	19.38	19.38	19.35	19.37	CH ₃ en C-19
74.06	73.81	73.58	73.50	73.46	73.46	C-3 base de éster
122.63	121.98	121.92	121.91	121.87	121.90	C-6 vinílico
136.88	136.89	136.59	136.59	136.95	136.33	C-5 vinílico
140.33	140.15	140.23	140.22	140.20	140.22	C-16 base C-CHO
161.00	161.38	161.39	161.39	162.31	162.36	C-Cl de C-17
162.64	170.63	174.05	173.23	173.35	173.40	C=O de éster en C-3
188.48	188.20	188.20	188.20	188.12	188.17	C=O de CHO en C-16

Tabla 3.11. Fragmentos más comunes en EM FAB⁺ (m/z) (IIIa-IIIf)

EM FAB ⁺ (m/z)		
Compuesto	Valor	Asignación
a	362	M ⁺
	363	[MH] ⁺
	251	M ⁺ - 111 pérdida de [HCOOH], [HCOH] y [Cl]
	253	M ⁺ - 109 pérdida de [CH ₃ COO], de [CHO] y [Cl]
	289	[MH] ⁺ - 74 pérdida de [HCOO] y [CHO]
b	376	M ⁺
	377	[MH] ⁺
	283	[MH] ⁺ - 94 pérdida de [CH ₃ COO] y [Cl]
c	390	M ⁺
	391	[MH] ⁺
	318	[MH] ⁺ - 73 pérdida de [CH ₃ CH ₂ COO]
	251	M ⁺ - 139 pérdida de [CH ₃ CH ₂ COOH], de [HCHO] y [Cl]
	253	M ⁺ - 137 pérdida de [CH ₃ CH ₂ COO], de [CHO] y [Cl]
	254	[MH] ⁺ - 137 pérdida de [CH ₃ CH ₂ COO], de [CHO] y [Cl]
d	404	M ⁺
	405	[MH] ⁺
	317	[MH] ⁺ - 88 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH]
	253	M ⁺ - 151 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO], de [CHO] y [Cl]
e	418	M ⁺
	419	[MH] ⁺
	317	[MH] ⁺ - 102 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH]
	253	M ⁺ - 165 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COO], de [CHO] y [Cl]

f	433	M^+
	434	$[MH]^+$
	317	$M^+ - 116$ pérdida de $[CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COOH]$
	319	$[MH]^+ - 115$ pérdida de $[CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COO]$
	253	$[MH]^+ - 181$ pérdida de $[CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COOH]$, de $[HCHO]$ y $[Cl]$

3.1.9. Síntesis de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa-IVf)



En un matraz de bola de 25 mL se colocaron 2 mL de DMF, 1 mmol de esteroide III (IIIa-III f), 1.5 mmol de carbazol y 1.5 mmol de carbonato de cesio, se adaptó una trampa de humedad y se dejó en agitación por 3:30 horas y 60 °C con atmósfera de N_2 . Terminada la reacción se dejó enfriar y se agregó lentamente en una mezcla de agua-hielo-sal con agitación vigorosa, hasta formar un precipitado de color café claro, se filtró y se purificó por cristalización con una mezcla cloroformo-metanol (1:1), obteniéndose un sólido de color blanco hueso.

3.1.10. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa-IVf)

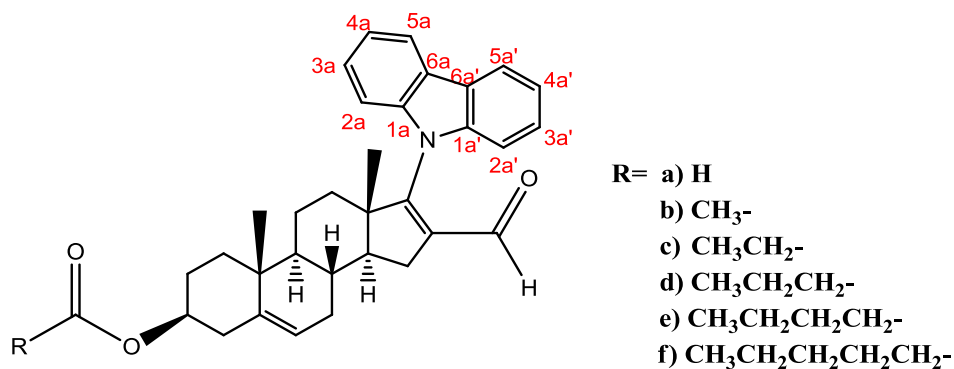


Figura 3.6. Estructura de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa-IVf).

Tabla 3.12. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos finales IVa-IVf.

Propiedades físicas	Valor/ Aspecto					
	a	b	c	d	e	f
Fórmula molecular	C ₃₃ H ₃₅ NO ₃	C ₃₄ H ₃₇ NO ₃	C ₃₅ H ₃₉ NO ₃	C ₃₆ H ₄₁ NO ₃	C ₃₇ H ₄₃ NO ₃	C ₃₈ H ₄₅ NO ₃
Peso molecular (uma)	493.63	507.66	521.68	535.71	549.74	563.76
Punto de fusión (°C)	95-97	171-173	186-189	210-213	159-161	80-83
Rendimiento	54%	35%	33%	34%	32%	30%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso

Tabla 3.13. Señales características de IR y UV (IVa-IVf)

IR (cm ⁻¹)						Asignación
a	b	c	d	e	f	
2930.09	2919.00	2925.35	2939.28	2936.89	2925.46	CH de -CH ₃ y CH ₂
1723.44	1725.09	1726.07	1719.39	1725.04	1725.58	C=O de éster C-3

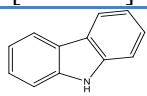
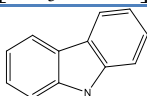
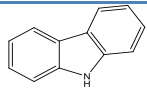
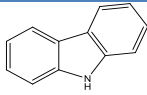
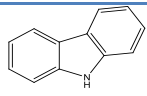
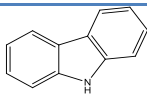
1650.07	1636.31	1635.07	1636.72	1635.80	1635.34	C=O aldehído en C-16
1271.91	1275.12	1273.95	1274.07	1272.85	1273.96	C-N de C-17
UV (nm)						
245.11	245.13	245.09	244.98	245.31	245.20	Aldehído α - β insaturado en C-16
288.69	288.64	288.46	287.81	290.97	288.32	Aldehído α - β insaturado conjugado con un anillo aromático del carbazol
341.50	341.55	341.84	341.56	341.22	341.57	Aldehído α - β insaturado conjugado con dos anillos aromáticos del carbazol

Tabla 3.14. Señales características de RMN ^1H y RMN ^{13}C (IVa-IVf).

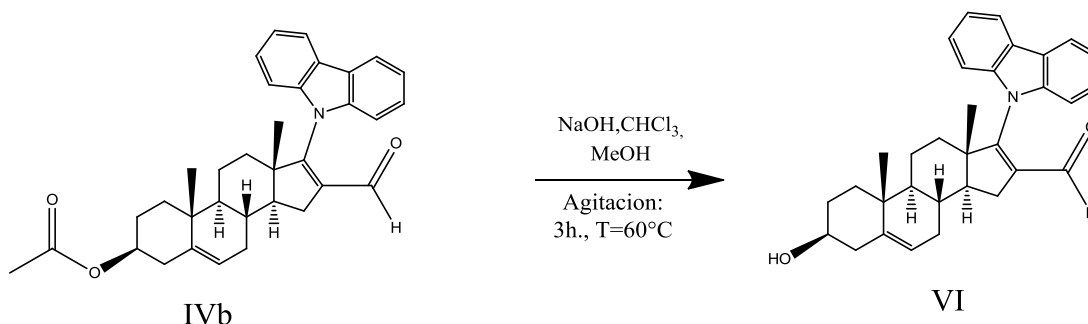
RMN ^1H (ppm)						Asignación
a	b	c	d	e	f	
0.99 (s, 3H)	1.08 (s, 3H)	1.08 (s, 3H)	1.08 (s, 3H)	1.08 (s, 3H)	1.08 (s, 3H)	CH ₃ de C-18
1.07 (s, 3H)	1.13 (s, 3H)	1.14 (s, 3H)	1.14 (s, 3H)	1.14 (s, 3H)	1.34 (s, 3H)	CH ₃ de C-19
8.15* (t, 3H)	2.02 (t, 3H)	2.30 (t, 3H)	0.94 (t, 3H)	0.91 (t, 3H)	0.89 (t, 3H)	CH ₃ del éster (*H del éster)
9.98 (s, 1H)	8.14 (s, 1H)	8.14 (s, 1H)	8.14 (s, 1H)	8.35 (s, 1H)	8.34 (s, 1H)	H-C=O de C-16
4.74 (m, 1H)	4.59 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	4.58 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	H base de éster en C-3
5.40 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.32 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.31 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.30 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.33 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.33 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	C=CH en C-6
8.08 (d, 2H, $J=7.7$ Hz)	8.08 (d, 2H, $J=7.7$ Hz)	8.08 (d, 2H, $J=7.7$ Hz)	8.07 (d, 2H, $J=7.7$ Hz)	8.08 (d, 2H, $J=7.7$ Hz)	8.07 (d, 2H, $J=7.7$ Hz)	5a y 5a'
7.34 (t, 2H, $J=7.4$ Hz)	7.35 (t, 2H, $J=7.4$ Hz)	7.34 (t, 2H, $J=7.4$ Hz)	7.34 (t, 2H, $J=7.4$ Hz)	7.35 (t, 2H, $J=7.4$ Hz)	7.34 (t, 2H, $J=7.4$ Hz)	4a y 4a'
7.50 (t, 2H, $J=7.8$ Hz)	7.50 (t, 2H, $J=7.8$ Hz)	7.49 (t, 2H, $J=7.8$ Hz)	7.49 (t, 2H, $J=7.8$ Hz)	7.50 (t, 2H, $J=7.8$ Hz)	7.49 (t, 2H, $J=7.8$ Hz)	3a y 3a'
7.41	7.41	7.43	7.41	7.43	7.43	2a y 2a'

(d, 2H, $J=$ 8.2 Hz)	(d, 2H, $J=$ 8.2 Hz)	(d, 2H, $J=$ 8.2 Hz)	(d, 2H, $J=$ 8.2 Hz)	(d, 2H, $J=$ 8.2 Hz)	(d, 2H, $J=$ 8.2 Hz)	
RMN ^{13}C (ppm)						
---	21.55	9.31	13.78	13.88	14.06	CH ₃ del éster
14.53	14.67	14.66	14.66	14.61	14.66	CH ₃ en C-18
19.66	19.52	19.53	19.53	19.53	19.53	CH ₃ en C-19
74.06	73.84	73.59	73.51	73.53	73.52	C-3 base de éster
121.71	121.70	121.78	121.77	121.78	121.77	C-6 vinílico
140.11	140.27	140.12	140.12	140.12	140.12	C-5 vinílico
127,26	127.24	127.23	127.24	127.25	127.22	C-16 base C-CHO
161.00	-	156.86	-	-	-	C-17
162.00	170.63	174.04	173.22	173.22	173.42	C=O de éster en C-3
188.48	209.05	209.05	209.03	209.03	209.05	C=O de CHO en C-16
127.95	127.93- 111.55	127.92	127.92	127.93	127.93	1a y 1a'
111.56	110.71	111.59	111.54	110.71	115.54	2a y 2a'
125.83	124.87- 125.96	124.87	124.86	124.87	124.87	3a y 3a'
120.92	119.56- 120.46	120.55	120.35	119.57	120.55	4a y 4a'
122.63	120.56- 121.85	121.69	121.69	120.50	121.69	5a y 5a'
126.52	126.51	126.50	126.50	126.51	126.50	6a y 6a'

Tabla 3.15. Fragmentos más comunes en EM FAB⁺ (*m/z*) (IVa-IVf)

EM FAB ⁺ (<i>m/z</i>)		
Compuesto	Valor	Asignación
a	493	M ⁺
	494	[MH] ⁺
	448	[MH] ⁺ -46 pérdida de [HCOOH]
	341	[MH] ⁺ -153 pérdida de 
b	507	M ⁺
	508	[MH] ⁺
	448	[MH] ⁺ -60 pérdida de [CH ₃ COOH]
	341	[MH] ⁺ -167 pérdida de 
c	521	M ⁺
	522	[MH] ⁺
	355	[MH] ⁺ -167 pérdida de 
	448	[MH] ⁺ -74 pérdida de [CH ₃ CH ₂ COOH]
d	535	M ⁺
	536	[MH] ⁺
	369	[MH] ⁺ -167 pérdida de 
	448	[MH] ⁺ -88 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH]
e	549	M ⁺
	550	[MH] ⁺
	383	[MH] ⁺ -167 pérdida de 
	448	[MH] ⁺ -102 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH]
f	563	M ⁺
	564	[MH] ⁺
	397	[MH] ⁺ -167 pérdida de 
	448	[MH] ⁺ -116 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH]

3.1.11. Síntesis de (3β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).



En un matraz bola de 25 mL se colocaron 50 mg de esteroide IVb con 50 mg de NaOH, metanol y cloroformo, se dejó en agitación por 3 horas a 60 °C, finalizada la reacción se neutralizó el exceso de base con HCl hasta pH neutro, se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente el rota evaporador, obteniéndose un sólido de color blanco.

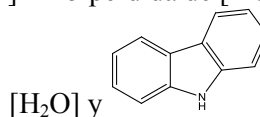
Tabla 3.16. Propiedades físicas de VI

Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₃₂ H ₃₅ NO ₃
Peso molecular (uma)	465.62
Punto de fusión (°C)	145-148
Rendimiento	98%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso

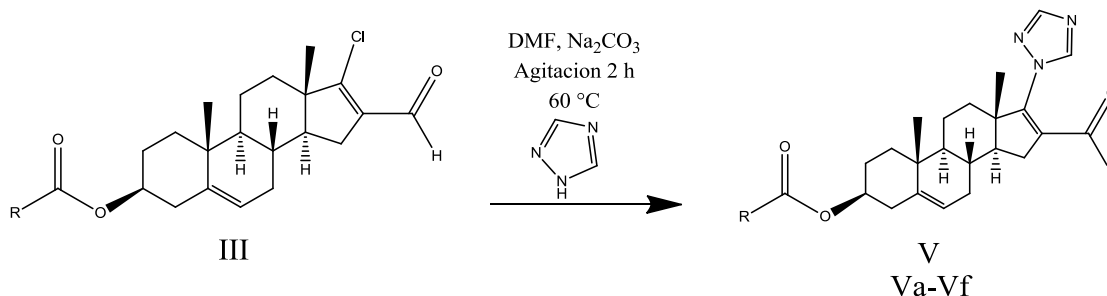
Tabla 3.17. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de VI

Valor	Asignación
UV (nm)	
244.92	Aldehído α-β insaturado en C-16
288.40	Aldehído α-β insaturado conjugado con un anillo aromático del carbazol
341.23	Aldehído α-β insaturado conjugado con dos anillos aromáticos del carbazol
IR (cm⁻¹)	
3279.36	OH en C-3
2926.91	CH de -CH ₃ y CH ₂

1634.41	C=O de aldehído C-16
1274.14	C-N de C-17
RMN ¹H (ppm)	
1.07 (s, 3H)	CH ₃ de C-18
1.34 (s, 3H)	CH ₃ de C-19
8.15 (s, 1H)	H-C=O de C-16
3.53 (m, 1H)	H base de éster en C3
3.37 (s, 1H)	H de OH en C-3
5.29 (dd, 1H; J ₁ =4 Hz y J ₂ =2Hz)	C=CH en C-6
8.08 (d, 2H, J= 7.7 Hz)	5a y 5a'
7.34 (t, 2H, J= 7.4 Hz)	4a y 4a'
7.50 (t, 2H, J= 7.8 Hz)	3a y 3a'
7.43(d, 2H, J= 8.2 Hz)	2a y 2a'
RMN ¹³C (ppm)	
14.68	CH ₃ en C-18
19.61	CH ₃ en C-19
73.73	C-3
121.73	C-6 vinílico
141.33	C-5 vinílico
127.24	C-16 base C-CHO
-	C-17
209.18	C=O de CHO en C-16
127.95	1a y 1a'
111.56	2a y 2a'
124.87	3a y 3a'
120.56	4a y 4a'
120.92	5a y 5a'
126.52	6a y 6a'
EM FAB⁺ (m/z)	
465	M ⁺
466	[MH] ⁺
251	[MH] ⁺ -215 pérdida de [HCHO], [H ₂ O] y



3.1.12. Síntesis de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va-Vf).



- R= a) H
 b) CH₃-
 c) CH₃CH₂-
 d) CH₃CH₂CH₂-
 e) CH₃CH₂CH₂CH₂-
 f) CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-

En un matraz de bola de 25mL se colocaron 2 mL de DMF, 1 mmol de esteroide III (IIIa-III f), 1.5 mmol de 1,2,4-triazol y 1.5 mmol de carbonato de sodio, se adaptó una trampa de humedad y se dejó en agitación por 3:30 horas y 60 °C con atmósfera de N₂. Terminada la reacción se dejó enfriar y se agregó lentamente una mezcla de agua-hielo-sal con agitación vigorosa, hasta formar un precipitado de color blanco-amarillento, se filtró y se purificó por cristalización con una mezcla cloroformo-metanol (1:1), obteniéndose un sólido de color blanco hueso.

3.1.13. Caracterización física y espectroscópica de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va-Vf)

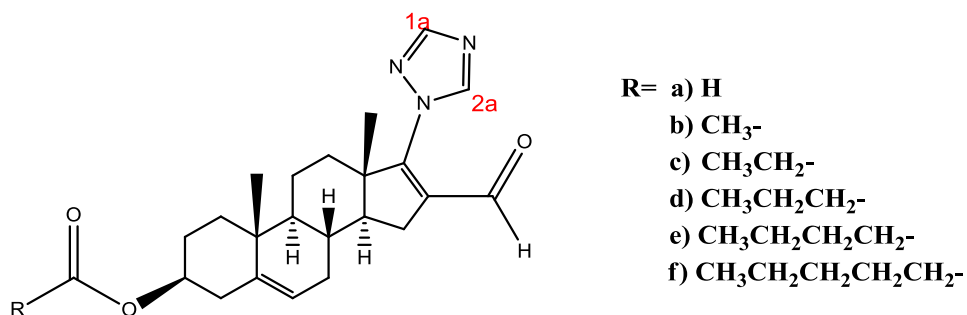


Figura 3.7. Estructura de (3 β)-alquiloiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va-Vf).

Tabla 3.18. Propiedades físicas y peso molecular de los compuestos Va-Vf

Propiedades físicas	Valor/ Aspecto					
	a	b	c	d	e	f
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₃	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₃	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₃	C ₂₆ H ₃₅ N ₃ O ₃	C ₂₇ H ₃₇ N ₃ O ₃	C ₂₈ H ₃₉ N ₃ O ₃
Peso molecular (uma)	395.49	409.52	423.54	423.54	451.60	465.62
Punto de fusión (°C)	145-148	156-158	135-137	155-157	158-160	121-123
Rendimiento	70%	75%	73%	75%	75%	68%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso







Tabla 3.19. Señales características de IR y UV (Va-Vf)

IR (cm ⁻¹)						Asignación
a	b	c	d	e	f	
2937.19	2940.59	2935.38	2932.65	2930.20	2933.88	CH de -CH ₃ y CH ₂
1717.50	1731.97	1726.95	1727.35	1728.38	1723.07	C=O de éster en C-3
1661.41	1667.35	1663.62	1667.22	1666.55	1662.69	C=O de aldehído C-16
1276.35	1279.21	1273.41	1277.82	1277.67	1275.88	C-N de C-17
UV (nm)						
276.08	276.53	275.27	275.25	275.09	275.74	Aldehído α-β insaturado en C-16

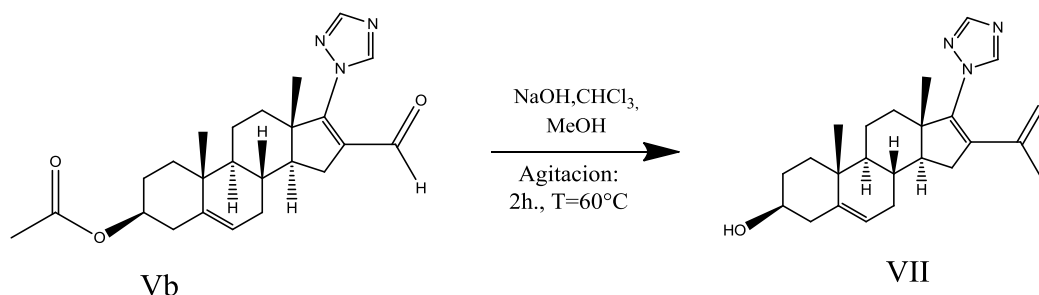
Tabla 3.20. Señales características de RMN ^1H y RMN ^{13}C (Va-Vf)

RMN ^1H (ppm)						Asignación
a	b	c	d	e	f	
1.08 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	1.06 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	CH ₃ de C-18
1.20 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	CH ₃ de C-19
8.03 (s, 1H)	2.03 (s, 3H)	1.13 (t, 3H)	0.92 (t, 3H)	0.90 (t, 3H)	0.88 (t, 3H)	CH ₃ del éster (*H del éster)
10.10 (s, 1H)	10.11 (s, 1H)	10.10 (s, 1H)	10.09 (s, 1H)	10.10 (s, 1H)	10.10 (s, 1H)	H-C=O de C-16
4.75 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	4.61 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	H base de éster en C3
5.42 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.43 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.40 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.39 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.41 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	5.40 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	C=CH en C-6
8.11 (s, 1H)	8.11 (s, 1H)	8.11 (s, 1H)	8.10 (s, 1H)	8.11 (s, 1H)	8.10 (s, 1H)	1a
8.43 (s, 1H)	8.43 (s, 1H)	8.42 (s, 1H)	8.43 (s, 1H)	8.42 (s, 1H)	8.43 (s, 1H)	2a
RMN ^{13}C (ppm)						
---	21.53	9.17	13.74	13.87	13.89	CH ₃ del éster
19.34	19.35	19.23	19.32	19.34	19.39	CH ₃ en C-18
20.59	20.59	20.47	20.54	20.35	20.43	CH ₃ en C-19
73.67	73.75	73.42	73.39	73.43	73.27	C-3 base de éster
122.25	121.91	121.72	121.80	121.82	121.67	C-6 vinílico
139.77	139.77	140.06	140.12	140.13	140.02	C-5 vinílico
132.46	132.49	132.39	132.40	132.42	132.33	C-16 base C-CHO
156.83	156.86	156.76	156.83	156.84	156.69	C-17
189.12	189.15	189.08	189.17	189.20	188.97	C=O de CHO en C-16
160.67	170.62	173.96	173.20	173.40	173.23	C=O de éster en C-3
153.20	153.19	153.03	153.12	153.15	153.01	1a
143.81	143.81	143.67	143.78	143.77	143.65	2a

Tabla 3.21. Fragmentos más comunes en EM FAB⁺ (*m/z*) (Va-Vf)

EM FAB ⁺ (<i>m/z</i>)		
Compuesto	Valor	Asignación
a	395	M ⁺
	396	[MH] ⁺
	251	[MH] ⁺ - 145 pérdida de [HCOOH], [HCHO] y 
b	409	M ⁺
	410	[MH] ⁺
	251	[MH] ⁺ -159 pérdida de [CH ₃ COOH], [HCHO] y 
c	423	M ⁺
	424	[MH] ⁺
	251	[MH] ⁺ -173 pérdida de [CH ₃ CH ₂ COOH], [HCHO] y 
d	437	M ⁺
	438	[MH] ⁺
	251	[MH] ⁺ -187 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH], [HCHO] y 
e	451	M ⁺
	452	[MH] ⁺
	251	[MH] ⁺ -201 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH], [HCHO] y 
f	465	M ⁺
	466	[MH] ⁺
	251	[MH] ⁺ -215 pérdida de [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH], [HCHO] y 

3.1.14. Síntesis de (3β)-hidroxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).




En un matraz bola de 25 mL se colocaron 50 mg de esteroide Vb con 50 mg de NaOH, metanol y cloroformo, se dejó en agitación por 1 hora a 60 °C, finalizada la reacción se neutralizó el exceso de base con HCl hasta pH neutro, se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente el rota evaporador, obteniéndose un sólido de color blanco.

Tabla 3.22. Propiedades físicas de VII.

Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₉ N ₃ O ₃
Peso molecular (uma)	367.48
Punto de fusión (°C)	109-110
Rendimiento	95%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso

Tabla 3.23. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de VII.

Valor	Asignación
UV (nm)	
268.78	Aldehído α-β insaturado en C-16
IR (cm⁻¹)	
3252.97	OH en C-3
2925.97	CH de -CH ₃ y CH ₂
1625.39	C=O de aldehído C-16
1273.44	C-N de C-17
RMN ¹H (ppm)	
0.90 (s, 3H)	CH ₃ de C-18
1.04 (s, 3H)	CH ₃ de C-19

8.35 (s, 1H)	H-C=O de C-16
3.54 (m, 1H)	H base de éster en C3
3.85 (s, 1H)	H de OH en C-3
5.38 (dd, 1H; $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz)	C=CH en C-6
8.08 (s, 1H)	1a
8.43 (s, 1H)	2a
RMN 13C (ppm)	
19.57	CH ₃ en C-18
20.58	CH ₃ en C-19
71.79	C-3
121.16	C-6 vinílico
141.23	C-5 vinílico
132.02	C-16 base C-CHO
158.42	C-17
197.70	C=O de CHO en C-16
154.80	1a
143.23	2a
EM FAB⁺ (m/z)	
367	M ⁺
368	[MH] ⁺
251	[MH] ⁺ -117 pérdida de[H ₂ O], [HCHO] y 

3.2. Desarrollo parte biológica

3.2.1. Material biológico

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

3.2.2. Equipos

- Ultracentrífuga marca Beckman modelo Optima L-70K.
- Centrifuga marca Beckman modelo Allegra 6R.
- Analizador de centelleo Packard modelo Tri-Carb 2100 TR.
- Placas cromatografías de gel sílice 60 GF254 en soporte de aluminio (20x20 cm, Merck).

- Incubadora marca Julabo modelo SW22.

3.2.3. Sustancias

- Testosterona [^3H] (T[H^3]) actividad específica 85-105 Ci/mmol suministrado por NEM Life Science Products, Inc. (Boston, MA).
- Mibolerona [^3H] actividad específica 70-87 Ci/mmol suministrado por NEN Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA).
- Androstenediona [^3H] ($\Delta^4\text{A}$ [^3H]) actividad específica 24,9 Ci/mmol suministrado por NEN Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA).

3.2.4. Ensayo *in vitro*, citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

Para analizar los compuestos IVa-IVf, Va-Vf, VI y VII se utilizaron 3 líneas celulares cancerosas humanas:

- PC-3: Próstata
- MCF-7: Mama
- SKLU-1: Pulmón

Éstas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640, enriquecido con 10% de suero fetal bovino. 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL penicilina G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sulfato de estreptomycin, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales, se incubaron a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO_2 .

Posteriormente se tomó 100 μL de la línea celular correspondiente, el contenido de células por pozo varía entre 5000 y 10 000 dependiendo de la línea celular, se incubó por 24 h. se preparó una solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar, dicha solución se adicionó a cada pozo de las líneas celulares en 100 μL de medio de cultivo siendo la concentración final de cada compuesto de 50 μM y se incubó por 48

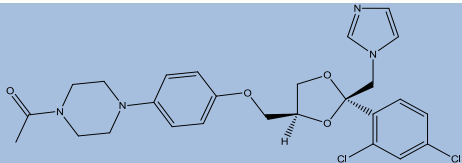
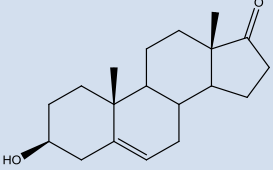
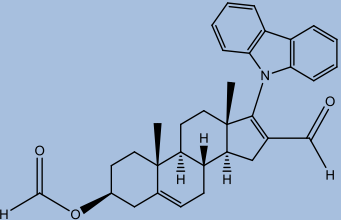
Horas (plato experimental). Adicionalmente se preparó otro pozo al cual se adicionó únicamente medio de cultivo este, último se incubó por 1 hora (plato basal); ambas

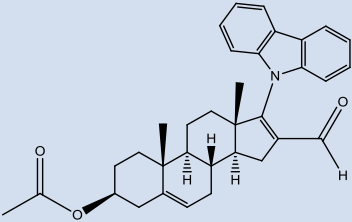
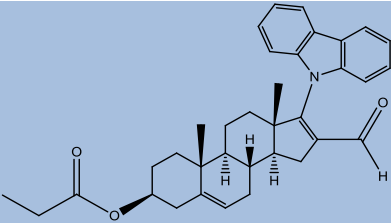
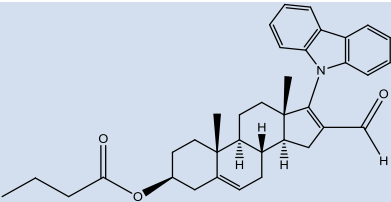
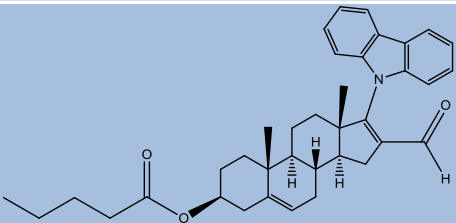
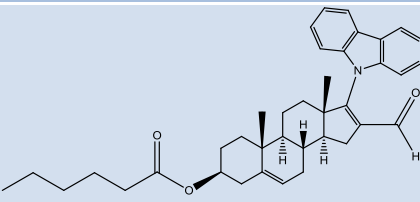
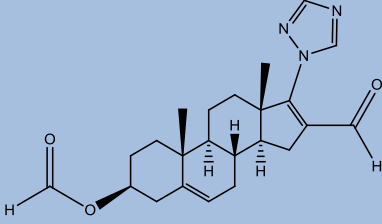
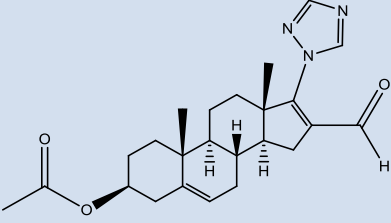
incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa.

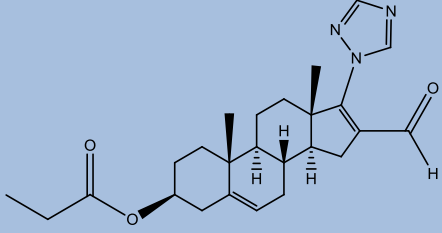
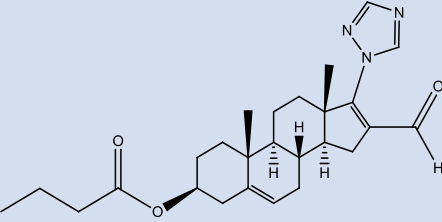
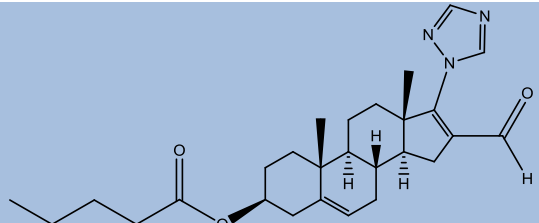
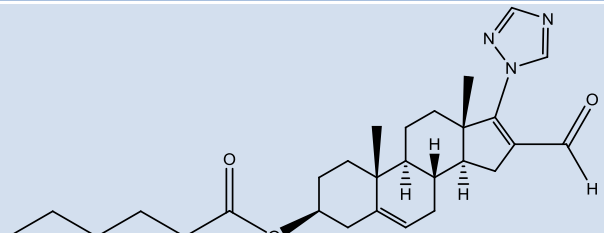
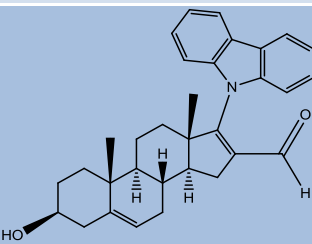
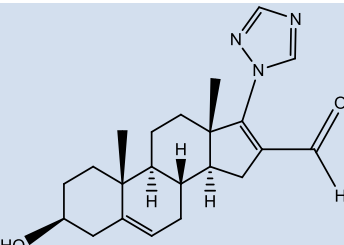
Finalizado el tiempo correspondiente se realizó la fijación de los cultivos celulares *in situ* por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) frío, se incubó por 60 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se hicieron 5 lavados con agua desionizada y se dejó secar por 24 h. Posteriormente se realizó el teñido adicionando 100 µL de sulforodamida B (SRB) (0.4% p/v en 1% ácido acético) a cada pozo, se incubó por 30 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.

Tabla 3.24. Resultados de pruebas *in vitro* en cultivo celular en líneas cancerosas humanas

No	Compuesto	Porcentaje de inhibición del crecimiento		
		PC-3	MCF-7	SKLU-1
	 Ketoconazol	88.48±3.9	95.16±4.8	73.39±1.6
	 DHEA	17.4	11.40	48.8
IVa		50.4±2.0	27.8±1.9	39.3±0.4

IVb		38.4±0.6	0	25.0±0.8
IVc		40.3±0.6	0	0
IVd		11.7±0.7	0	0
IVe		22.6±0.1	0	47.9±4.7
IVf		10.3±0.5	0	9.9±6.9
Va		99.3±0.6	100	100
Vb		100	100	100

Vc		100	100	100
Vd		63.4±2.9	100	100
Ve		78.4±5.3	100	100
Vf		100	100	100
VI		57.2±4.4	27.8±1.3	48.4±0.8
VII		31.8±3.4	30.1±1.3	42.5±2.3

3.2.5. Ensayo *in vitro* (inhibición de la enzima 5 α -reductasa)

El ensayo consistió en 2 partes, la primera la extracción de la enzima 5 α -reductasa y la segunda en las pruebas para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀); solo fueron evaluados los compuestos que contienen el triazol ya que fueron los que presentaron la mayor actividad inhibitoria en células cancerosas humanas, es decir la serie de compuestos Va-Vf, y VII.

3.2.5.1. Extracción de la enzima 5 α -reductasa

La próstata de cadáver humano se cortó y homogeneizó utilizando una solución A (20 mM de fosfato de sodio, 0.32 M de sacarosa. 0.1 mM ditiotreitól, pH=6.5). Este homogeneizado se centrifugó a 1500 rpm durante 20 minutos. El pellet formado se separó y se lavó 3 veces con el medio A, nuevamente 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 el contenido de proteínas por el método de Bradford utilizando como referencia albumina sérica bovina.

Para hacer el análisis sobre la próstata de hámsters se sacrificaron 50 machos con aproximadamente 72 horas de castración. Se separaron la próstata y las vesículas seminales.

Se limpiaron los tejidos perfectamente de grasa y se pesaron por separado. Los tejidos se homogeneizaron con una mezcla que contenía: 20 mM de HCl-tris, 1.5 mM EDTA, 20 mM de molibdato de sodio y 10% de glicerol, con relación al peso del tejido (v/p 3:1). La homogenización se centrifugó a 14000 rpm, durante 1 hora a 2 °C. Posteriormente se separó el precipitado, se suspendió en tres volúmenes del medio A en relación con el peso del tejido obtenido inicialmente y se determinó el contenido de proteínas tanto en la fracción microsomal como en la citosólica, por el método de Bradford.²⁶

3.2.5.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de la enzima 5 α -reductasa en glándulas prostáticas humanas

Para cada uno de los compuestos Va-Vf, y VII se prepararon una serie de tubos en los cuales se utilizaron 6 series de tubos de ensayo con concentraciones desde 10⁻¹ – 10⁻⁴ disueltos en metanol y conteniendo T [³H] a una concentración final de 2 nM, así mismo se incluyeron los tubos controles a los que se adicionó T [³H] a la misma concentración de 2nM. Los tubos se colocaron en baño agua y atmósfera de nitrógeno hasta evaporar totalmente el disolvente; enseguida se añadió 720 μ L de bufer 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 a la reacción.

Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron a 37 °C por una hora; finalizado este tiempo 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 [3 H] realizando tres extracciones mas y una vez reunidos los extractos, el disolvente se evaporó en un baño de agua. El sólido formado se resuspendió con 0.5 mL de metanol y se aplicó gota a gota en una placa cromatografía para separar la DHT [3 H] formada; el procedimiento se repitió 5 veces; adicionalmente se aplicaron los estándares de testosterona y DHT en cada extremo de la placa. Se eluyó 3 veces en un sistema de elución 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 [3 H] (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 reactividad producida por la DHT [3 H] 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 [3 H]. Cada experimento se realizó por duplicado.

Los resultados obtenidos para este ensayo mostraron que la actividad de la T+Finasterida dio como IC₅₀ para la enzima prostática humana un valor de 8.5×10^{-9} M, mientras que para los compuestos evaluados la actividad fue muy leve y por lo tanto se concluye que no tienen actividad.

3.2.5.3. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de la enzima 5 α -reductasa en vesículas de hámster

Con la fracción microsomal de vesícula seminal de los hámsteres previamente obtenida, se realizó un estudio metabólico *in vitro* para conocer el posible efecto inhibitor del esteroide sobre la enzima 5 α -reductasa.

Se utilizaron diferentes concentraciones de los compuestos, Va-Vf, y VII y de Finasterida para obtener la concentración inhibitoria 50%, los compuestos se incubaron en presencia de 250 μ g de proteína de microsomal de vesícula seminal y una mezcla de incubación que contenía: 2 mM de T [3 H], 2 mM de NADPH⁺, 1 mM de ditiotreitól y una solución

amortiguadora 40 mM de fosfatos a pH=7.0. el bioensayo se incubó durante una hora a una temperatura de 37 °C con agitación constante.

Además se preparó un control que contenía fracción microsomal y T [³H] en la mezcla de incubación, sin inhibidor, en el cual corresponde al 100% de conversión. La incubación terminó con la adición de CH₂Cl₂, para después realizar las extracciones sucesivas a la mezcla de reacción con el mismo disolvente. La separación de los productos tritiados T [³H] y DHT [³H] se realizó por CCF, en un sistema de elución cloroformo-acetona (9:1).

La región de la placa correspondiente a DHT [³H] (Rf=0.68) producto obtenido por la transformación de la T [³H] y DHT [³H] en presencia de la enzima 5 α -reductasa, se colocó en viales con líquido de centelleo (Packard tri-carb 2100TR).

Para este ensayo el tratamiento de la T+Finasterida dio como IC₅₀ para la enzima prostática de hámster un valor de 1.0x10⁻⁸ M, mientras que los compuestos evaluados no mostraron una actividad apreciable así que no son activos para esta enzima.

3.2.5.4. Ensayo de inhibición de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD)

Para realizar este ensayo se prepararon los tubos que contenían:

Δ^4 A [³H] (4nM), Δ^4 A -fria (174 μ M), DMSO y las soluciones de los compuestos Va-Vf, y VII.

Primero se dejó evaporar el solvente de las Δ^4 A [³H] (4nM), Δ^4 A -fria (174 μ M) así como el del inhibidor (para que solo quedara en DMSO) por medio de un baño de agua.

A cada tubo de ensayo se adicionó 10 μ L de la solución que contenía el buffer de fosfatos (40mM) pH 7.5, 100 μ L de DTT (1mM) y 100 μ L de NADPH (25mM), finalmente se adicionó 60 μ L de fracción microsomal de próstata de cadáver humano con los que se dió inicio a la reacción.

Se incubaron a 37.5 °C con agitación constante durante 30 minutos, pasado este tiempo se agregaron 100 μ L de diclorometano para detener la reacción, se agitó nuevamente en vortex por 1 minuto, se centrifugó a 3700 rpm durante 5 min y se extrajo el diclorometano (fase inferior), este se colocó en tubos cónicos, donde posteriormente se adicionó 100 μ L

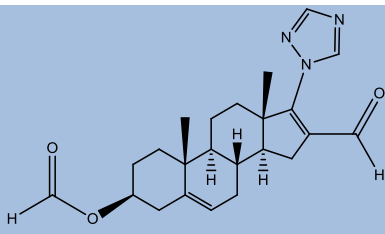
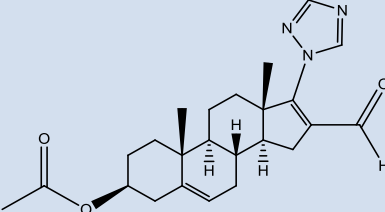
de acetato de etilo, se agitó nuevamente en vortex por 1 min y se esperó la separación de fases, se extrajo el acetato de etilo (fase superior) se repitió el mismo procedimiento 5 veces y se colocó en el mismo tubo cónico.

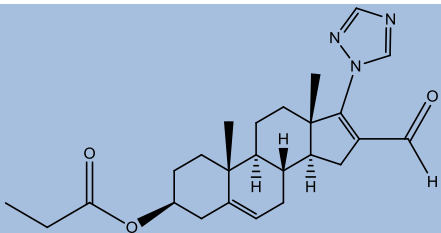
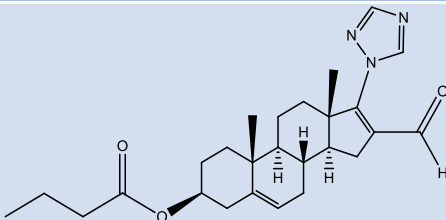
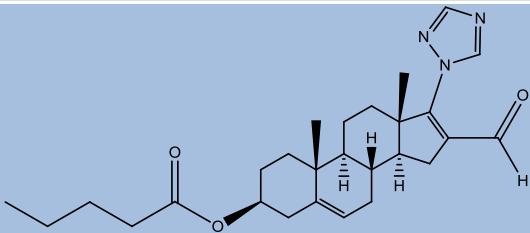
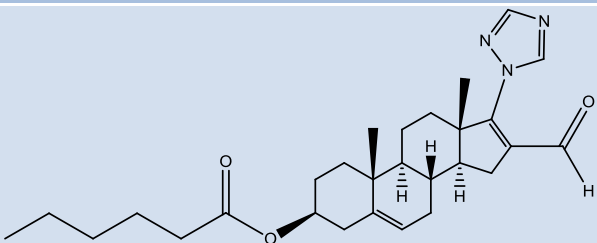
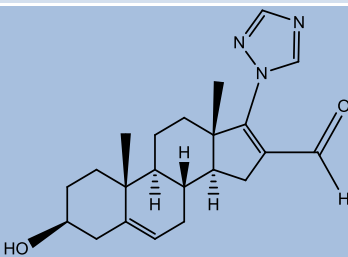
Se dejó evaporar el solvente y se agregaron 100 μ L de cloroformo –metanol (1:1) y se aplicó gota a gota sobre una placa de cromatografía, el procedimiento se repitió 5 veces; adicionalmente se aplicaron los estándares de Δ^4 A, T, DHT, 5 α A (Androstenediol) y androstandiol y se dejó secar por 30 min. Se eluyó dos veces en un sistema cloroformo: acetona (9:1).

Los estándares de T y de Δ^4 A se observaron bajo luz UV ($\lambda=254$ nm) y posteriormente se revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 8% y calor. Se marcó y cortó la zona de DHT y diol. La 5 α A se reveló con KOH 2.5N: metadinitrobenzeno 2% (1:1) y calor.

Finalmente, los pedazos de sílice se colocaron en viales en donde se les adicionó 10mL de líquido de centelleo Ultima Gold (packard) y se determinó su IC₅₀ [nM]. Cada experimento se realizó por duplicado.

Tabla 3.25. Resultados de inhibición de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

No	Compuesto	Inhibición de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa IC ₅₀ [nM]
Va		0.13 nM
Vb		0.12 nM

Vc		0.15 nM
Vd		0.18 nM
Ve		0.28 nM
Vf		0.38 nM
VII		5 nM

CAPITULO 4

ANALISIS DE RESULTADOS

4.1. Parte Química

En la ruta sintética planteada en este trabajo se empleó como materia prima la 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona (I), ya que es un compuesto disponible comercialmente, con un costo accesible, y es tomado como punto de partida en muchas síntesis de compuestos esteroideos de interés farmacéutico.

Basándonos en estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación se obtuvieron los datos de la caracterización de la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas; ésta presenta en IR una banda mediana en 3425 cm⁻¹ característica del grupo -OH en C-3, en 2931 cm⁻¹ se observaron las bandas de alargamiento de metilos y metilenos, se mostró una banda fuerte en 1742 correspondiente al carbonilo de cetona en C-17.

En RMN ¹H se observan dos señales en forma simple (s) que integra cada una para tres protones en 0.87 y 1.02 ppm correspondientes a los C-18 y C-19 respectivamente. También se observó una señal múltiple (m) que integra para un protón en 3.51 ppm correspondiente al protón de C-3. La señal del hidrógeno en C-6 se observó a 5.37 ppm como un doblete (d), este protón se encuentra acoplado a un protón vecino en C-7.

En RMN ¹³C presenta una señal a 221.15 ppm correspondiente al carbonilo de C-17, a 141.05 ppm y 120.89 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos C-5 y C-6 respectivamente. En 71.58 se observa la señal correspondiente al carbono C-3, los metilos de los carbonos C-18 y C-19 se observan a 13.53 ppm y 19.41 ppm respectivamente.

En EM (FAB⁺) se encuentra el ion molecular a 289 unidades y un pico base a 271 unidades que indica la pérdida de agua (M⁺-H₂O).

Como primer paso de síntesis se realizó una esterificación de la 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona (I) en C-3 con el fin de aumentar la liposolubilidad del esteroide y así facilitar el paso de este por la membrana celular; la primera esterificación se realizó con ácido fórmico, y reflujo por 6 horas, la segunda con anhídrido acético, piridina y agitación por 1 hora, ambas reacciones se llevaron a cabo utilizando el método de Fisher. Las demás esterificaciones se

realizaron con DCC (diciclohexilcarbodiimida) y DMAP (4-N,N-Dimetilaminopiridina) y 4 ácidos lineales diferentes (propiónico, butanoico, pentanoico, hexanoico), esta esterificación se llevo a cabo a temperatura ambiente por el método de Steglich.

Para estos compuestos esterificados se observaron los siguientes resultados:

En IR se vio la desaparición de la señal de 3425 cm^{-1} y la formación de una señal fuerte entre 1735 y 1740 cm^{-1} característica del carbonilo de éster.

En RMN ^1H se observa una señal múltiple (m) entre 4.60 y 4.70 ppm correspondiente al protón de C-3.

En RMN ^{13}C se aprecia la aparición de una señal entre 160 y 175 ppm correspondiente al carbonilo de éster en C-3.

En EM (FAB $^+$) se observa un pico de 271 unidades correspondiente a la pérdida del grupo éster en de C-3.

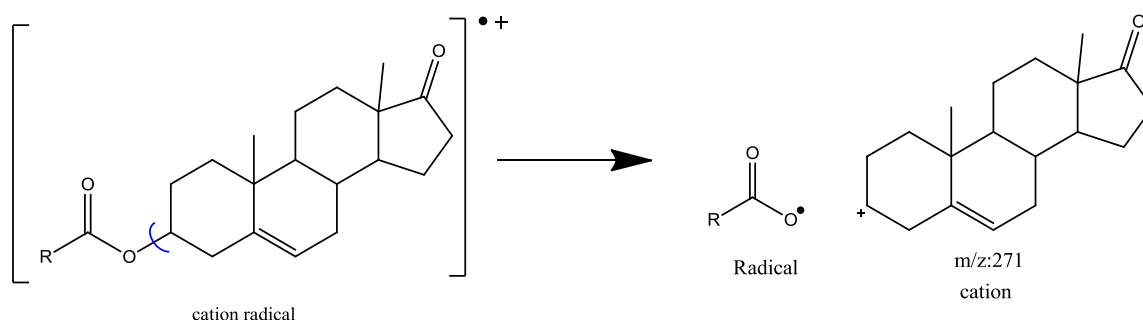


Figura 4.1. Fragmentos más comunes para los esteroides con un éster en C-3

El siguiente paso en la ruta sintética fue la activación de la posición C-17 por medio de la reacción de Vilmeyer-Hack, donde se adiciona un átomo cloro en C-17 y formilo en C-16, esta reacción se llevó a cabo con POCl_3 en DMF en atmósfera de N_2 , el compuesto se purificó por columna con un sistema de elución 95:5 Hexano-Acetato de etilo.

Para estos compuestos IIIa-III f se observaron los siguientes resultados:

En IR se observa la pérdida de la señal correspondiente la cetona en C-17 y la aparición de una señal entre 1665 y 1675 cm^{-1} correspondiente al el carbonilo del formilo α - β insaturado.

En RMN ^1H se observa una señal simple (s) entre 9.93 y 9.99 ppm correspondiente al protón de formilo en C-16.

En RMN ^{13}C se observa la pérdida de la señal correspondiente a la cetona en C-17 y la aparición de una señal nueva correspondiente al carbonilo de aldehído de C-16 entre 188 y 188.2 ppm, también se observa una señal entre 161 y 162 ppm de C-17 unido al cloro y otra señal entre 140.10 y 140.33 ppm del C-16.

En los espectros de UV se observan un pico entre 260.85 y 260.99 correspondiente al aldehído α - β insaturado en C-16.

En EM (FAB^+) se encuentran los iones moleculares para cada esteroide y se observa una pérdida de 289 unidades correspondiente a pérdida del grupo éster en C-3 y al formilo en C-16.

Para la siguiente reacción de adición de azol en C-17, esta reacción no se podría efectuar con un buen rendimiento debido a la poca susceptibilidad del halógeno a sufrir un desplazamiento nucleofílico bimolecular, por esta razón se lleva a cabo la adición de un formilo en C-16, la presencia de este grupo activa el cloro por la resonancia formada entre la doble ligadura en C-16 y el formilo permitiendo así que el carbono en C-17 adquiera una carga positiva que aumenta la electrofilia de esta posición y como consecuencia de esto se facilita el desplazamiento del Cl por un grupo azol.

Como primera adición a C-17 se utilizó carbazol como heterociclo, obteniendo rendimientos bajos aproximadamente del 30%, todos los compuestos finales IVa-IVf y VII fueron caracterizados por espectroscopia y espectrometría:

En RMN ^1H se observó la aparición de las señales correspondientes a los protones aromáticos (aprox. 7.5 ppm). Se observa que la señal correspondiente al formilo se desplaza a campo alto (aprox. 8 ppm), esto debido al cono de protección que genera uno de los anillos aromáticos del carbazol.

En RMN ^{13}C se observó igualmente la aparición de los carbonos aromáticos entre 120 y 127 ppm aproximadamente.

En UV se pueden apreciar tres picos, uno en 245 nm correspondiente al aldehído en C-16 α - β insaturado, el otro a 288 nm del aldehído α - β insaturado en C-16 conjugado con un

anillo aromático del carbazol y uno en 341 nm correspondiente al aldehído α - β insaturado conjugado con los anillos aromáticos del carbazol.

En EM (FAB⁺) se observan los iones moleculares para los compuestos finales y se observa un pico a 448 unidades correspondiente a la pérdida del éster en C-3.

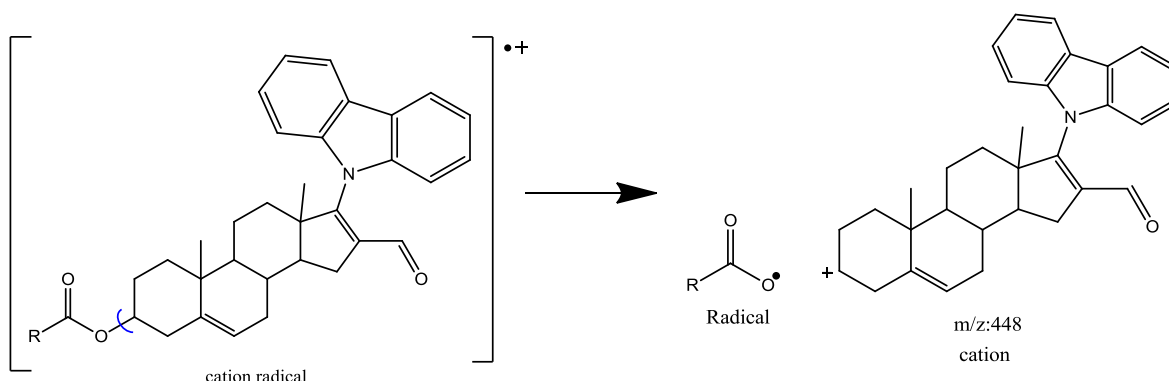


Figura 4.2. Fragmento más común para un esteroide con un éster en C-3 y un grupo carbazol en C-17

La segunda adición realizada a C-17 se llevó a cabo usando 1,2,4-triazol como heterociclo aromático, se obtuvieron como rendimientos promedio el 70%, todos los compuestos finales Va-Vf y VII se caracterizaron por espectroscopía y espectrometría:

En IR se observó una señal entre 1596 y 1597 cm^{-1} correspondiente al enlace $C=N$ del triazol.

En RMN ^1H se observó la aparición de las señales de los dos protones correspondientes al triazol, dando cada uno una señal simple (s) en 8.11 y 8.43 ppm.

En RMN ^{13}C se apreció la aparición de las señales para los dos carbonos pertenecientes al triazol entre 143 y 152 ppm.

En UV se observó solo un pico correspondiente a la conjugación del aldehído α - β insaturado.

En EM (FAB⁺) se observan los iones moleculares para los compuestos finales y se observa un pico característico a 251 unidades correspondiente a la pérdida del éster en C-3, el formilo en C-16 y el grupo azol de C-17.

4.2. Parte Biológica.

En la tabla 3.24. se observan los resultados para el ensayo *in vitro* para la inhibición del crecimiento en líneas celulares cancerosas para los compuestos IVa-IVf, Va-Vf, VI y VII comparados con la DHEA, que fue el andrógeno utilizado como materia prima para las síntesis, y el ketoconazol que hace años era usado para combatir el cáncer y afecciones fúngicas, presentando como efecto secundario el bloqueo de la producción de cortisol, lo que causó su discontinuación como tratamiento contra el cáncer.

Para los compuestos de carbazol no se observó actividad inhibitoria favorable, posiblemente debido a la mala solubilidad que presentan éstos; a pesar de la poca actividad reportada (figura 4.4) se observa una tendencia a inhibir la línea celular PC-3 (cáncer de próstata) y esto se debe muy posiblemente a que todos son derivados de la DHEA, una hormona sexual masculina, el compuesto con mayor inhibición fue el VI con un grupo hidroxilo en C-3, debido a que este grupo mejora la solubilidad, por la formación de enlaces de hidrógeno en medio acuoso.

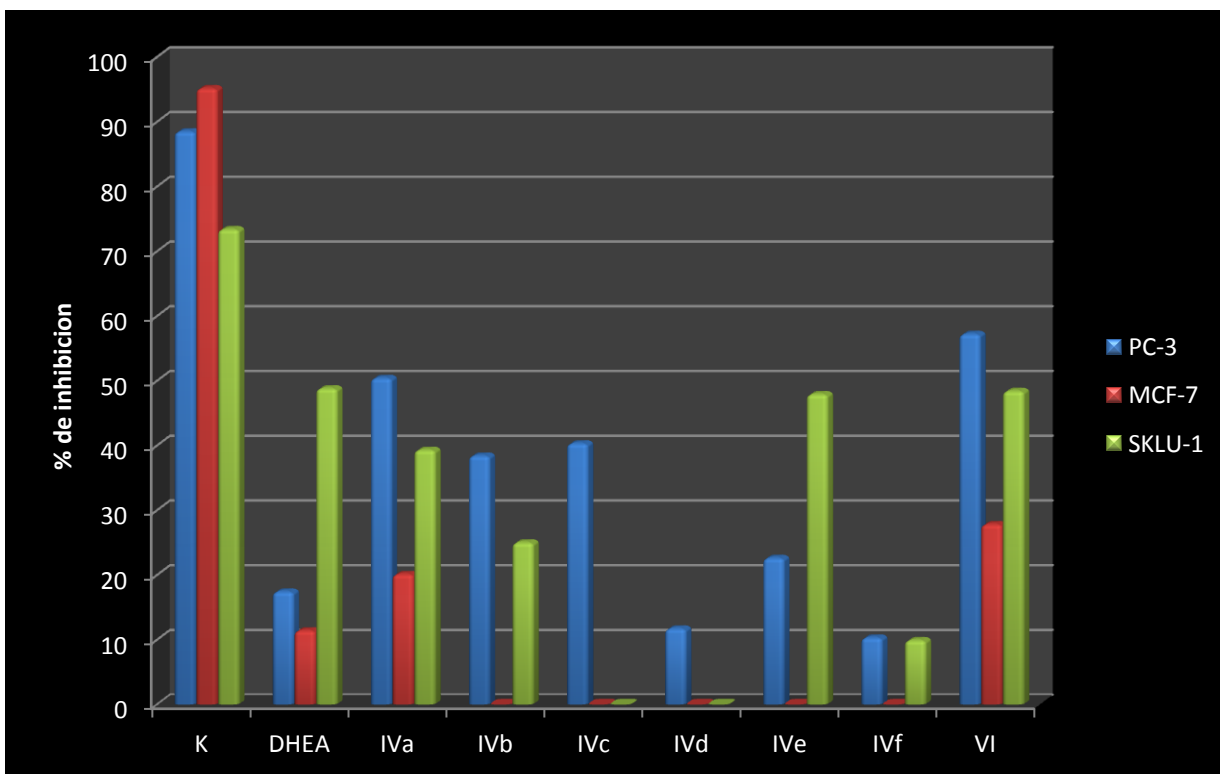


Figura 4.4. Gráfica de resultados de pruebas *in vitro* para los compuestos finales de carbazol (IVa-IVf, VI) Vs % inhibición.

En los compuestos que contienen el grupo 1,2,4-triazol en C-17 se observó un alto porcentaje de inhibición sobre las tres líneas de cáncer evaluadas, corroborando que la cadena lineal en C-3 le confiere una característica lipofílica, permitiendo así mejorar su actividad.

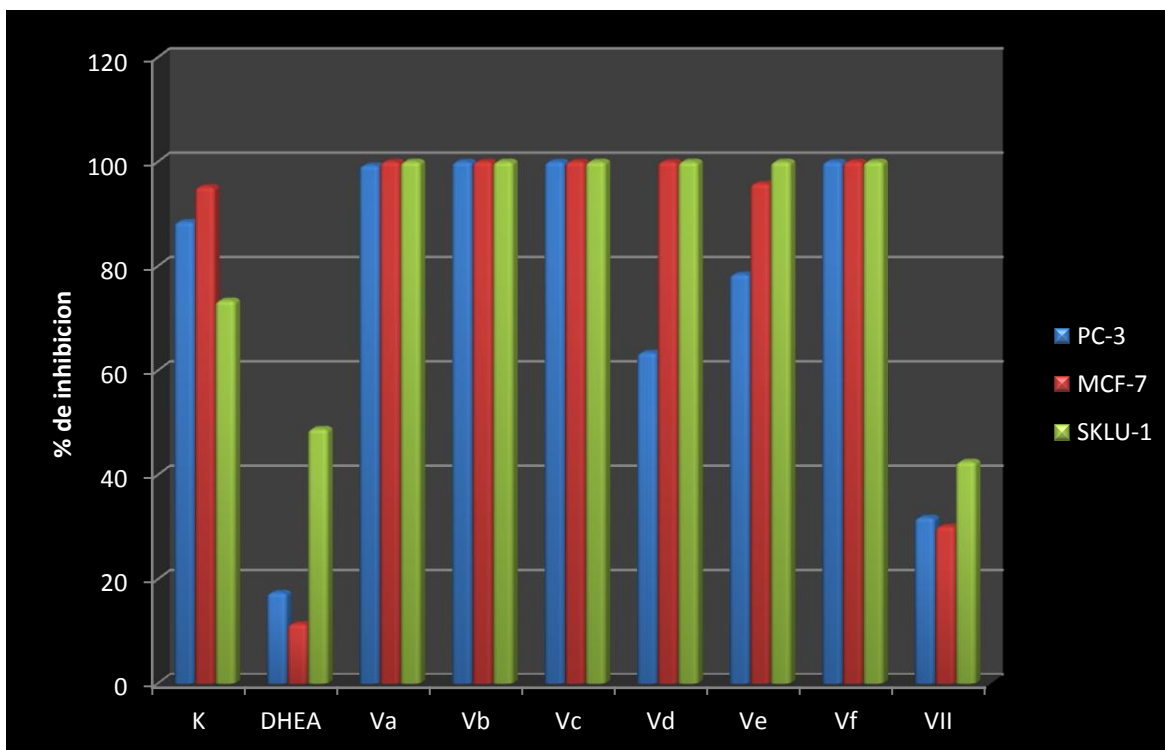


Figura 4.5. Gráfica de resultados de pruebas in vitro para los compuestos finales de triazol (Va-Vf, VII) Vs % inhibición.

Debido a que los mejores resultados sobre líneas celulares se observaron en los compuestos de triazol, se probaron para el ensayo de la enzima 5α -reductasa y para la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, obteniéndose como resultados una excelente inhibición en el segundo ensayo y ningún tipo de efecto inhibitorio en el primero.

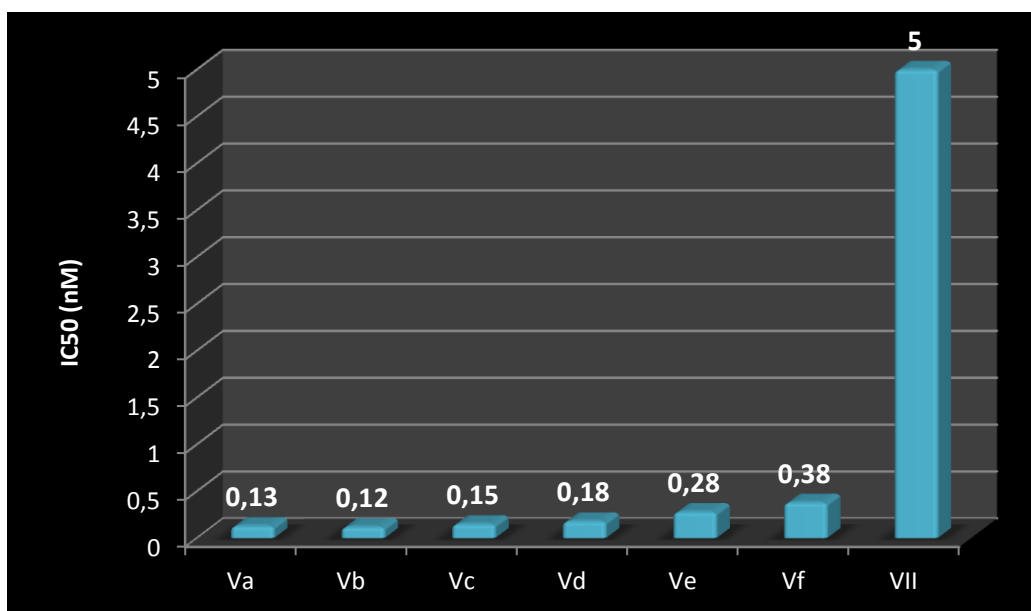


Figura 4.6. Gráfica de resultados de pruebas sobre la enzima 17 β -HSD para los compuestos finales de triazol (Va-Vf, VII) Vs % IC₅₀.

Existen dos rutas para la producción de DHT, por medio de la transformación de Androstenediona a Testosterona, por efecto de la 17 β -HSD, con 5 α -reductasa a DHT.

La segunda ruta es a partir de la Androstenediona que por medio de la 5 α -reductasa se transforma a 5 α -androstandiona, la cual posteriormente se convierte a DHT por efecto de la 17 β -HSD.

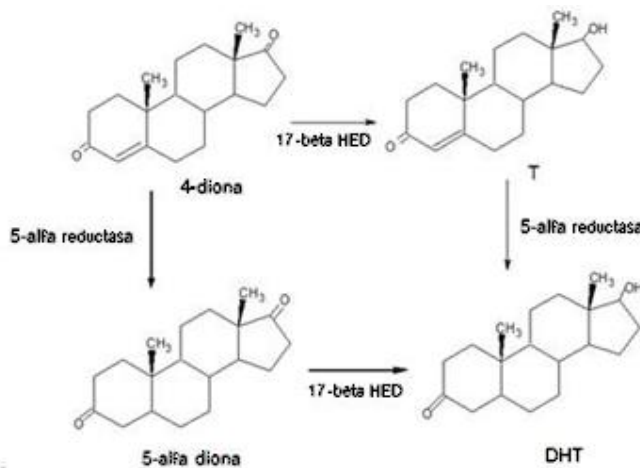


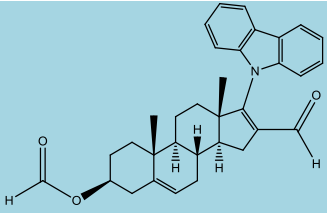
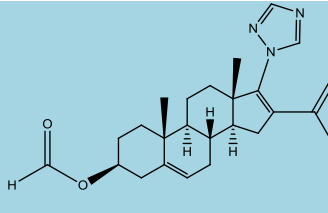
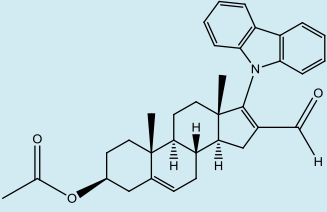
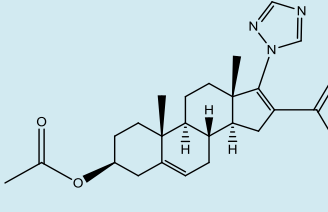
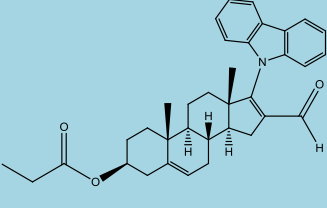
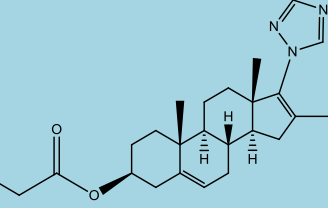
Figura 4.7. Vías metabólicas para la biosíntesis de la DHT en la próstata.

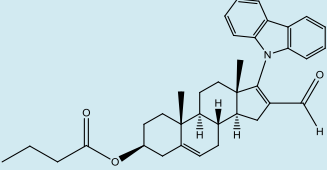
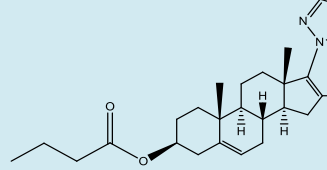
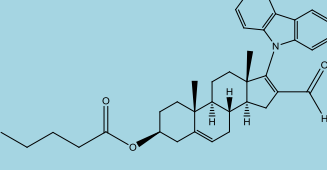
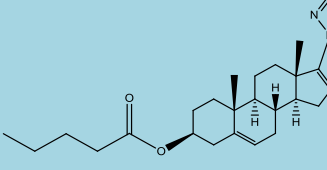
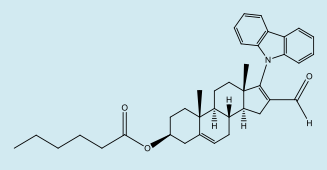
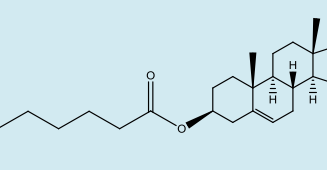
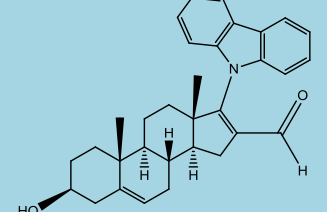
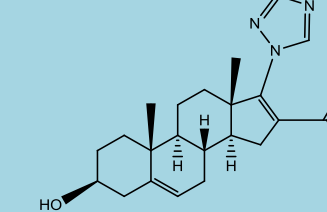
La inhibición de la enzima 17 β -HSD con los compuestos sintetizados es de gran importancia, ya que al inhibir esta ruta se bloquean las dos formas de obtención de DHT en el organismo pero no se afecta la producción de corticoides, disminuyendo así la probabilidad de efectos secundarios graves en el cuerpo y permitiendo la producción natural de Androstandiona (5 α -diona) la cual es una hormona precursora de la Testosterona y de Estrona; a diferencia de la Abiraterona (Zytiga $\text{\textcircled{R}}$), que, siendo el método de terapia hormonal más reciente en el mercado, bloquea al conjunto de enzimas llamadas CYP-17, inhibiendo la producción de corticoides.

Por medio del programa ChemDraw, se determinó el parámetro que describe la lipofilia de los compuestos, éste se encuentra dado por el Log P (coeficiente de partición), este estudio sirve para determinar la capacidad que tiene el esteroide de penetrar la membrana celular y así correlacionarlo con la actividad biológica. Para determinar la variación se compararon con el fármaco más utilizado en el mercado (Finasterida) cuyo Log P es de 3.15, esperando que los compuestos con Log P más alto a éste sean más activos.

En la tabla se muestran los resultados de la estimación del parámetro Log P obtenido para los compuestos finales.

Tabla 4.1. Valores calculados de Log P para los compuestos finales sintetizados

No	Compuesto	Log P	No	Compuesto	Log P
IVa		4.89	Va		1,95
IVb		5	Vb		2.06
IVc		5.66	Vc		2.72

IVd		6.07	Vd		3.13
IVe		6.49	Ve		3.55
IVf		6.91	Vf		3.97
VI		4.77	VII		1.83

En estos resultados se observa que para el ensayo de la 5α -reductasa es determinante que el Log P sea posiblemente lo más aproximado al de la Finasterida, para así tener una liposolubilidad óptima, mientras que para el ensayo de la 17β -HSD, según los resultados obtenidos, entre menor sea el Log P mejor será la actividad de los compuestos sintetizados.

CONCLUSIONES

- ❖ Se sintetizaron catorce nuevos compuestos derivados de la deshidroepiandrosterona como posibles antiandrógenos, para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y/o el cáncer de próstata.
- ❖ Se logró la optimización de la ruta sintética y la purificación de cada uno de estos nuevos compuestos, obteniéndose rendimientos buenos y aceptables.
- ❖ Todos los nuevos compuestos se caracterizaron por diferentes métodos espectroscópicos (IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y espectrometría de masas).
- ❖ Todos los compuestos con triazol evaluados sobre líneas celulares de cáncer, presentaron una alta inhibición sobre las tres líneas utilizadas, mientras que los compuestos que contenían carbazol no presentaron ningún tipo de actividad.
- ❖ Se realizó la evaluación biológica (*in vivo*) solo de la segunda serie de compuestos, mostrando excelentes resultados de inhibición sobre la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, pero sin ningún tipo de efecto sobre la enzima 5α - reductasa.
- ❖ El compuesto **(3 β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va)**, es un candidato ideal como antiandrógeno, ya que presenta una actividad inhibitoria de 0.13 nM sobre la enzima 17β -HSD, siendo mucho que el fármaco de selección en el mercado (Abiraterona) ya que no inhibe al CYP-17 permitiendo la biosíntesis de corticoides.
- ❖ Los resultados de las pruebas *in vivo* aun se están llevando a cabo, se esperan los resultados para su correspondiente discusión.
- ❖ La realización de este trabajo de investigación aporta información importante para la continuación de estudios sobre compuestos derivados de la deshidroepiandrosterona para el diseño de nuevas moléculas contra el cáncer de próstata y/o la hiperplasia prostática benigna.

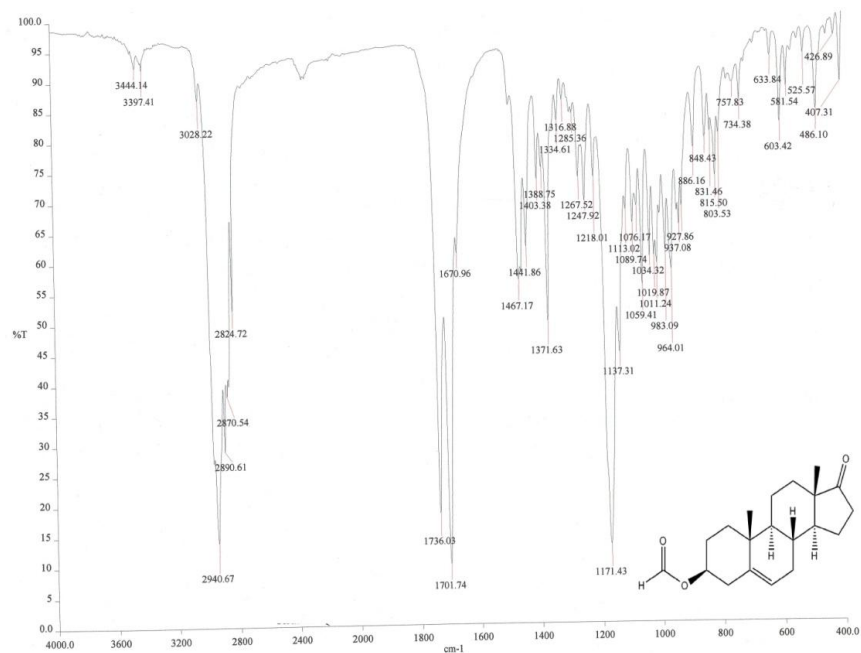
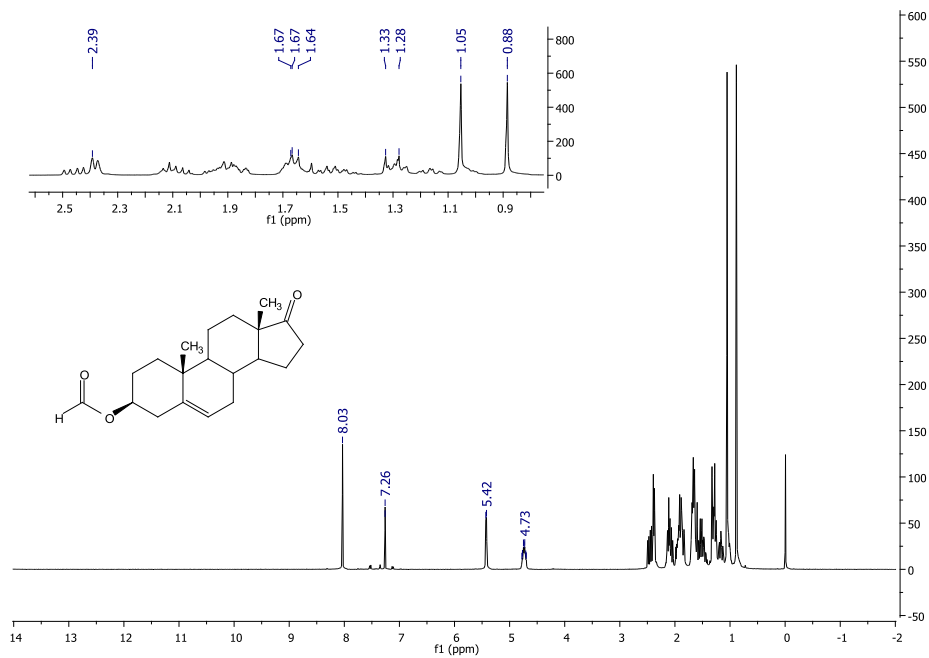
BIBLIOGRAFIA

- [1] Newschanffer C.J, Otani K, Mc Donald M.K, Penberthy L.T, Causes of death in elderly prostate cancer patients and comparison nonprostate cancer cohort, *J. Natl. Cáncer Inst*, 92, **2000**, p. 613.
- [2] <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer> página consultada el día 08 de octubre del **2011**. Fuente principal <http://www.cancer.org/>.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A, Cancer Statistics 2013, American cancer society. *CA. Cancer. J. Clin.*, 63, **2013**, p. 11–30.
- [4] <http://www.aeu.es/approstatata.aspx>, página consultada el día 08 de octubre del **2012**. Fuente: <http://www.aeu.es>.
- [5] <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/overviewguide/prostate-cancer-overview-what-is-cancer>, página consultada el día 08 de octubre del **2011**. Fuente principal <http://www.cancer.org/>.
- [6] Martinez A, Esteroles, Facultad de química farmacéutica, Universidad de Antioquia. **2002**, p. 2.
- [7] Brandan N, Llanos I.C, Miño C.A, Cátedra de Bioquímica, Universidad Nacional del Nordeste, **2008**, p. 3-4.
- [8] Boron W.F, Boulpaep E.L, Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach, Elsevier, **2003**, p. 1300
- [9] McMurry JE, Química Orgánica, 7a ed., Thomson, p. 1134-1135
- [10] Labrie F, Luu V, *et al.*, Is deshydroepiandrosterone a hormone?, *J. Endocrinolol*, 187, **2005**, p. 169-196.
- [11] Hartmann R.W, Markus H, *et al.*, Synthesis and Evaluation of novel steroidal oxime inhibitors of P450 17 (17 α -Hydroxylase/C17-20-Lyase) and 5 α -reductase types 1 and 2. *J. Med. Chem*, 43, **2000**, p. 4266-4277.
- [12] Russell D. W, Wilson J.D, Steroid 5 α -Reductase: Two genes/Two enzymes, *Annu Rev. Biochem.* 64, **1994**, p. 25-61.
- [13] Dalton T.J., Bohl E.C, Gao W, Chemistry and structural biology of androgen Receptor,

- Chem Rev*, 105, **2005**, p. 3352-3370.
- [14] Debes JD, Tindall DJ, The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer, *Cancer Letters*, 187, **2002**, p. 1-7.
- [15] 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.*, 38, **1995**, p. 1456-1461.
- [16] Gormley GJ, Stoner E, Bruskeewis RC, *et al.* the effect of Finasteride in men with benign prostatic hyperplasia, *N Engl J Med*, 372, **1992**, p. 1185-1191.
- [17] Bratoeff E, *et al.* Steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, 6, **1999**, p. 1107-1123.
- [18] Herbert GB, *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.*, 118, **1996**, p. 2359-2365.
- [19] Arellano G, Nuevos Derivados de la Deshidroepiandrosterona como Inhibidores de la Enzima 5 α -Reductasa y/o Antagonistas del receptor Androgenico, Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM **2013**.
- [20] Posada A, Síntesis de Antiandrogens Esteroidales Basados en el Esqueleto de Deshidroepiandrosterona con un Heteroatomo en C-17, Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM **2011**.
- [21] Cortes F, Síntesis y Evaluación biológica de derivados de la deshidroepiandrosterona con un grupo azol en C-17 como antiandrogens. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM **2013**.
- [22] Nomenclature of Steroids. *Pure and Applied Chem*, 61, **1989**, p. 1783-1822
- [23] Steroid Nomenclature. *J. Org. Chem.*, 34, **1969**, p. 1517-1548.
- [24] Pretsch E, Bulhmann P, Badestscher M, Structure Determination of Organic Compounds, 4^a ed., **2009**, p.184
- [25] Moreira V, Salvador J, Beja A, Paixao J, The reaction of azoles with 17 chloro-16-formylandrosta-5-16-dien-3 β -yl-acetate: Synthesis and structural elucidation of novel 16-azolylmethylene-17-oxoandrostanes. *Steroids*, 76, **2011**, p. 582-587.

- [26] Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem*, 72, **1976**, p.248f
- [27] Long B, Jelovac D, Thiantanawat A, *et al*, The Effect of Second-Line Antiestrogen Therapy on Breast Tumor Growth after First-Line Treatment with the Aromatase Inhibitor Letrozole: Long-Term Studies Using the Intratumoral Aromatase Postmenopausal Breast Cancer Model. *Clin. Cancer. Res.*, 8, **2002**, p. 2378-2388.
- [28] Wade LG, *Química Organiza*, 5^a ed, editorial Person, p. 1211-1214.
- [29] Flores E, Bratoeff E, *et al*, 5 α -reductasa inhibitors, *Mini. Med. Rev. Chem.*, 3, **2003**, p.225-237.
- [30] Bratoeff E, Rubio M, *et al*, Pharmacological and theoretical evaluation of new antiandrógenos, *Chem. Today.*, 16, **1998**, p. 33-35
- [31] Mmangan F, Ainwaring I, An explanation of the antiandrogenic properties of 6-bromo-17-hydroxi-4-oxa-5 α -androstane-3-one, *Steroids*, 20, 1972, p. 331
- [32] Espada M, Avendaño C, *Inhibidores enzimáticos como farmacodinamicos*, *Introducción a la Química Farmacéutica*, Mc Graw-Hill, Madrid, España, 1996, p. 292-295.
- [33] Bratoeff E, *et al*, Biological activity of novel progesterone derivates having a bulky ester side chains at C-3. *Steroids*, 73, 2008, p.838-843.

ANEXOS

A.1. Espectros de (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa).Figura A.1. Espectro de IR de la (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa).Figura A.2. Espectro de RMN¹H de la (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa).

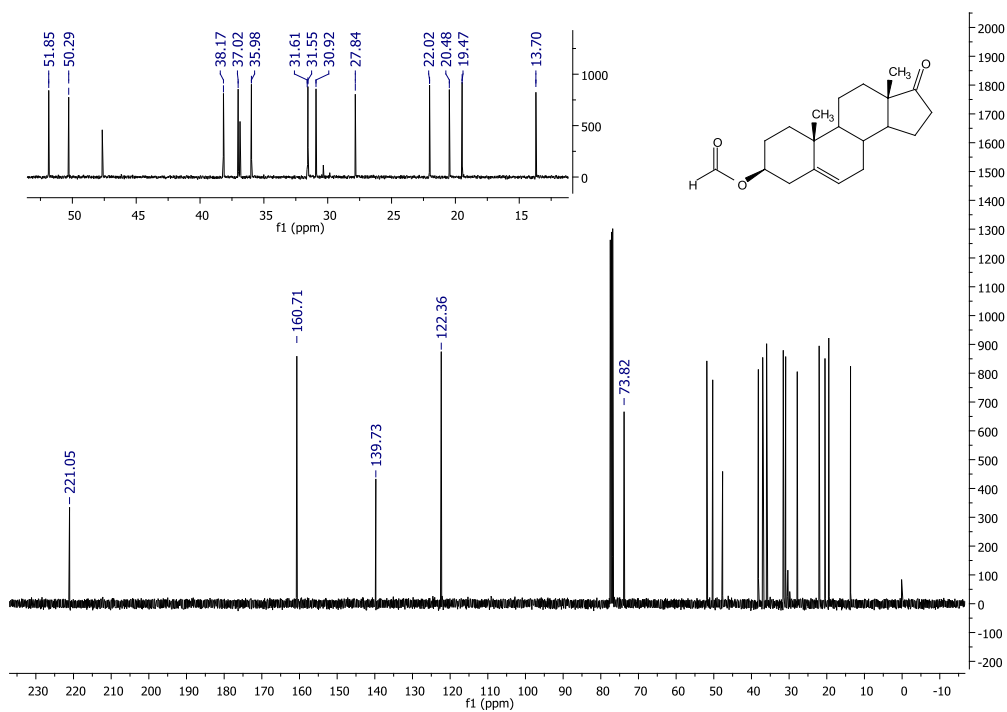


Figura A.3. Espectro de RMN ^{13}C de la (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa).

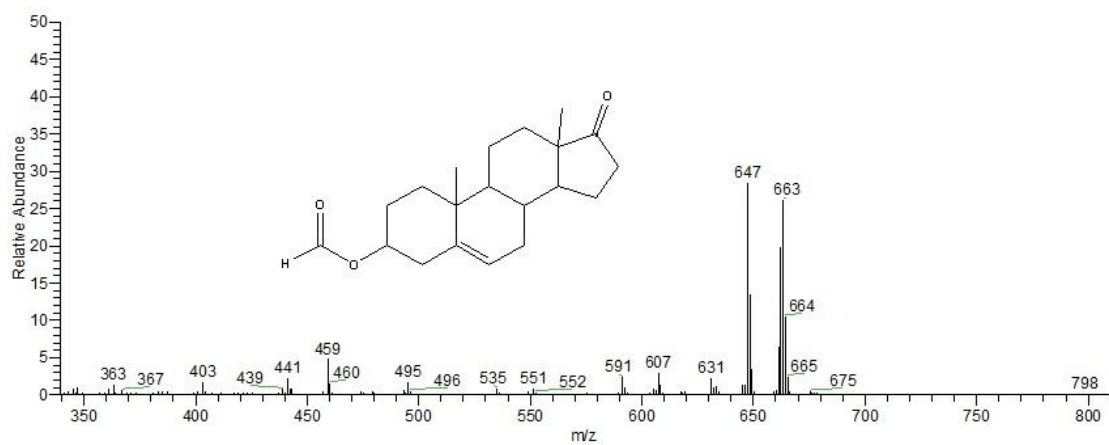
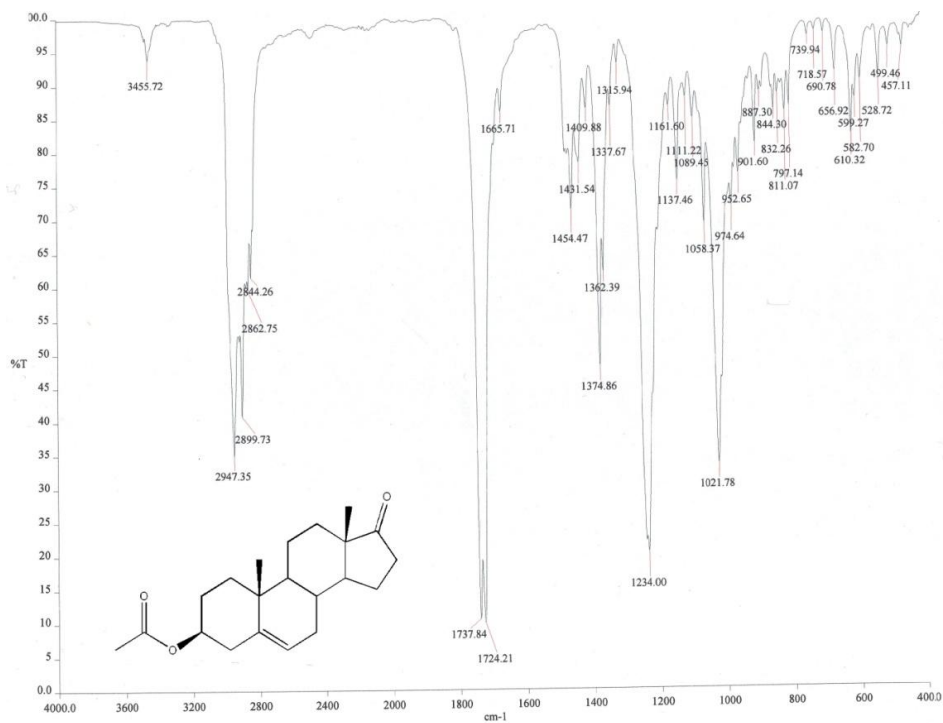
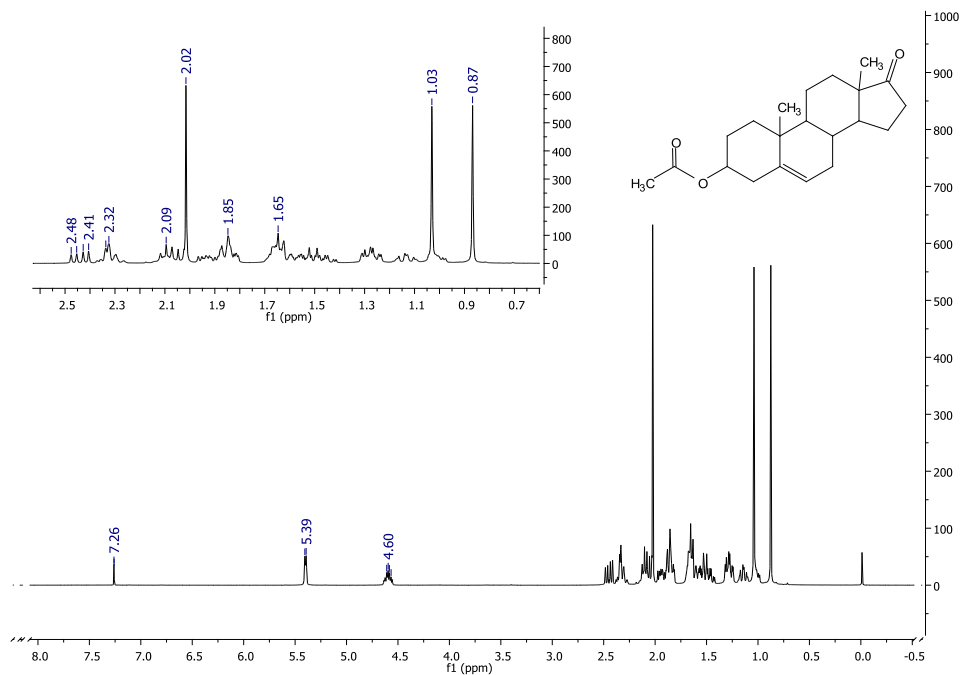


Figura A.4. Espectro de masas de la (3 β)-formiloxi-androst-5-en-17-ona (IIa).

A.2. Espectros de (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb).**Figura A.5.** Espectro de IR de la (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb).**Figura A.6.** Espectro de RMN ¹H de la (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb).

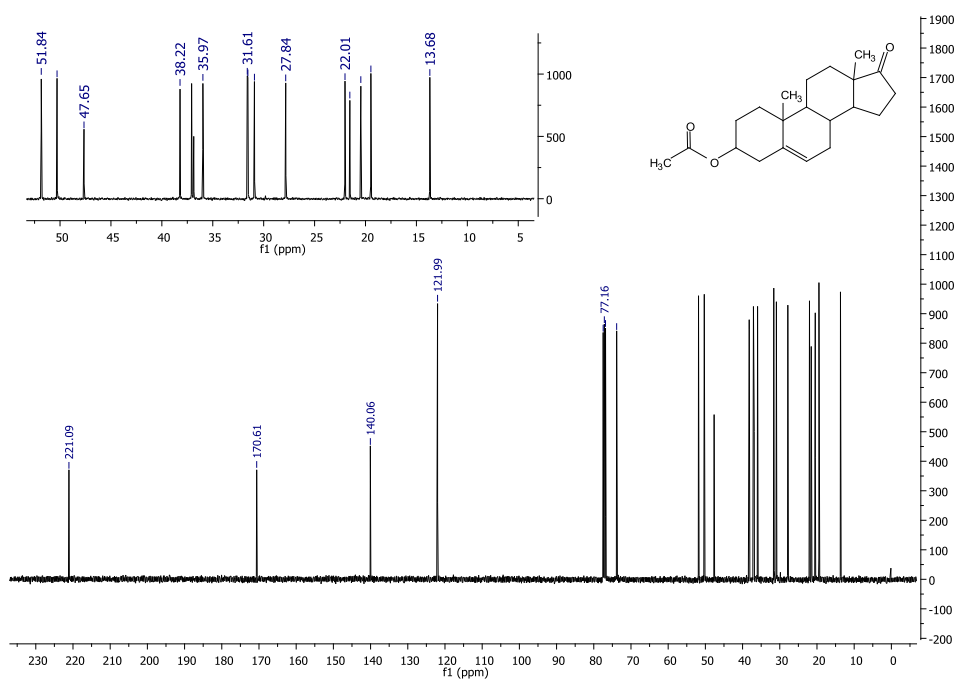


Figura A.7. Espectro de RMN ^{13}C de la (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb).

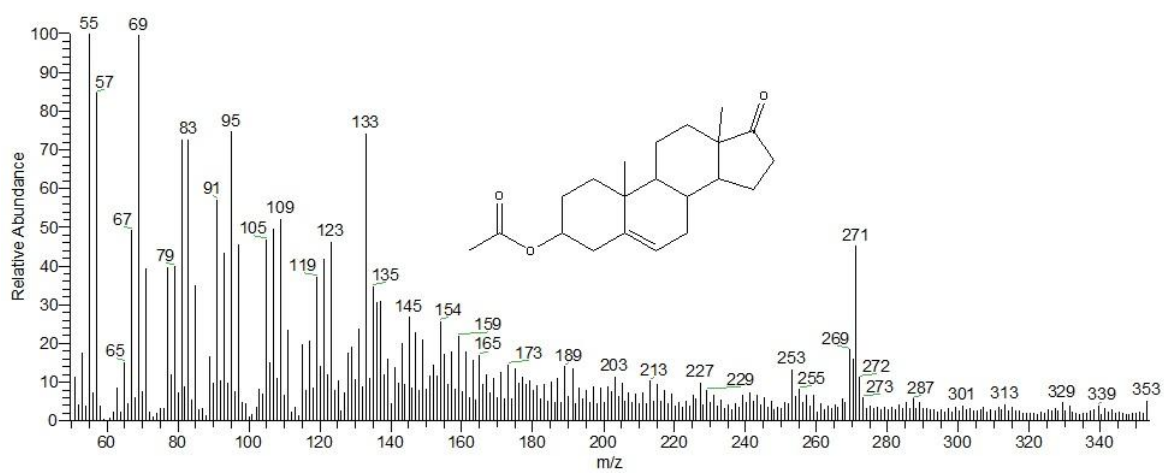


Figura A.8. Espectro de masas de la (3 β)-acetiloxi-androst-5-en-17-ona (IIb).

A.3. Espectros de (3 β)-propioniloxi-androst-5-en-17-ona (IIc).

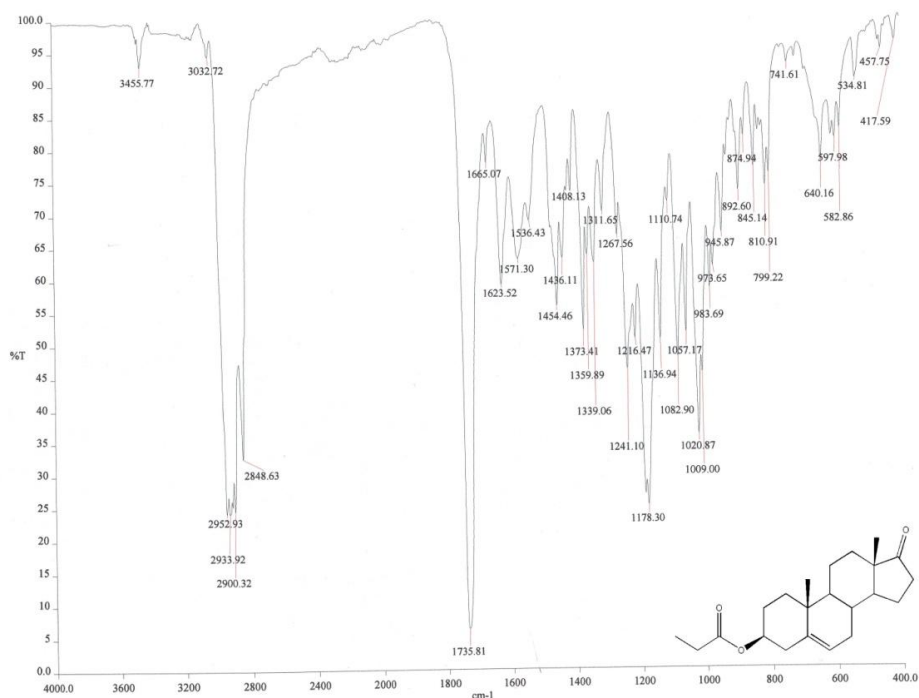


Figura A.9. Espectro de IR de la (3 β)-propioniloxi-androst-5-en-17-ona (IIc).

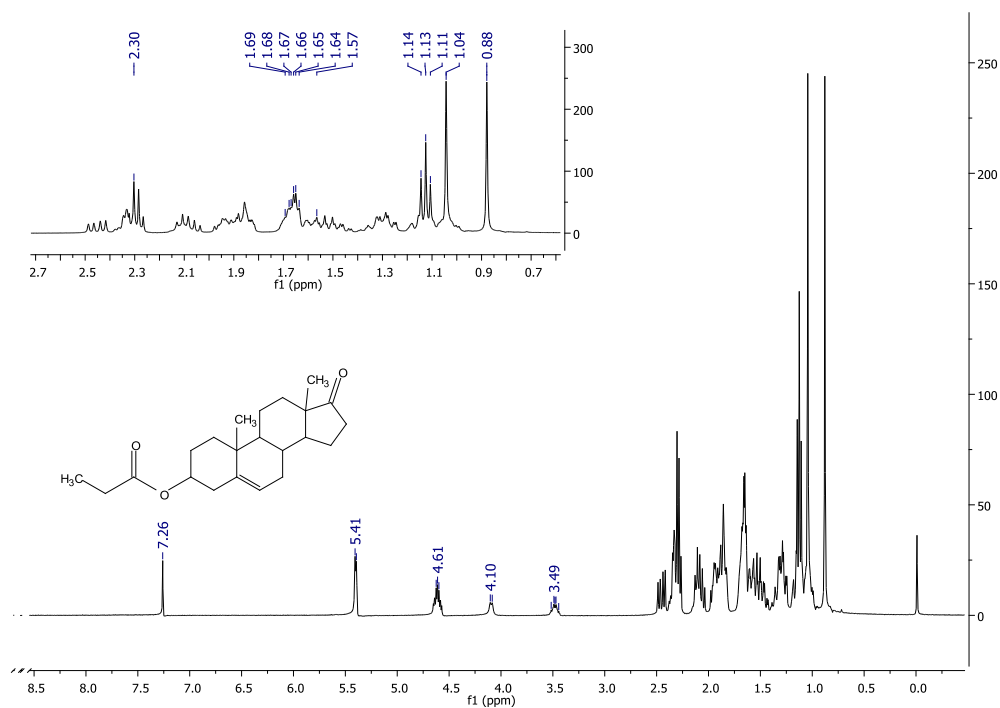


Figura A.10. Espectro de RMN¹H de la (3 β)-propioniloxi-androst-5-en-17-ona (IIc).

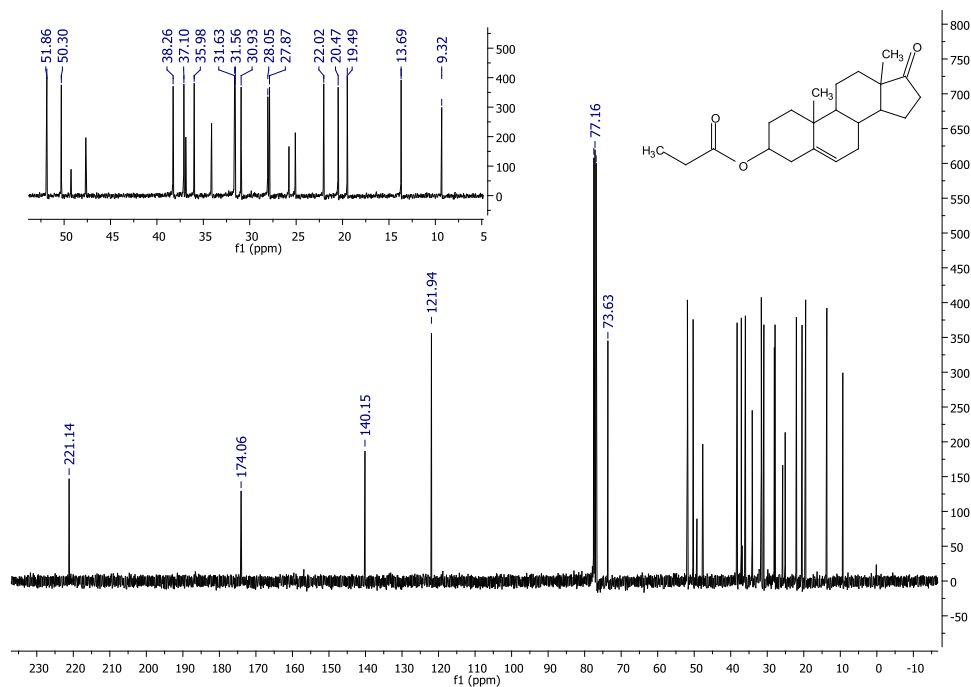


Figura A.11. Espectro de RMN¹³C de la (3 β)-propionioiloxi-androst-5-en-17-ona (IIc).

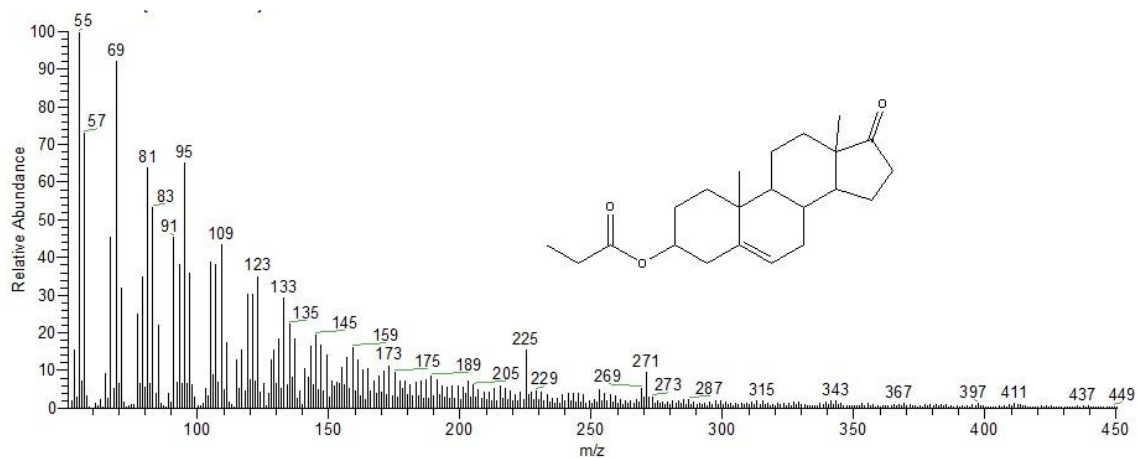
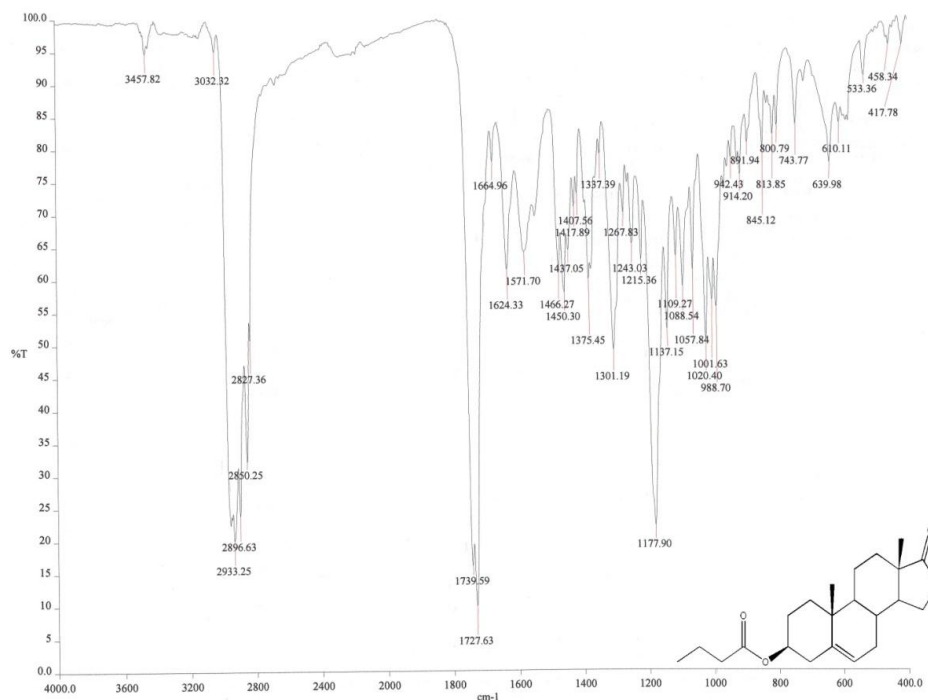
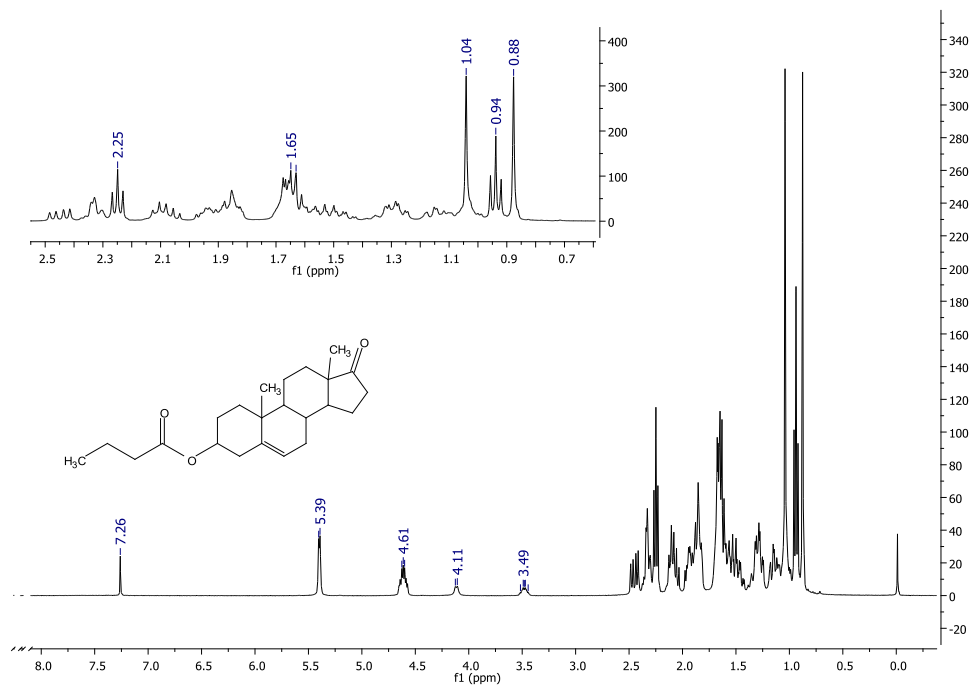


Figura A.12. Espectro de masas de la (3 β)-propionioiloxi-androst-5-en-17-ona (IIc).

A.4. Espectros de (3 β)-butiroiloxi-androst-5-en-17-ona (II_d).Figura A.13. Espectro de IR de la (3 β)-butiroiloxi-androst-5-en-17-ona (II_d).Figura A.14. Espectro de RMN¹H de la (3 β)-butiroiloxi-androst-5-en-17-ona (II_d).

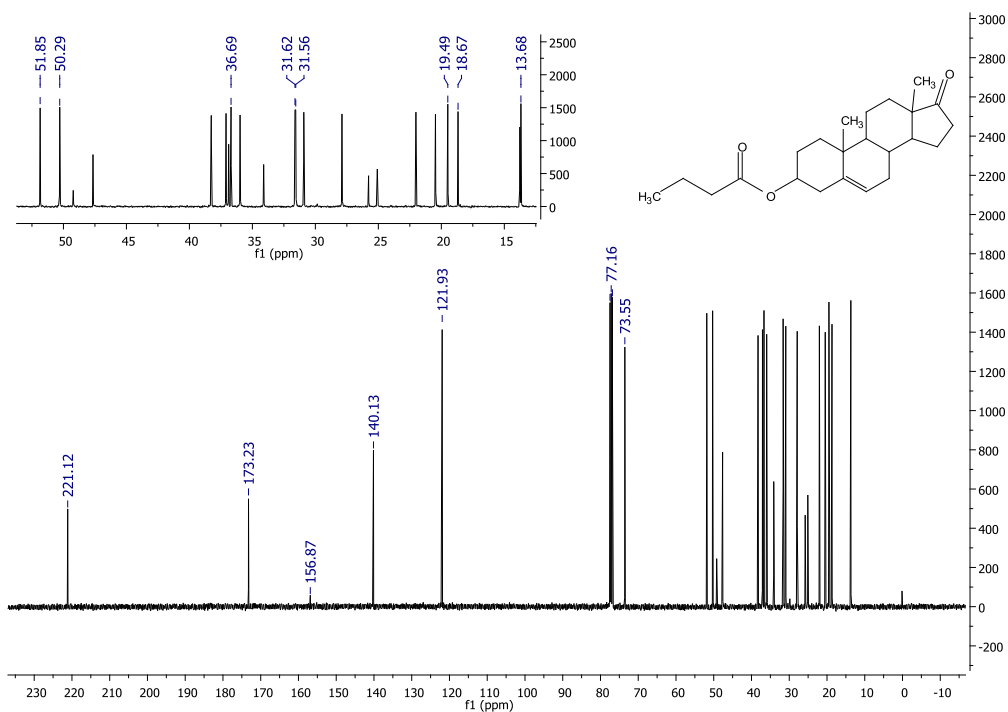


Figura A.15. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-butiroiloxi-androst-5-en-17-ona (IId).

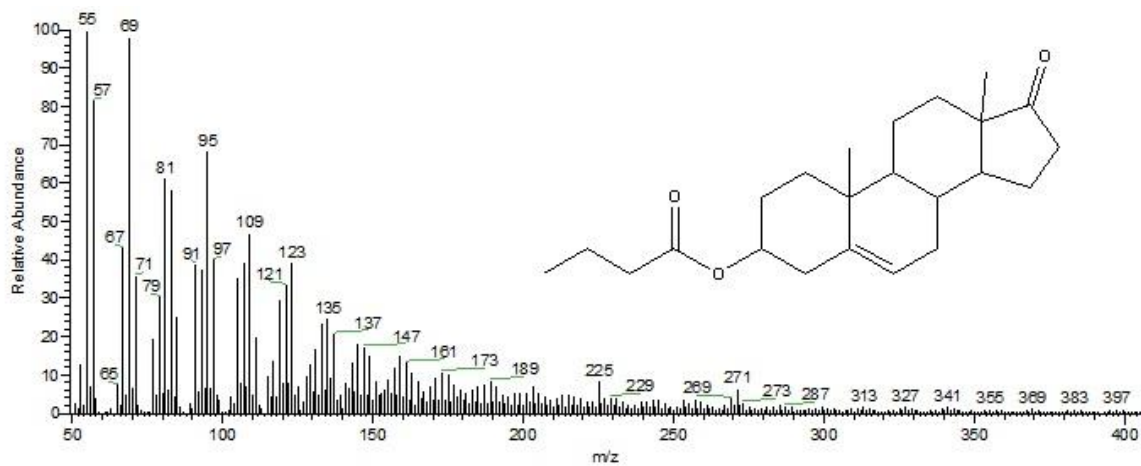
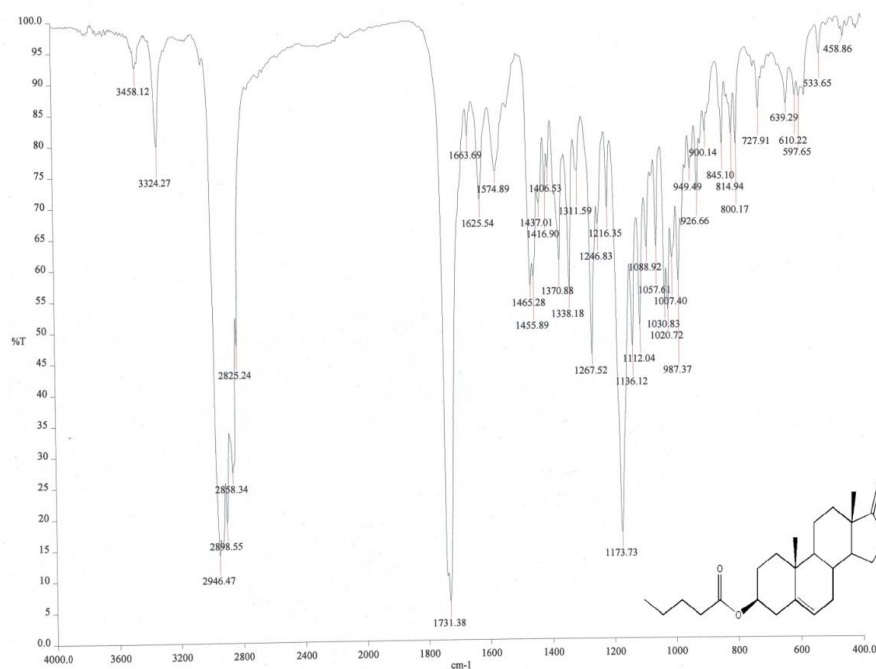
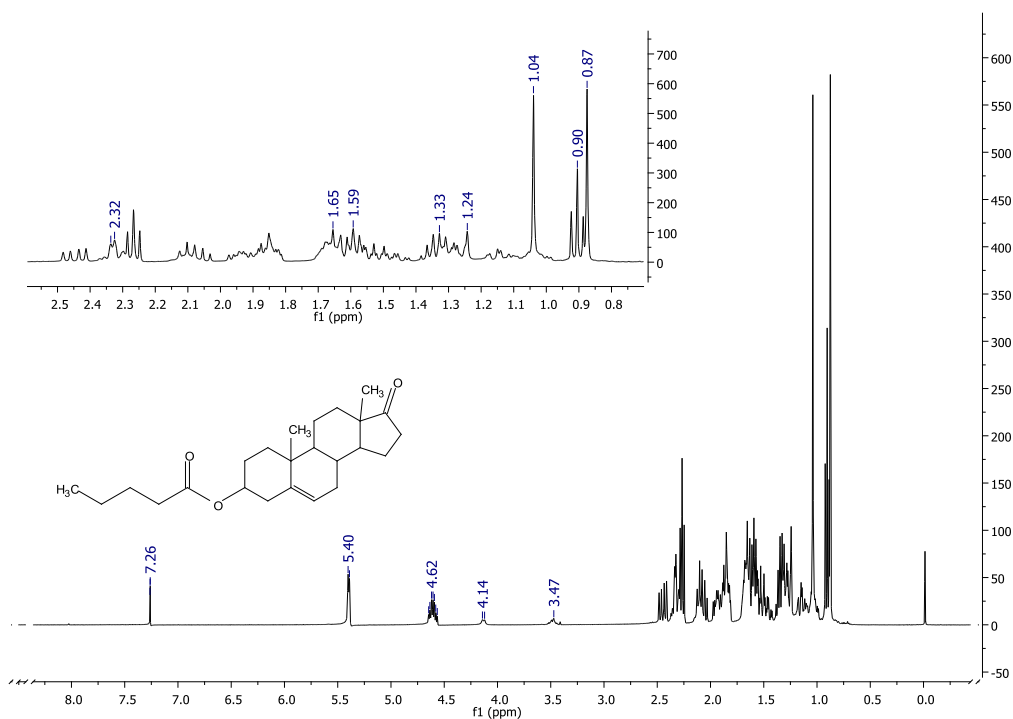


Figura A.16. Espectro de masas de la (3β)-butiroiloxi-androst-5-en-17-ona (IId).

A.5. Espectros de (3 β)-valeroiloxi-androst-5-en-17-ona (IIe).**Figura A.17.** Espectro de IR de la (3 β)-valeroiloxi-androst-5-en-17-ona (IIe).**Figura A.18.** Espectro de RMN¹H de la (3 β)-valeroiloxi-androst-5-en-17-ona (IIe).

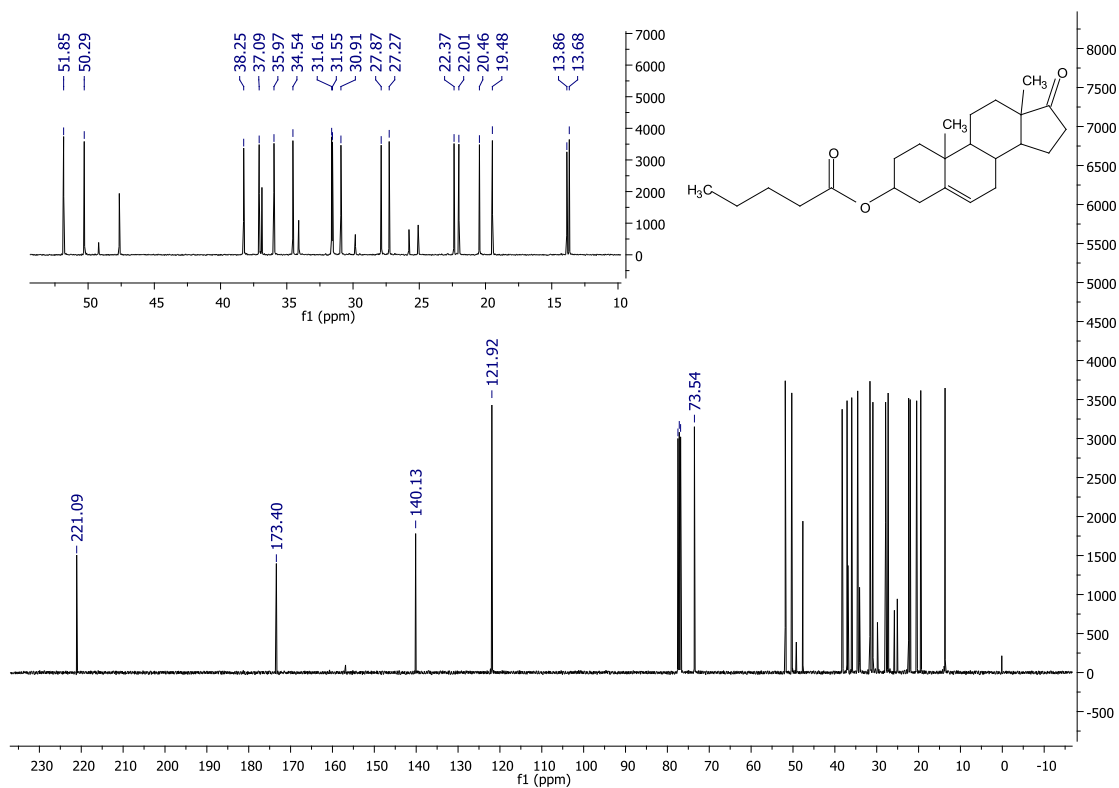


Figura A.19. Espectro de RMN ^{13}C de la (3 β)-valeroiloxi-androst-5-en-17-ona (IIe).

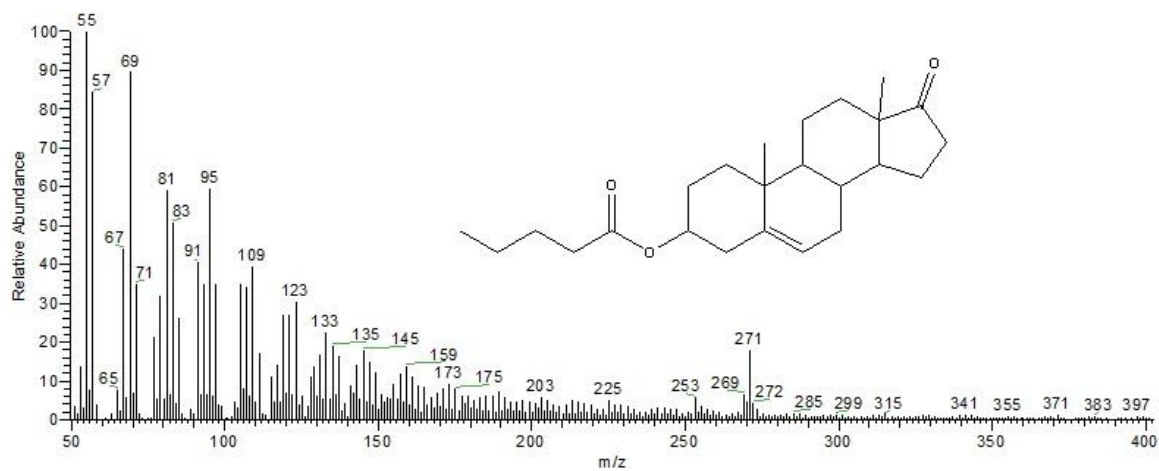
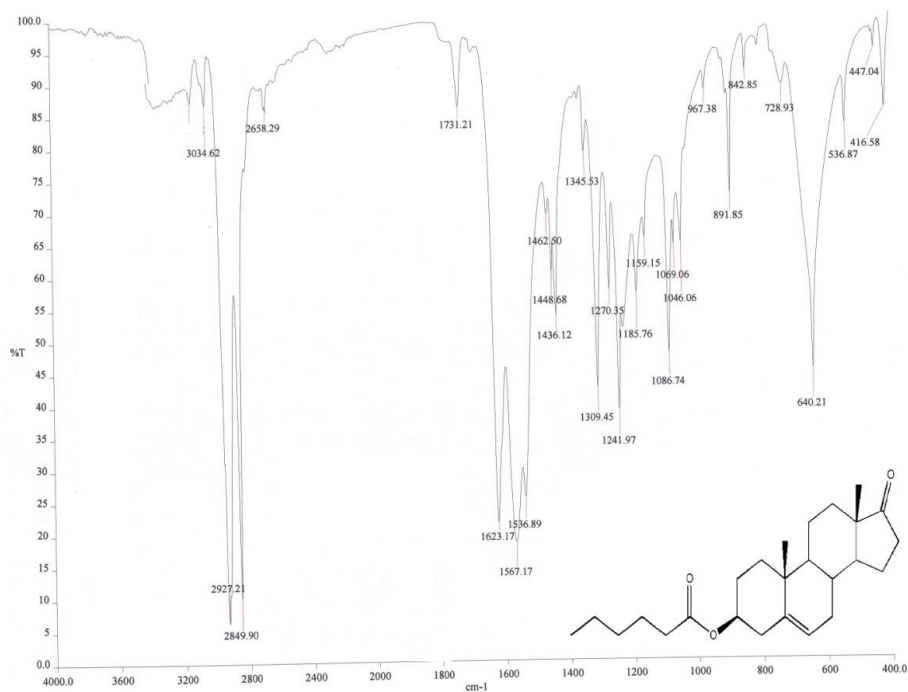
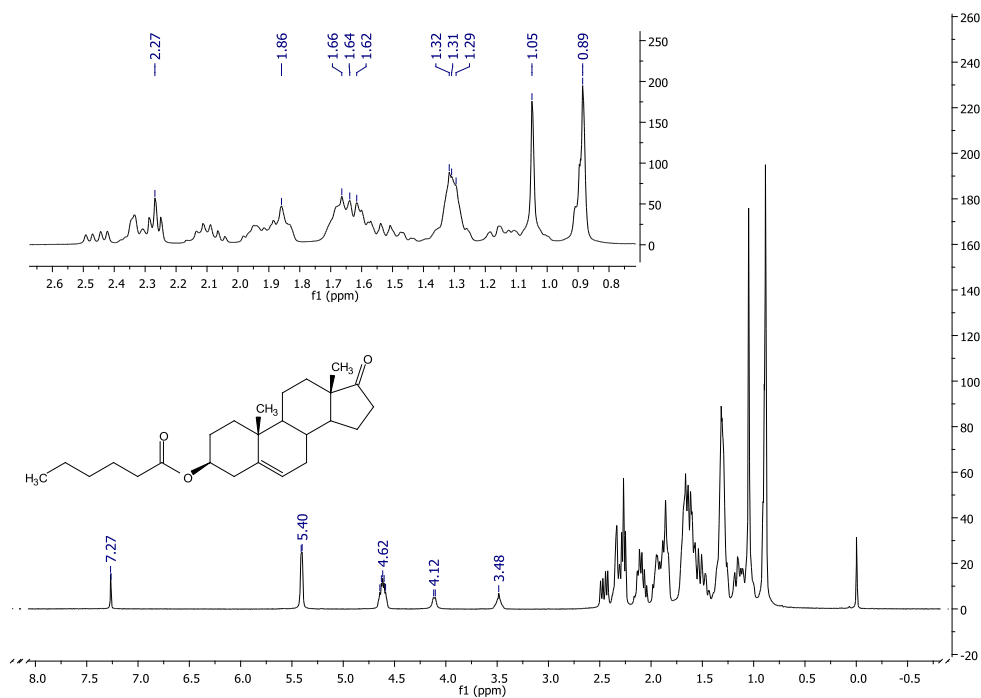


Figura A.20. Espectro de masas de la (3 β)-valeroiloxi-androst-5-en-17-ona (IIe).

A.6. Espectros de (3 β)-hexanoiloxi-androst-5-en-17-ona (IIf).

Figura A.21. Espectro de IR de la (3 β)-hexanoiloxi-androst-5-en-17-ona (IIf).

Figura A.22. Espectro de RMN¹H de la (3 β)-hexanoiloxi-androst-5-en-17-ona (IIf).

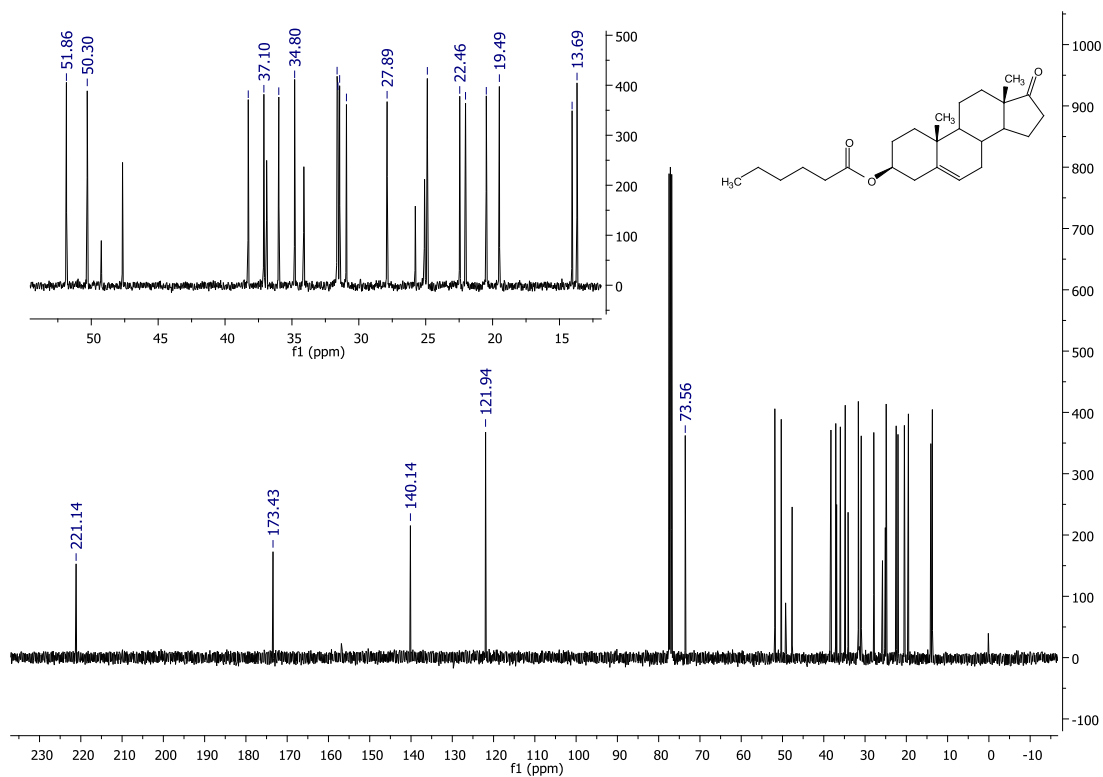


Figura A.23. Espectro de RMN ^{13}C de la (3 β)-hexanoiloxi-androst-5-en-17-ona (IIf).

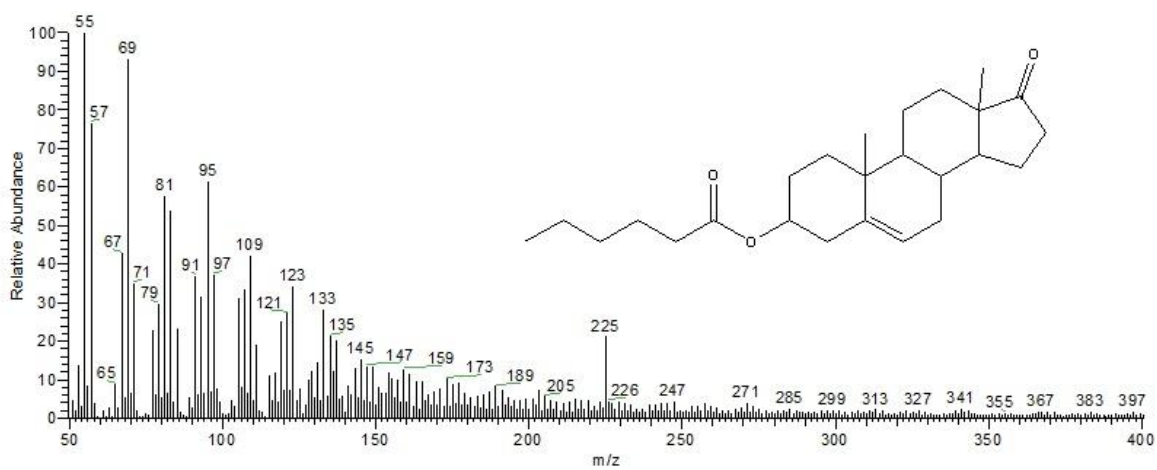


Figura A.24. Espectro de masas de la (3 β)-hexanoiloxi-androst-5-en-17-ona (IIf).

A.7. Espectros de (3 β)-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIa).

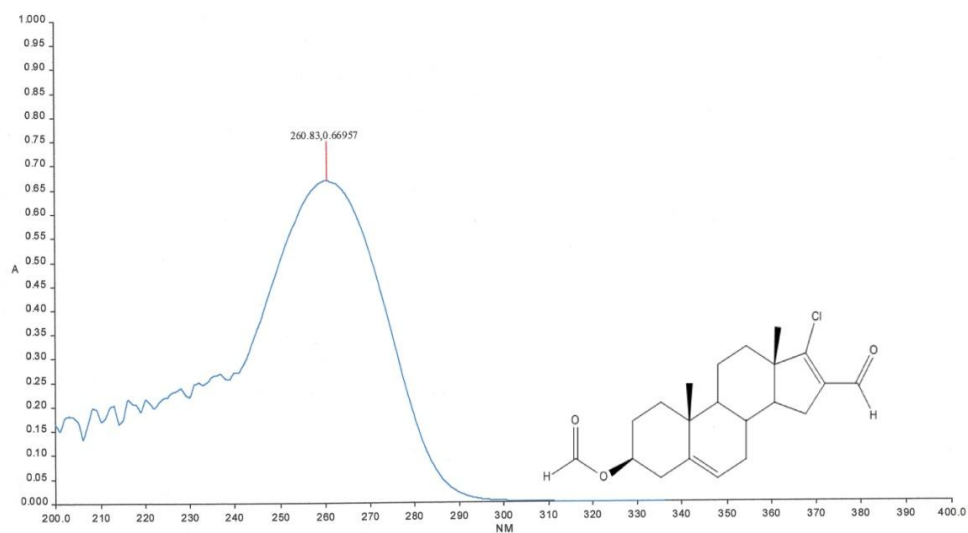


Figura A.25. Espectro de UV de la (3 β)-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno

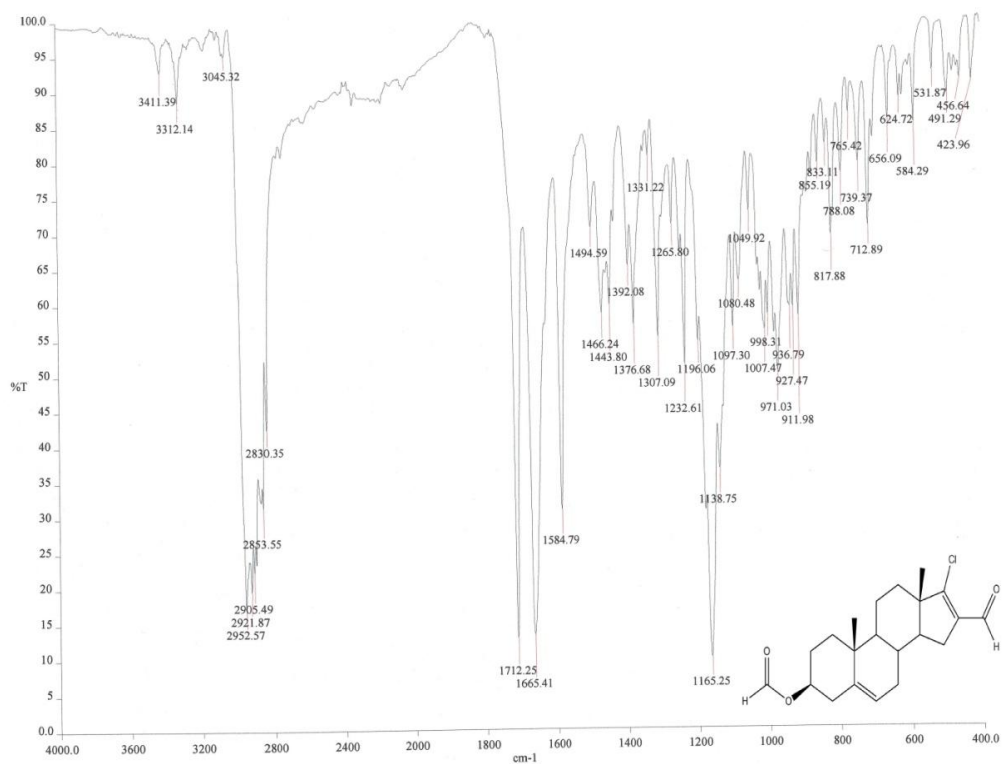


Figura A.26. Espectro de IR de la (3 β)-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno

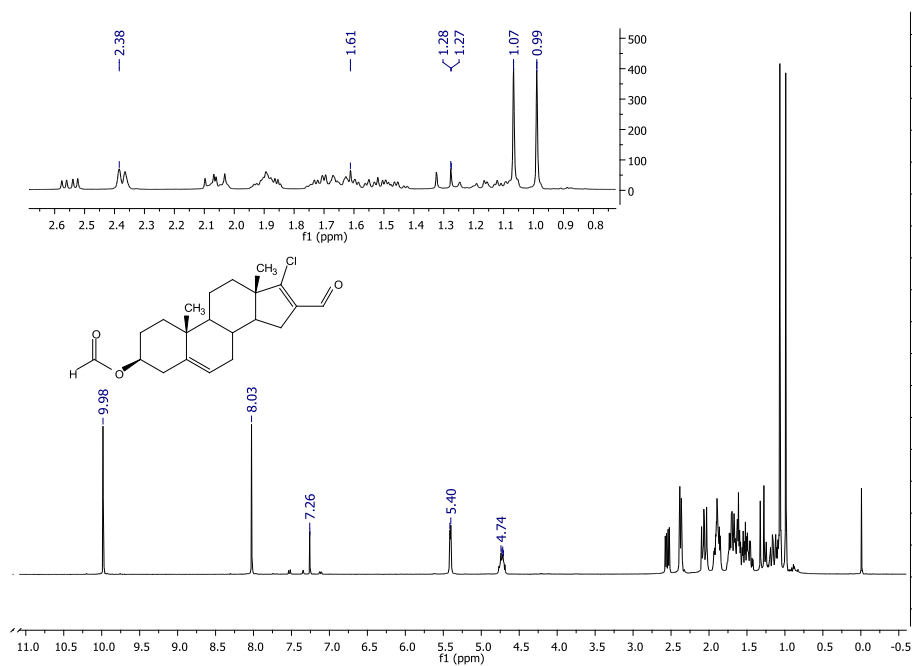


Figura A.27. Espectro de RMN^1H de la (3 β)-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno

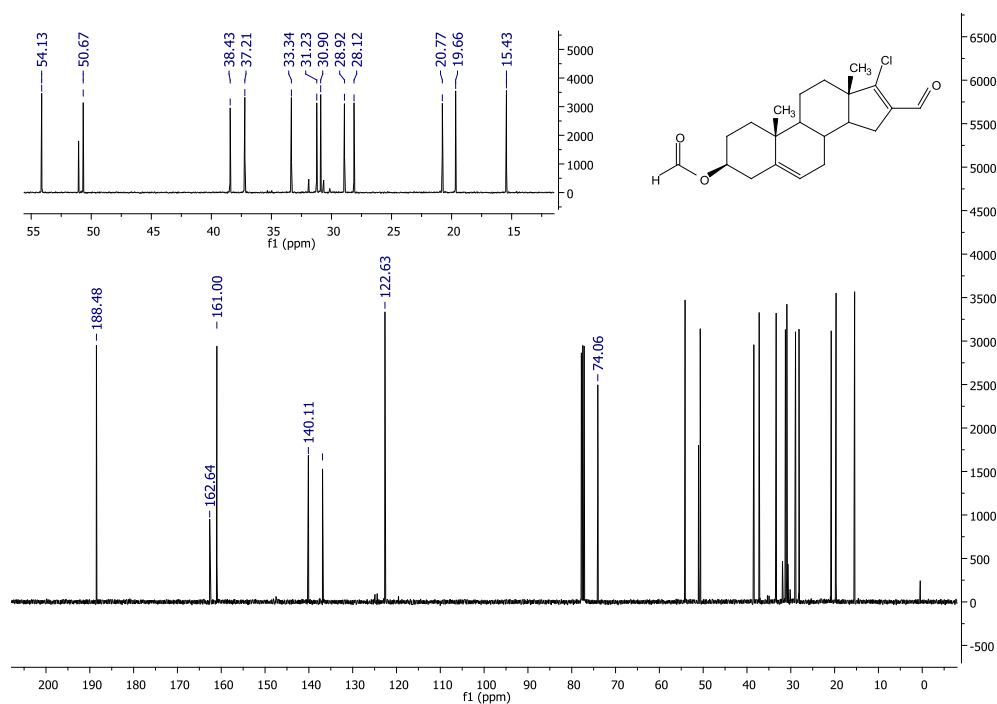


Figura A.28. Espectro de RMN^{13}C de la (3 β)-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno

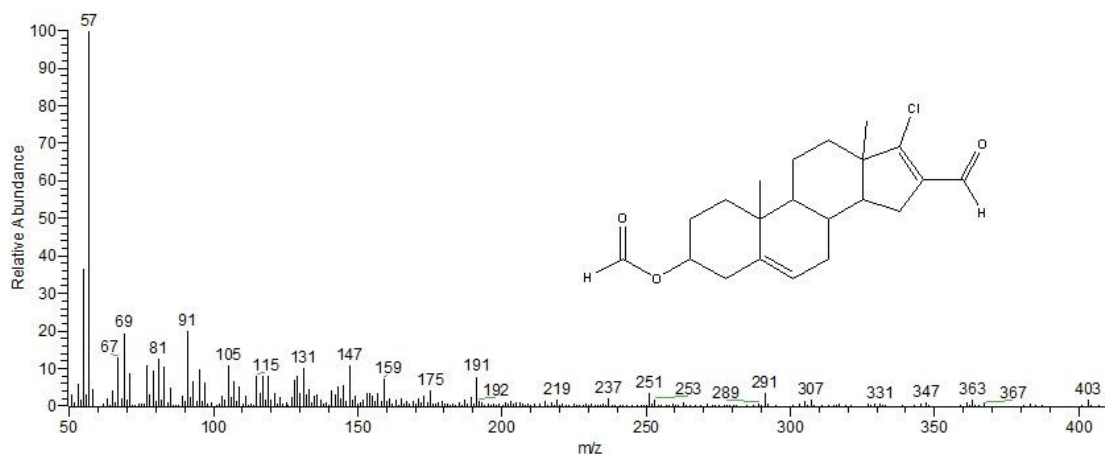


Figura A.29. Espectro de masas de la (3β)-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno

A.8. Espectros de (3β)-acetoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIb).

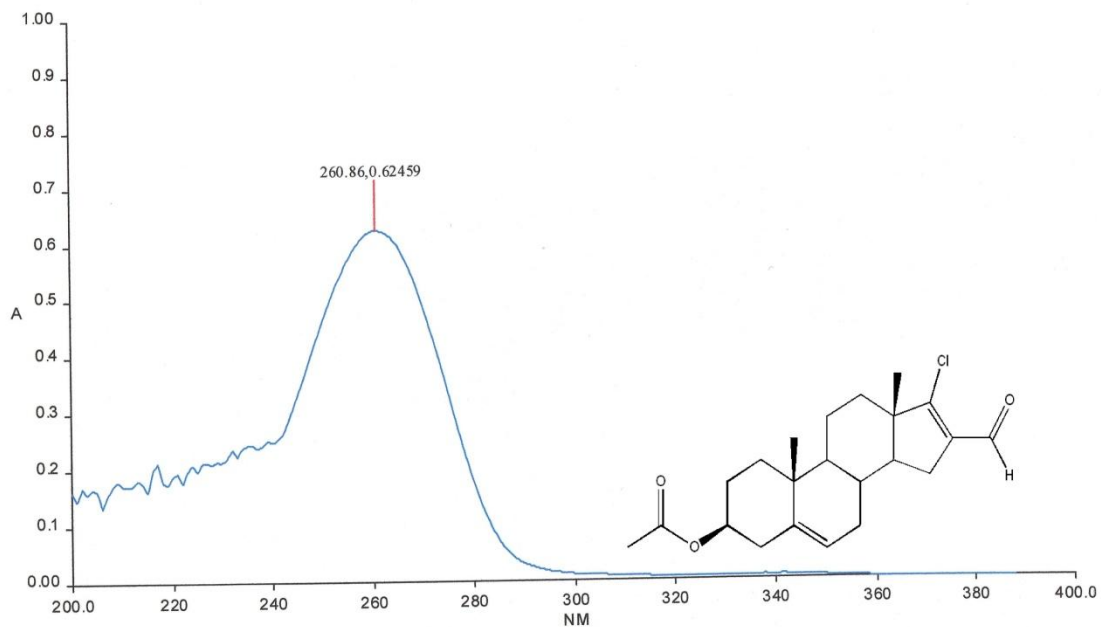


Figura A.30. Espectro de UV de la (3β)-acetoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIb).

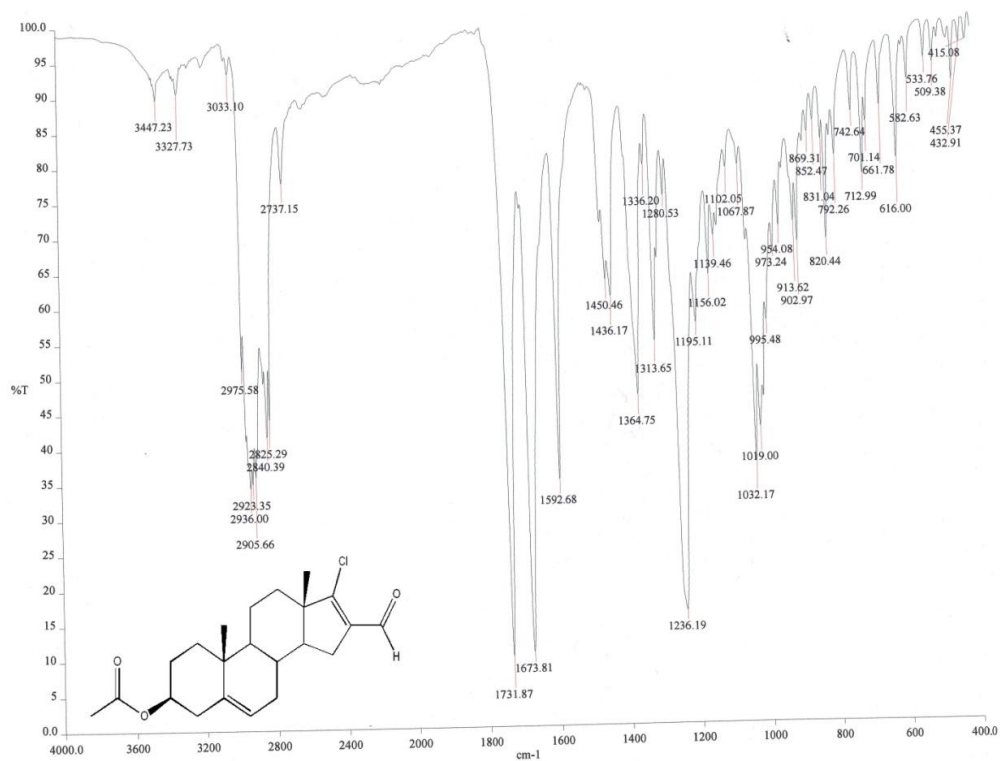


Figura A.31. Espectro de IR de la (3β)-acetoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIb).

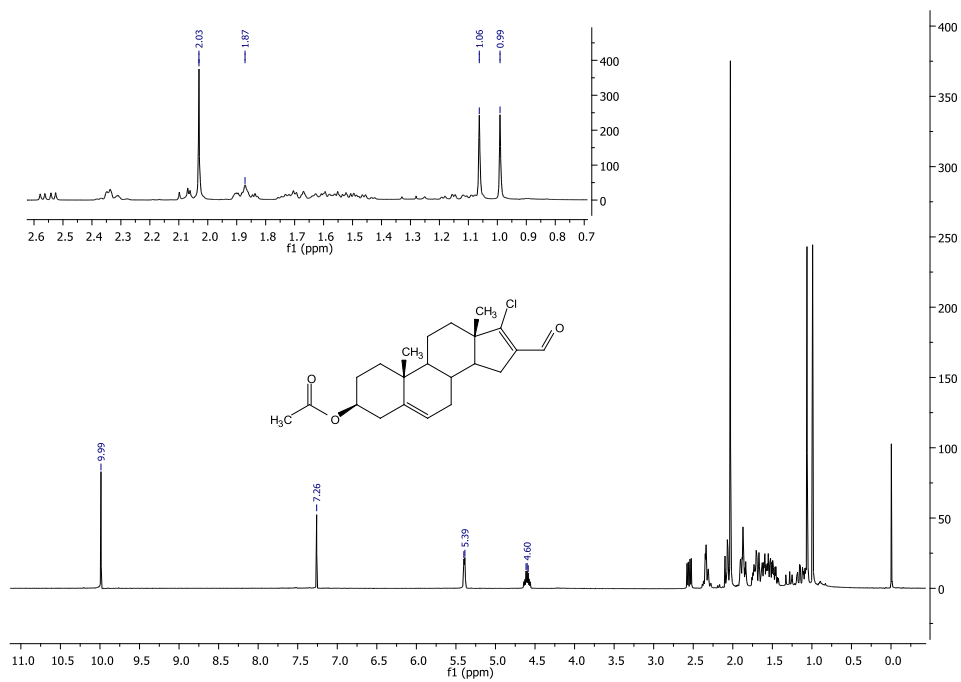


Figura A.32. Espectro de RMN¹H de la (3β)-acetoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIb).

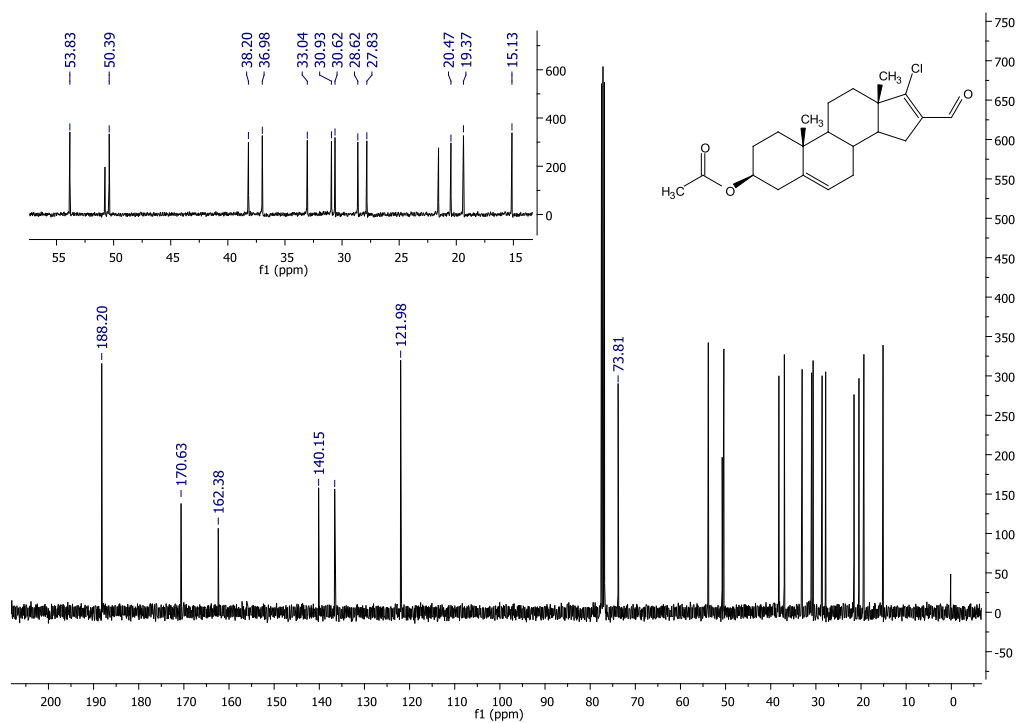


Figura A.33. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-acetoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIb).

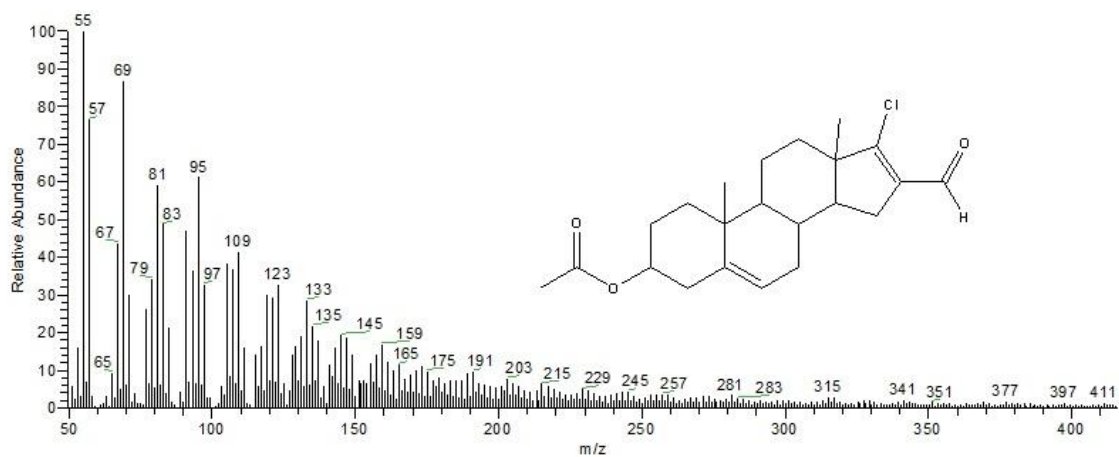


Figura A.34. Espectro de masas de la (3β)-acetoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIb).

A.9. Espectros de (3 β)-propioniloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIc).

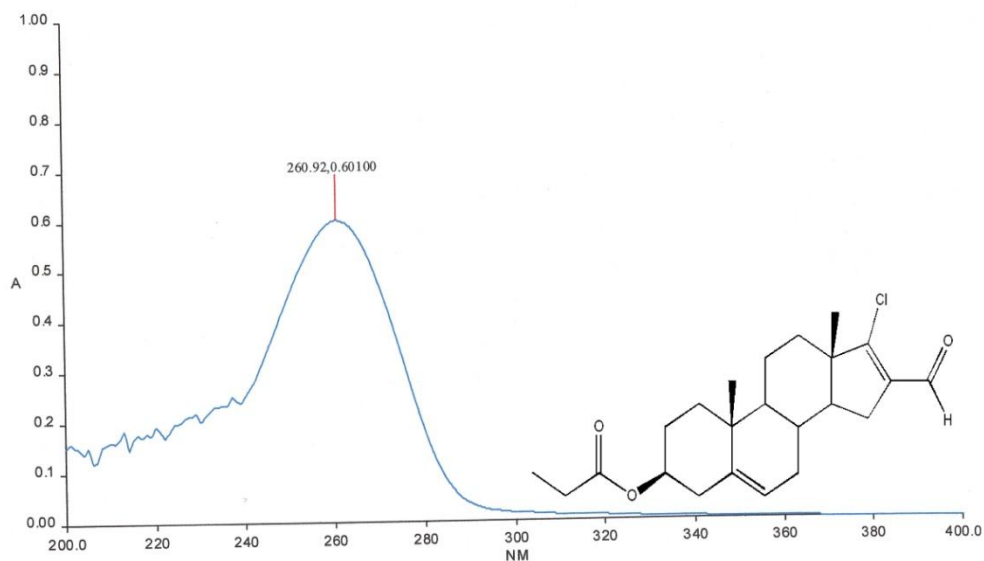


Figura A.35. Espectro de UV de la (3 β)-propioniloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIc).

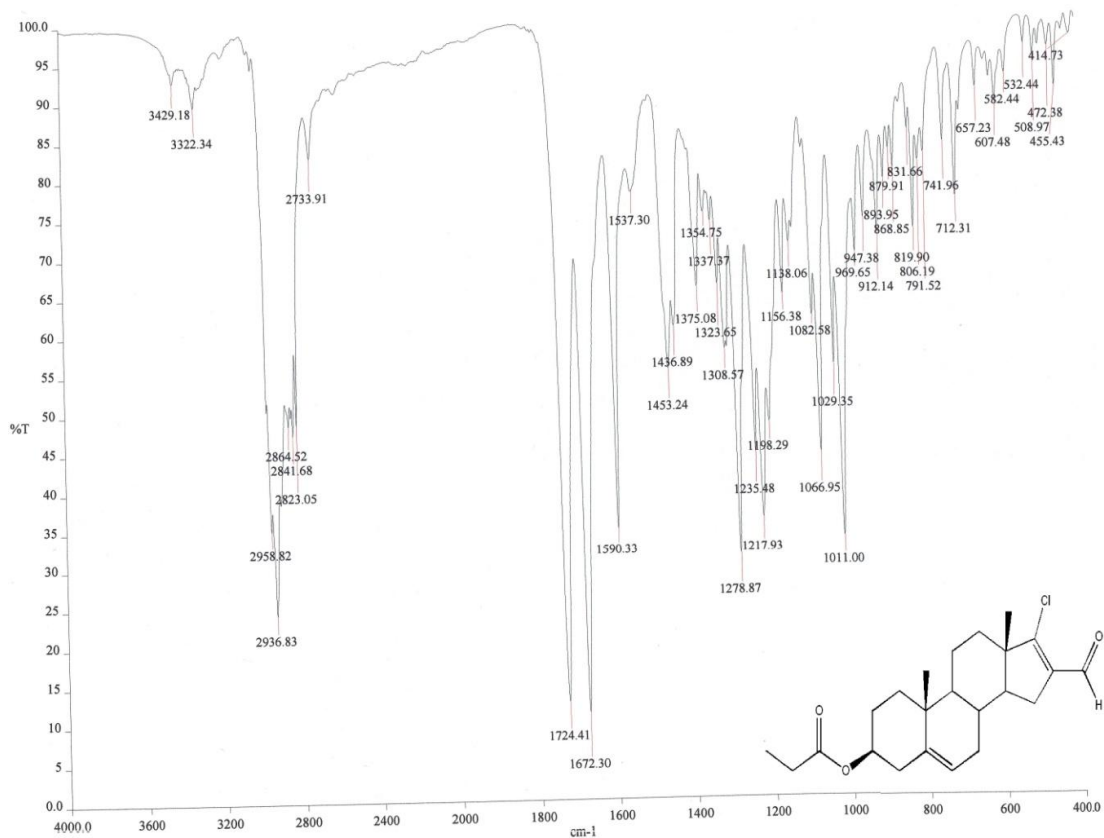


Figura A.36. Espectro de IR de la (3 β)-propioniloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIc).

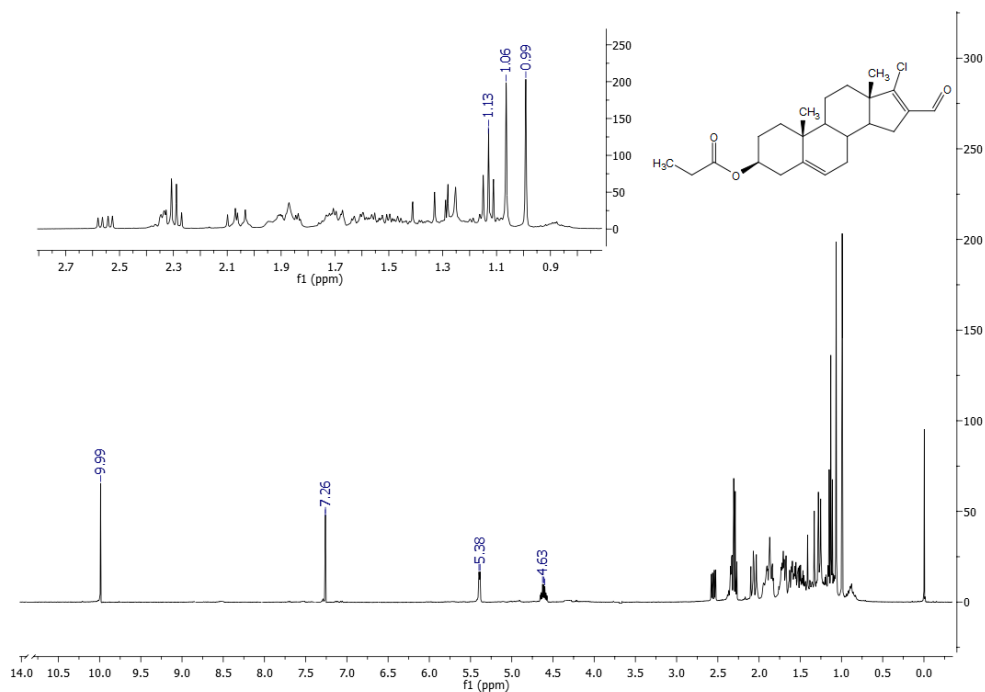


Figura A.37. Espectro de RMN ^1H de la (3 β)-propioniooxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIc).

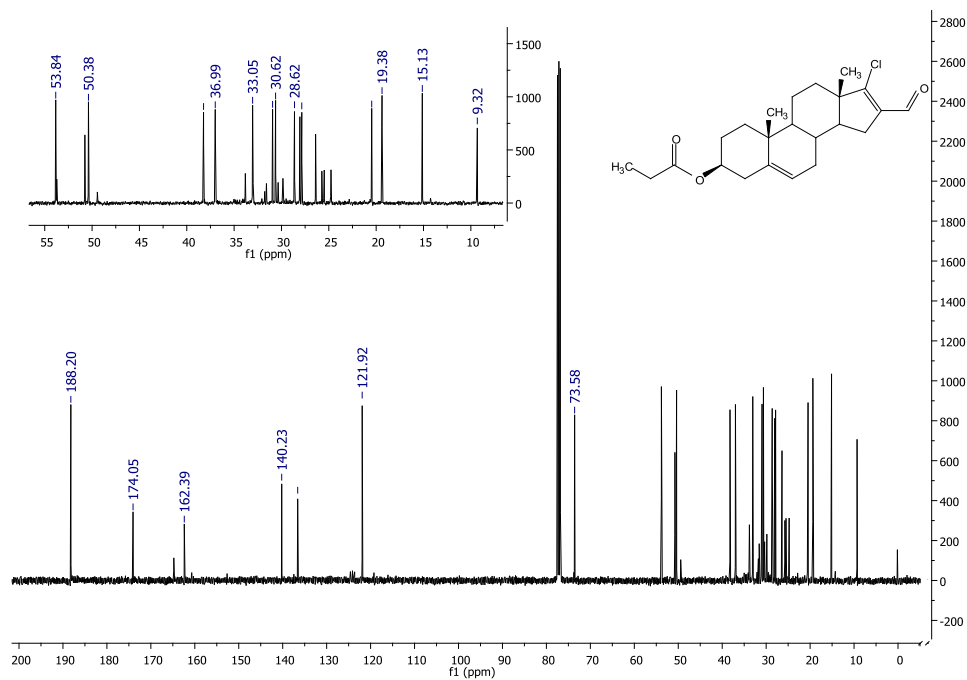


Figura A.38. Espectro de RMN ^{13}C de la (3 β)-propioniooxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIc).

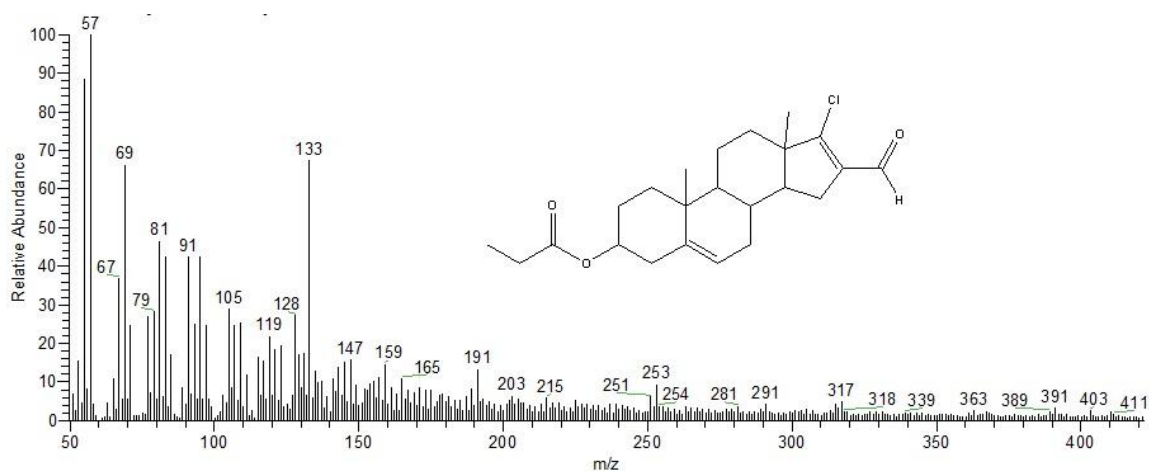


Figura A.39. Espectro de masas de la (3β)-propionioxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIc).

A.10. Espectros de (3β)-butiroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIId).

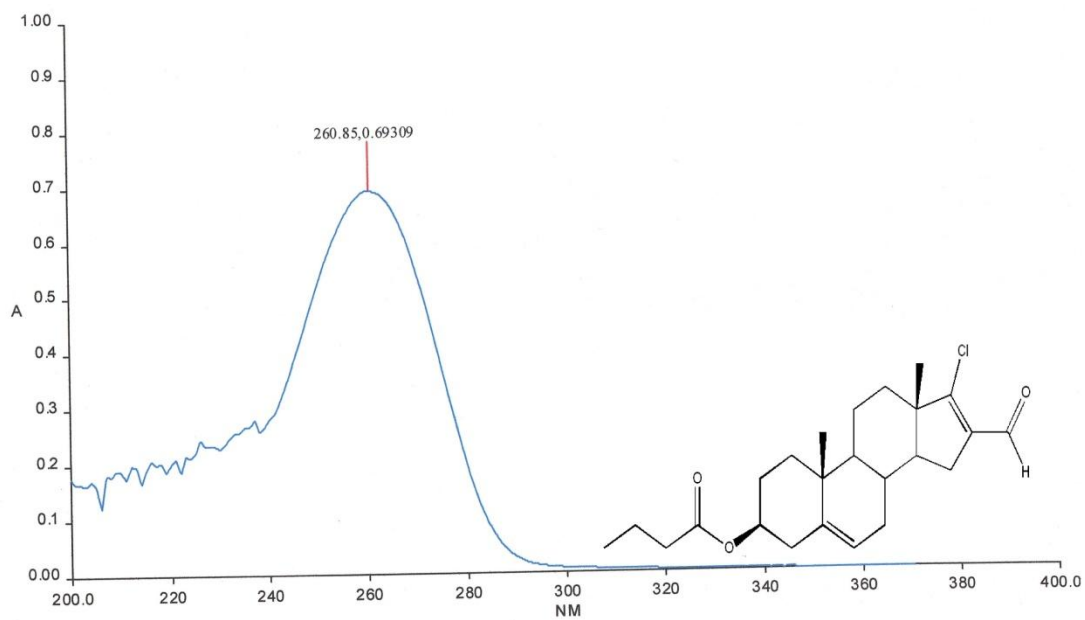


Figura A.40. Espectro de UV de la (3β)-butiroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIId).

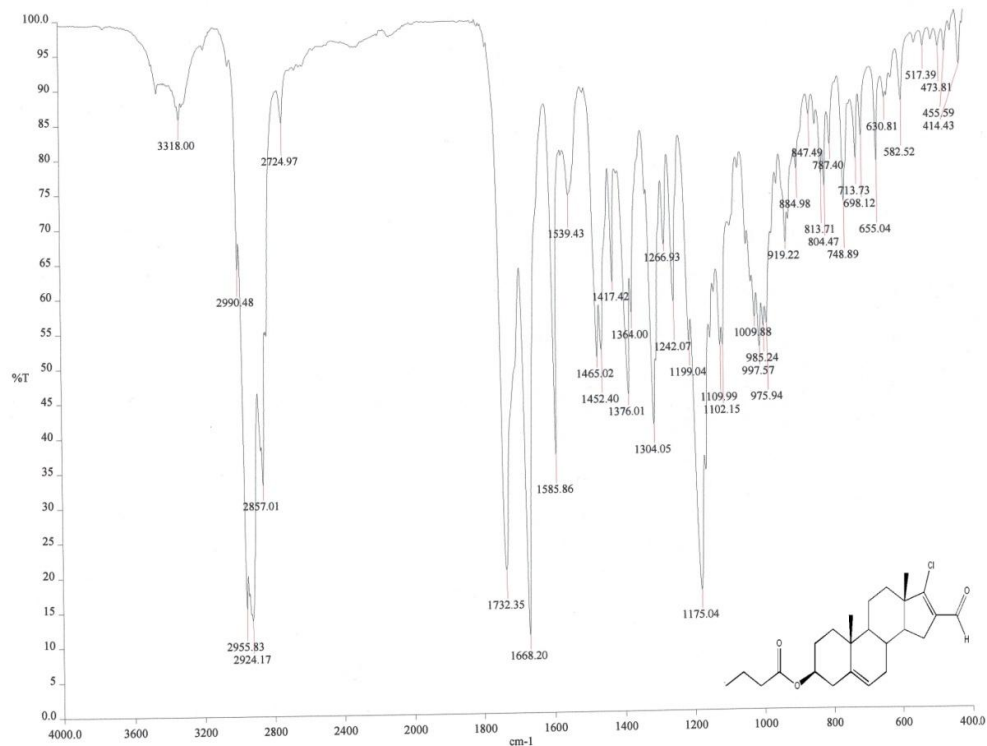


Figura A.41. Espectro de IR de la (3β)-butiroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIId).

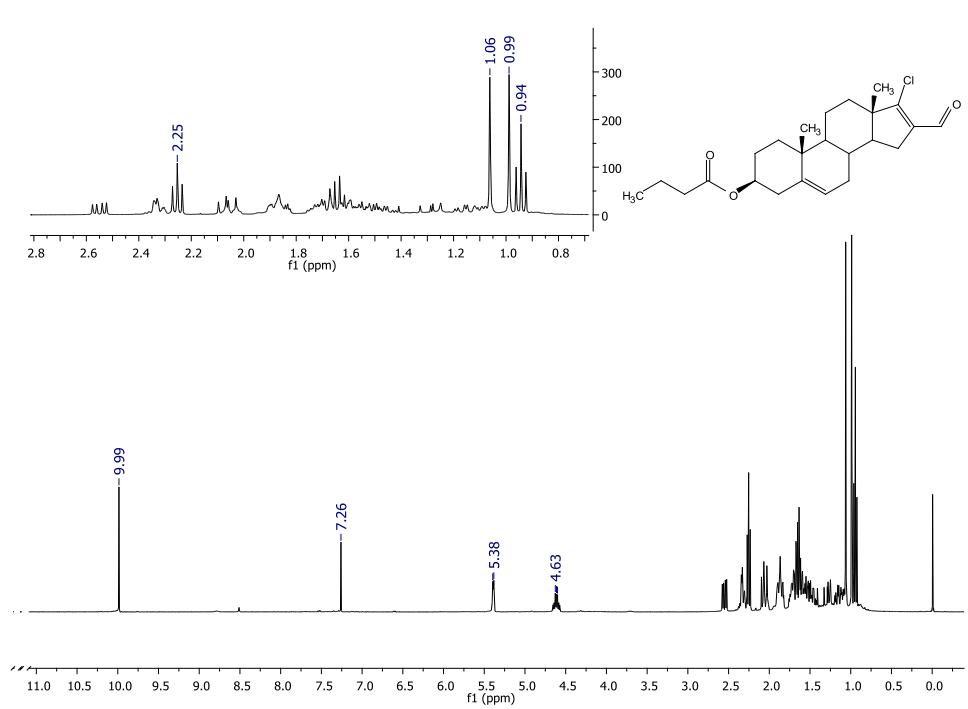


Figura A.42. Espectro de RMN¹H de la (3β)-butiroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIId).

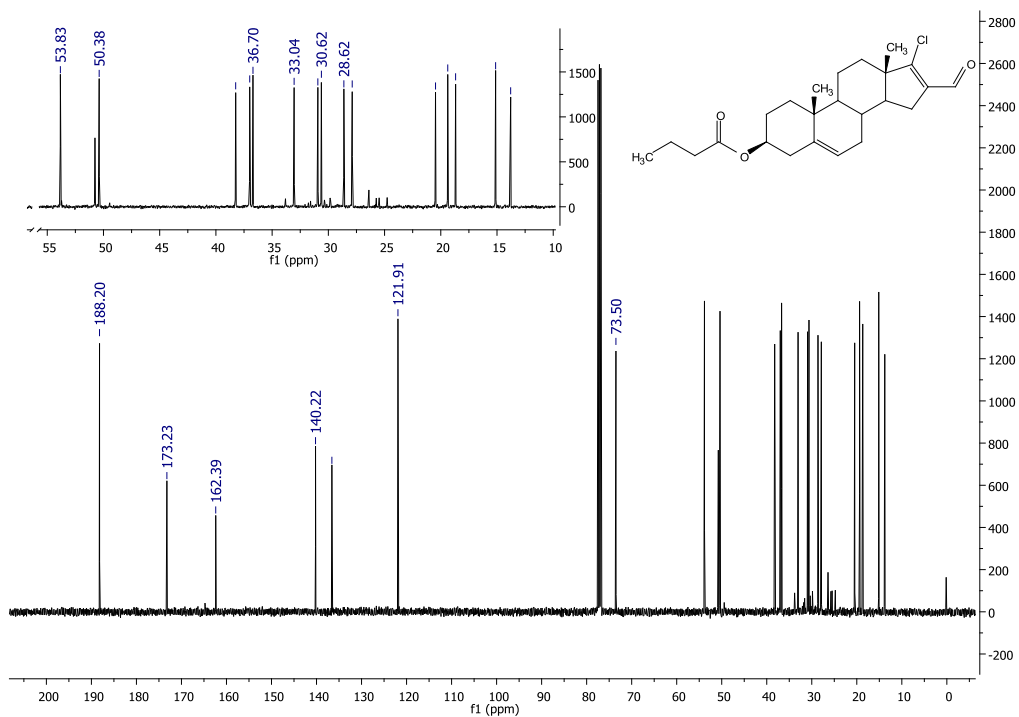


Figura A.43. Espectro de RMN ^{13}C de la (3 β)-butiroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIId).

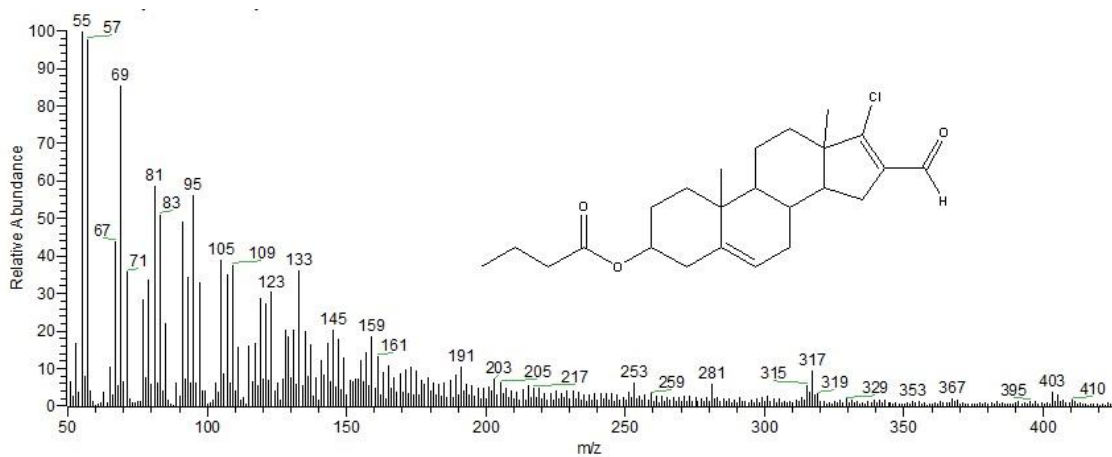
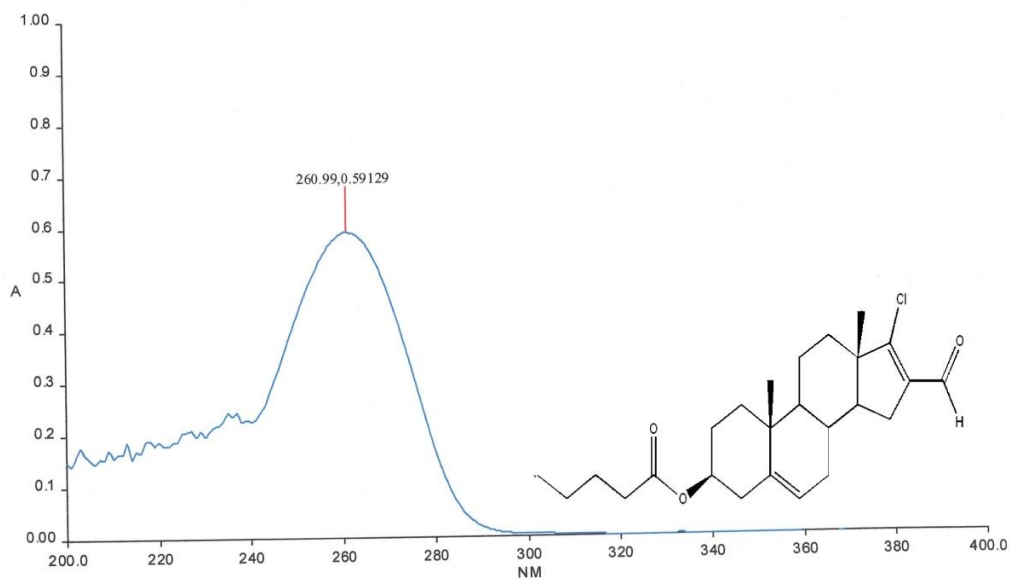
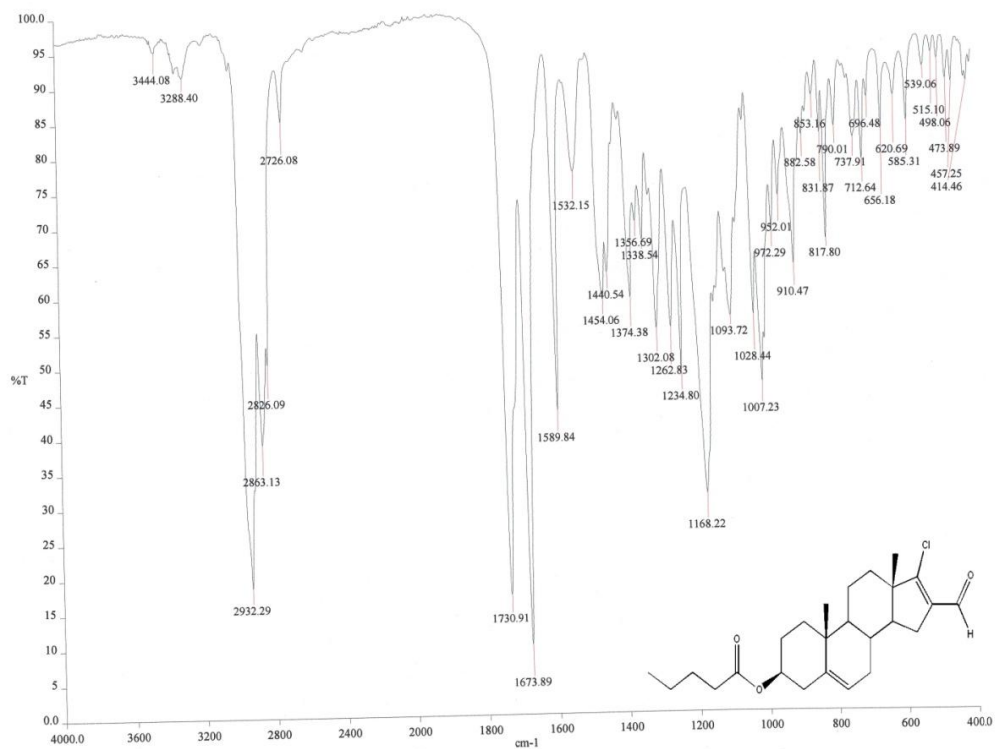


Figura A.44. Espectro de masas de la (3 β)-butiroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIId).

A.11. Espectros de (3 β)-valeroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIe).**Figura A.45.** Espectro de IR de la (3 β)-valeroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIe).**Figura A.46.** Espectro de IR de la (3 β)-valeroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIe).

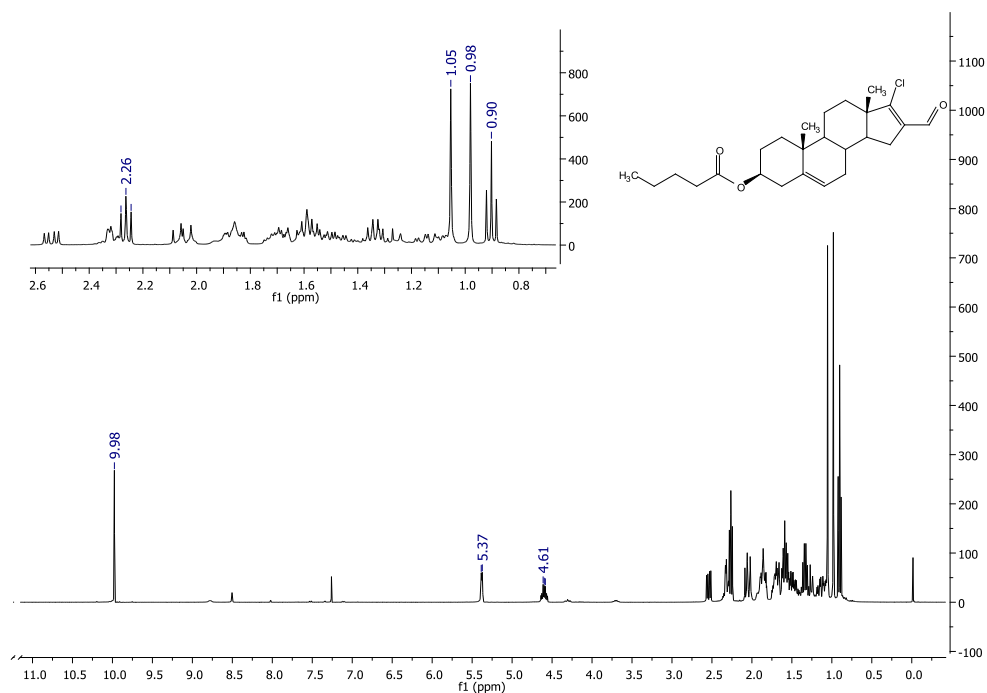


Figura A.47. Espectro de RMN ^1H de la (3 β)-valeriloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIe).

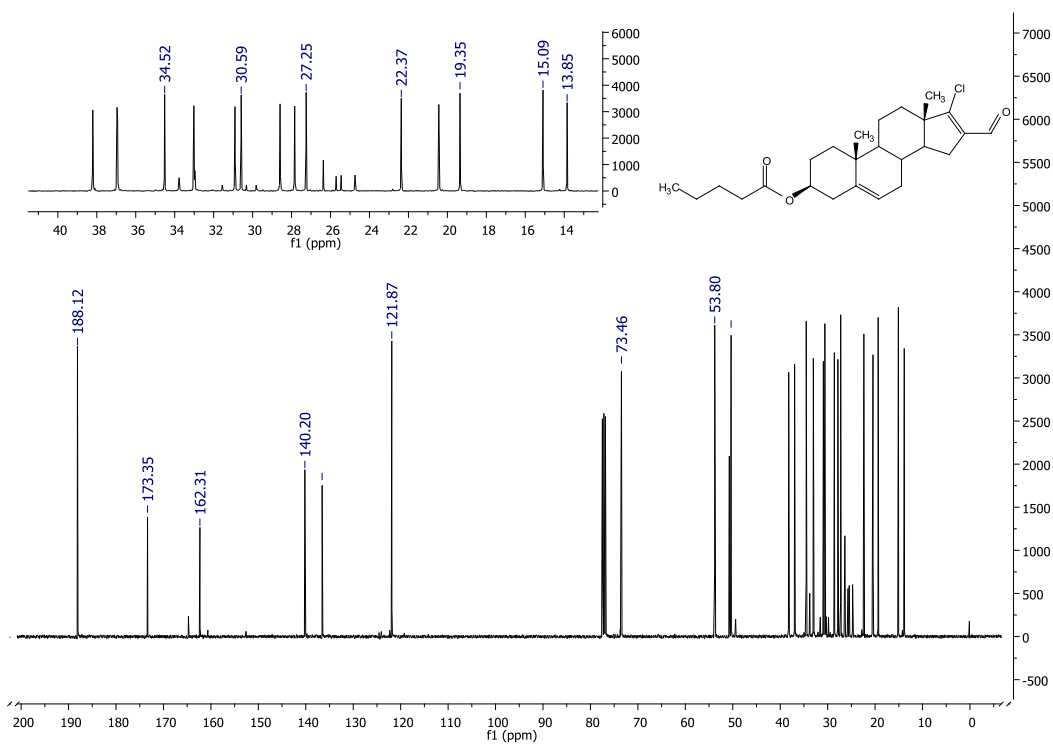


Figura A.48. Espectro de RMN ^{13}C de la (3 β)-valeriloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIe).

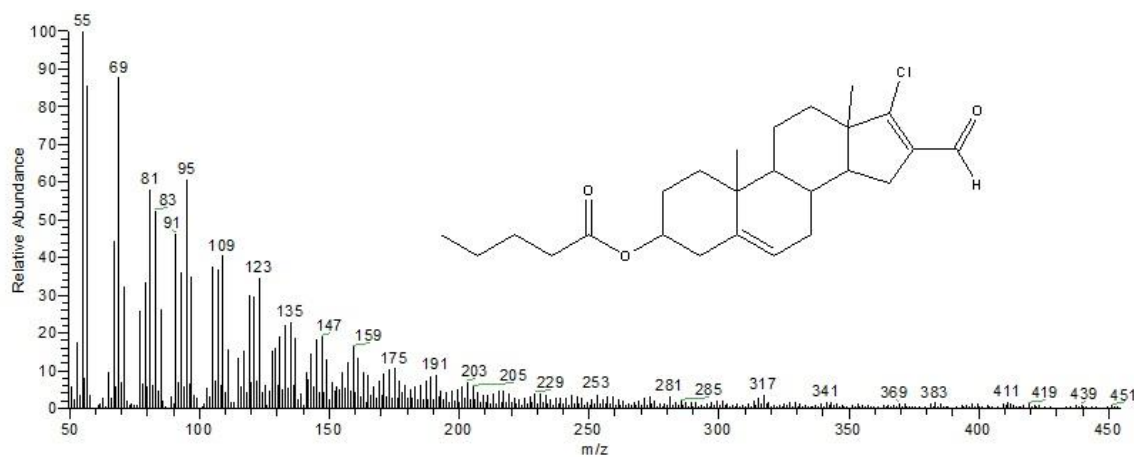


Figura A.49. Espectro de masas de la (3β)-valeroiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIe).

A.12. Espectros de (3β)-hexanoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIf).

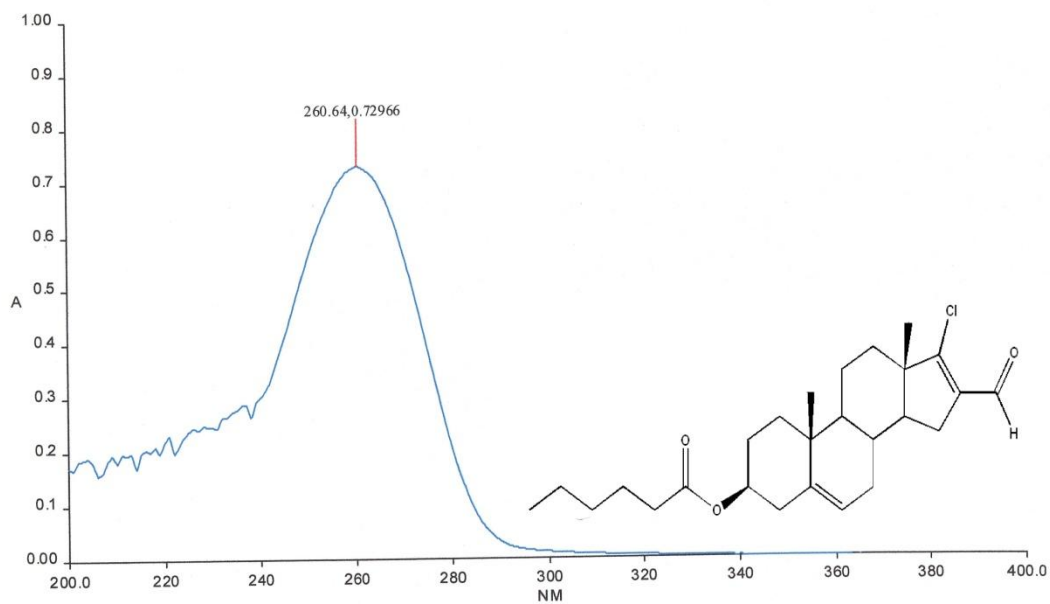


Figura A.50. Espectro de UV de la (3β)-hexanoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (IIIf).

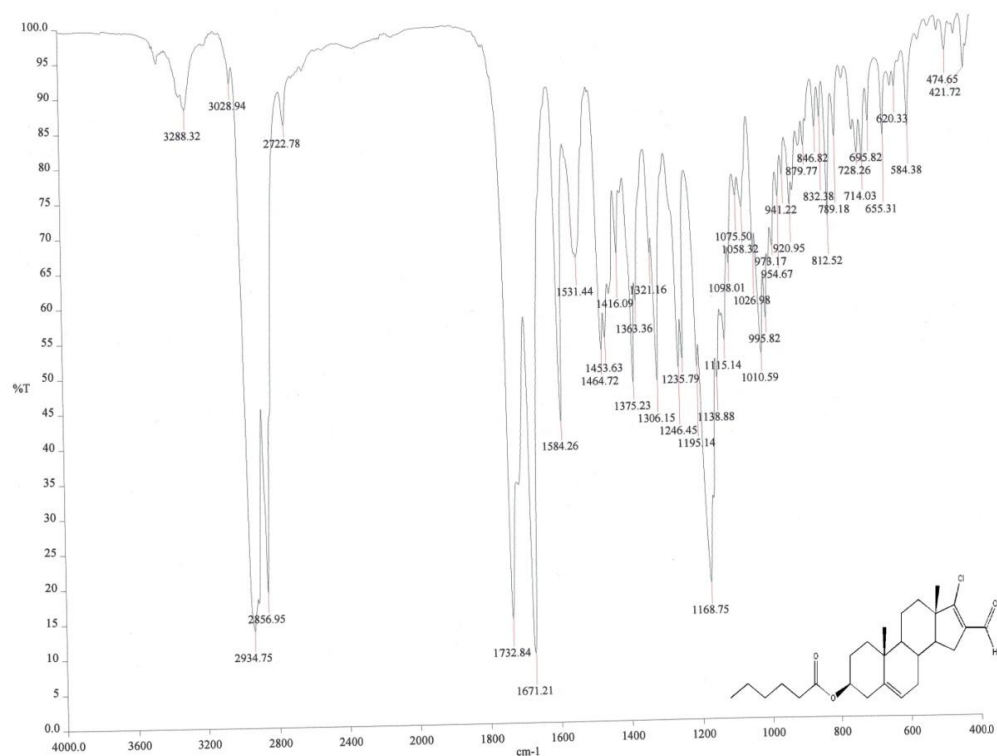


Figura A.51. Espectro de IR de la (3 β)-hexanoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (III f).

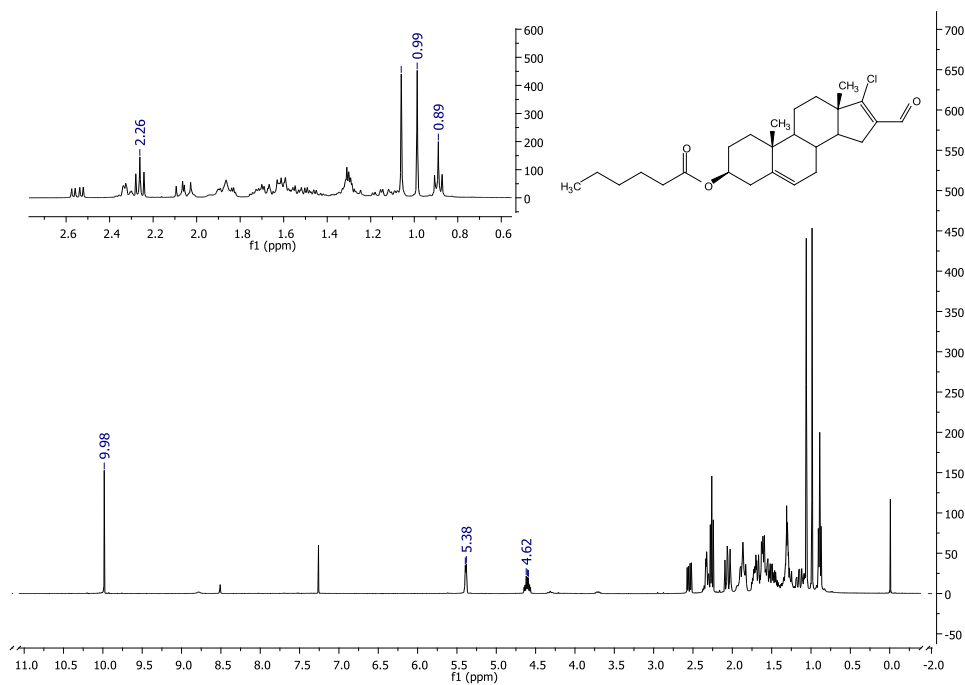


Figura A.52. Espectro de RMN ^1H de la (3 β)-hexanoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (III f).

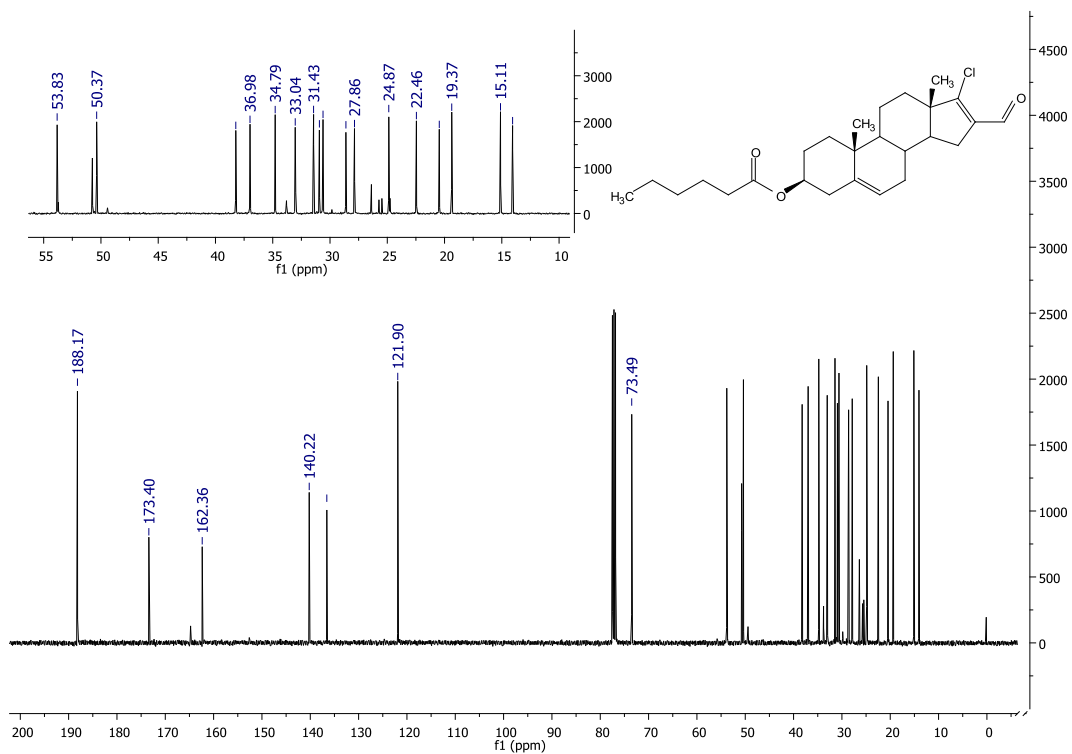


Figura A.53. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-hexanoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (III f).

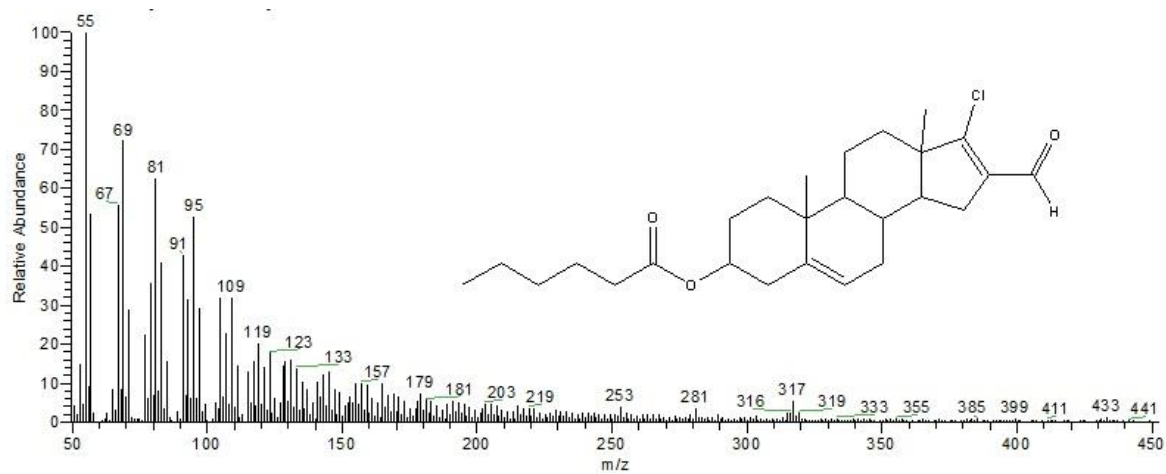


Figura A.54. Espectro de masas de la (3β)-hexanoiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (III f).

A.13. Espectros de (3 β)-formiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa).

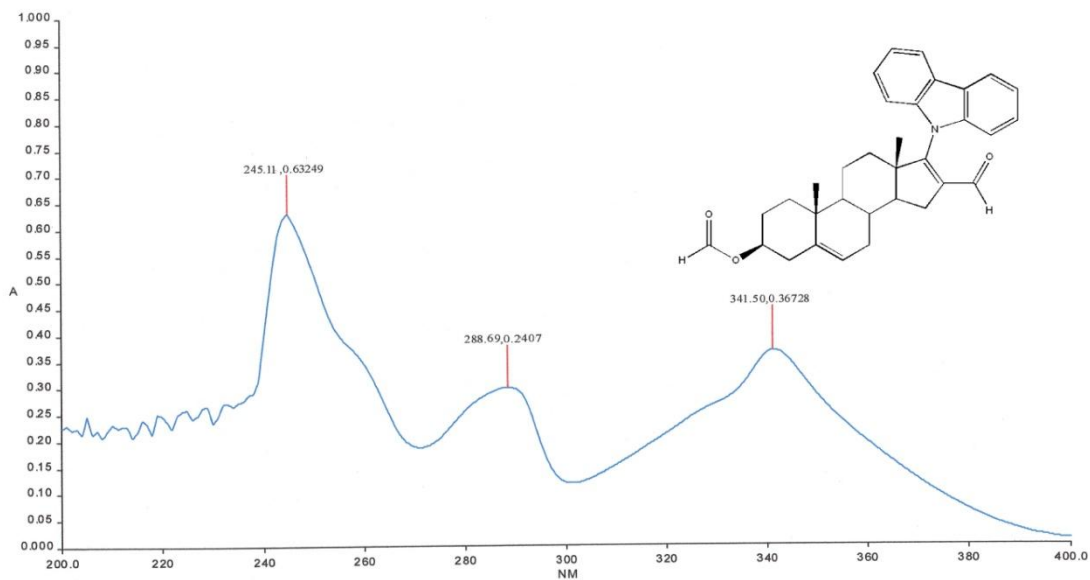


Figura A.55. Espectro de UV de la (3 β)-formiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa).

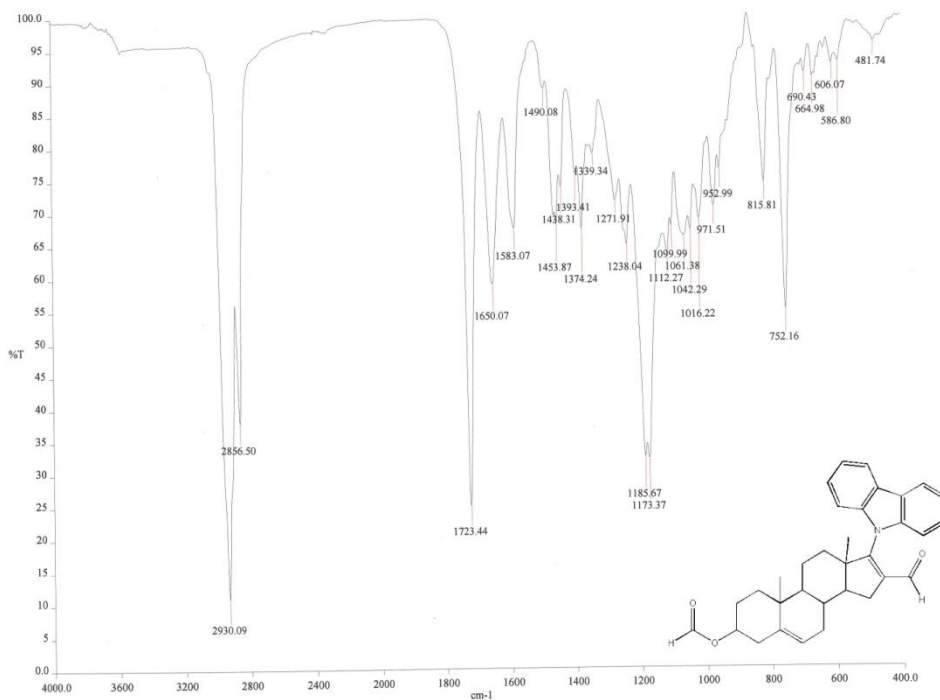


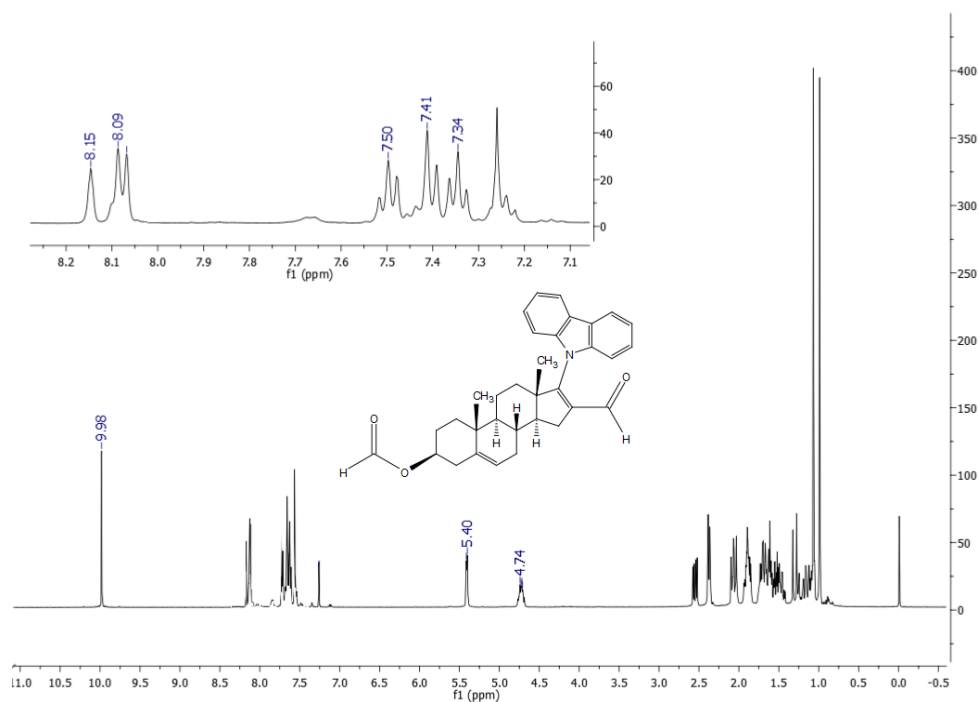
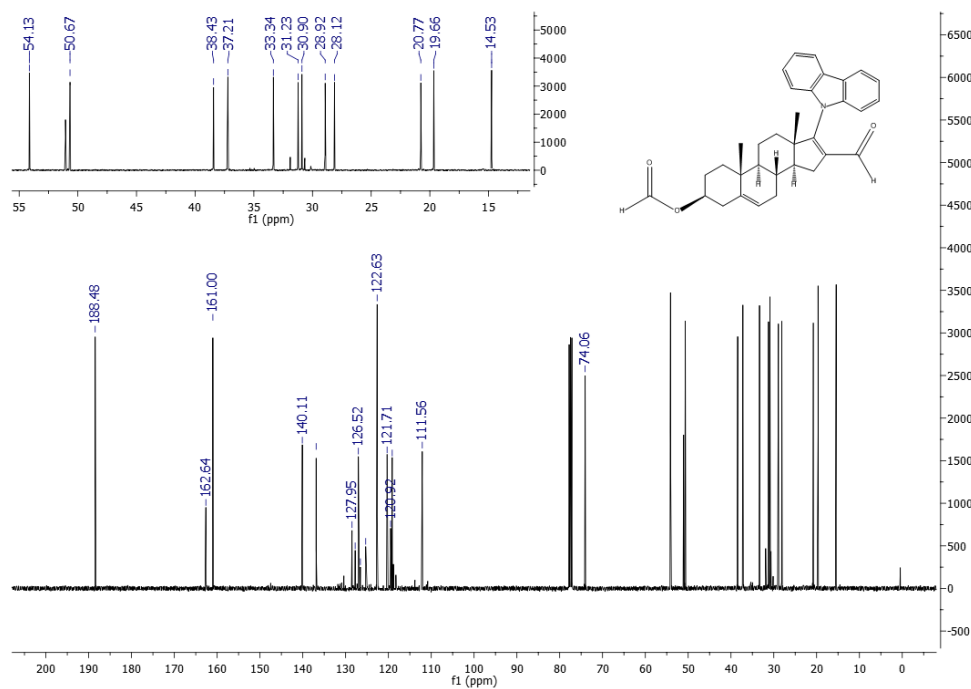
Figura A.56. Espectro de IR de la (3 β)-formiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa).**Figura A.57.** Espectro de RMN¹H de la (3 β)-formiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa).

Figura A.58. Espectro de RMN¹³C de la (3 β)-formiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa).

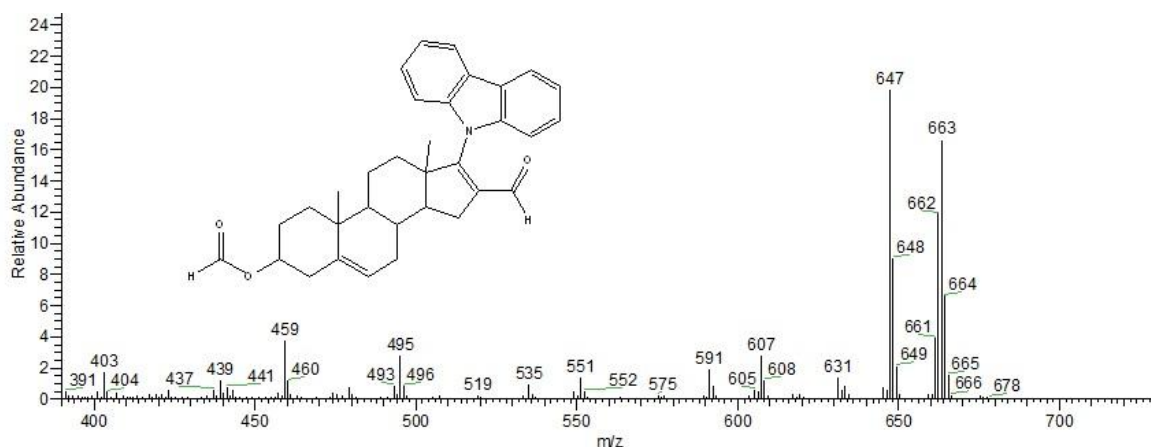


Figura A.59. Espectro de masas de la (3 β)-formiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVa).

A.14. Espectros de (3 β)-acetoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno- (IVb).

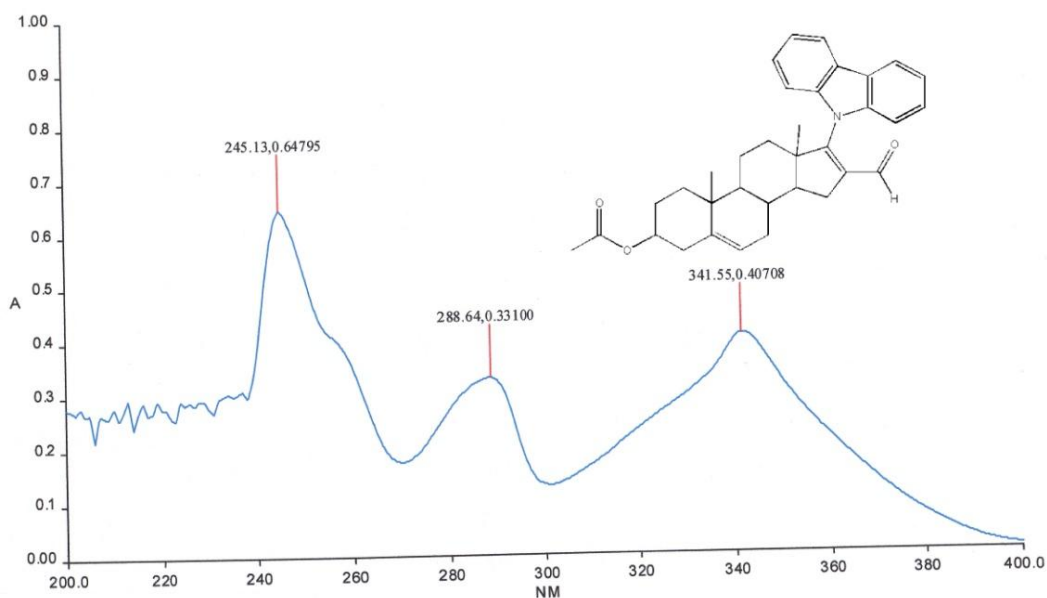


Figura A.60. Espectro de UV de la (3 β)-acetoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno- (IVb).

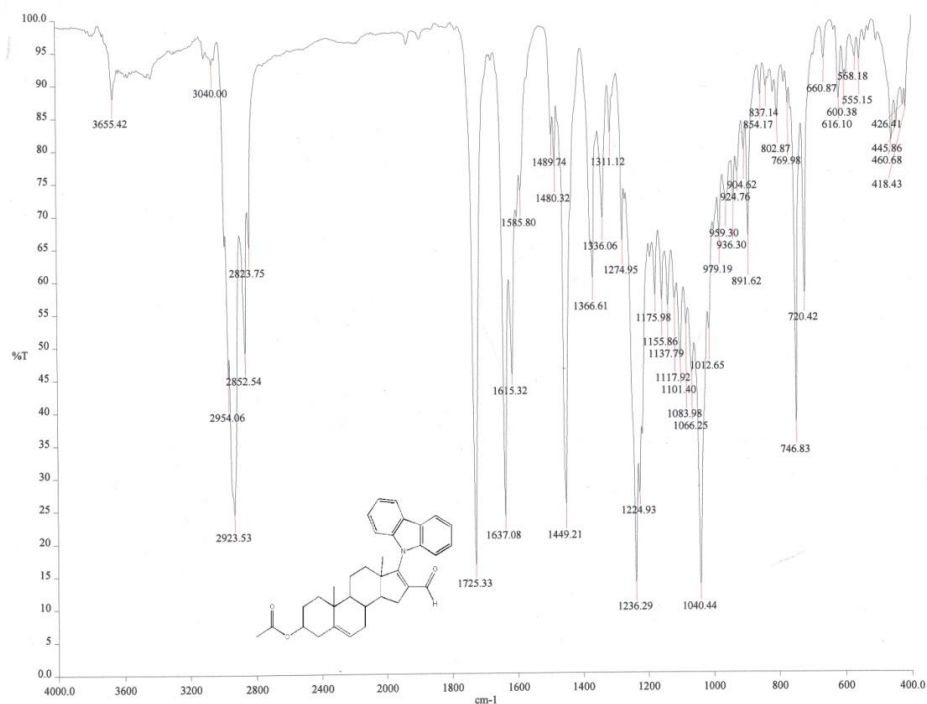


Figura A.61. Espectro de IR de la (3β)-acetoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVb).

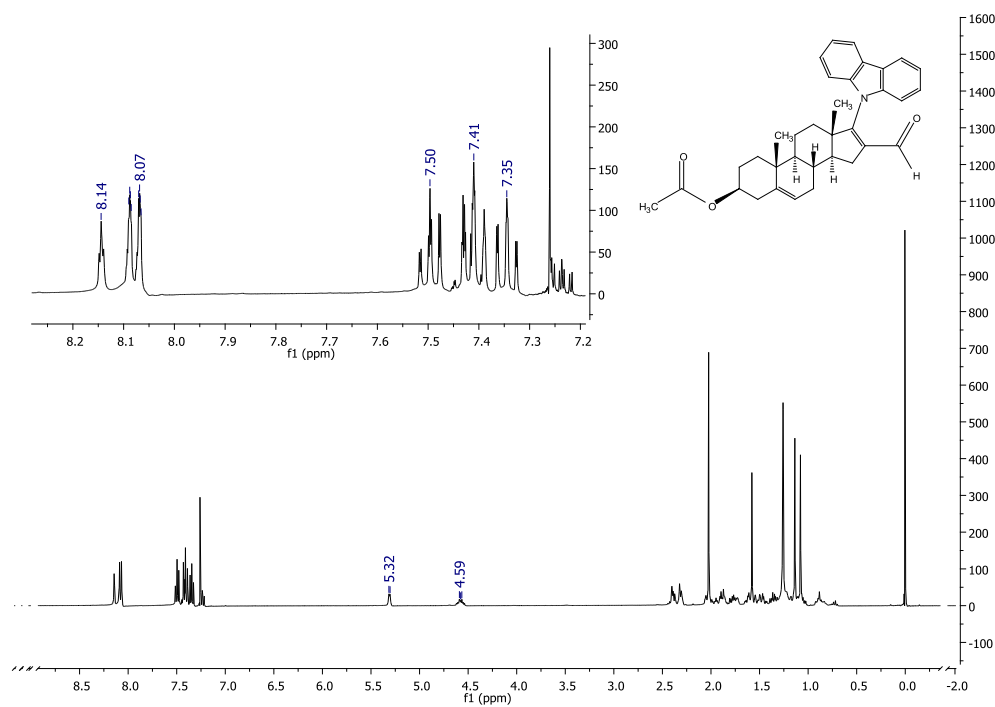


Figura A.62. Espectro de RMN¹H de la (3β)-acetoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVb).

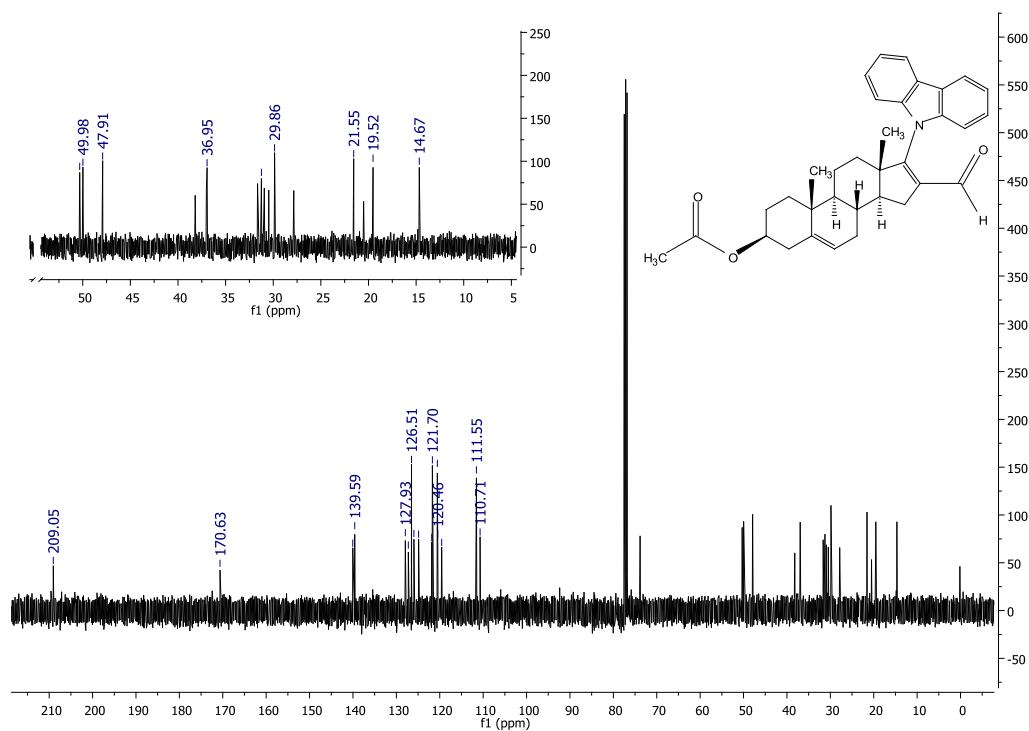


Figura A.63. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-acetoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVb).

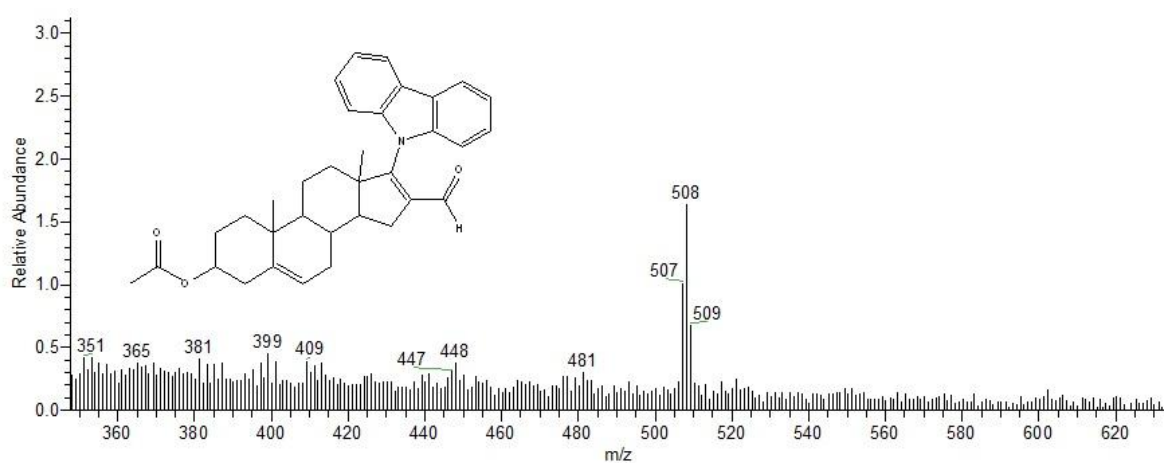
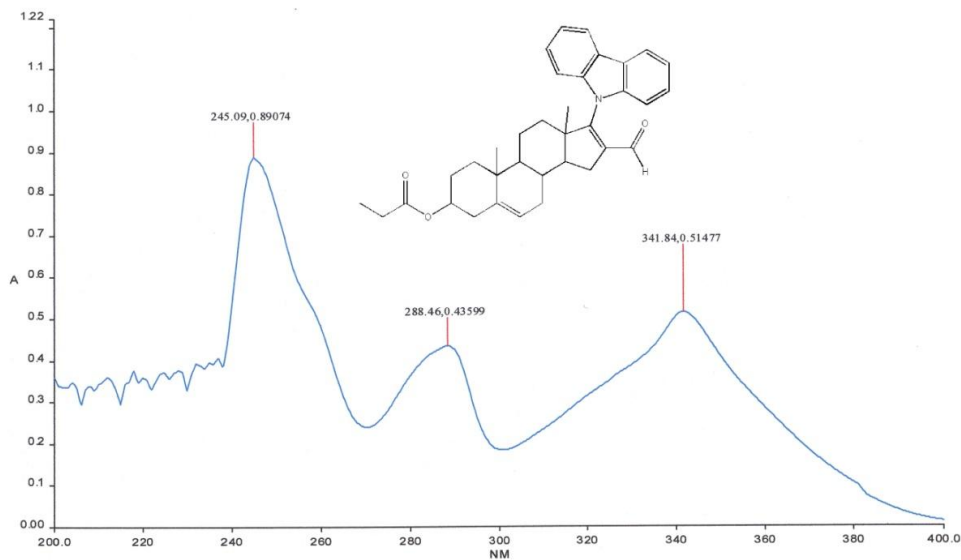
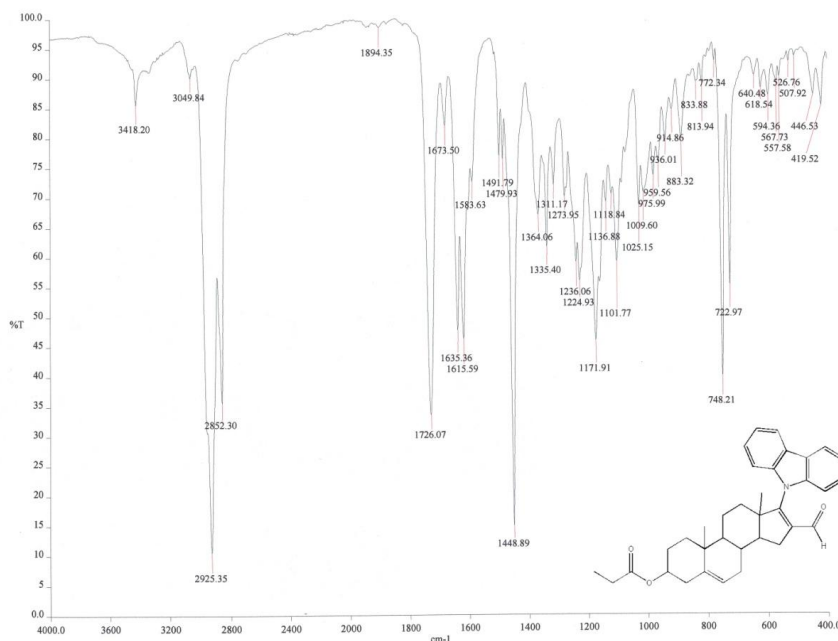


Figura A.64. Espectro de masas de la (3β)-acetoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVb).

A.15. Espectros de (3 β)-propioniloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVc).**Figura A.65.** Espectro de UV de la (3 β)-propioniloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVc).**Figura A.66.** Espectro de IR de la (3 β)-propioniloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVc).

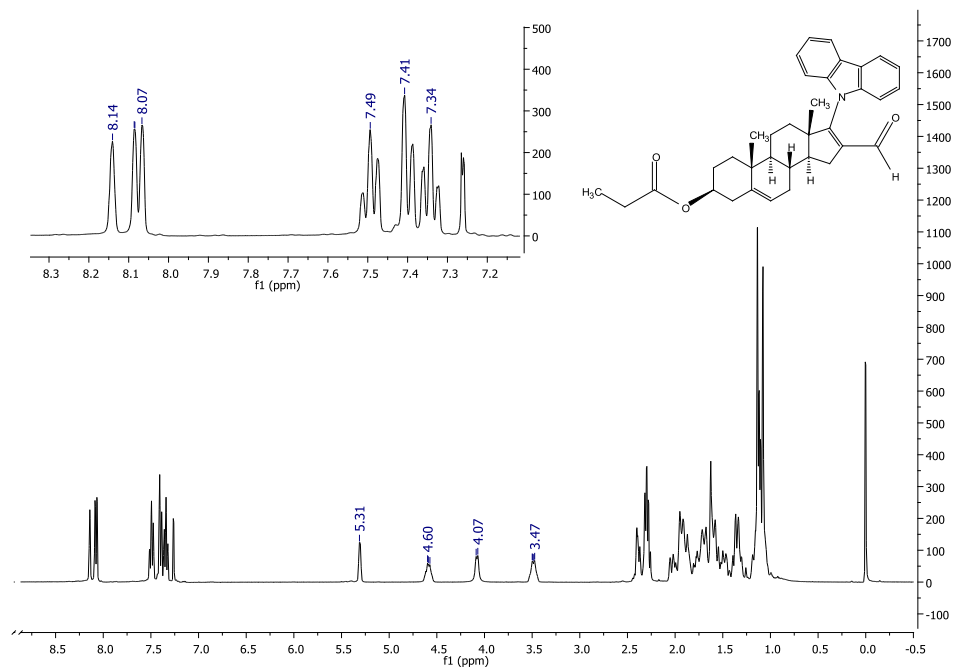


Figura A.67. Espectro de RMN^1H de la (3 β)-propionioiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVc).

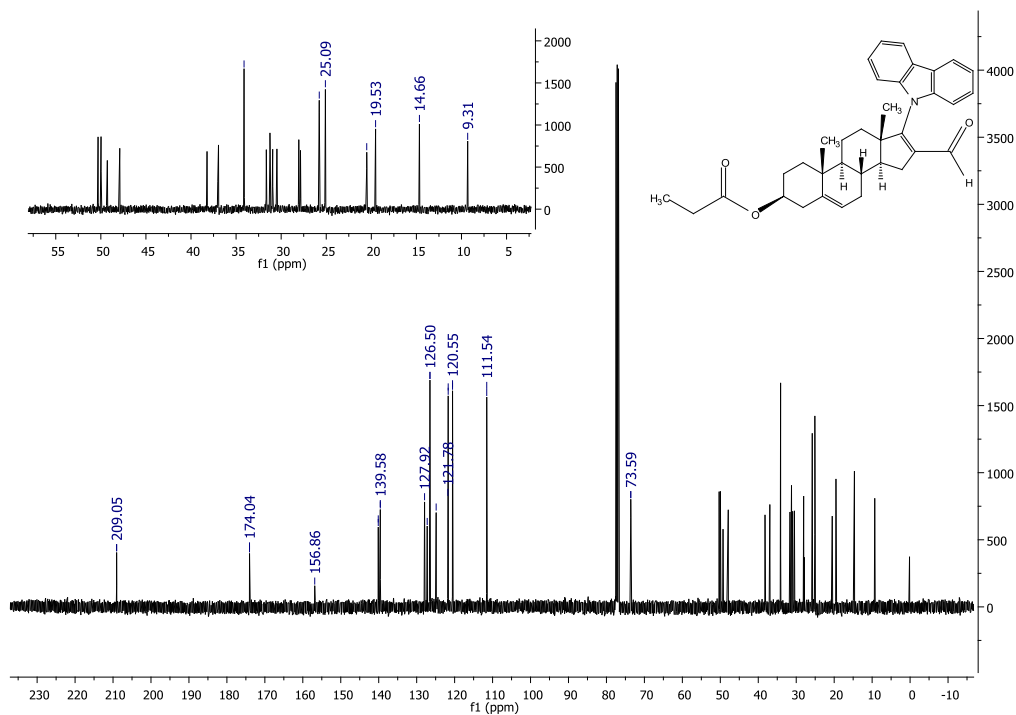


Figura A.68. Espectro de RMN^{13}C de la (3 β)-propionioiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVc).

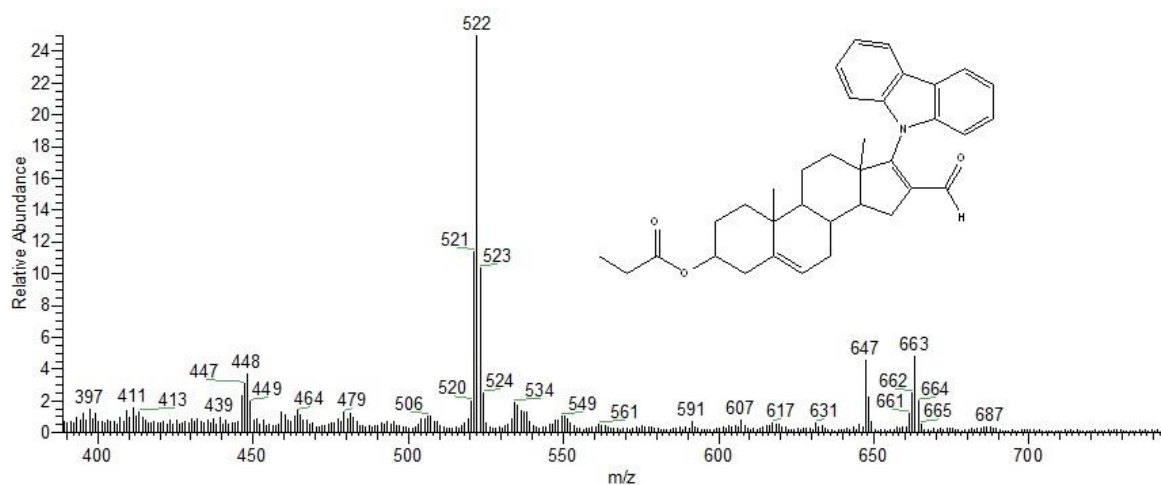


Figura A.69. Espectro de masas de la (3β)-propionioxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVc).

A.16. Espectros de (3β)-butiroiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVd).

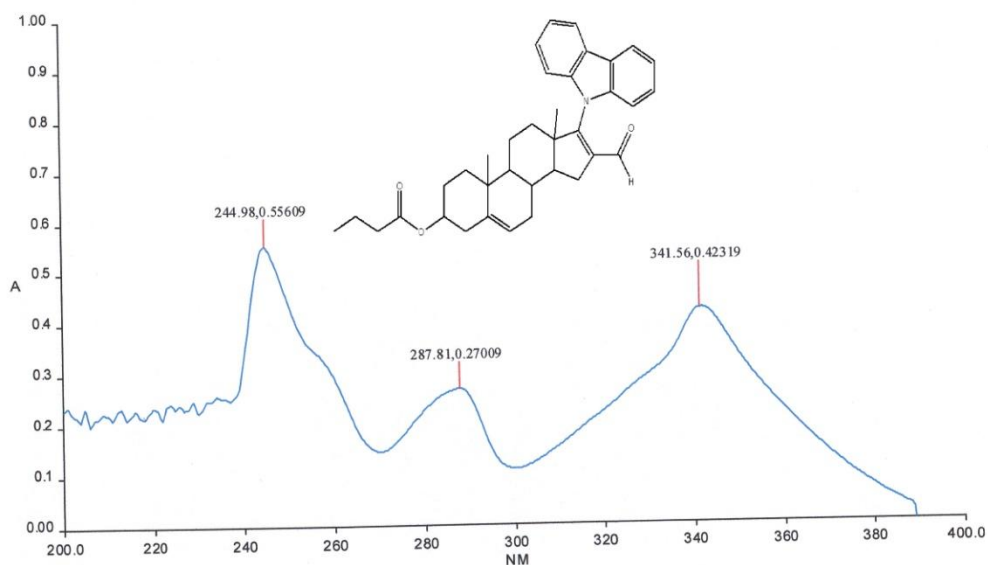


Figura A.70. Espectro de UV de la (3β)-butiroiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVd).

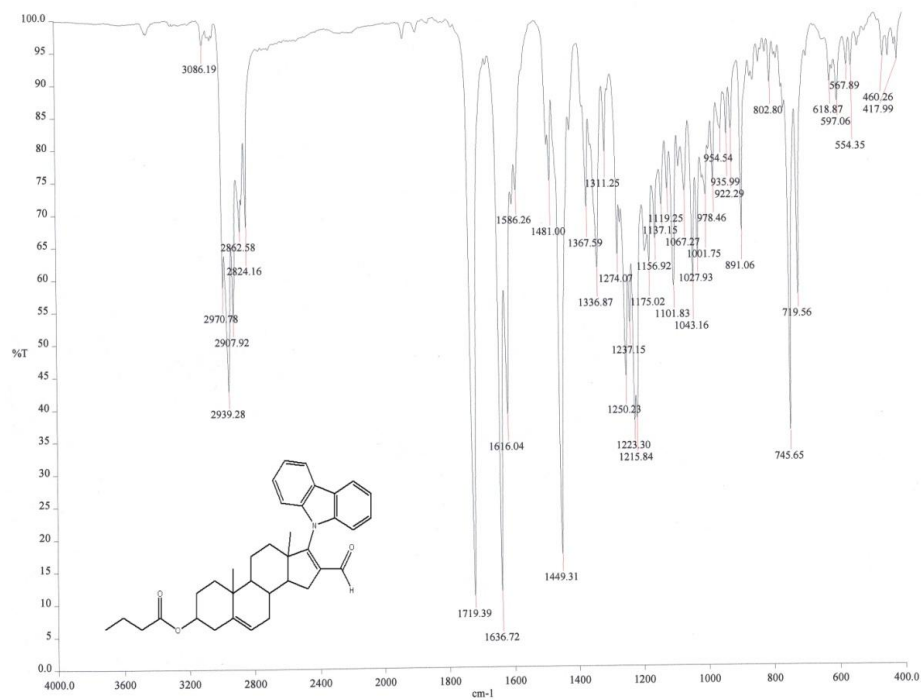


Figura A.71. Espectro de IR de la (3β)-butiroiloxi-17-(1H-carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVd).

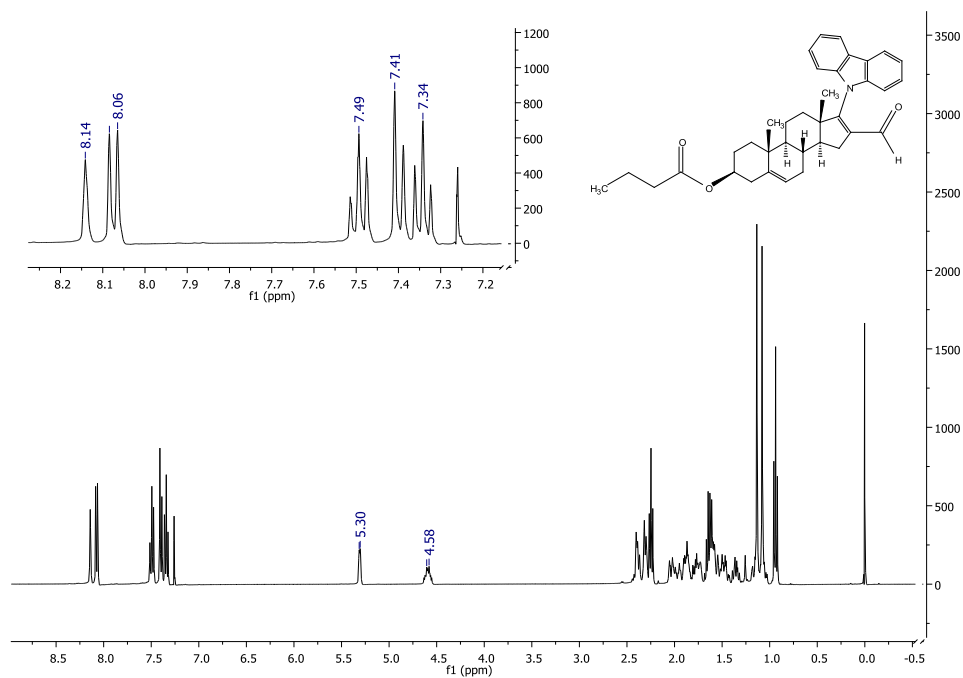


Figura A.72. Espectro de RMN¹H de la (3β)-butiroiloxi-17-(1H-carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVd).

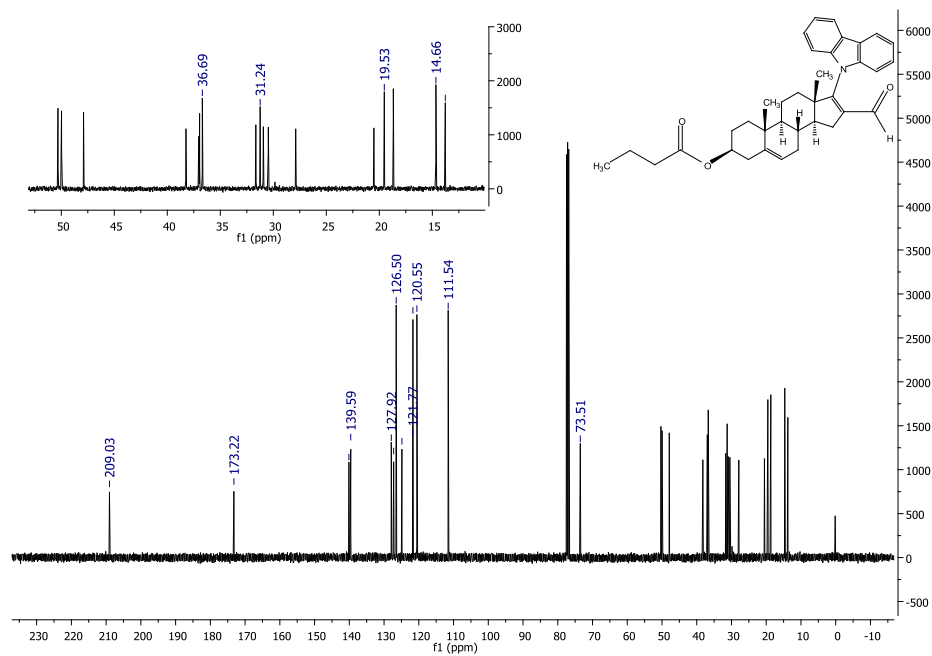


Figura A.73. Espectro de RMN^{13}C de la (3 β)-butiroiloxi-17-(1H-carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVd).

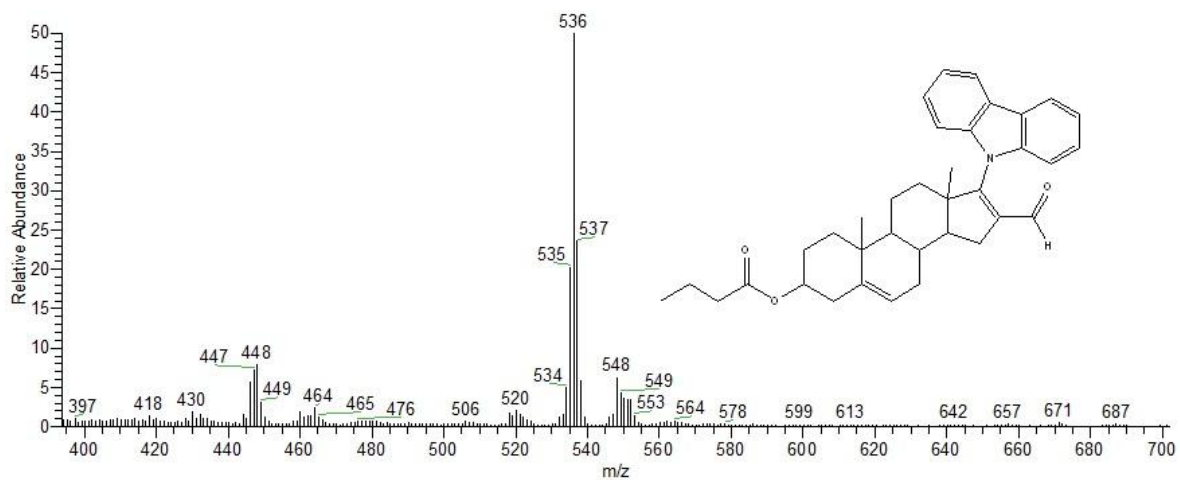


Figura A.74. Espectro de masas de la (3 β)-butiroiloxi-17-(1H-carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVd).

A.17. Espectros de (3 β)-valeroiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVe).

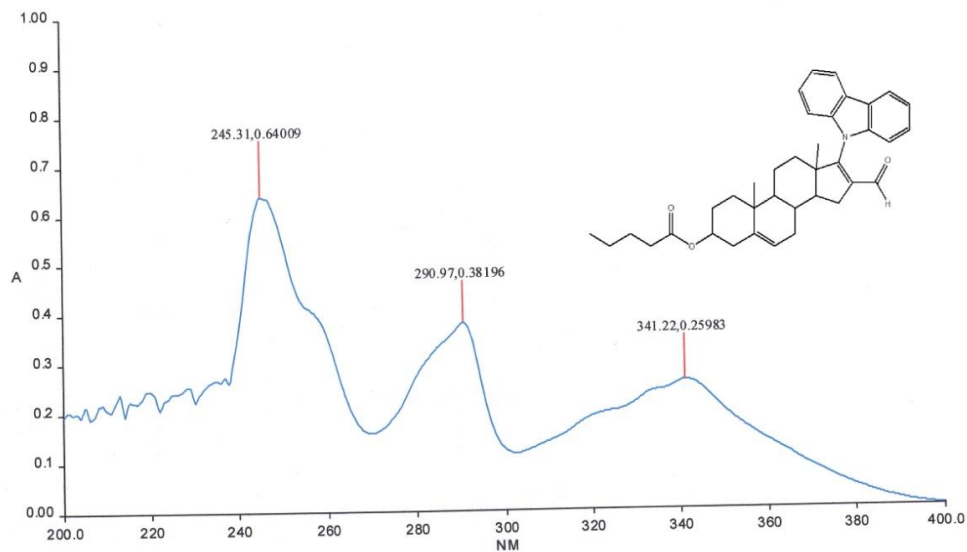


Figura A.75. Espectro de UV de la (3 β)-valeroiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVe).

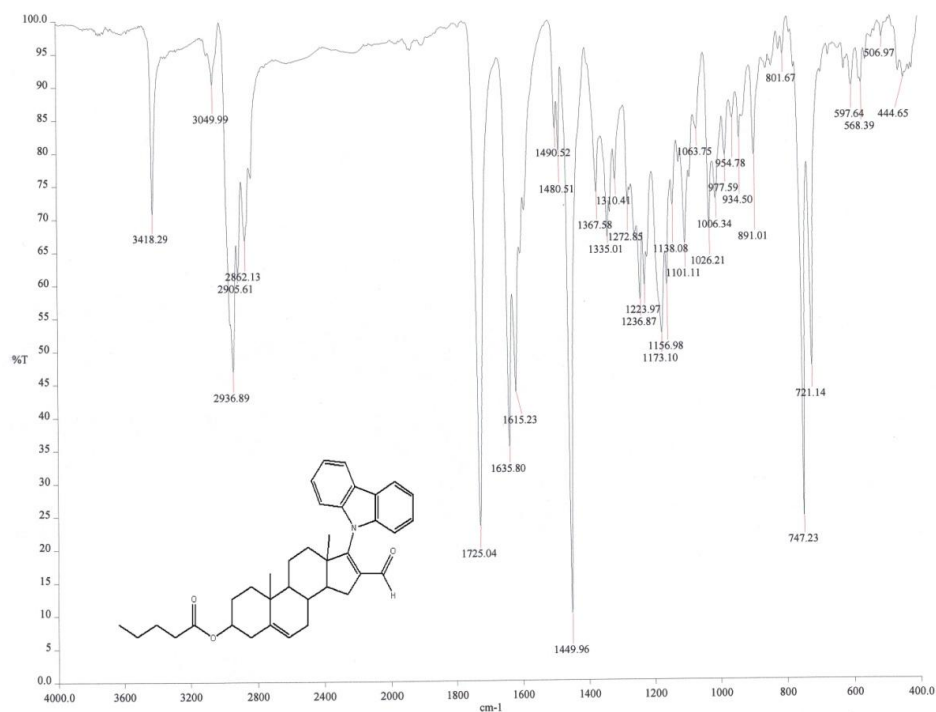


Figura A.76. Espectro de IR de la (3 β)-valeroiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVe).

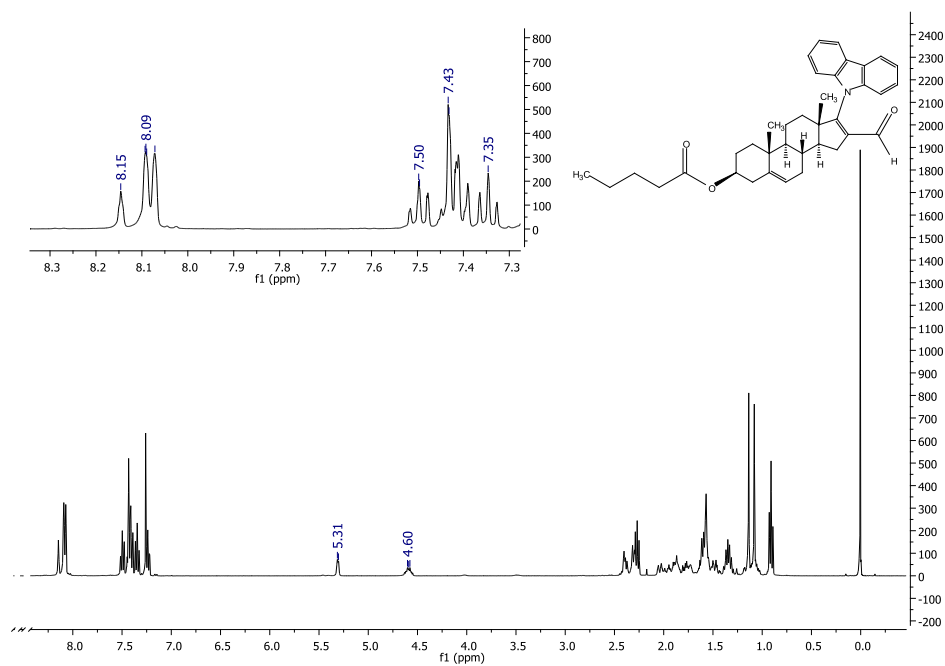
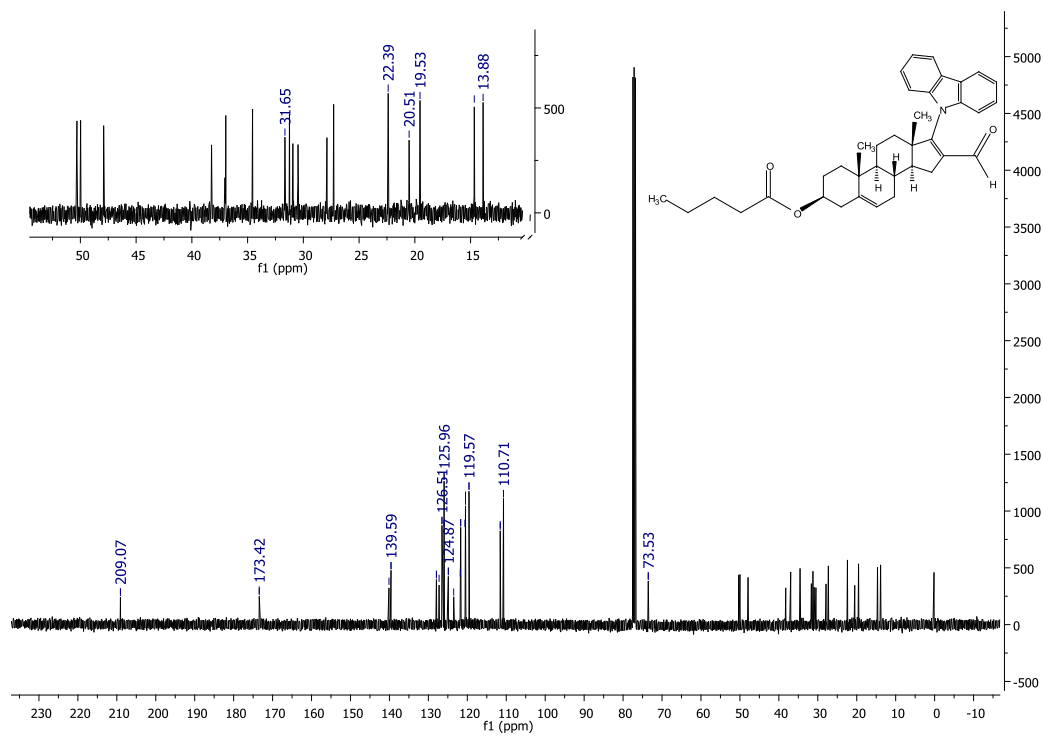


Figura A.77. Espectro de RMN¹H de la (3β)-valeriloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno



(IVe).

Figura A.78. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-valeriloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVe).

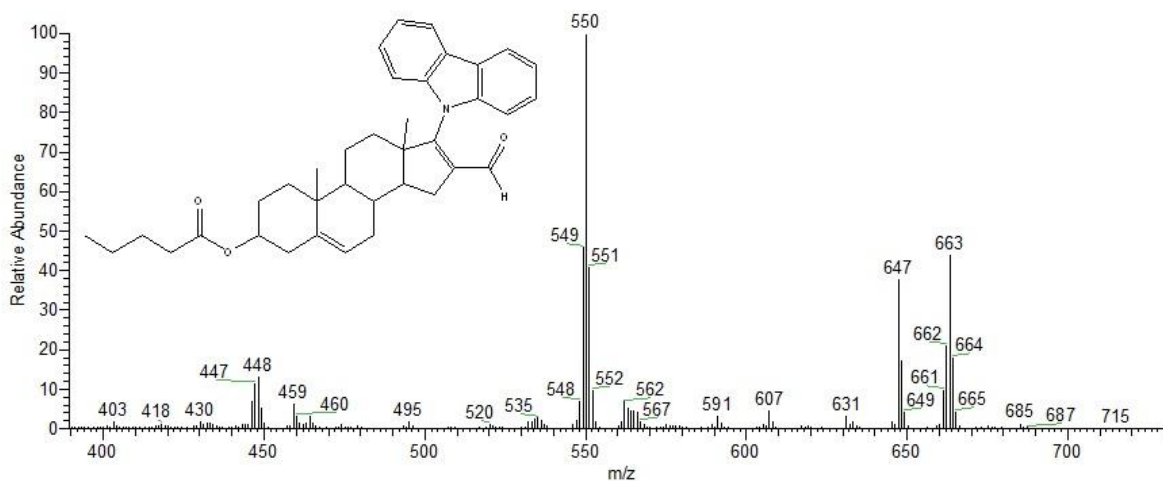


Figura A.79. Espectro de masas de la (3β)-valeroiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVe).

A.18. Espectros de (3β)-hexanoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVf).

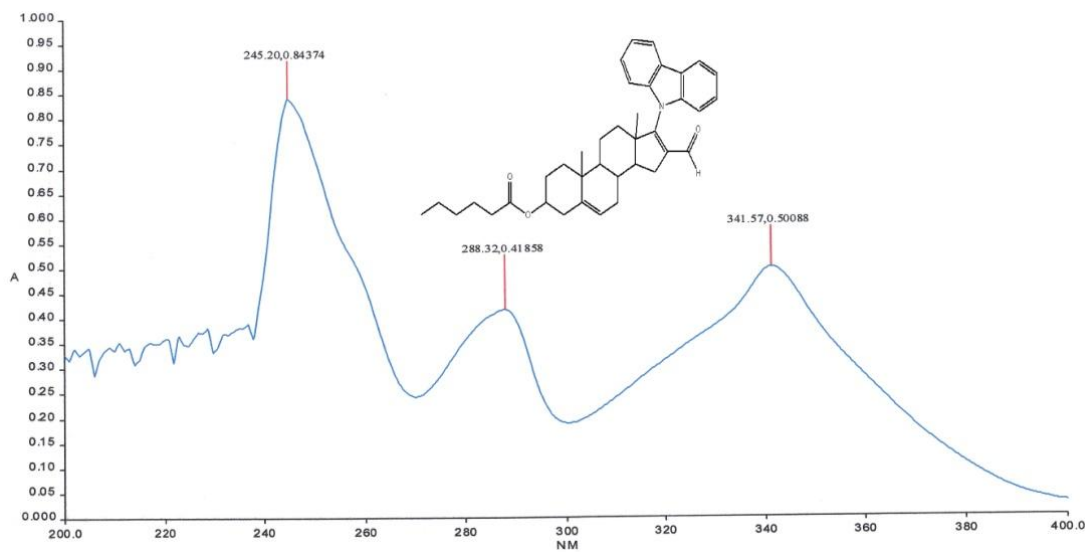


Figura A.80. Espectro de masas de la (3β)-hexanoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVf).

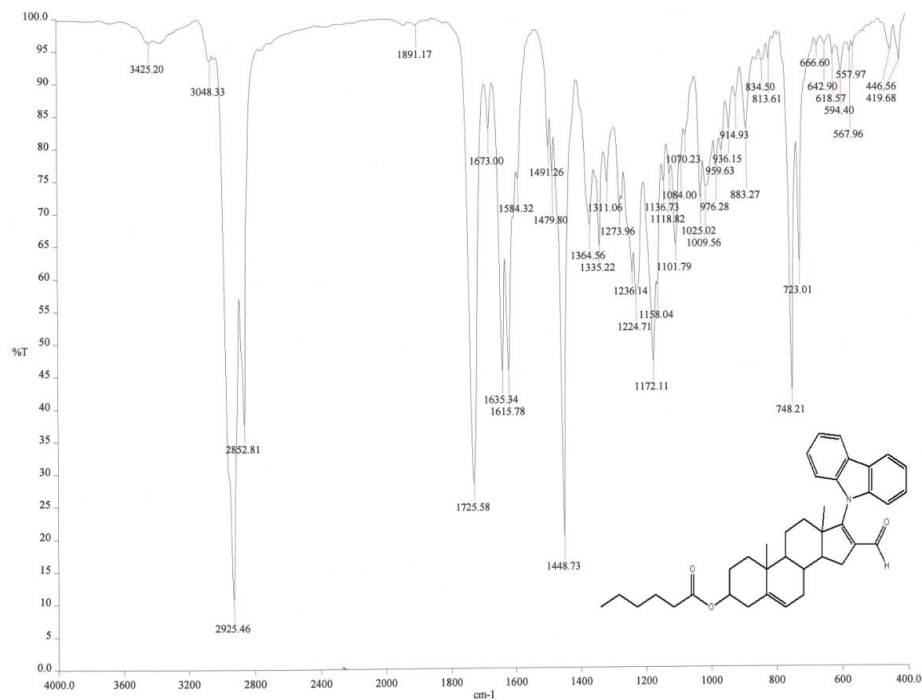


Figura A.81. Espectro de IR de la (3β)-hexanoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVf).

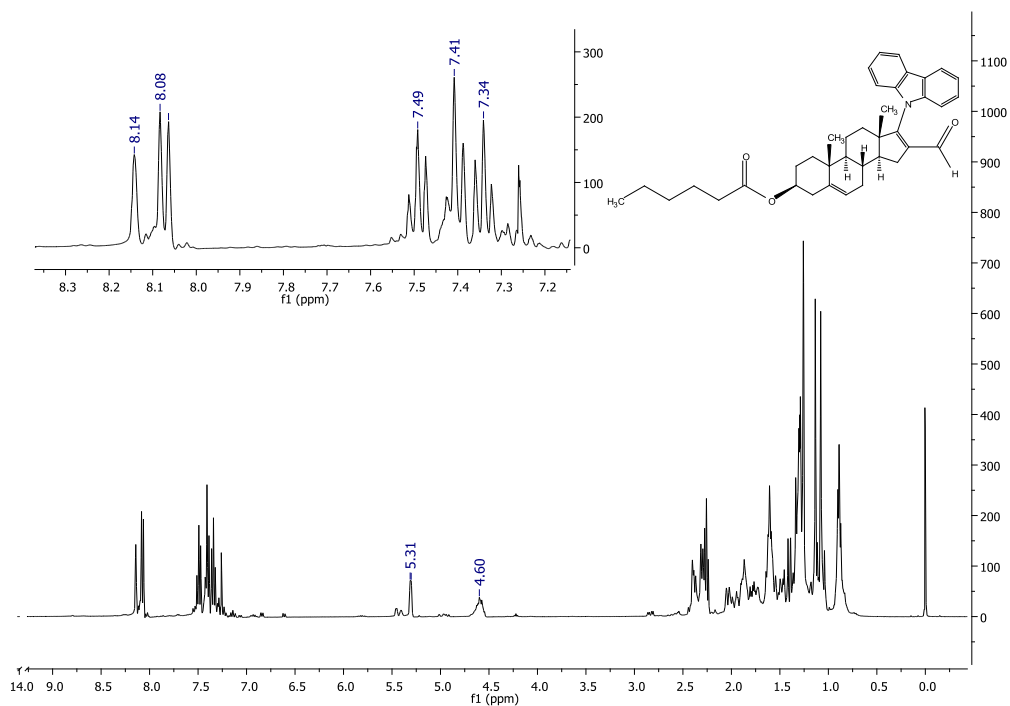


Figura A.82. Espectro de RMN¹H de la (3β)-hexanoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVf).

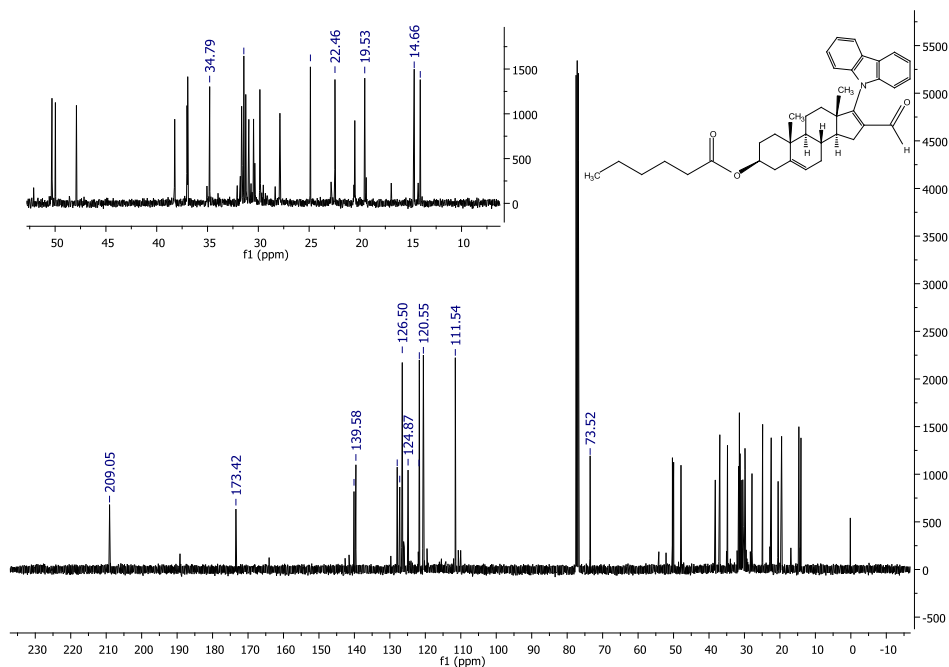


Figura A.83. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-hexanoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVf).

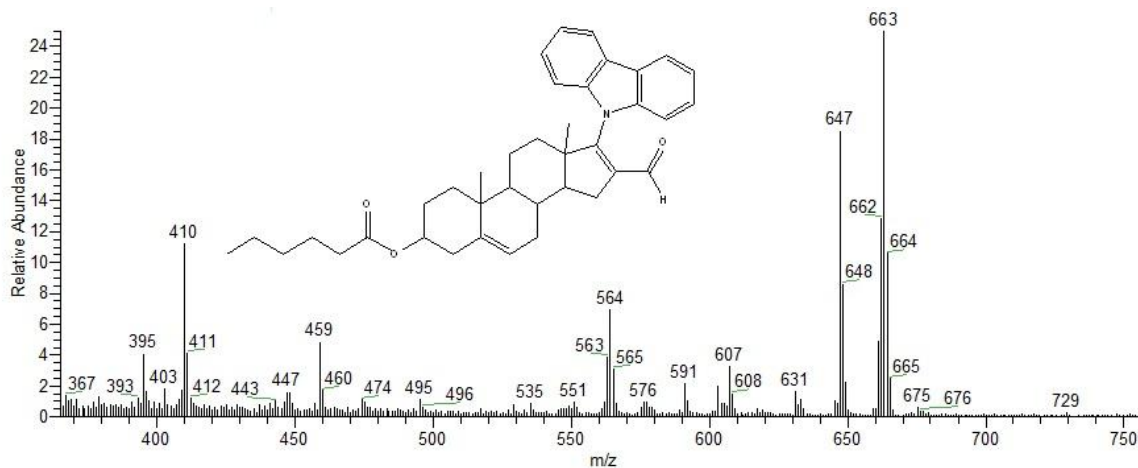


Figura A.84. Espectro de masas de la (3β)-hexanoiloxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (IVf).

A.19. Espectros de (3 β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).

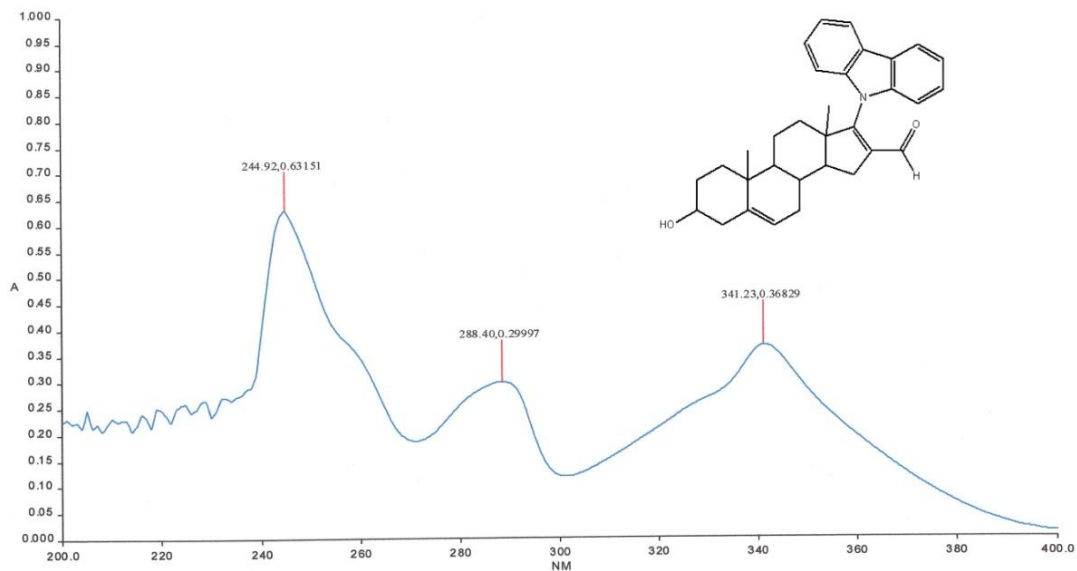


Figura A.85. Espectro de UV de la (3 β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).

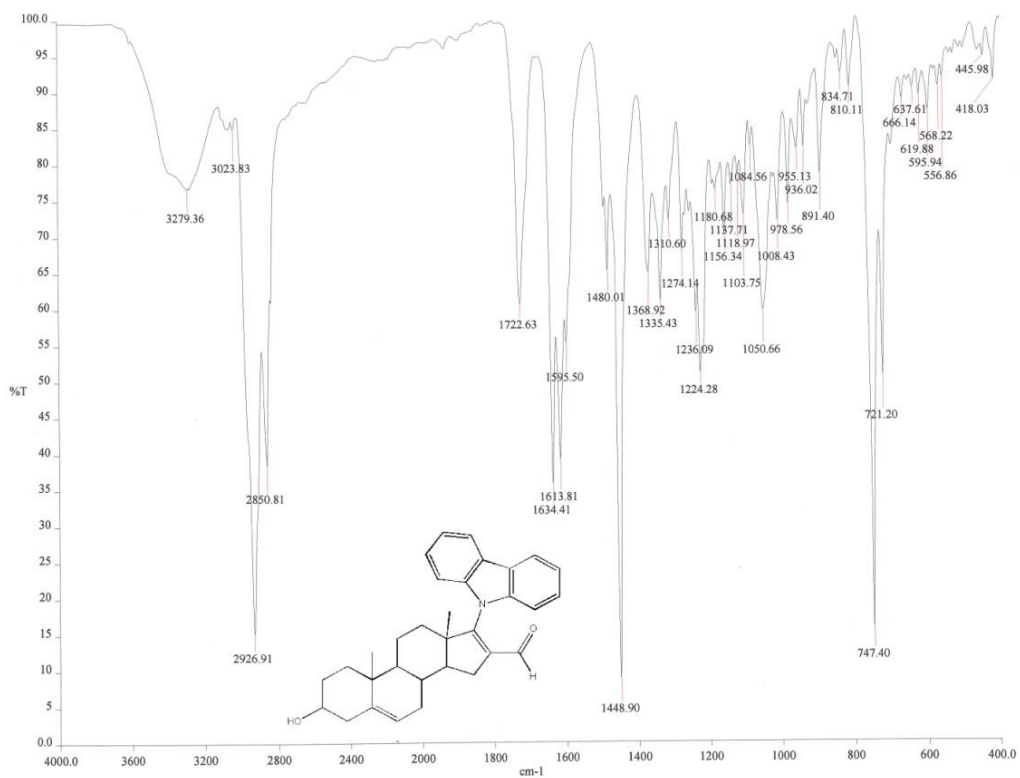


Figura A.86. Espectro de IR de (3 β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).

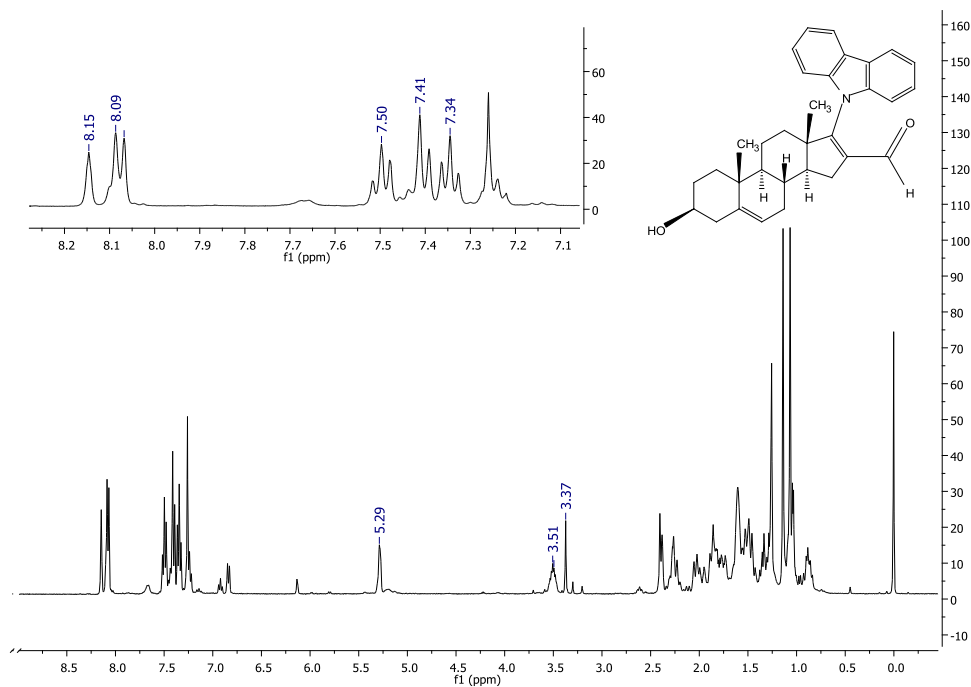


Figura A.87. Espectro de RMN ^1H de (3 β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).

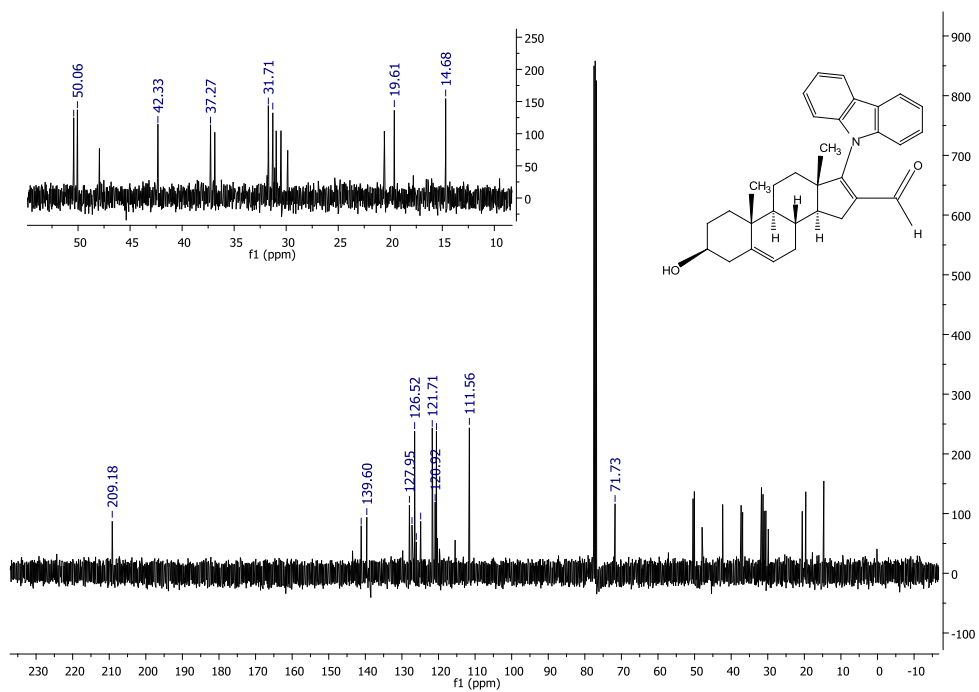


Figura A.88. Espectro de RMN ^{13}C de (3 β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).

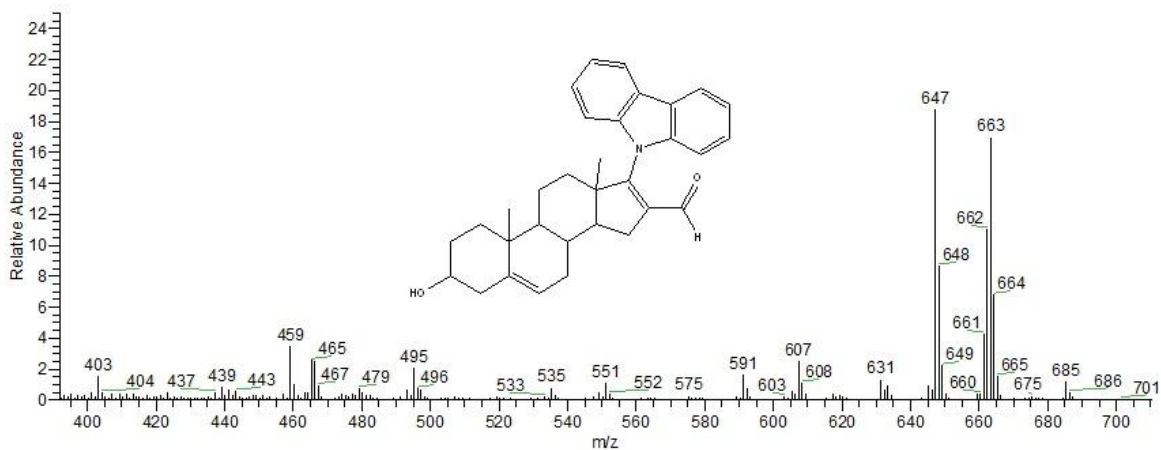


Figura A.89. Espectro de masas de (3β)-hidroxi-17-(1H carbazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VI).

A.20. Espectros de (3β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va).

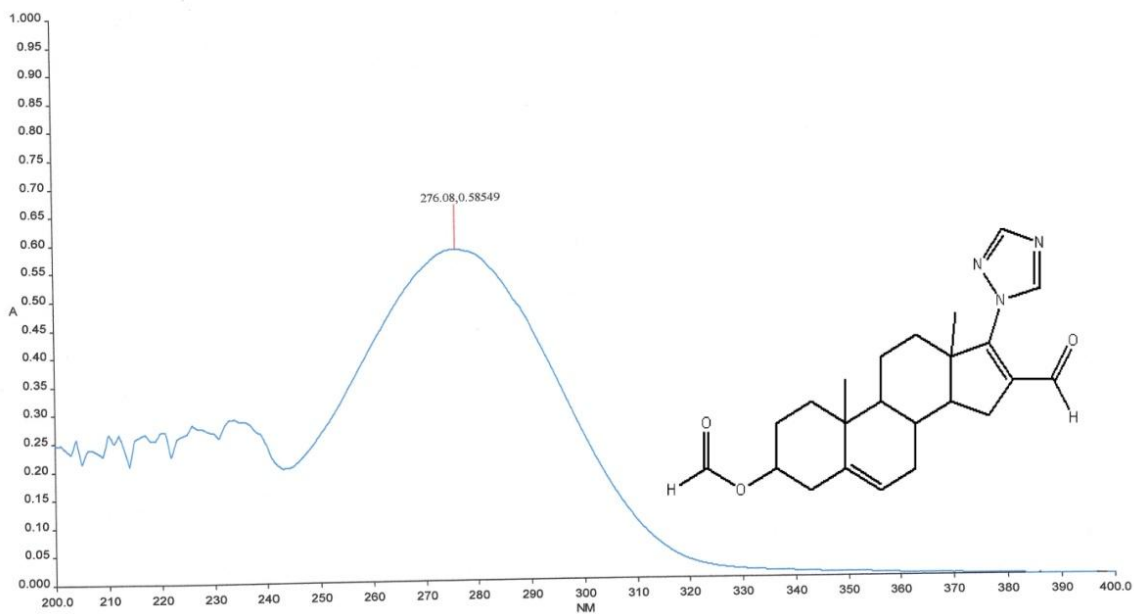


Figura A.90. Espectro de UV de (3β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va).

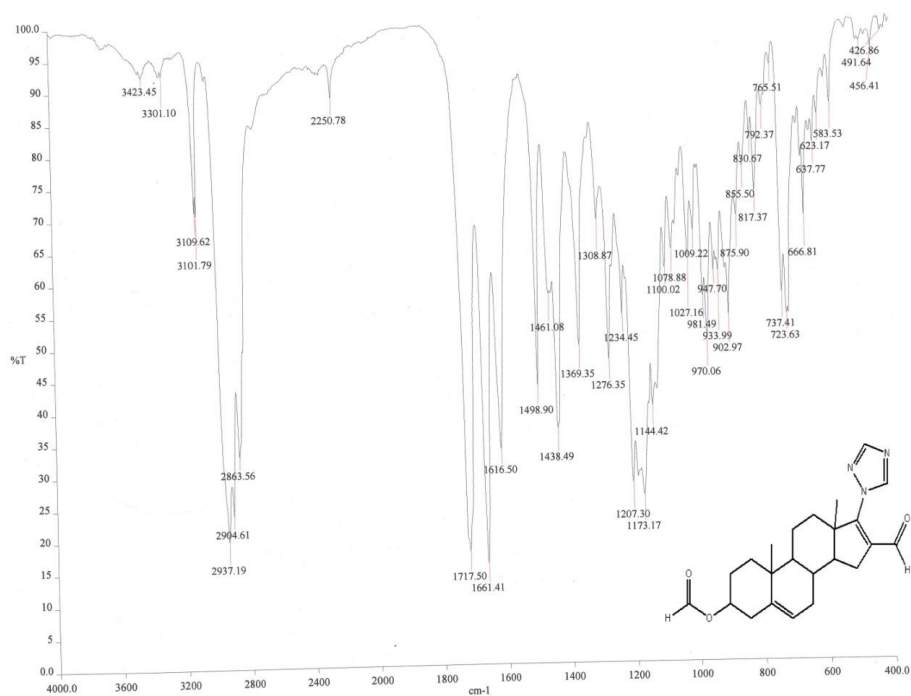


Figura A.91. Espectro de IR de (3 β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va).

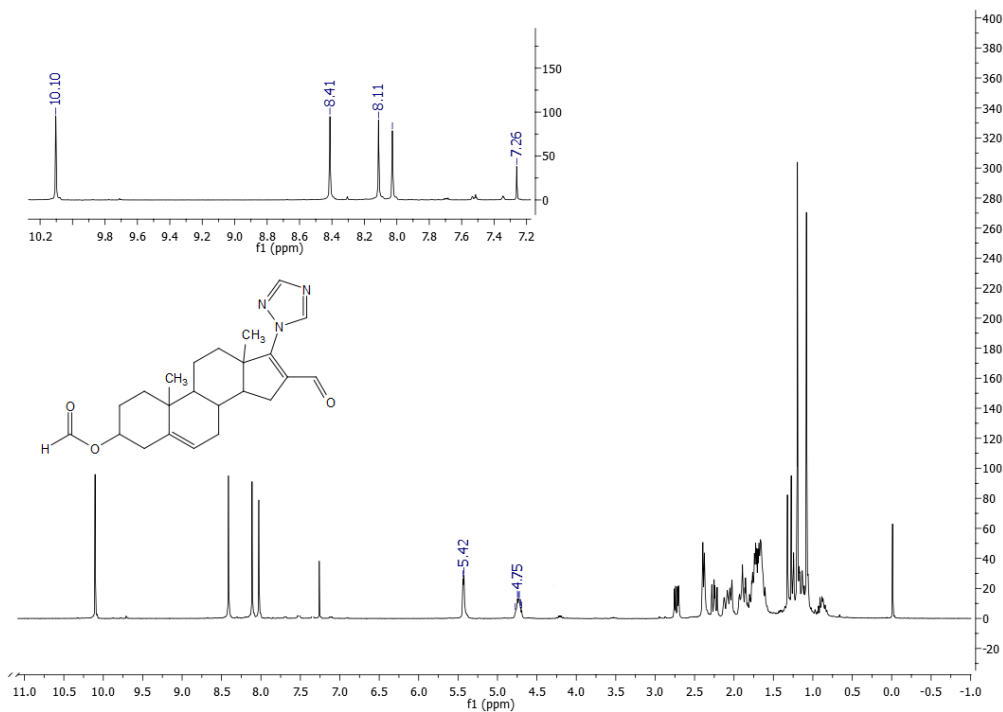


Figura A.92. Espectro de RMN¹H de la (3 β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va).

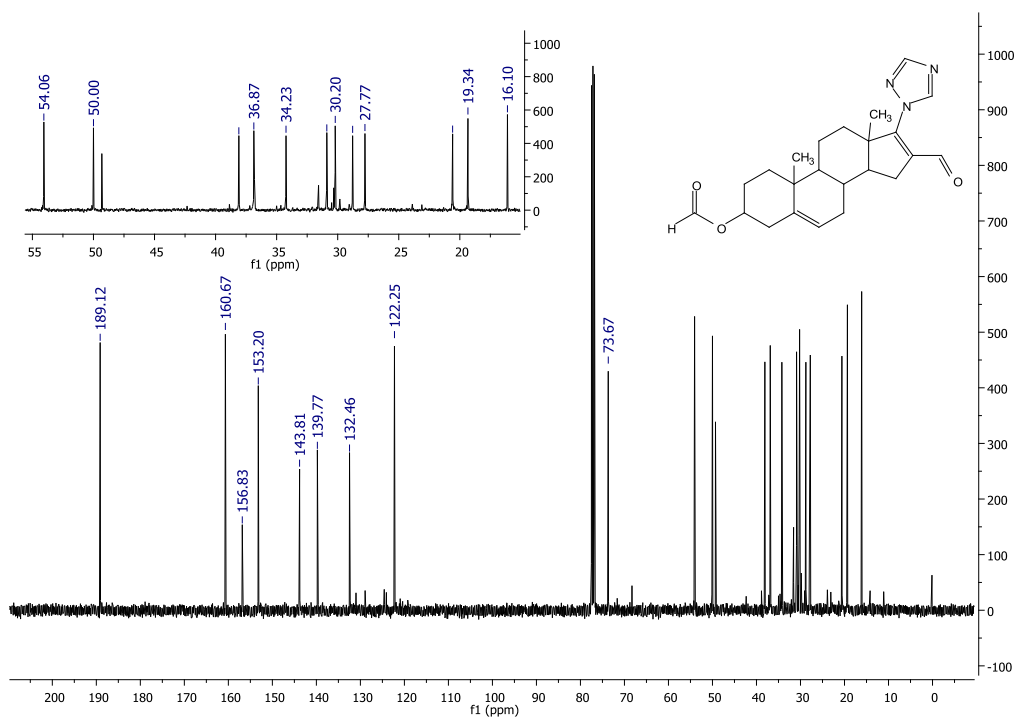


Figura A.93. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va).

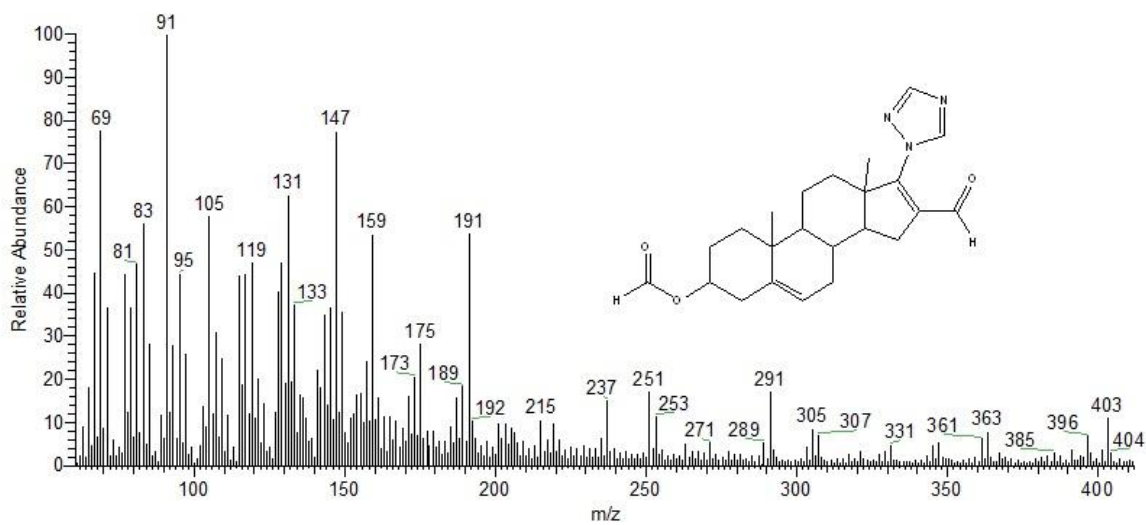


Figura A.94. Espectro de RMN¹³C de la (3β)-formiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Va).

A.21. Espectros de (3 β)-acetiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vb).

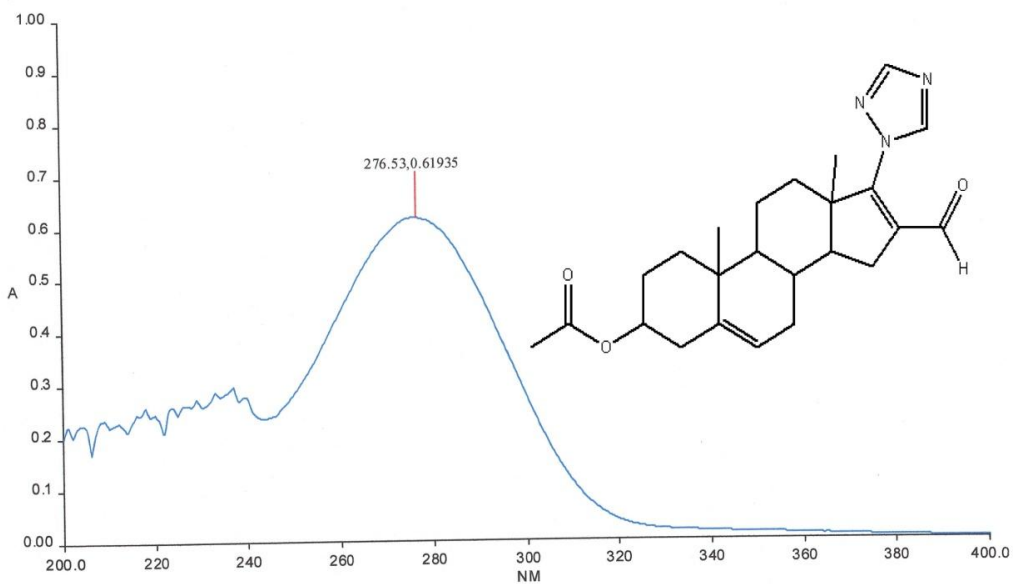


Figura A.95. Espectro de UV de la (3 β)-acetiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vb).

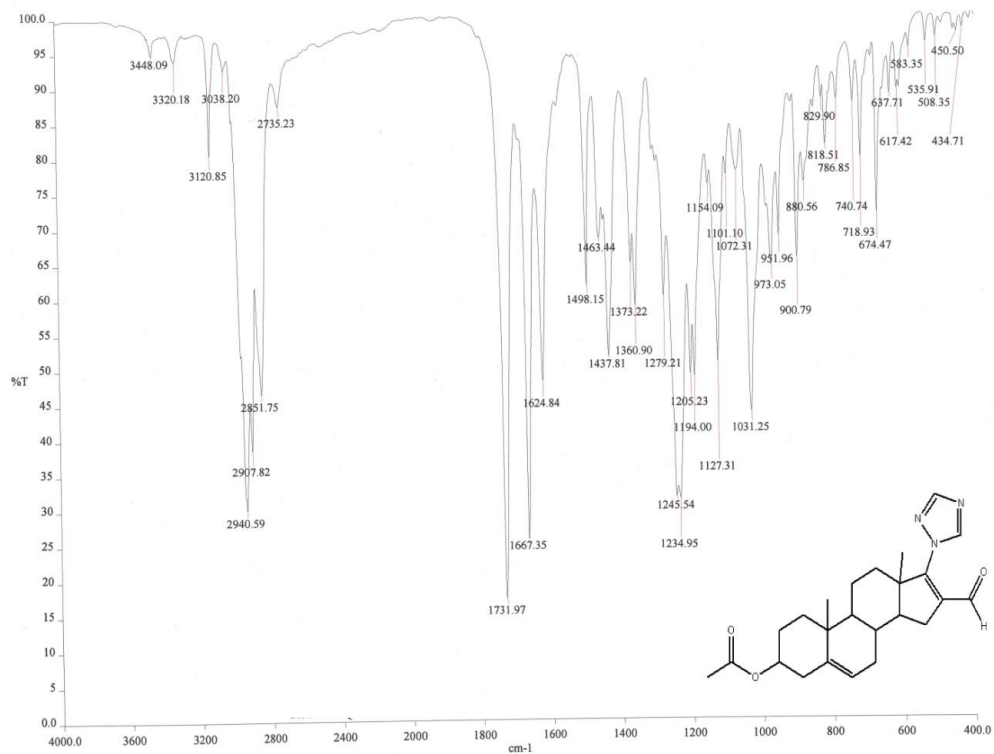


Figura A.96. Espectro de IR de (3 β)-acetiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vb).

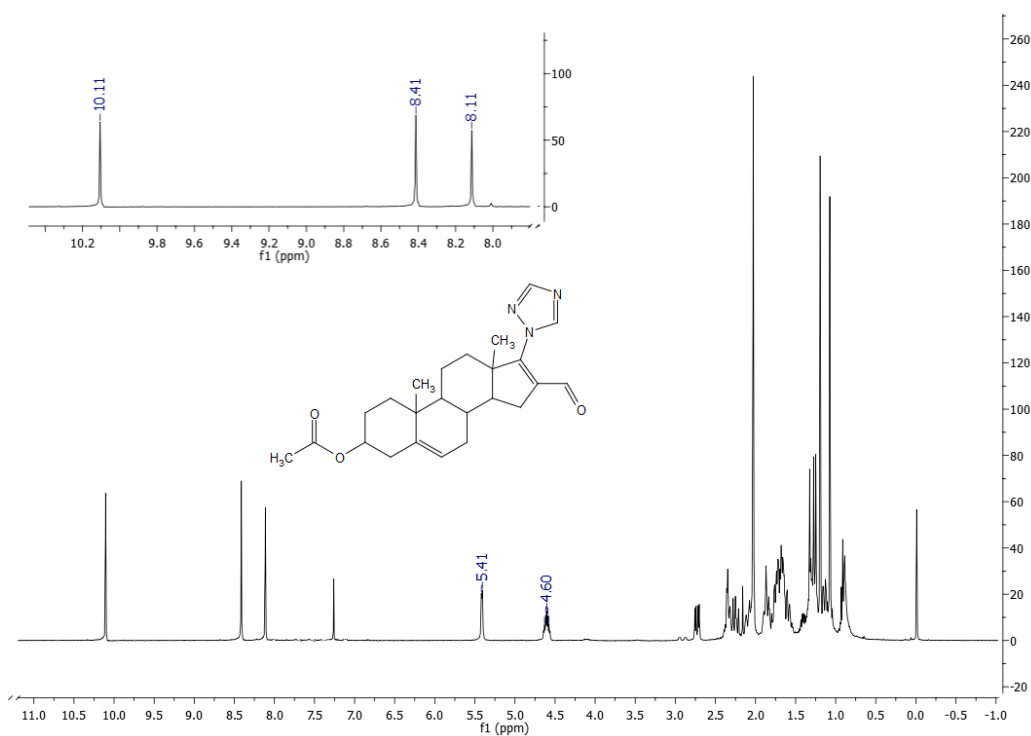


Figura A.97. Espectro de RMN ^1H de (3 β)-acetiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vb).

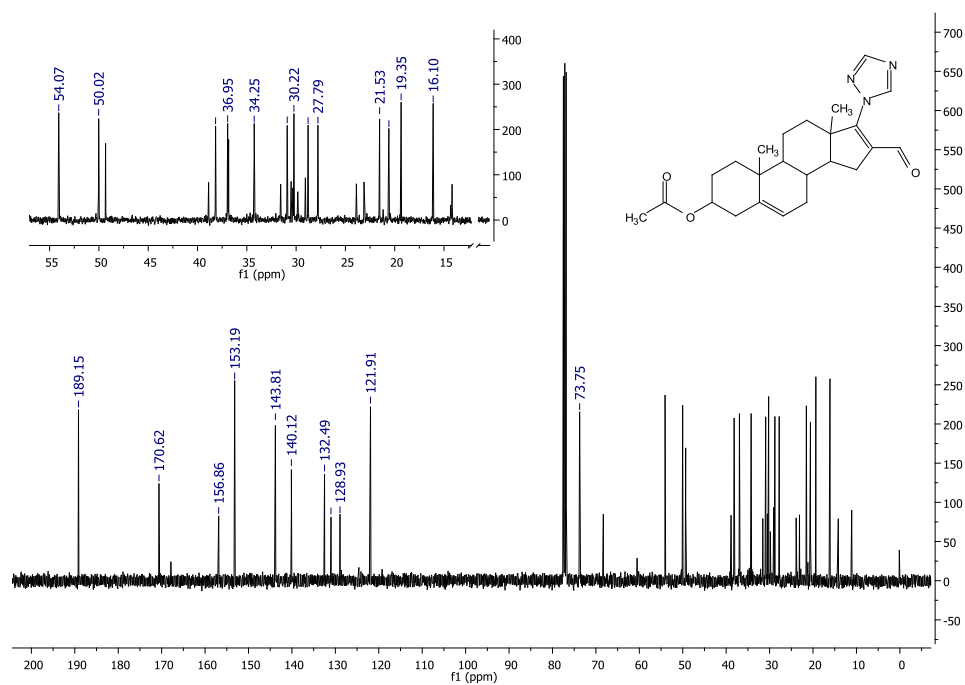


Figura A.98. Espectro de RMN ^{13}C de (3 β)-acetiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vb).

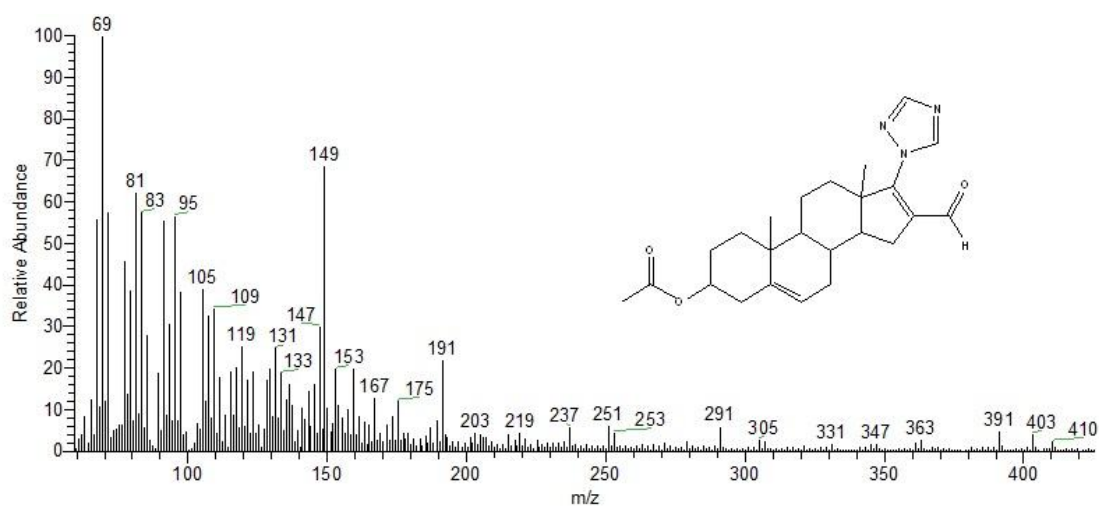


Figura A.99. Espectro de RMN¹³C de (3β)-acetiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vb).

A.22. Espectros de (3β)-propioniloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vc).

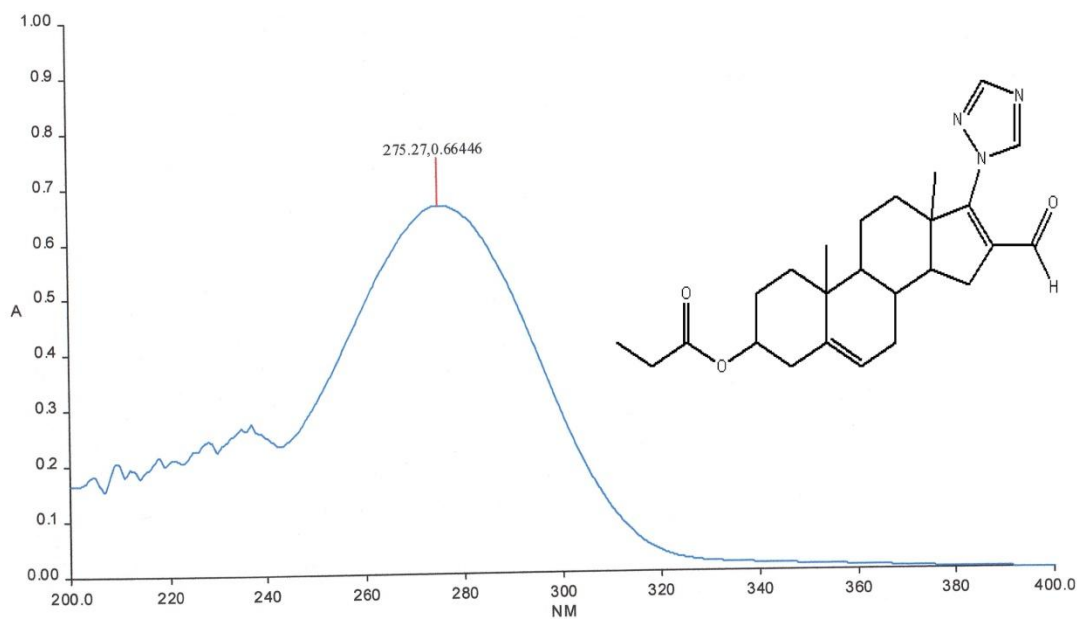


Figura A.100. Espectro de UV de (3β)-propioniloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vc).

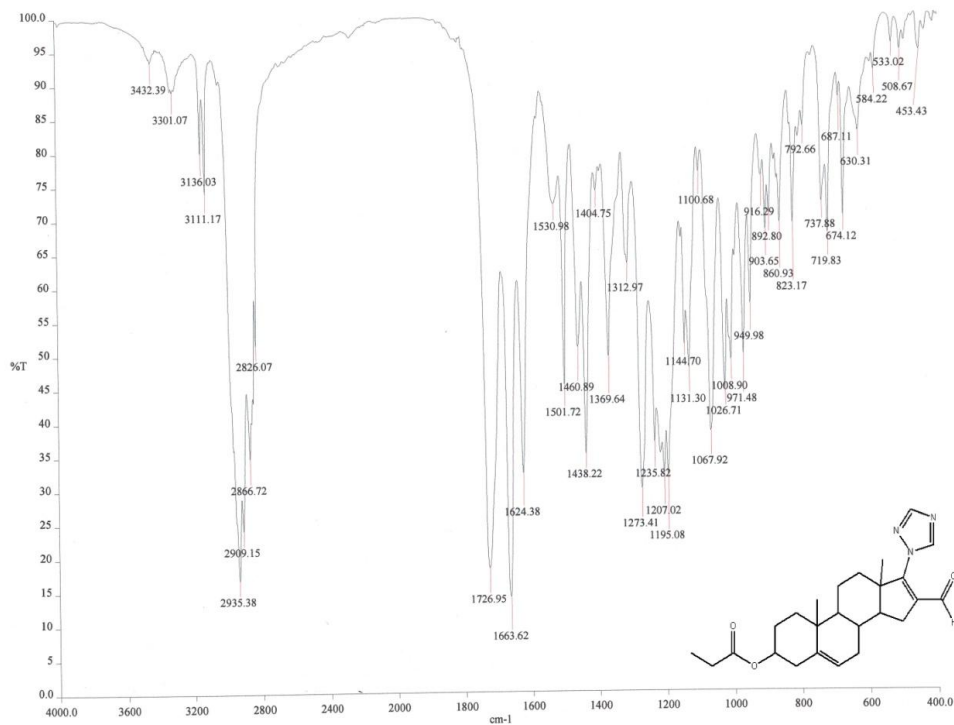


Figura A.101. Espectro de IR de (3β)-propionioiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vc).

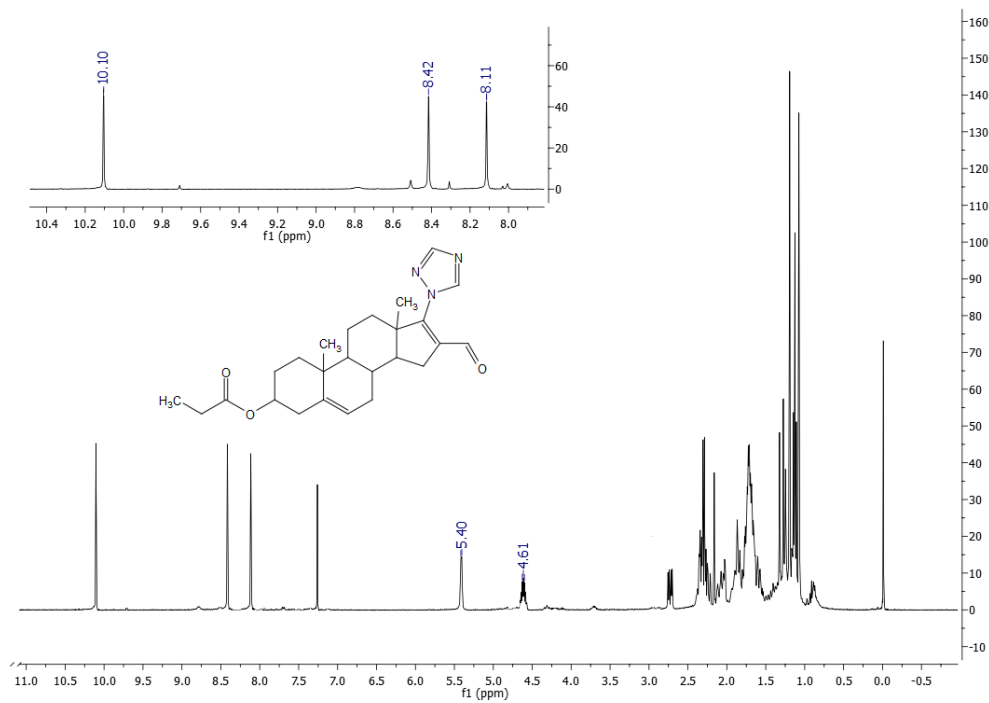


Figura A.102. Espectro de RMN¹H de (3β)-propionioiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vc).

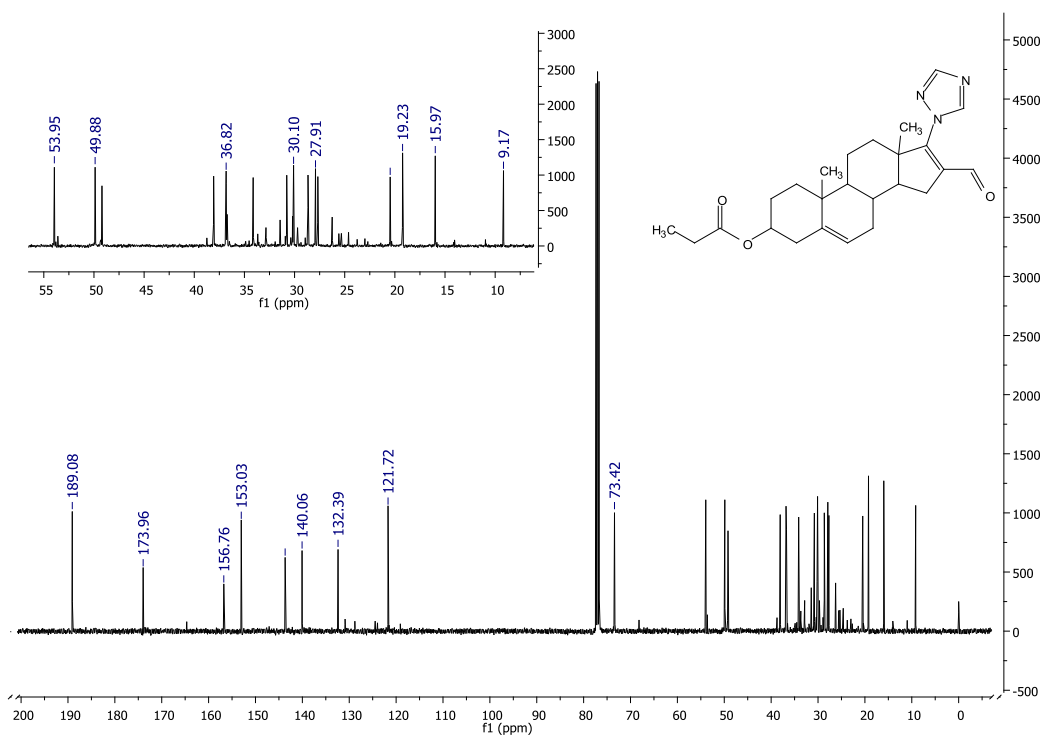


Figura A.103. Espectro de RMN ^{13}C de (3 β)-propionioxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vc).

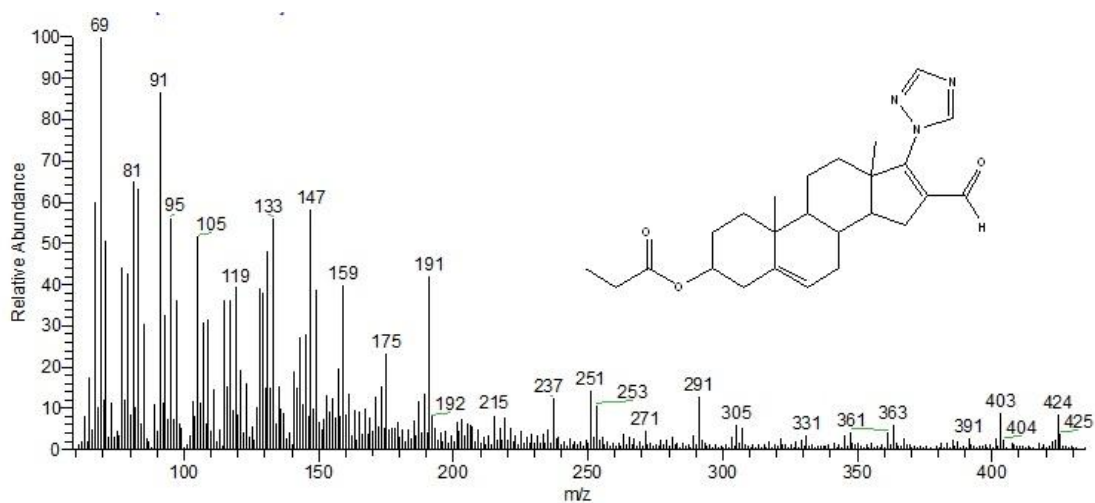


Figura A.104. Espectro de masas de (3 β)-propionioxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vc).

A.23. Espectros de (3 β)-butiroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vd).

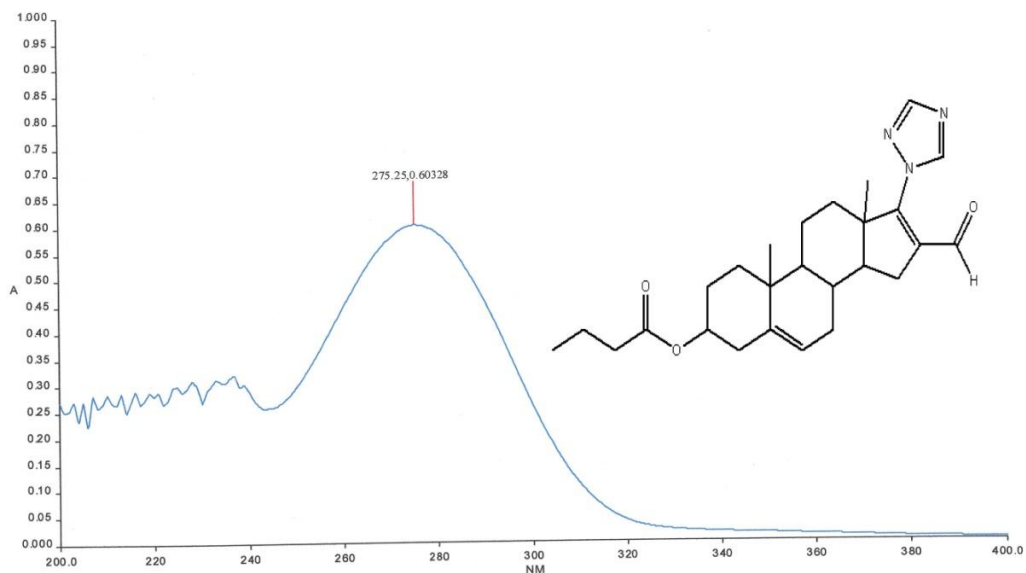


Figura A.105. Espectro de UV de (3 β)-butiroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vd).

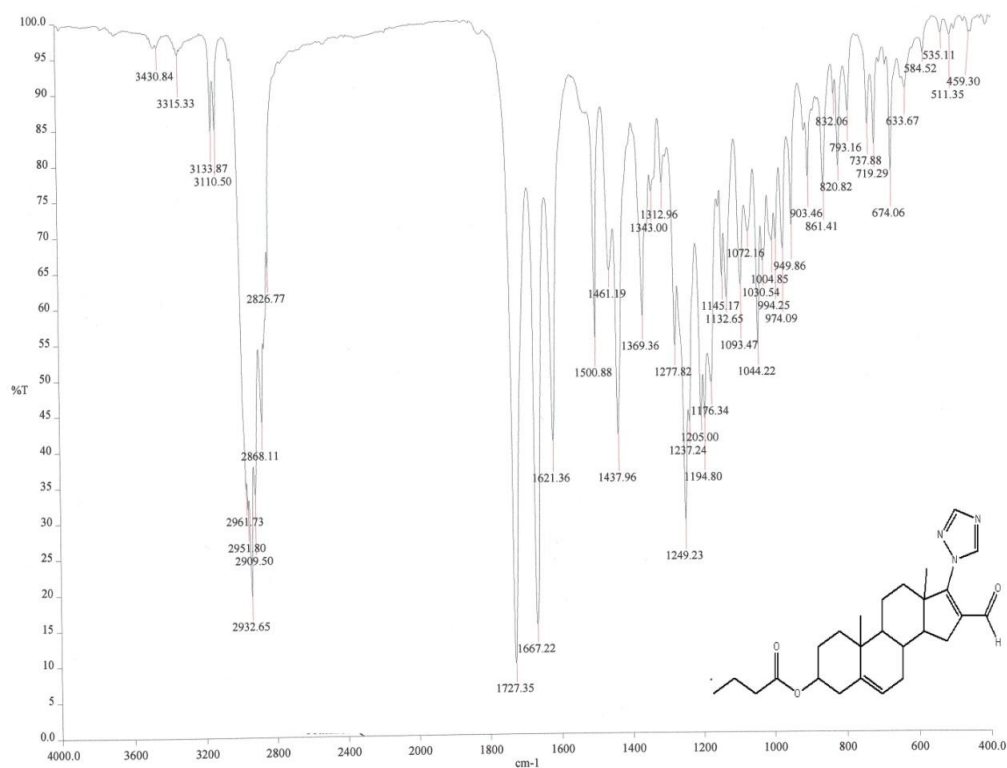


Figura A.106. Espectro de IR de (3 β)-butiroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vd)

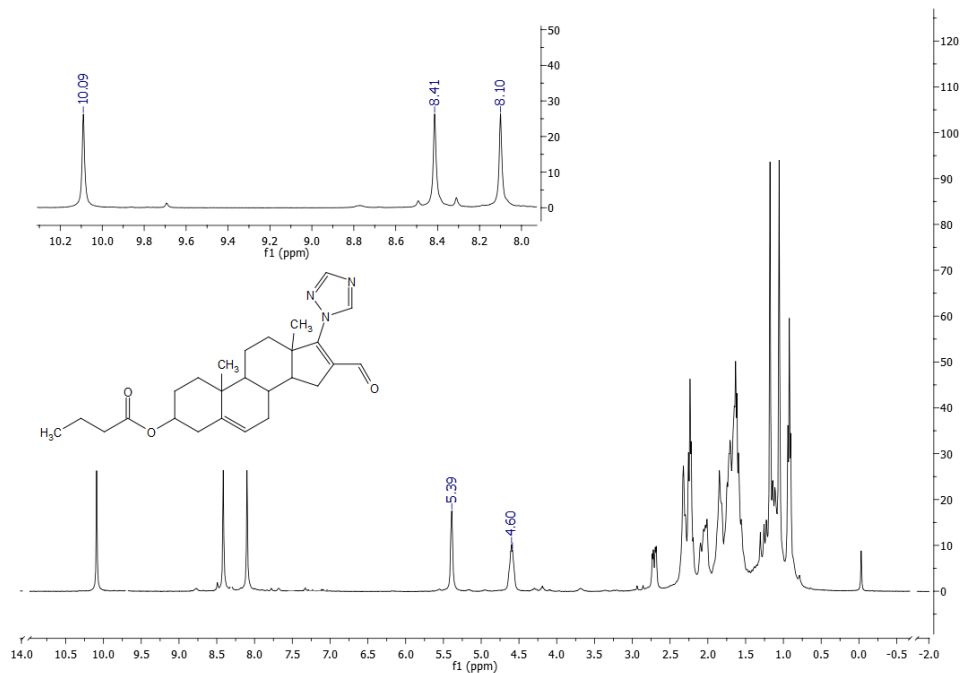


Figura A.107. Espectro de RMN ^1H de (3 β)-butiroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vd)

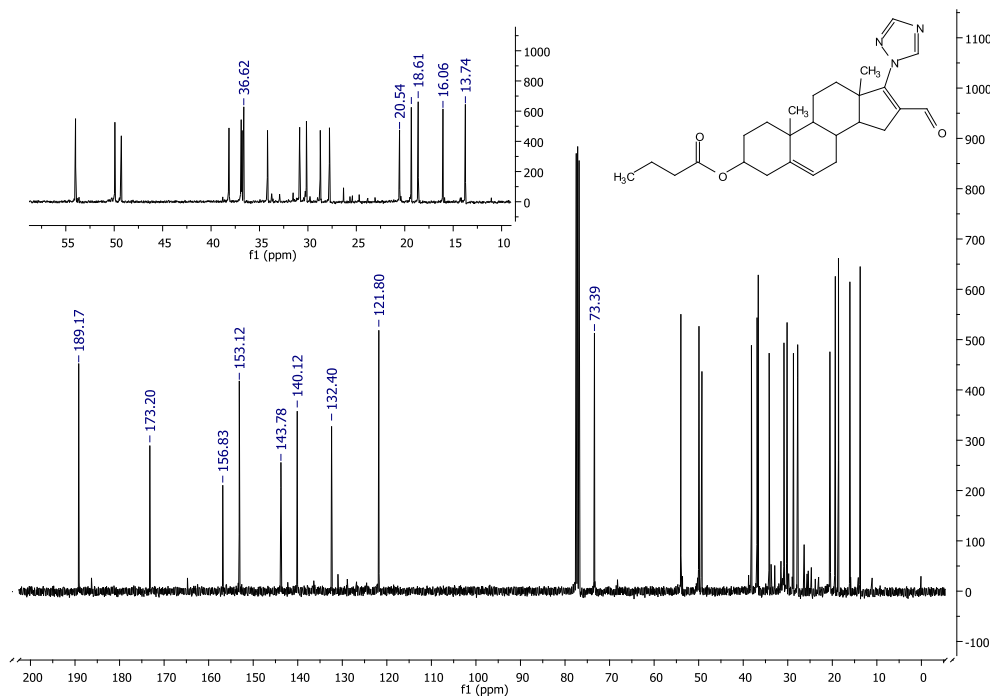


Figura A.108. Espectro de RMN ^{13}C de (3 β)-butiroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vd)

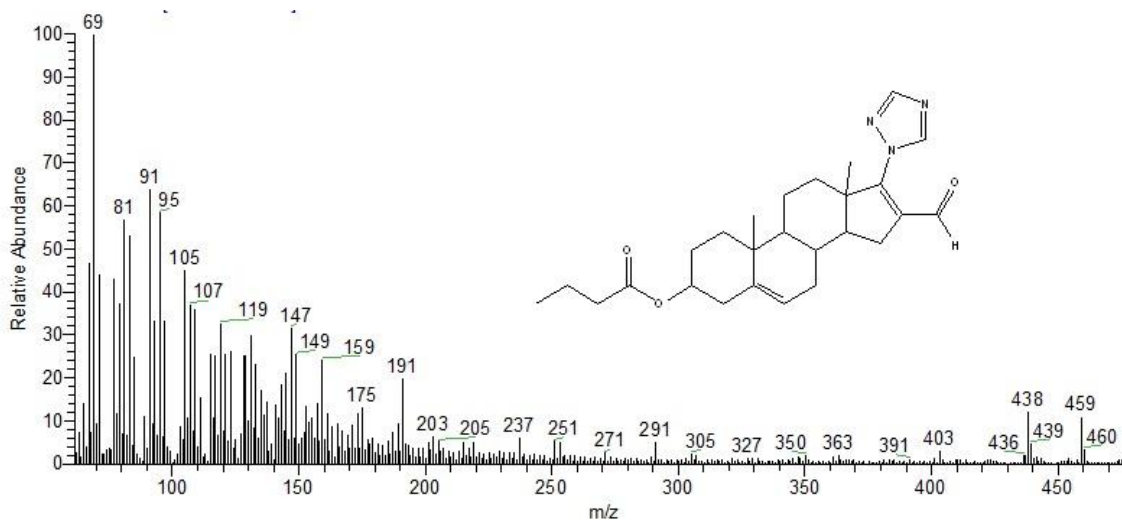


Figura A.109. Espectro de masas de (3β)-butiroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vd)

A.24. Espectros de (3β)-valeroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Ve).

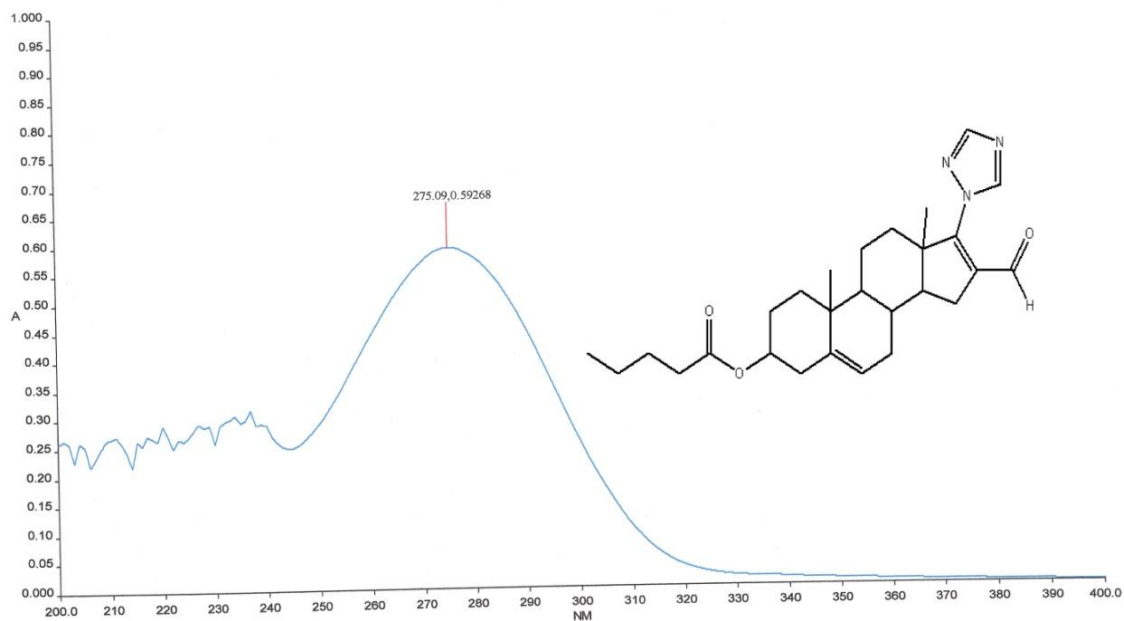


Figura A.110. Espectro de UV de (3β)-valeroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Ve).

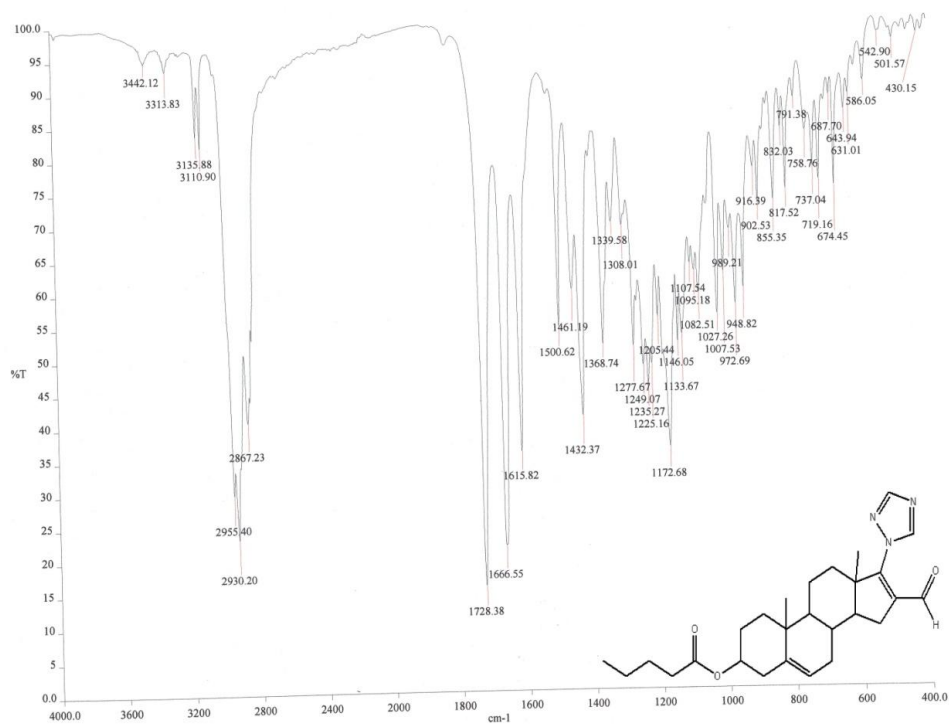


Figura A.111. Espectro de IR de (3 β)-valeroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Ve).

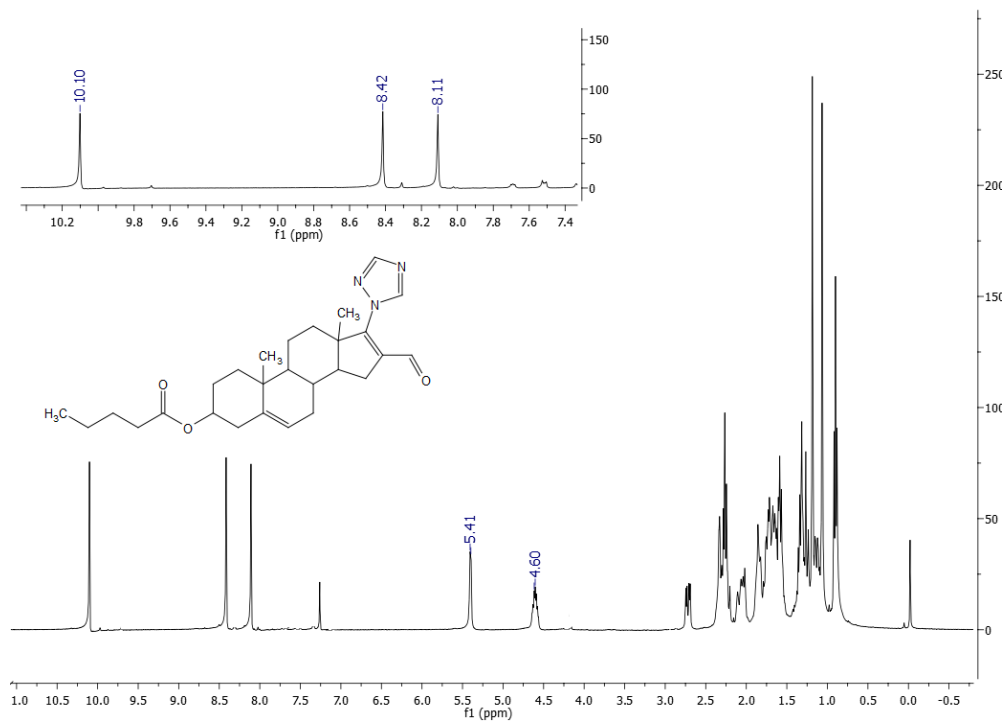


Figura A.112. Espectro de RMN ^1H de (3 β)-valeroiloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Ve).

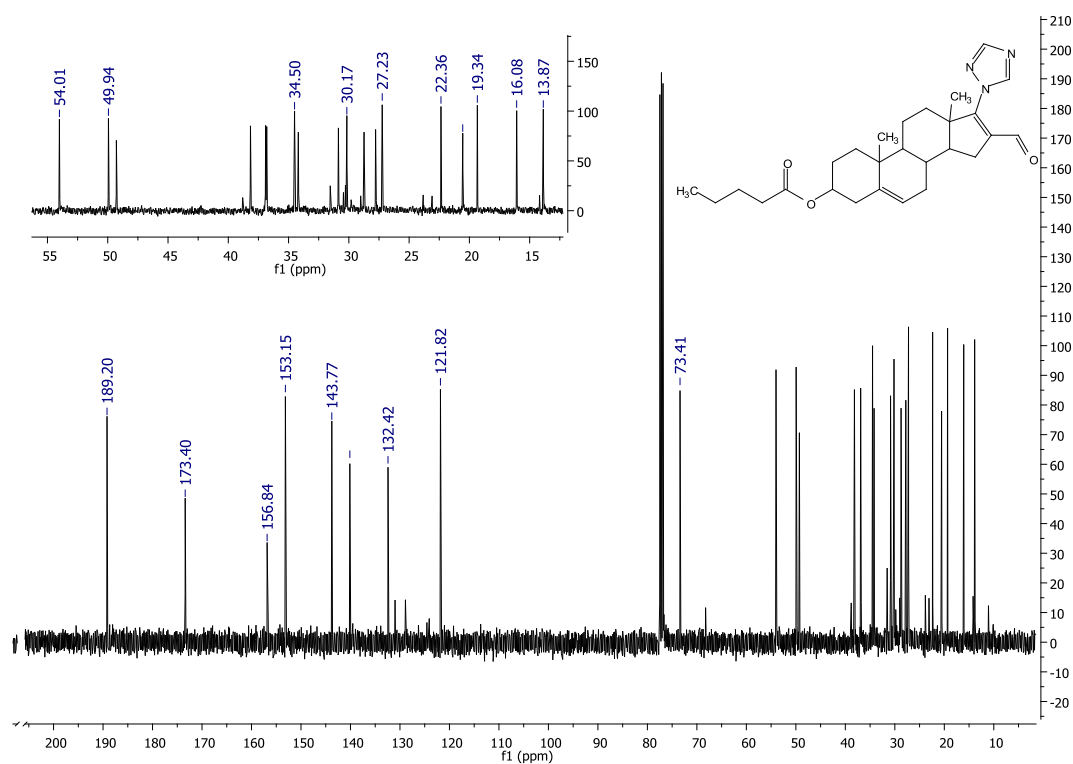


Figura A.113. Espectro de RMN¹³C de (3β)-valeriloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Ve).

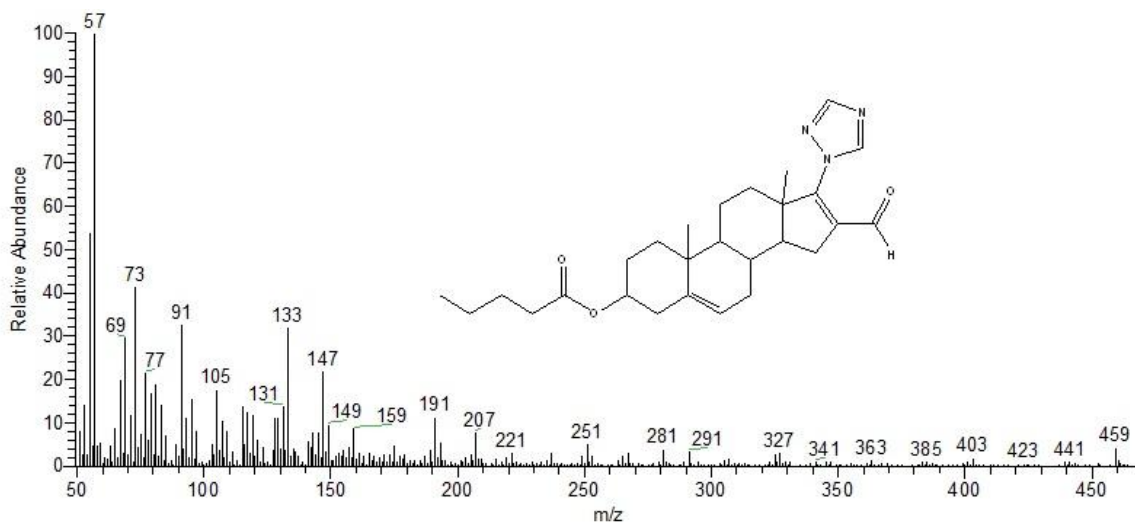


Figura A.114. Espectro de masas de (3β)-valeriloxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Ve).

A.25. Espectros de (3 β)-hexanoiloxi-17-(1H-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vf).

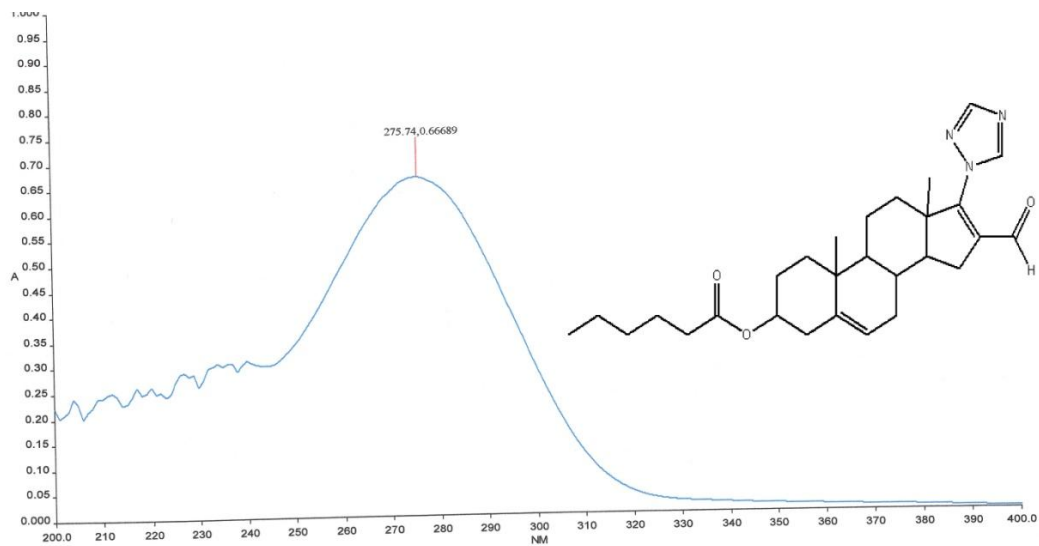


Figura A.115. Espectro de UV de (3 β)-hexanoiloxi-17-(1H-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vf).

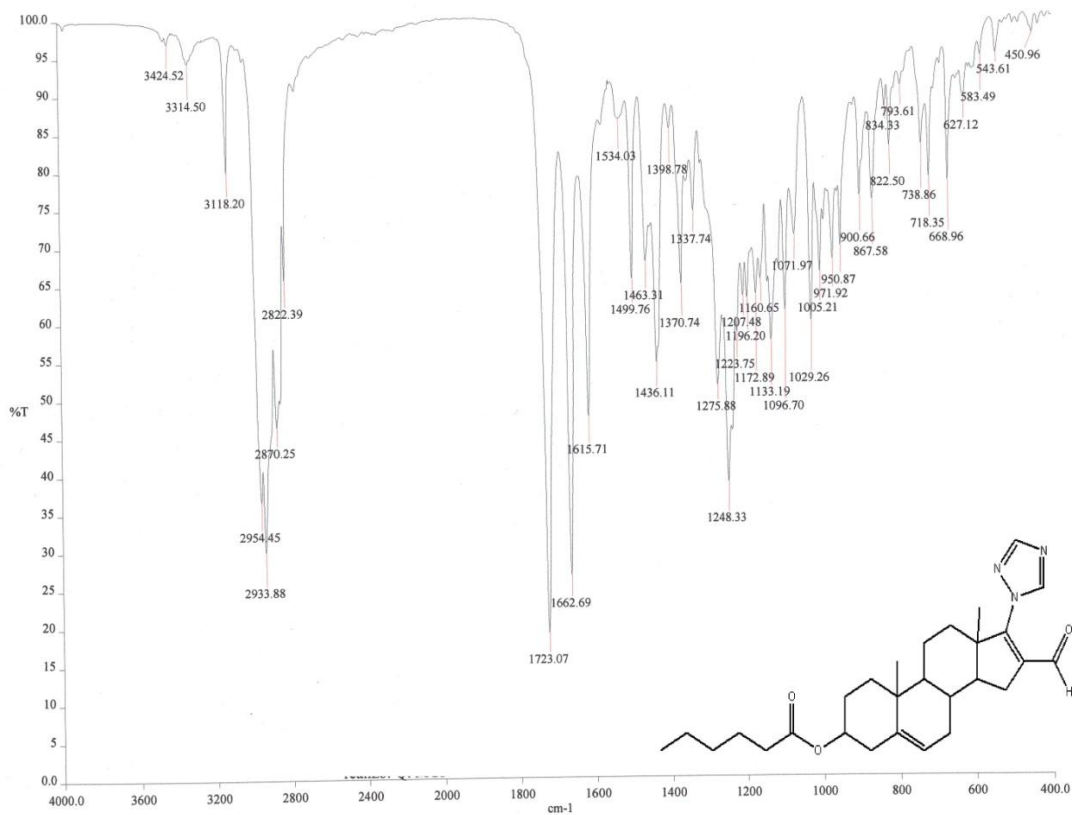


Figura A.116. Espectro de IR de (3 β)-hexanoiloxi-17-(1H-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vf)

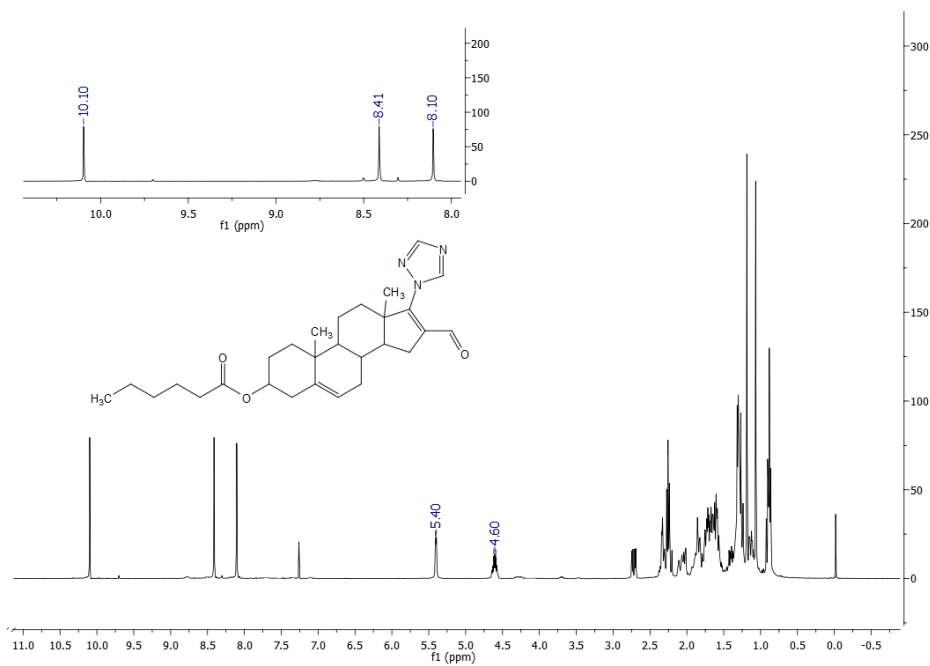


Figura A.117. Espectro de RMN^1H de (3 β)-hexanoiloxi-17-(1H-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vf)

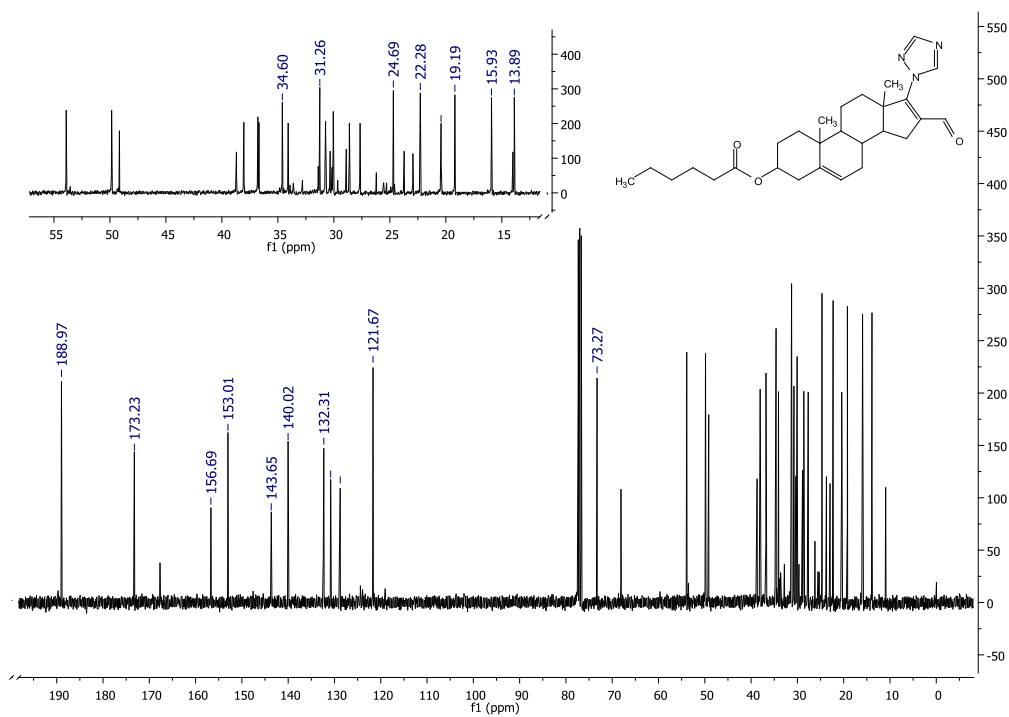


Figura A.118. Espectro de RMN^{13}C de (3 β)-hexanoiloxi-17-(1H-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vf)

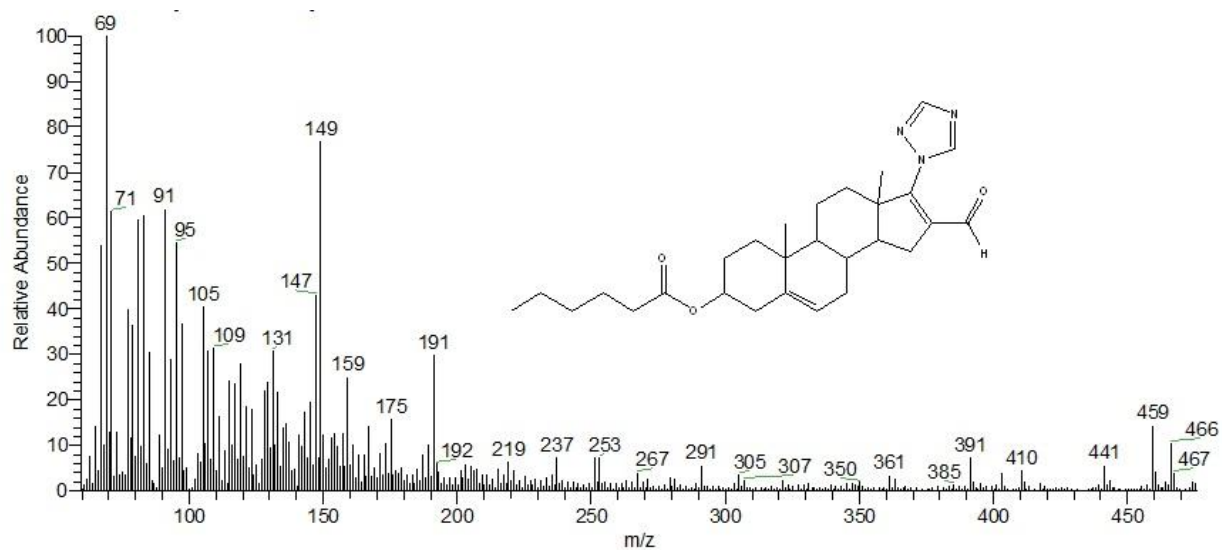


Figura A.119. Espectro de masas de (3β)-hexanoiloxi-17-(1H-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (Vf)

A.26. Espectros de (3β)-hidroxi--17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).

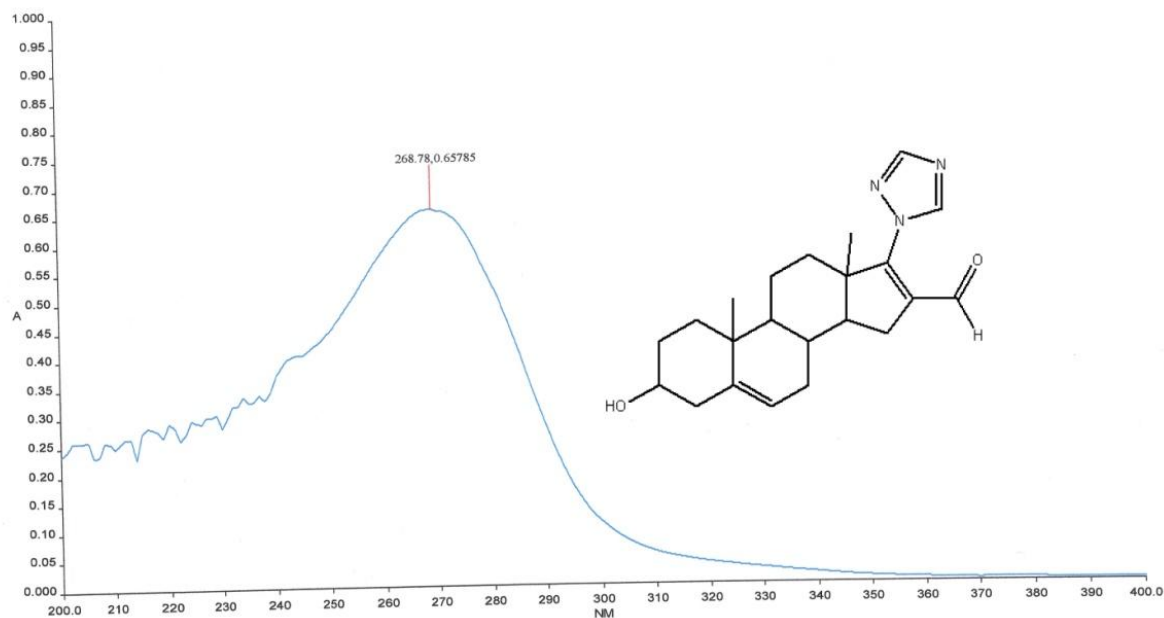


Figura A.120. Espectro de UV de (3β)-hidroxi--17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).

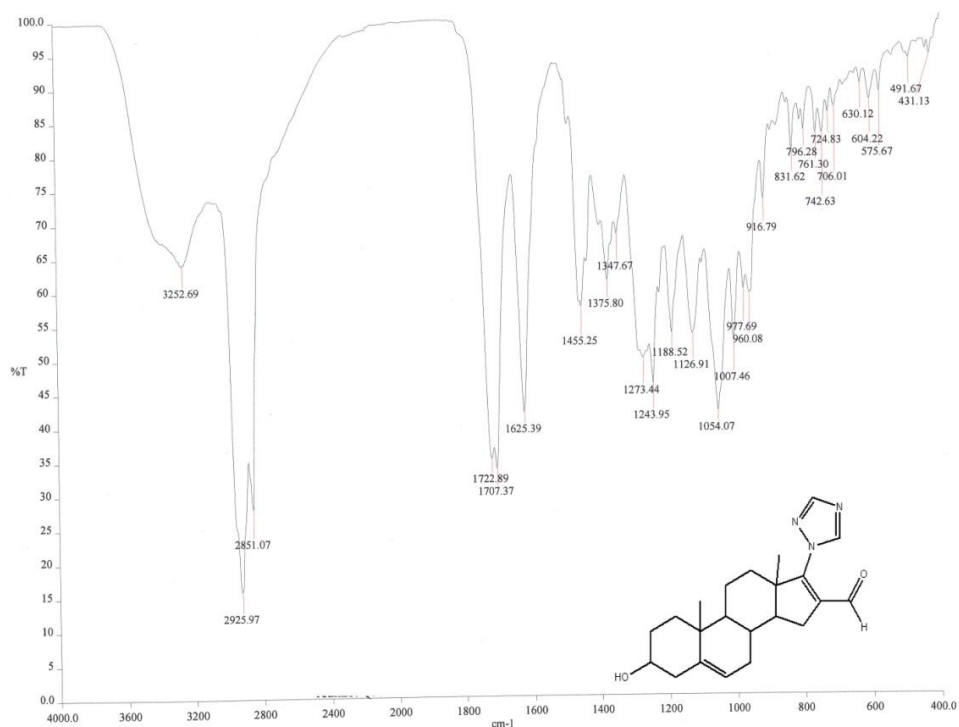


Figura A.121. Espectro de IR de (3β)-hidroxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).

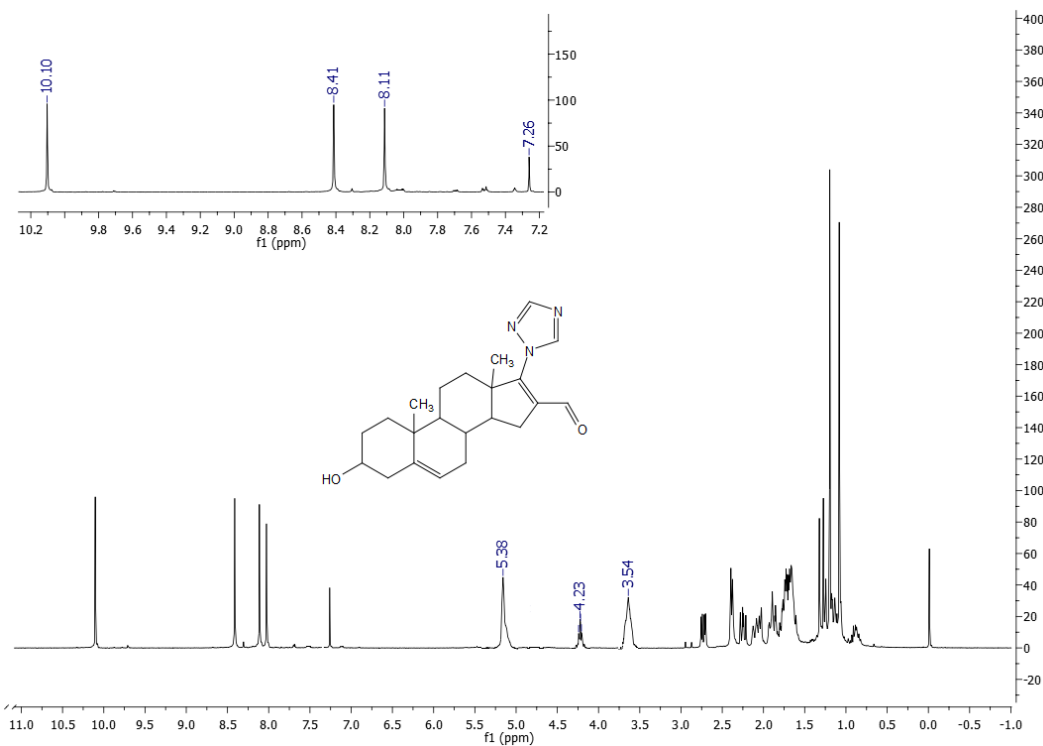


Figura A.122. Espectro de RMN^1H de (3β)-hidroxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).

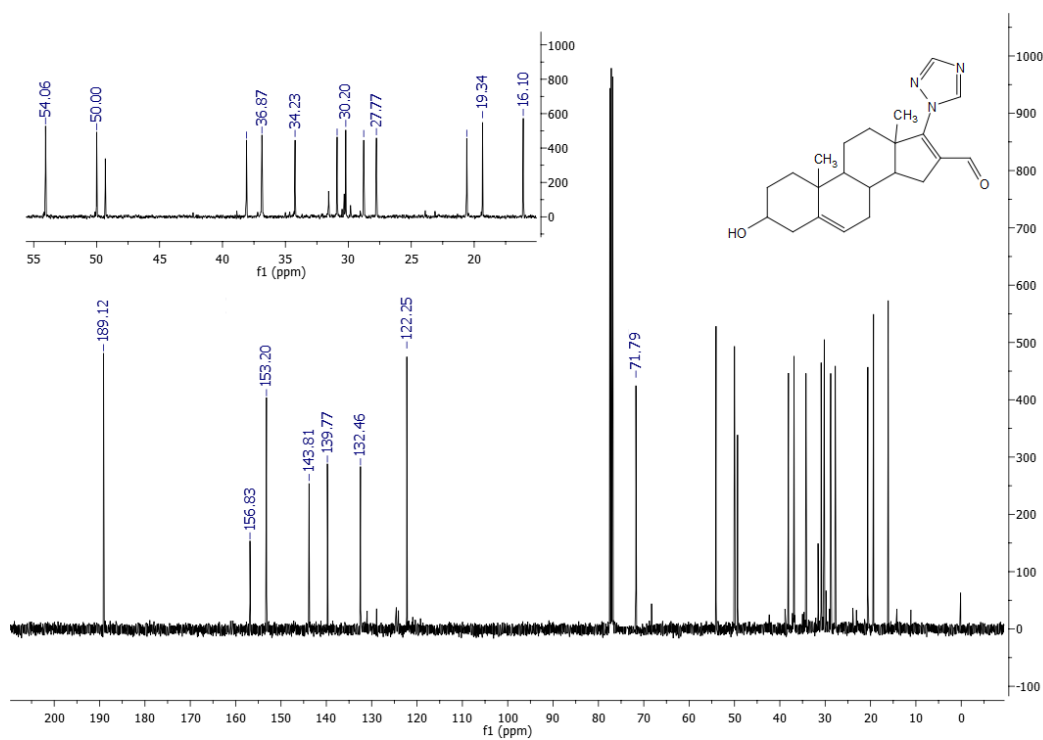


Figura A.123. Espectro de RMN ^{13}C de (3 β)-hidroxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).

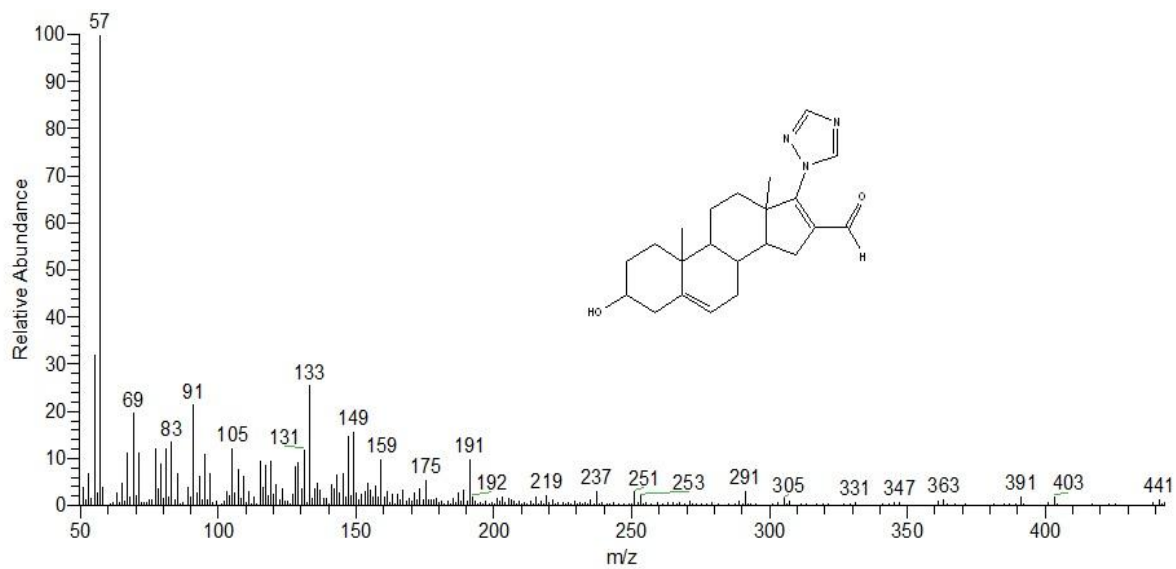


Figura A.124. Espectro de masas de (3 β)-hidroxi-17-(1H triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (VII).