

95

FACULTAD DE QUIMICA

**SINTESIS DE C-19 HEMISUCCINATOS DE LA
SERIE DEL ANDROSTANO**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

p r e s e n t a :

PATRICIA NOBLE GONZALEZ

México, D. F.

1973

M-174441



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: DOCTOR JOSE LUIS MATEOS
VOCAL: DOCTOR ALFONSO ROMO DE VIVAR
SECRETARIO: DOCTOR JORGE CORREA PEREZ
1er. SUPLENTE: Q. Ma. DEL CARMEN RIVERA MUÑOZ
2o. SUPLENTE: DOCTOR VICTOR CORONADO BRAVO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

SUSTENTANTE



PATRICIA NOBLE GONZALEZ

ASESOR DEL TEMA



DOCTOR JOSE LUIS MATEOS

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA DEL INSTITUTO MEXICA-
NO DEL SEGURO SOCIAL, BAJO LA DI-
RECCION DEL DOCTOR JOSE LUIS MA-
TEOS, A QUIEN REITERO MI MAS SIN-
CERO AGRADECIMIENTO.

DESEO EXPRESAR MI RECONOCIMIENTO
A LOS DOCTORES OSCAR DOMINGUEZ V.
Y ANTONIO MIJARES M. POR LA ASESORIA
Y FACILIDADES QUE ME FUERON BRINDA-
DAS PARA LA REALIZACION DE ESTA TE-
SIS. ASIMISMO AGRADEZCO LA SUPERVI-
SION Y VALIOSA AYUDA DEL DOCTOR VIC-
TOR CORONADO B.

CON CARÍÑO Y ADMIRACION
A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI MADRE CON
CARIÑO Y GRATITUD

A MIS HERMANOS CARÍÑOSAMENTE
POR SU APOYO Y ACERTADAS INDICACIONES

S U M A R I O

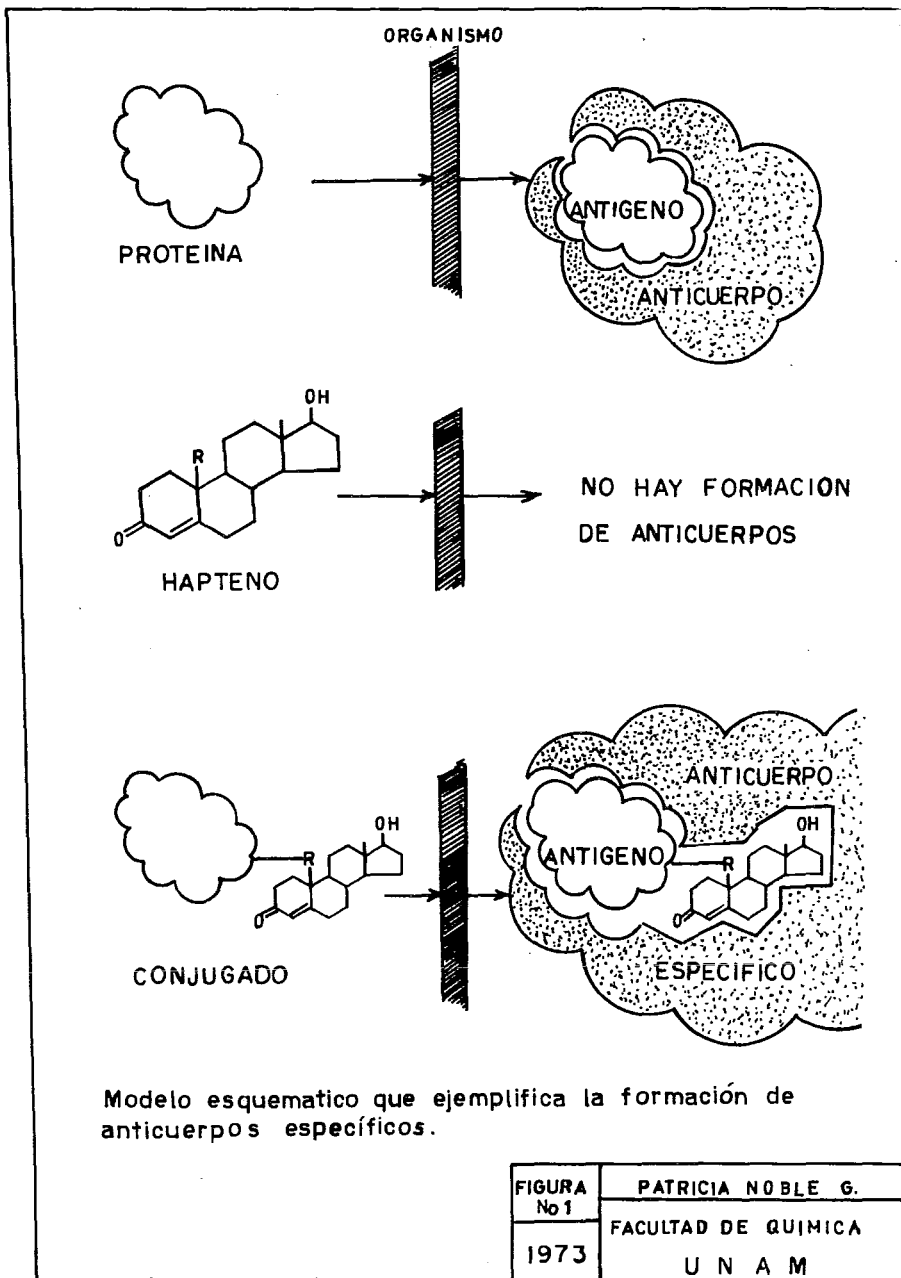
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
PARTE EXPERIMENTAL.....	10
DISCUSION Y RESULTADOS.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	55

I N T R O D U C C I O N

Actualmente los antígenos son definidos como sustancias con la capacidad de inducir la producción de anticuerpos, los cuales a su vez ejercen un fenómeno de protección contra las agresiones externas para el organismo donde se desarrollan¹.

En términos generales se acepta que los antígenos naturales, por ejemplo los polisacáridos, los complejos lipoproteicos etcétera, son sustancias de alto peso molecular, estructuralmente complejas y portadoras de determinantes antigénicos, características que se han estudiado recientemente¹.

Se ha tratado de modificar la estructura de los antígenos naturales para lograr otros antígenos con la capacidad de inducir la producción de anticuerpos específicos, usando sustancias conocidas con una estructura química sencilla llamados haptenos, que no inducen por sí solos la producción de anticuerpos, pero que uniéndolos a proteínas, el conjugado resultante si induce la producción de anticuerpos específicos contra la estructura del hapteno y de la proteína portadora². (Fig. 1)



Tomando en consideración lo anterior, se han obtenido antígenos de hormonas esteroidales usando derivados de esteroides y conjugándolos con proteínas mediante un enlace covalente. En la formación de los derivados se han usado varios grupos funcionales en el esteroide ubicados con diferentes posiciones y se cree que ésto ha restado la especificidad deseada en la producción de anticuerpos específicos contra dichos esteroides.

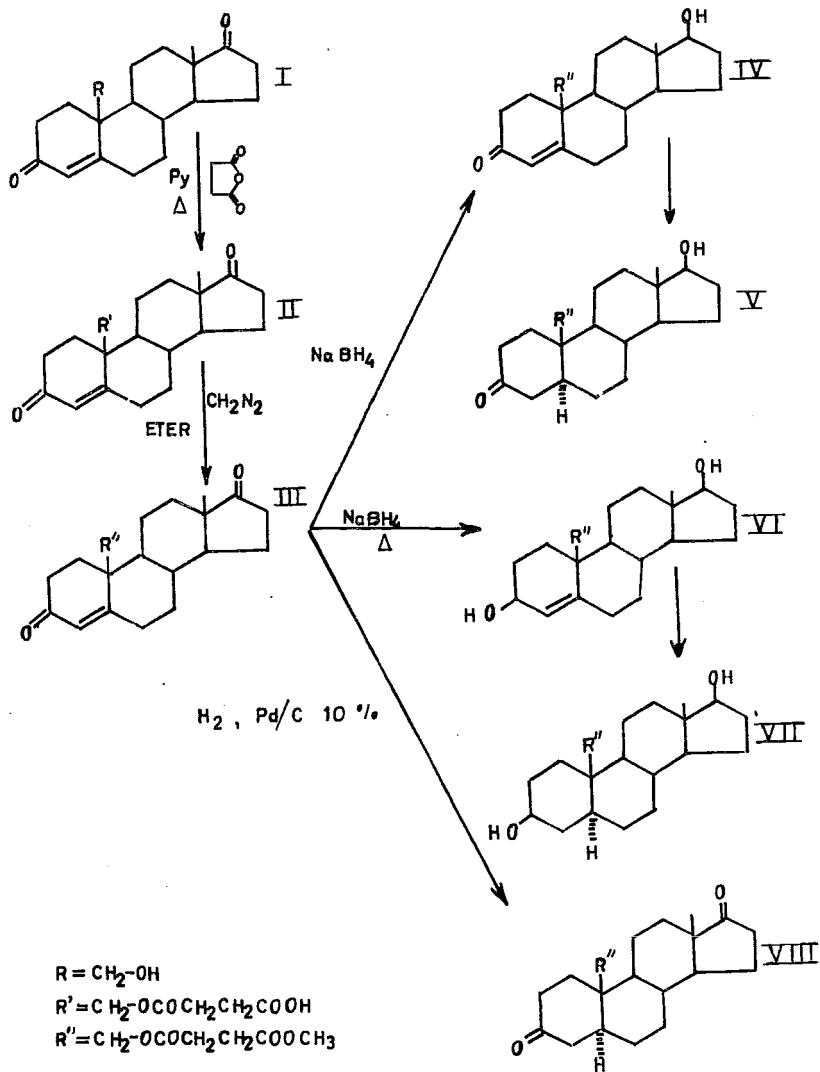
En el presente trabajo, se llevó a cabo la síntesis de C-19 Hemisuccinatos derivados del androstano, a fin de preparar antígenos que pudieran tener la capacidad de producir anticuerpos específicos contra hormonas y metabolitos esteroidales. Para unir el esteroide a la proteína se eligió una posición ajena a los grupos funcionales importantes o también llamados determinantes en la hormona. Se intenta con ésto que exista una mayor especificidad de los anticuerpos que se formen contra los esteroides, enfocándolos principalmente a estudios fisiológicos y analíticos.

Para ésto se prepararon los C-19 Hemisuccinatos de testosterona, 5 α -dihidrotestosterona, 4-androsten-3, 17-diona y 4-an-

drosten-3 β , 17 β -diol.

Debido a que se encontraron propiedades espectroscópicas interesantes en los primeros hemisuccinatos sintetizados, se prepararon también los C-19 Hemisuccinatos de 5 α -andros-
tan-3, 17-diona y 5 α -androstan-3 β , 17 β -diol. Durante la
preparación del hemisuccinato de 4-androsten-3 β , 17 β -diol,
se obtuvo accidentalmente el 19-hemisuccinato de -3, 5-andros-
tadién-17 β -ol.

Para la síntesis de los compuestos antes mencionados, se si-
guieron las reacciones de los esquemas 1, 2, 3 y 4.



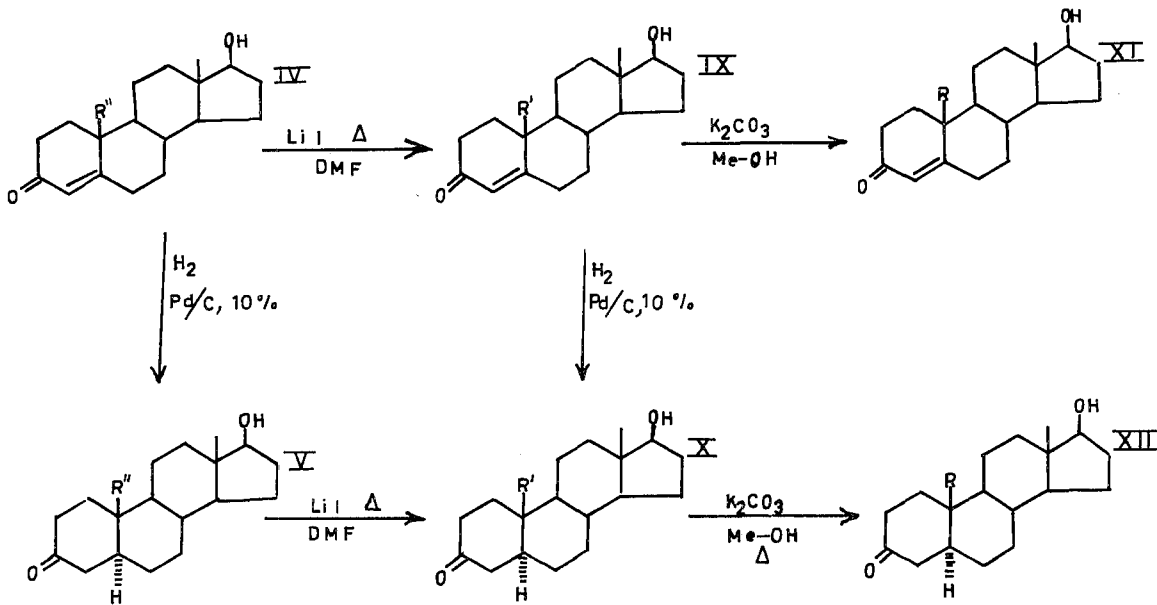
ESQUEMA
No 1

PATRICIA NOBLE G.

1973

FACULTAD DE QUIMICA

UNAM

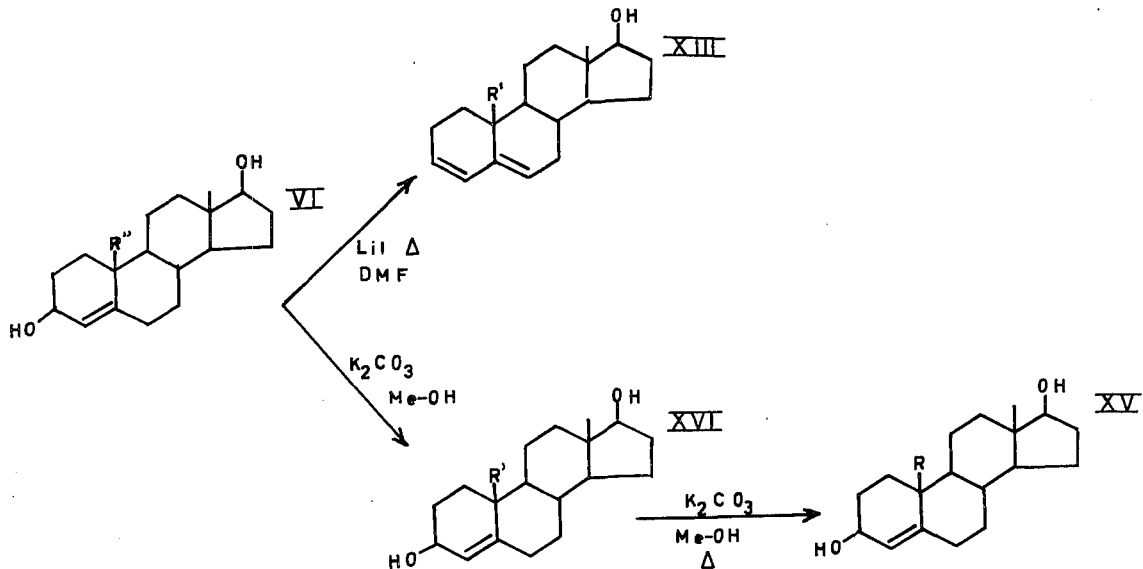


$\text{R} = \text{CH}_2\text{-OH}$

$\text{R}' = \text{CH}_2\text{OCOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

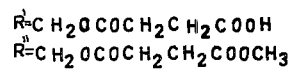
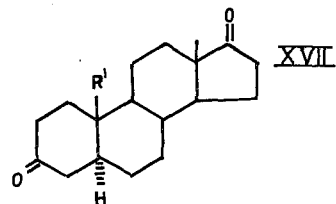
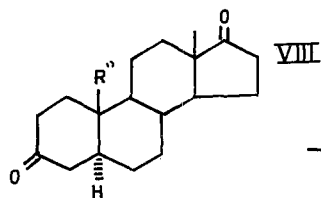
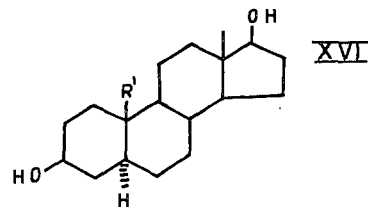
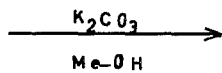
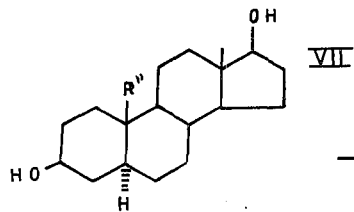
$\text{R}'' = \text{CH}_2\text{OCOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$

ESQUEMA	PATRICIA NOBLE G.
No 2	FACULTAD DE QUIMICA
1973	U N A M



$R = \text{CH}_2\text{OH}$
 $R' = \text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
 $R'' = \text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$

ESQUEMA No 3	PATRICIA NOBLE G
1973	FACULTAD DE QUIMICA UNAM



ESQUEMA No 4	PATRICIA NOBLE G
1973	FACULTAD DE QUIMICA U N A M

A N T E C E D E N T E S

Los primeros estudios encaminados a la obtención de anticuerpos específicos, fueron realizados por Sachs y Klopstock³ en 1925, ellos mezclaron colesterol con suero de cerdo tratando de obtener anticuerpos contra el colesterol, sin embargo los resultados fueron inciertos. Von Mooser y Griliches⁴ en 1941, intentaron formar anticuerpos para 5 α -androstano-3,17-diol, uniendo el esteroide a la proteína con un grupo éster.

Landsteiner⁵ en 1946, fue el primero en demostrar, que los esteroides al igual que otras moléculas de bajo peso molecular, son incapaces de actuar como antígenos por sí solos, pero, unidos a una sustancia que sí lo sea, como una proteína, el conjugado resultante es capaz de provocar la formación de anticuerpos específicos, tanto contra la proteína portadora, como, contra el esteroide unido.

En 1951 Sprunt⁶ publicó un compendio, en el cual asegura haber obtenido anticuerpos para el 17 β -estradiol, conjugando el esteroide con albúmina procedente de varios animales, pero no indica que tipo de enlace emplearon para unir el esteroide

a la proteína.

Erlanger^{7, 8} en 1957, Beiser⁹ en 1959 y Lieberman¹⁰ casi simultáneamente con Goodfriend y Sehon¹¹ en 1958, 1960¹² y 1961¹³, mediante una serie de trabajos publicados, dieron a conocer la importancia que tendrían en la Endocrinología los anticuerpos específicos, ya que éstos podrían en muchos casos contrarrestar los efectos fisiológicos de los esteroides de producción endógena.

Para la obtención de anticuerpos Lieberman¹⁰ hizo notar que era necesario hacer la unión esteroide-proteína mediante un enlace covalente y como característica fundamental, debería ser la estructura del derivado esteroidal lo más parecida posible a la hormona o metabolito del cual se desea producir los anticuerpos.

También encontró que los reactivos más apropiados para unirse a los grupos amino libres de los residuos de la lisina presentes en la albúmina son la O-carboximetiloxima y los hemisuccinatos mediante la formación de un enlace peptídico. Goodfriend y Sehon¹¹, prepararon los isocianatos como precursor-

res de los conjugados, pero no encontraron la especificidad deseada y suspendieron dichas investigaciones.

La idea de obtener anticuerpos específicos, volvió a tener interés para su aplicación en métodos analíticos; Abraham en 1969¹⁴ y 1970¹⁵, Midgley¹⁶ en 1969 y Jiang con Ryan¹⁷ en 1969, entre otros, emplearon el método conocido como Radioinmunoensayo para medir a niveles de picogramos, la cantidad de esteroides presentes en líquidos y tejidos biológicos, usando anticuerpos de especificidad relativa¹⁸.

En la síntesis de los hemisuccinatos mencionados, se empleó como materia prima 19-hidroxi-4-androsteno-3,17-diona, tomando en consideración que mediante transformaciones sencillas a la molécula, se pueden obtener las estructuras deseadas; además de ser un producto comercial de fácil adquisición.

Dichas transformaciones se llevaron a cabo tomando en cuenta los antecedentes de la literatura necesarios, de los cuales los de mayor interés para la elaboración de la síntesis de los compuestos ya mencionados se describen a continuación.

Norymberski y colaboradores¹⁹ han descrito un método para la reducción selectiva del carbonilo en la posición 17 del 4-androsteno-3,17-diona, con un 70% de selectividad usando borohidruro de sodio en metanol a 0°. (Fig. 5)

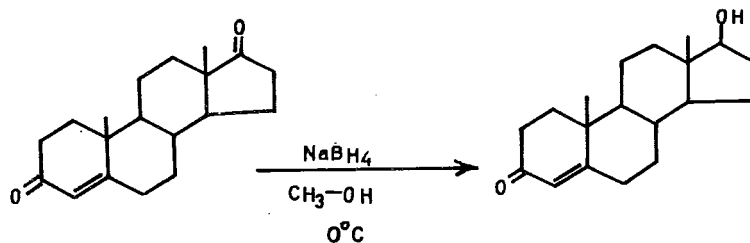


FIG. 5

Existen muchos ejemplos de hidrogenaciones catalíticas en sistemas $\Delta 4,3$ ceto donde se informa de la obtención en cantidades considerables del isómero 5β correspondiente²⁰. Sin embargo, Chiadao Chen²¹ ha informado la obtención del isómero 5α (Fig. 6)

ejemplo:

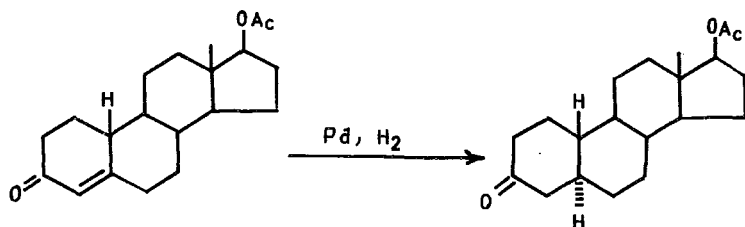


FIG. 6

Otra reacción importante para la síntesis, fue la saponificación selectiva del éster metílico, la cual se llevó a cabo tratando el éster con carbonato de potasio en solución metanólica y a temperatura baja; en estas condiciones la saponificación se efectuó con cierta selectividad. Este método fue seguido por Kalvoda y colaboradores²² y posteriormente por Wicha y Caspi²³ en reacciones de saponificación de acetatos en diferentes posiciones. (Fig. 7)

Los ésteres metílicos pueden sufrir una halogenólisis en presencia de yoduro de litio, usando disolventes como piridina, 2,6-lutidina y 2,4,6-colidina a reflujo; se encuentran descritos ejemplos, donde se pone de manifiesto que tan selectiva

es esta reacción. Por ejemplo Krakower y colaboradores²⁴ informan un rendimiento de 95% en la halogenolisis de un derivado del éster eburicoico. (Fig. 8). Dean²⁵ reporta mejores resultados en cuanto al rendimiento usando dimetilformamida (DMF) como disolvente.

ejemplo:

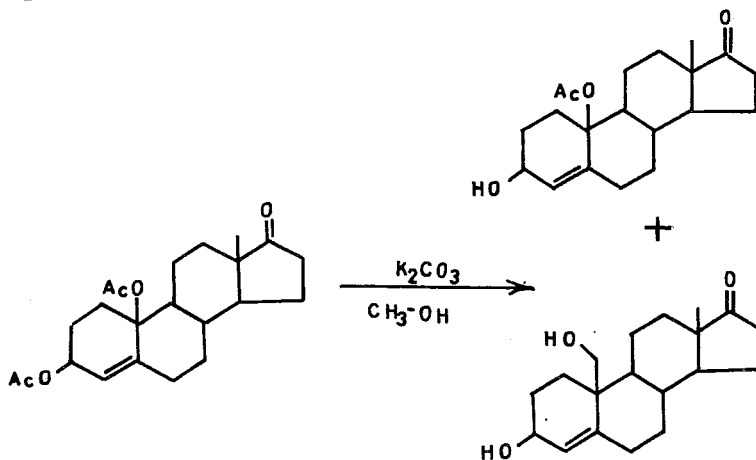


FIG. 7

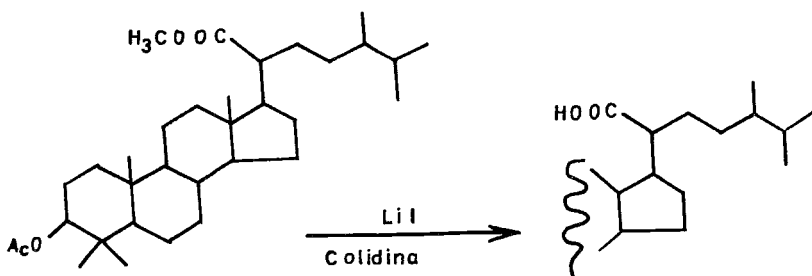


FIG. 8

(*) P A R T E E X P E R I M E N T A L

Obtención de 19-Hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-hemisuc-
cinato (II).

A 5g. de 19-hidroxi-4-androsteno-3, 17-diona (I), se le agregaron 10g. de anhídrido succínico y 50ml. de piridina; la mezcla se mantuvo a temperatura de reflujo durante 3 horas. Se dejó enfriar, se vertió sobre hielo y se dejó reposar hasta que alcanzó la temperatura ambiente, se aciduló con HCl, se extrajo con CHCl_3 y se lavó varias veces con agua.

La solución en cloroformo se extrajo varias veces con solución saturada de NaHCO_3 , los extractos acuosos se lavaron con CHCl_3 y se acidularon con HCl, se precipitó un aceite y éste se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con agua destilada varias veces, se decoloró con carbón activado, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. Se obtuvieron 6g. de un sólido amorfo (91% de rendimiento), este sólido con aspecto de vidrio no cristalizó de varios sistemas de disolventes, presenta una sola mancha en cromatografía en capa delgada y fue caracterizado como 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-

hemisuccinato (II) por sus características espectroscópicas.

I. R. ν max. (KBr película): 3450, ancha (COOH del succinato); 1740, grueso (C=O del éster succínico y C=O de cetona en anillo de 5 miembros); 1675, (C=O conjugado de la enona en el anillo A); 1050, (C-O del éster y el ácido del hemisuccinato).

R. M. N. 60 Mc, TMS externo, DMSO d_6 : 1.24, s 3H (CH₃ 18); sistema AB centrado en 4.76 con J=12cps 2H (CH₂ 19); 6.2, s 1H (C-H vinílico en 4).

E. M. M^+ 402, m/e; 302, 284, 272 es el pico base.

U. V. λ max. 243 (14, 500).

(*) Los puntos de fusión fueron tomados en un aparato Mettler FP y están sin corregir. Los espectros de infrarrojo (I. R.) se hicieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer grating modelo 421; la posición de las bandas se dan en cm^{-1} .

Los espectros de resonancia magnética nuclear (R. M. N.) fue-

ron hechos en un espectrómetro analítico Varian A - 60, empleando TMS como referencia interna. El desplazamiento químico está expresado en partes por millón (ppm) utilizando el parámetro delta (δ). La descripción de los espectros se hizo de la siguiente forma: posición en δ ; tipo de bandas (s=singulete, d= doblete, t= triplete), constante de acoplamiento J en ciclos por segundo (cps).

Los espectros de absorción en el ultravioleta (U. V.), se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer 124.

La λ máxima está dada en nanometros (nm).

Para la cromatografía en capa fina, usada para verificar la pureza de las sustancias o para su purificación, se empleó sílice GF-254 de Merk y empleando como revelador vapores de yodo y luz U. V.

Los microanálisis fueron efectuados por el doctor Alfred Bernhardt de Mulheim (Alemania).

Los espectros de masas fueron hechos en un espectrómetro de masas Hitachi-Perkin-Elmer Modelo RMU-6D y RMU-7H.

La nomenclatura de los compuestos mencionados en este trabajo se escribió siguiendo las reglas de la IUPAC e IUPAC-IUB de nomenclatura en Química Orgánica y Bioquímica²⁶.

Nota:

Agradezco a los señores: químico Eduardo Díaz e ingeniero químico Fernando Jáuregui su valiosa ayuda en la determinación e interpretación de espectros de R. M. N. y masas.

Obtención de 19-Hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-metil-succinato (III).

6g. de 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-hemisuccinato (II) se disolvieron en el menor volumen posible de benceno y se vertieron lentamente sobre una solución etérea de diazometano (obtenido con 8. 1g. de N-nitroso-N-metilurea), se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de diazometano por calentamiento en la campana, se filtró y se eliminó el disolvente hasta sequedad. El residuo se disolvió en benceno (100ml.), se lavó varias veces con solución saturada de NaHCO_3 y finalmente con agua, se secó la solución bencénica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó a sequedad. Se obtuvieron 5g. de un sólido amorfo que no fue posible cristalizar (81% de rendimiento) y que presentó las siguientes características espectroscópicas.

I. R. ν max. (KBr película): 2850, (CH_3O del éster); 1740, (C=O del metilsuccinato y del C=O en el anillo de 5 miembros en 17); 1670, (C=O conjugado de la enona del anillo A); 1050, (C-O de los ésteres del succinato).

R.M.N. 60 Mc. : 0.91, s 3H (CH₃ 18); 2.58, s 4H (CH₂CH₂ del succinato); 3.68, s 3H (CH₃O del metil succinato en 19); sistema AB centrado en 4.45 con J=12cps, 2H (CH₂19); 5.9, s 1H (C-H vinílico en 4)

E. M. M⁺ 416

U. V. λ max. 242 (ϵ =15, 800)

Obtención de 17 β , 19-Dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil-succinato (IV).

A 6.9 g. de 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-metilsuccinato (III) disueltos en 1380ml. de metanol, se le agregaron 1.1 gramos de NaBH₄ (1.8 moles) a temperatura de baño de hielo seco acetona. Se mantuvo la temperatura durante 2 horas y media; la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada. Una vez terminada la reacción se agregaron 2 ml. de AcOH, se dejó reposar durante unos minutos a la misma temperatura y después se dejó a temperatura ambiente. Se evaporó el metanol a presión reducida en un rotavapor y el residuo se disolvió en CHCl₃, se lavó varias veces con agua, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se eliminó el disolvente. Se obtuvieron 6.6g. de un sólido amorfo.

Este sólido se purificó en placas de 3mm de espesor, eluyendo con CHCl₃-Me₂CO, se obtuvieron 4g. de un sólido amorfo que no fue posible cristalizar y que presenta las siguientes características espectroscópicas.

I. R. KBr película ν max.: 3420, (OH en 17); 1740 (C=O del

succinato); 1668, (C=O de la enona en el anillo A); 1050 (C-O de los ésteres del succinato).

R. M. N. 60 Mc : 0.78, s, 3H (CH₃ 18); 1.89, s, 1H (desaparece con D₂O de OH en C-17); 2.58, s, 4H (CH₂CH₂ del succinato); 3.68, s con triplete J=8.5cps, 4H (correspondiente al éster metílico y al protón base de OH 17); sistema AB centrado en 4.45 con J=11.5 cps, 2H (CH₂ 19); 5.9, s, 1H (C-H vinílico en 4).

E. M. M⁺ 418, m/e : 115 en el pico base.

U. V. λ max. 238 (ε =15,401).

Obtención de 17 β , 19-Dihidroxi-3-oxo-5 α -androstando-19-metil succinato (V).

Se sometieron a hidrogenación 2g. de 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV) disueltos en 30 ml. de etanol, usando 50 mg. de Pd/C al 10% como catalizador, a temperatura ambiente y presión ligeramente superior a la atmosférica.

La reacción se controló por cromatografía en capa delgada y fue completa al cabo de 2 horas; terminado ese tiempo se filtró el catalizador y se evaporó el disolvente a sequedad en el rotavapor obteniéndose 1.9 g. de un sólido amorfo que no fue posible cristalizar y que presentó las siguientes características espectroscópicas.

I. R. KBr película, ν max: 3450 (OH en 17); 1732 (C=O de los ésteres del succinato); 1715 (C=O de cetona en anillo de 6 miembros en 3); 1050 (C-O del succinato).

R. M. N. 60 Mc; 0.8, s, 3H (CH₃ 18); 2.68, s con hombro, 5H (CH₂CH₂ del succinato), el hombro desaparece con D₂O (17

OH); 3.7, s, 3H (OCH₃ del metil succinato); 4.5, s, 2H (CH₂
19).

E.M. M⁺ 420 que concuerda con el peso molecular deseado.

Obtención de 3 β , 17 β , 19-Trihidroxi-4-androsteno-19-metil succinato (VI).

600 mg. de 19-hidroxi-3,17-dioxo-4-androsteno-19-metil succinato (III) se disolvieron en 120 ml. de metanol y se trataron con 102 mg. de NaBH_4 (1.8 moles), a temperatura ambiente durante una hora. Terminado ese tiempo se agregaron 0.5 ml. de ácido acético y se evaporó el metanol en un rotavapor. El residuo se disolvió en CHCl_3 y se lavó varias veces con agua; se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó el disolvente. El residuo cristalizó al disolverse en éter, se recrystalizó de acetona-hexano.

Se obtuvieron 365 mg. de un sólido blanco con $\text{pf} = 159.4 - 160.5^\circ$ (rendimiento de 60%) que se identificó como el producto (VI) gracias a sus características espectroscópicas.

I. R. KBr pastilla, ν max: 3360, ancha (OH en 3 y 17); 1732 (C=O de metil succinato).

R. M. N. 100 Mc: 0.8, s, 3H (CH_3 18); 1.95, s, 2H que desaparece con D_2O (OH 3 y 17); 2.62, s, 4H (CH_2CH_2 del succi-

nato); 3.6, t, 1H (C-H base de OH 17); 3.67, s, 3H (OCH₃ del éster succínico); sistema AB centrado en 4.35, J=11 cps (CH₂ 19); 4.1 señal ancha, 1H, que al irradiar a 2.02 se resuelve en doblete con J=2.2 cps (C-H 4).

E.M. Introducción Directa M⁺ 420, pico base m/e 115.

Análisis calculado para C₂₄ H₃₆ O₆ : C, 68.62%; H, 8.62%; O, 22.82%.

Análisis encontrado: C, 68.63%; H, 8.62%; O, 22.78%.

Obtención de 3 β , 17 β , 19-Trihidroxi-5 α -androstano-19-metilsuccinato (VII).

Se hidrogenó 1g. de 3 β , 17 β , 19-Trihidroxi-4-androsteno-19-metilsuccinato (VI) con 100mg. de Pd/C al 10% como catalizador. Se obtuvieron 780mg. de un sólido amorfo que presenta una mancha en cromatografía en capa delgada eluyendo con CHCl_3 , no fue posible cristalizarlo y presentó las siguientes características espectroscópicas.

I. R. KBr película, ν max. : 3420, (OH 3 y 17); 1730 (C=O del succinato); 1150, (C-O de los ésteres).

R. M. N. 60 Mc : 0.72, s, 3H (CH_3 18); 2.0, s, 2H desaparece con D_2O ; 2.68, s, 4H (CH_2CH_2 del succinato); 3.7, s, con señal ancha en la base 5H (CH_3O del éster metílico y bases de OH 3 y 17); 4.35, s, 2H (CH_2 19).

Obtención de 19-Hidroxi-3, 17-dioxo-5 α -androstano-19-metil succinato (VIII).

Se hidrogenaron 600 mg. de 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-metil succinato (III) con 50 mg. de Pd/C al 10% en 30 ml. de etanol, siguiendo la técnica descrita en la pagina 18. Se obtuvieron 509 mg. (84% de rendimiento) de un sólido cristalino que se purificó por cristalizaciones sucesivas de hexano-éter, hasta $pf=144-146^{\circ}$, y presenta las siguientes características espectroscópicas.

I. R. KBr pastilla, ν max. 1740, (C=O de cetona en anillo de 5 miembros y ésteres del metil succinato); 1715, (C=O de cetona en anillo de 6 miembros); 1150, (C-O de los ésteres).

R. M. N. 60 Mc: 0.88, s, 3H (CH₃ 18); 2.65, s, 4H (CH₂CH₂ del succinato); 3.7, s, 3H (OCH₃ del metil succinato); 4.51, s, 2H (CH₂ 19).

E. M. M^{+} 418, pico base m/e 115.

Obtención de 17 β , 19-Dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-hemisuccinato (IX).

(A)* A un gramo de 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV), disueltos en 25 ml. de DMF, se agregaron 7 g. de LiI, se calentó a temperatura de reflujo durante 6 horas y media, después de ese tiempo se comprobó por cromatografía en capa fina que la reacción había terminado. La mezcla de reacción se vertió sobre 150 ml. de agua, se aciduló ligeramente con HCl concentrado, se extrajo con CHCl_3 , los extractos clorofórmicos se lavaron con agua. Por concentrado, se extrajo con CHCl_3 - Me_2CO (6:4) se pudo determinar que la mezcla de reacción fue hemisuccinato y materia prima, por lo cual se extrajo con solución saturada de bicarbonato de sodio varias veces, se lavaron con CH_2Cl_2 los extractos acuosos y éstos fueron acidulados con HCl concentrado hasta pH=1, se extrajo nuevamente con CH_2Cl_2 , se lavó el extracto con agua varias veces, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el disolvente en el rotavapor. Se obtuvieron 400 mg. de un sólido amorfo que no fue posible cristalizar (rendimiento de 40%). Presentó las siguientes características espectroscópicas.

I. R. KBr película, ν max: 3420 muy ancha (COOH del hemisuccinato y OH 17); 1740 (C=O del éster 19 hemisuccinato); 1720 (C=O del ácido); 1670 (de la enona 3); 1160 (C-O del hemisuccinato).

R. M. N. en CDCl_3 - DMSO d_6 a 60 Mc; 0.79, s, 3H (CH_3 18); 2.59, s, 4H ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$ del hemisuccinato); sistema AB centrado en 4.45, $J=11\text{cps}$ (CH_2 19); 5.68, s ancho, 2H que desaparece con D_2O (COOH del hemisuccinato y OH 17); 5.91, s, 1H (C-H vinílico en 4).

U. V. λ max: 242 ($\epsilon = 14,370$).

(B)* A 200 mg. de 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV), disueltos en 20 ml. de metanol, se agregaron 100 mg. de K_2CO_3 disueltos en la menor cantidad posible de agua, se mantuvo durante 3 horas con agitación a temperatura ambiente, al cabo de este tiempo se vertió la solución sobre 100 ml. de agua destilada y se aciduló la mezcla con HCl conc. hasta pH=1, se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó varias veces con agua. De esta solución se extrajo con solución saturada de bicarbonato de sodio el hemisuccinato (IX),

obteniéndose 68 mg. de la parte neutra, secando con sulfato de sodio y eliminando el disolvente en rotavapor, se obtuvieron 120 mg. de un sólido cristalino que se purificó por cristalización de acetona-éter, con $pf=201.5 - 203.6^\circ$, el cual corresponde al informado para la 17 β , 19-dihidroxi-4-androsteno-3-ona (XI) $pf=201-203^\circ$ ^{28, 29}. El compuesto presentó las siguientes características.

I. R. KBr pastilla, ν max; 3300 (OH 17 y 19); 1640 (C-O de la enona 3).

R.M.N. 60 Mc; 0.79, s, 3H (CH₃ 18); 3-3.8, señal ancha que integra para 3H y que al agregar D₂O desaparece dejando un triplete centrado en 3.68 que integra para 1H (C-H base de OH en 17 β); sistema AB centrado a 3.98, J=11 cps (CH₂ 19); 5.89, s, 1H (C-H vinílico 4).

U. V. λ max. 243 ($\epsilon =14,950$).

* A y B, indican diferentes técnicas para obtener el mismo compuesto.

Obtención de 17 β , 19-Dihidroxi-3-oxo-5 α -androstando-19-hemisuccinato (X).

Se hidrogenaron 400mg. de 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-4 androsteno-19-hemisuccinato (IX), disueltos en 40ml. de etanol, usando 100 mg. de Pd C al 10% como catalizador, siguiendo la técnica ya descrita en la página 18. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre 40g. de sílice. De las fracciones eluidas con CHCl₃-acetona 8:2, se aislaron 220mg. de un producto que presenta las siguientes características. Fue un sólido amorfo que no se pudo cristalizar.

I. R. KBr película, ν max.: 3420, ancha (COOH del hemisuccinato y OH 17 β); 1735 (C=O del hemisuccinato 19); 1715 (C=O del ácido y de la cetona en el anillo de 6 miembros 3); 1150 (C-O del éster).

R. M. N. en CDCl₃ - DMSO d₆: 0.79, s, 3H (CH₃ 18); 2.7, s grueso 4H (CH₂CH₂ del succinato); 3.69, señal ancha 1H (C-H base del OH 17); 4.52, s, 2H (CH₂ 19); 6.0, señal muy ancha, 2H que desaparece con D₂O (COOH y OH).

Obtención de 17 β , 19-Dihidroxi-5 α -androstano-3-ona (XII).

Se disolvieron 500 mg. de 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-5 α -androstano-19-metil succinato (V) obtenidos de la reacción anterior, en 25 ml. de metanol y se agregaron 400 mg. de K_2CO_3 disueltos en la mínima cantidad de agua, se calentó a ebullición durante 2 horas. Pasado este tiempo se vertió la solución sobre 150 ml. de agua destilada, se aciduló con HCl conc. y se extrajo con CH_2Cl_2 , éste se lavó varias veces con agua destilada. La fracción orgánica se extrajo con solución saturada de $NaHCO_3$, se aciduló con HCl conc. y se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 anhidro y evaporó el disolvente. De esta fracción se obtuvieron 110 mg. de 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-5 α -androstano-19-hemisuccinato (X).

La fracción de CH_2Cl_2 de la que se extrajo el compuesto (X), se lavó varias veces con agua destilada, se secó con Na_2SO_4 anhidro y evaporó el disolvente. Se obtuvo un sólido blanco que cristalizó de acetona-éter y se recrystalizó de acetona pf=149.4-151.2°, el cual corresponde al informado para 17 β , 19-dihidroxi-5 α -androstano-3-ona (XII) pf=150-151°³¹; además en el espectro de IR aparece la banda en 1700 cm^{-1} ,

la cual aparece tambien informada para este compuesto.

0:

Obtención de 17β , 19-Dihidroxi-3, 5-androstadieno-19-hemisuccinato (XIII).

A un gramo de 3β , 17β , 19-Trihidroxi-4-androstano-19-metil succinato (VI), se disolvió en 20 ml. de DMF, se agregaron 800 mg. de LiI y se mantuvo a reflujo durante 16 horas. Al cabo de este tiempo se observó por cromatografía en capa fina eluyendo con benceno - acetona 1:1 que la reacción había terminado. Se dejó enfriar y se vertió sobre 50 ml. de agua, se aciduló ligeramente y se extrajo con CHCl_3 , se lavó varias veces con agua, se extrajo con solución saturada de NaHCO_3 , se lavó con CHCl_3 los extractos acuosos, se aciduló con HCl conc. y se extrajo con CHCl_3 , se eliminó el disolvente y se obtuvo un sólido blanco que cristalizó de benceno-hexano $\text{pf} = 162-169^\circ$ que posee la estructura del 17β , 19-dihidroxi-3, 5-androstadieno-19-hemisuccinato (XIII) y que presentó las siguientes características.

I. R. KBr pastilla, ν max.: 3320, (COOH del hemisuccinato); 3020, (C-H vinílico 3, 4, 6); 1740, (C=O del succinato); 1700, (del ácido).

R. M. N. en CDCl_3 - $\text{DMSO } d_6$: 0.78, s, 3H (CH_3 18); 2.58, s, 4H (CH_2CH_2 del succinato); 3.62, t, 1H (CH base del alcohol 17 β); sistema AB centrado a 4.12, $J=11$ cps, (CH_2 19); 5.4, señal compleja que integra para 5H y que con D_2O pierde 2H (C-H vinílicos 3, 4 y 6).

U. V. λ max. 234 (ϵ 18,500), el valor calculado es de 234.

Obtención de 3 β , 17 β , 19-Trihidroxi-4-androsteno-19-hemisuccinato (XIV).

A un gramo de 3 β , 17 β ; 19-trihidroxi-4-androsteno-19-metil succinato (VI) disueltos en 50 ml. de metanol, se agregaron 500 mg. de K₂CO₃ disueltos en la menor cantidad de agua posible, se dejó agitando por 5 horas a 10°. Terminado este tiempo se vertió la solución sobre 150 ml. de agua destilada, se aciduló con ácido clorhídrico conc., se extrajo con CH₂Cl₂ varias veces, se lavó con agua a los extractos orgánicos, y se extrajo el hemisuccinato con solución saturada de NaHCO₃, se aciduló el extracto acuoso con HCl, se extrajo con CH₂Cl₂, se lavó varias veces con agua, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente. Se obtuvieron 430 mg. de un sólido que cristalizó de acetona -éter pf=164.5-165.2°, presentó las siguientes características.

I. R. KBr pastilla, ν max : 3380 (OH 3 β , 17 β y COOH del Hemisuccinato); 1735 (C=O del succinato); 1700 (C=O, del grupo ácido).

R. M. N. CDCl₃ - DMSO d₆ : δ . 75, s, 3H (CH₃, C-18); 2.62,

s, 4H (CH₂CH₂ del succinato); 3.62, t, J=8 cps, 1H (hidrógeno base del OH en C-17); 4.09, t, J=6 cps, 1H (hidrógeno base del OH en C-3); 4.38, sistema AB con J=11 cps, 2H (CH₂ en C-19); 5.54, s, ancho con señal en la base, 3H (1H, corresponde al protón vinílico, y los 2H restantes a los OH de C-3 y C-17).

De la fracción CH₂Cl₂ que no se extrajo con NaHCO₃, lavando varias veces con agua, secando con Na₂SO₄ y eliminando el disolvente, se obtuvieron 550 mg. de un sólido blanco que se purificó por cristalización de acetona-éter pf=204.5-206.5 y que corresponde al informado para 4-androsteno-3 β , 17 β , 19-triol (XV) pf=202-205°28, 33.

Obtención de 3β , 17β , 19-Trihidroxi- 5α -androstano-19-hemisuccinato (XVI).

A 200 mg. de 3β , 17β , 19-trihidroxi- 5α -androstano-19-metil succinato (VII) disueltos en 50 ml. de metanol, se agregaron 100 mg. de K_2CO_3 , siguiendo la técnica descrita en la página 28 se obtuvieron 97 mg. de un sólido blanco que cristalizó de acetona-éter $pf= 149-151.5^\circ$ y presenta las siguientes características.

I. R. KBr pastilla, ν max : 3420 muy intensa (COOH del succinato y OH 3β y 17β); 1730 (C=O del éster succínico); 1715 (C=O de ácido); 1160 (C-O del éster).

R.M.N. $CDCl_3$ - $DMSO d_6$, 60 Mc : 0.78, s, 3H (CH_3 18); 2.69, s, 4H (CH_2CH_2 del succinato); 3.68, t, 2H (C-H bases de OH 3β y 17β); 4.38, s, 2H (CH_2 19); 5.78, señal ancha 3H que desaparece con D_2O (COOH, OH 3β y 17β).

De 100 mg. de 3β , 17β , 19-trihidroxi-4-androsteno-19-hemisuccinato (XIV), por hidrogenación catalítica en las condiciones ya descritas en la página 18 se obtuvo el mismo compuesto (XVI).

Obtención de 19-Hidroxi-3, 17-dioxo-5 α -androstano-19-hemisuccinato (XVII).

Un gramo de 19-hidroxi-3, 17-dioxo-5 α -androstano-19-metil succinato (VIII) disuelto en 50 ml. de DMF y 5 g. de LiI, se mantuvo a reflujo 4 horas y siguiendo la técnica descrita en la página 30 se obtuvieron 750 mg. de un sólido blanco que se purificó por cristalización de éter-hexano $pf = 149.9-150.5^\circ$. Presentó las siguientes características.

I. R. KBr pastilla, ν max : 3420 ancha (COOH del hemisuccinato); 1740, (C=O de cetona en el anillo de 5 miembros); 1715 (C=O de cetona en el anillo de 6 miembros y C=O del ácido); 1050 (C-O del éster).

R.M.N. $CDCl_3$ 60 Mc : 0.85, s, 3H (CH_3 18); 2.65, s, 4H (CH_2-CH_2 del succinato); 4.5, s, 2H (CH_2 19); 9.0, s ancho que desaparece con D_2O , 1H (COOH del hemisuccinato).

E.M. M^+ 404, pico base m/e 108.

DISCUSION Y RESULTADOS

La reacción entre la 19-hidroxi-4-androsteno-3, 17-diona (I) y el anhídrido succínico en solución piridínica, produce el 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-hemisuccinato (II) como un sólido amorfo identificado por sus reacciones químicas y sus datos espectroscópicos. Así su espectro en el I. R. muestra bandas a 3450 cm^{-1} muy ancha (vibraciones longitudinales O-H) que se asigna al grupo COOH del hemisuccinato, a 1740 cm^{-1} señal gruesa (vibraciones longitudinales C=O) que corresponde a la cetona en C-17 y al carbonilo del éster succínico, a 1720 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) del grupo ácido del hemisuccinato, a 1675 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O de cetona $\alpha\beta$ no saturada) que corresponde a la cetona en C-3 y finalmente a 1050 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C-O) que se asigna al éster succínico. El espectro de R. M. N. presenta: una señal sencilla a $0.92\ \delta$ que integra para 3H (CH_3 , en C-18); señal sencilla a $2.46\ \delta$ que integra para 4H ($-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) que indica la presencia del hemisuccinato en la molécula; un sistema AB centrado en $4.5\ \delta$ con $J=11$ cps que integra para 2H ($-\text{CH}_2-$) en C-19 lo cual rectifica que el grupo hemisuccinato se unió en el carbono 19 del esteroide; una se-

ñal sencilla en 5.91 δ que integra para 1H el cual se asignó al hidrógeno vinílico en la posición C-4.

La solubilidad del compuesto (II) en base (NaHCO_3 acuosa) y la formación de un éster metílico por su reacción con diazometano²⁷ revelan la presencia del grupo COOH. El espectro de U. V. presenta λ_{max} . 237 ($\epsilon = 14,500$) lo cual confirma la presencia del doble enlace en C-4 conjugado a la cetona en la posición 3 del esteroide. El espectro de masas presenta ion molecular a m/e 402 que corresponde al peso molecular del compuesto (II).

Un problema que obstaculizó la purificación de los C-19 hemisuccinatos fue obviamente su elevada polaridad y la fácil descomposición en los adsorbentes, no obstante se intentó purificarlos con adsorbentes desactivados, pero la purificación resultó deficiente. Para evitar este problema se preparó un derivado (éster metílico) el cual es posible purificar con menos dificultad y posteriormente por una reacción selectiva de halogenolisis o saponificación permite la síntesis de los C-19 hemisuccinatos.

Para formar el derivado 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-metil succinato (III), se efectuó una metilación del compuesto (II) usando diazometano²⁷ en éter como agente alquilante. El éster metílico (III) es un sólido amorfo insoluble en NaHCO_3 acuoso; su espectro en el I. R. presenta bandas a 2850 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C-H) que comprueba la presencia del grupo metoxilo del éster; a 1740 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) de la cetona en C-17 y los ésteres del grupo metil succinato en la molécula; a 1670 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) de los ésteres presentes en el esteroide. En R. M. N. a 60 Mc. muestra en 0.91δ señal sencilla que integra para 3H (CH_3 , en C-18); otra señal sencilla en 2.58δ que integra para 4H ($-\text{CO}-\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{CH}_2}-$) del grupo succinato; en 3.68δ una señal sencilla que integra para 3H ($-\text{OCH}_3$), lo cual comprueba la presencia del éster metílico; sistema AB centrado en 4.45δ con $J=12$ cps que integra para 2H asignados al C-19; finalmente en 5.9δ una señal sencilla que integra para 1H que indica la presencia del protón vinílico en C-4.

El espectro de U. V. presenta $\lambda \text{ max. } 237$ ($\epsilon = 15,800$) lo que confirma la presencia de la cetona $\alpha\beta$ no saturada del anillo A. Su espectro de masas muestra ion molecular a m/e 416

que corresponde al peso molecular del compuesto (III).

Usando como materia prima el 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-metil succinato (III), se efectuó una reducción selectiva¹⁹ del carbonilo en la posición 17 del esteroide. La reducción selectiva de la 19-hidroxi-4-androsteno-3, 17-diona (I) con NaBH_4 en metanol ya ha sido informada previamente por Norymberski¹⁹ con un 70% de rendimiento en C-17. El compuesto 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV), mostró esa selectividad, aislándose de esta reacción el 3, 17-diol respectivo (VI) de $\text{pf}=159.4-160.5^\circ$, en un 30% aproximadamente; esta substancia se caracterizó por sus datos espectroscópicos. Su espectro de I. R. muestra absorción a 3360 mc^{-1} (vibraciones longitudinales O-H) de los grupos hidroxilo en C-3 β y C-17 β ; a 1732 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) se asignó a los grupos éster del metil succinato. En R. M. N. a 100 Mc. presenta una señal sencilla en 0.8δ que integra para 3H (CH_3 , en C-18); una señal sencilla en 1.95δ que integra para 2H y que desaparece con D_2O lo que indica se trata de los protectores hidroxílicos presentes en el esteroide; estos datos junto con los ya mencionados en la parte experimental confirmaron la estructura del 3 β , 17 β

19-trihidroxi-4-androsteno-19-metil succinato (VI) aislado de la reducción.

Después de algunos experimentos negativos utilizando otros disolventes (etanol, isopropanol en lugar de metanol), se encontró finalmente que una mejor selectividad se podría alcanzar si se verificaba la reacción a temperatura más baja ($\approx -78^\circ$). El producto así obtenido se purificó por cromatografía en capa fina (para separarlo de materia prima y pequeñas cantidades del 3, 17-diol) obteniéndose el producto deseado 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV), con un 40% de rendimiento. La caracterización de esta substancia se hizo por los métodos usuales; su espectro de I. R. presentó absorción a 3420 cm^{-1} (vibraciones longitudinales O-H) que se asignó al grupo hidroxilo en la posición C-17 β , a 1740 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) se asignó a los grupos carbonilo de los ésteres del succinato; a 1668 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O de cetona $\alpha\beta$ no saturada) de la cetona en C-3. En R. M. N. a 60 Mc. presenta: en $0.78\ \delta$ una señal sencilla que integra para 3H (CH₃, en C-18); en $1.89\ \delta$ señal sencilla que integra para 1H, que desaparece con D₂O, lo cual confirma la presencia del OH en C-17 β ; en $2.58\ \delta$ señal sencilla que

integra para 4H (-CO-CH₂CH₂-); en 3.68 δ señal sencilla sobrepuesta a un triplete en la base que integra para 4H, de los cuales 3 de ellos se asignan al (-OCH₃) y uno al hidrógeno base del hidroxilo en C-17β ; un sistema AB centrado en 4.45 δ con J=11.5 cps que integra para 2H y se asigna al (-CH₂-) en C-19; en 5.9 señal sencilla ancha que integra para 1H correspondiente al protón vinílico en C-4. El espectro de U. V. presenta λ max. 238 (ε =15,400) lo que nos confirma la presencia de la cetona αβ no saturada. El espectro de masas presenta ion molecular a m/e 418 que corresponde a la fórmula C₂₄ H₃₆ O₆.

Estos datos están de acuerdo con la estructura propuesta para el 17β, 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV).

Posteriormente se buscó una técnica adecuada para llevar a cabo hidrogenaciones catalíticas en sistemas 4,3 ceto²¹, sin embargo en los trabajos publicados se obtuvieron mezcla de productos 5α y 5β, usando Pd/C como catalizador. No obstante Knox y colaboradores³¹ informan del caso de la 19-hidroxi-4-androstendiona, en la cual al hidrogenar los C-19 és-

teres se observa una clara tendencia a incrementar la cantidad del isómero 5α . En nuestros compuestos tanto hemisuccinatos como metil succinatos, al ser hidrogenados con Pd/C al 10% nos dio como producto principal el isómero 5α , esto posiblemente se debió a que el sustituyente en C-19 es un grupo grande y facilita la formación del isómero AB trans.

El compuesto 17β , 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV) se sometió a una hidrogenación catalítica con Pd/C al 10%, temperatura ambiente y presión ligeramente superior a la atmosférica durante dos horas y media, dando como producto un sólido amorfo que no cristalizó y se identificó por sus datos espectroscópicos como el compuesto 17β , 19-dihidroxi-3-oxo- 5α -androstano-19-metil succinato (V).

En el I. R. mostró bandas a 3450 cm^{-1} (vibraciones longitudinales O-H) correspondiente al OH en C- 17β ; a 1732 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) que se asigna a los carbonilos de los ésteres del succinato; en 1715 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) que se asigna a la cetona en el anillo de 6 miembros en la posición C-3, lo que nos demuestra que el doble enlace en C-4 no está. En R.M.N. a 60 Mc. presenta en 2.68δ

una señal sencilla sobrepuesta a una señal ancha que desaparece con D_2O e integra para 5H, de los cuales 4 de ellos se asignan a $(-CO-\underline{CH}_2\underline{CH}_2-)$ y el hidrógeno restante al OH en C-17 β ; otra señal importante que indicó el cambio de estructura en la molécula fue en 4.5 δ una señal sencilla que integra para 2H y que se asignó al $(-CH_2-)$ en C-19. El espectro de masas presenta ion molecular a m/e 420 que corresponde al peso molecular del compuesto (V). Con estos datos incluyendo los de la parte experimental, se identificó plenamente el derivado 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-5 α -androstano-19-metil succinato (V).

Al compuesto 3 β , 17 β , 19-trihidroxi-4-androsteno-19-metil succinato (VI) se le hidrogenó en las condiciones descritas en la página 22 y se obtuvo un sólido amorfo que se identificó por sus datos espectroscópicos como el compuesto 3 β , 17 β , 19-trihidroxi-5 α -androstano-19-metil succinato (VII). Así su espectro en el I. R. muestra bandas a 3420 cm^{-1} (vibraciones longitudinales O-H) que se asignan a los grupos hidroxilo en C-3 β y C-17 β a 1730 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) que corresponde a los grupos carbonilo de los ésteres del succinato. En R. M. N. a 60 Mc. presenta en 2.0 δ una señal sen-

cilla que integra para 2H y que desaparece con D_2O lo que indica se trata de los protones hidroxílicos en C-3 β y C-17 β ; a 3.7 δ una señal sencilla con señal ancha en la base que integra para 5H de los cuales 3 de ellos corresponden al (-OCH₃) y los 2 restantes a los hidrógenos base de los alcoholes en C-3 β y C-17 β . En la parte experimental se describen todos los datos espectroscópicos que ayudaron a la identificación del compuesto (VII).

Para completar la serie de derivados metil éster, se hidrogenó en las condiciones descritas en la página 23 el compuesto 19-hidroxi-3, 17-dioxo-4-androsteno-19-metil succinato (III) obteniéndose en este caso un sólido blanco con $pf=144-146^\circ$ que se identificó como el 19-hidroxi-3, 17-dioxo-5 α -androstaño-19-metil succinato (VIII). El espectro de I. R. mostró absorción a 1740 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) se asignó a la cetona en C-17 y los carbonilos de los ésteres del succinato; a 1715 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) de la cetona en C-3, lo que nos indica que desapareció la conjugación con la doble ligadura en C-4; en 1150 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C-O) de los ésteres del succinato. En R. M. N. a 60 Mc. desaparece el sistema AB y en su lugar a 4.51 δ presenta

una señal sencilla que integra para 2H que se asigna al (-CH₂-) en C-19. El espectro de masas presenta ion molecular a m/e 418 que corresponde al peso molecular del compuesto (VIII). El análisis elemental fue correcto para C₂₄ H₃₄ O₆. (Todos los datos espectroscópicos se describen en la parte experimental).

La siguiente reacción necesaria en la síntesis, debería eliminar selectivamente el éster metílico y formar el hemisuccinato correspondiente. Esto sería posible hidrolizando el éster metílico con K₂CO₃ en solución metanólica a temperatura ambiente o bien empleando reacciones como halogenolisis²⁵ cuyo mecanismo de reacción es un ataque nucleofílico del ion haluro del LiI, al átomo de carbono del metilo, llevando un papel muy importante el disolvente DMF (N, N-dimetil formamida) en la eficiencia de la reacción.

La preparación del compuesto 17β, 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-hemisuccinato (IX) se efectuó a partir del derivado 17β, 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-metil succinato (IV) mediante una halogenolisis con yoduro de litio en exceso y DMF a reflujo durante seis horas y media. Se obtuvo un só-

lido amorfo que no fue posible cristalizar y presentó las siguientes características espectroscópicas. El espectro de I. R. mostró absorción a 3420 cm^{-1} muy ancha (vibraciones longitudinales O-H) se asigna al grupo OH en C-17 β y al grupo carboxílico del hemisuccinato; a 1740 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) del grupo carbonilo del éster en el hemisuccinato, a 1720 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) se asigna al carbonilo del grupo ácido del hemisuccinato; a 1670 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O de cetona α no saturadas) de la cetona en C-3; a 1160 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C-O) del grupo éster y hemisuccinato. En R. M. N. a 60 Mc. presenta: una señal sencilla en $0.79\ \delta$ que integra para 3H del (CH_3 , en C-18); en $2.59\ \delta$ señal sencilla que integra para 4H ($-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$); un sistema AB centrado en $4.45\ \delta$ con $J=11$ cps que integra para 2H ($-\text{CH}_2-$) en C-19; en $5.68\ \delta$ una señal sencilla ancha que integra para 2H y que desaparece con D_2O , esta señal se asigna al OH en C-17 β y al COOH del hemisuccinato; en $5.91\ \delta$ señal sencilla que integra para 1H y que pertenece al protón vinílico en C-4.

El espectro de U. V. presenta λ_{max} 239 ($\epsilon=14,000$) lo que comprueba la presencia de la cetona $\alpha\beta$ no saturada en C-3.

Estos datos permitieron identificar plenamente al compuesto (IX).

Para confirmar la estereoquímica del grupo hidroxilo en la posición C-17 del esteroide, se efectuó una saponificación²³ con K_2CO_3 en solución metanol-agua, dando como resultado la hidrólisis del éster metílico al hemisuccinato con una selectividad de 40% y la formación de la 19-hidroxi testosterona la cual aparece informada con $pf=201-203^\circ$ ^{28, 29, 30 y 32} que coincide con el obtenido. Esto nos confirmó que los compuestos reducidos en C-17 corresponden a los 17β alcoholes.

De la hidrogenación catalítica efectuada al compuesto 17β , 19-dihidroxi-3-oxo-4-androsteno-19-hemisuccinato (IX), se obtuvo un sólido amorfo que no fue posible cristalizar y se identificó como el 17β , 19-dihidroxi-3-oxo-5 α -androstano-19-hemisuccinato (X). A continuación se describen algunos de los datos espectroscópicos que junto con los ya mencionados en la parte experimental ayudaron a la identificación del compuesto (X). En el espectro de I. R. mostró absorción a 3420 cm^{-1} muy ancha (vibraciones longitudinales O-H) se asignó al grupo OH en C- 17β y al COOH del hemisuccinato; a 1735

cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) de los grupos carbonilo del hemisuccinato; a 1715 cm^{-1} (vibraciones longitudinales (C=O) de la cetona en la posición C-3 del esteroide lo confirma que ya no hay insaturación en C-4. En R.M.N. a 60 Mc. presenta en 4.52δ una señal sencilla que integra para 2H y que se asigna al (-CH₂-) en C-19, nuevamente en este caso no aparece el sistema AB; en 6.0δ una señal muy ancha que integra para 2H que desaparece con D₂O y por lo tanto se asigna al grupo OH en C-17 β y al COOH del hemisuccinato.

A fin de comprobar que en las hidrogenaciones catalíticas²¹ se forma como producto principal el isómero 5 α , se sometió a saponificar en condiciones más fuertes (temperatura más elevada y con exceso de K₂CO₃) el compuesto 17 β , 19-dihidroxi-3-oxo-5 α -androstano-19-metil succinato (V), reacción de la que se obtuvo como producto principal el 17 β , 19-dihidroxi-5 α -androstano-3-ona (XII), sólido cristalino con pf= 149-151.2° el cual aparece informado en la literatura³¹ como el isómero 19-hidroxi-5 α -dihidrotestosterona (XII); con lo cual se confirman las estructuras propuestas para los compuestos C-19 hemisuccinatos y metil succinatos sometidos a hidrogenación catalítica.

Al intentar obtener el compuesto $3\beta, 17\beta, 19$ -trihidroxi-4-androsteno-19-hemisuccinato (XIV) por medio de una halogenolisis del compuesto $3\beta, 17\beta, 19$ -trihidroxi-4-androsteno-19-metil succinato (VI), se obtuvo accidentalmente el compuesto $17\beta, 19$ -dihidroxi-3,5-androstadieno-19-hemisuccinato (XIII). Se explica la formación de este compuesto debido que el alcohol alílico en la posición 3 del esteroide se deshidrata fácilmente en presencia de trazas de ácido o de álcali para formar dienos³⁴.

El producto obtenido de esta reacción fue un sólido cristalino de $mp=162-169^\circ$, que se identificó por sus datos espectroscópicos. El espectro de I. R. mostró absorción a 3320 cm^{-1} (vibraciones longitudinales O-H) se asigna al grupo OH en C- 17β y al COOH del hemisuccinato, a 3020 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C-H vinílico) que se asignaron a las uniones en C-3, C-4 y C-6; a 1740 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) del grupo éster del hemisuccinato; a 1700 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) que corresponde al grupo ácido del hemisuccinato. El espectro de R. M. N. a 60 Mc. presenta en 0.78δ una señal sencilla que integra para 3H (CH_3 , en C-18); en 2.58δ señal sencilla que integra para 4H ($-\text{CO}-\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{CH}_2}-$); en

3.62 δ un triplete que integra para 1H y se asigna al hidrógeno base del alcohol en C-17 β ; un sistema AB centrado en 4.12 con J=11 cps que integra para 2H correspondientes al (-CH₂-) en C-19; en 5.4 δ señal compleja que integra para 5H de los cuales 2 de ellos desaparecen con D₂O y se asignan al OH en C-17 β y al COOH del hemisuccinato, y los 3 hidrógenos restantes pertenecen a protones vinílicos de C-3, C-4 y C-6.

En el espectro de U. V. presenta λ max. 234 (ϵ =18,500) que en comparación con el 3,5 Colestadieno³⁵ que tiene una ϵ =20,000. Estos datos comprobaron la estructura propuesta para el compuesto (XIII).

En vista que la halogenólisis no funcionó para darnos el compuesto deseado, se probó la saponificación²³ del éster metílico con K₂CO₃ en solución metanólica. Esta reacción favoreció la formación del compuesto 4-androsteno-3 β , 17 β , 19-triol (XV), sólido cristalino con un pf=205-206.5° y que corresponde al informado^{28, 33} para dicho compuesto; además se formó un 40% de 3 β , 17 β , 19-trihidroxi-4-androsteno-19-hemisuccinato (XIV), que se identificó por sus datos espectroscópicos. En el espectro de I. R. muestra absorción a 3380 cm⁻¹

muy ancha (vibraciones longitudinales O-H) que corresponden a los grupos OH en C-3 β , 17 β y al COOH del hemisuccinato; a 1735 cm⁻¹ (vibraciones longitudinales C=O) del éster del hemisuccinato; a 1700 cm⁻¹ (vibraciones longitudinales C=O) que se asigna al grupo ácido del hemisuccinato. En R.M.N. las señales más interesantes fueron en 3.62 δ una señal triple mal formada con J=8 cps que integra para 1H y se asigna al protón base del hidroxilo en C-17 β ; en 4.09 δ otra señal triple mal formada que integra para 1H y se asigna al hidrógeno base del OH en C-3; en 5.54 δ aparece una señal sencilla ancha que integra para 2H de los cuales uno pertenece al protón vinílico en C-4 y el otro al OH en C-17 β , además en la base de dicha señal aparece otra mal formada y se asigna al OH en C-3 ya que desaparece con D₂O.

Para preparar el compuesto 3 β , 17 β , 19-trihidroxi-5 α -androstano-19-hemisuccinato (XVI) se efectuó la hidrogenación catalítica del 3 β , 17 β , 19-trihidroxi-4-androsteno-19-hemisuccinato (XIV). Otro camino para obtenerlo fue mediante la saponificación²³ de su éster metílico (VII) con K₂CO₃ en solución metanólica, obteniéndose por ambos caminos un sólido cristalino con pf=149-152° que presenta las siguientes característi-

cas. En el espectro de I. R. presenta absorción a 3420 cm^{-1} muy ancha (vibraciones longitudinales O-H) de los grupos OH en C-3 β , C-17 β y el COOH del hemisuccinato; a 1730 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) banda que se asignó al carbonilo del éster en el hemisuccinato; a 1715 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) correspondiente al COOH del hemisuccinato. En R. M. N. a 60 Mc. las señales más interesantes fueron: en 3.68 δ señal compleja que integra para 2H y se asignó a los protones base de los OH en C-3 β y C-17 β en 4.38 δ una señal sencilla que integra para 2H que corresponde al (-CH₂-) en C-19 y a 5.78 δ una señal ancha que integra para 3H que desaparece con D₂O lo cual indica se trata de protones hidroxílicos en C-3 β , C-17 β y al COOH del hemisuccinato.

Finalmente se obtuvo el 19-hidroxi-3,17-dioxo-5 α -androsta-
no-19-hemisuccinato (XVII) empleando para ello el correspondiente éster metílico (VIII) como materia prima. La ruptura del grupo éster se hizo mediante una halogenólisis²⁵ con un rendimiento de 77%. También se probó la saponificación²³ con K₂CO₃ en solución metanólica con un rendimiento de 61% del compuesto (XVII).

En ambos casos se obtuvo un sólido cristalino con $pf=149-150.2^\circ$ que se identificó por sus datos espectroscópicos. En el I. R. presentó absorción a 3420 cm^{-1} muy ancha (vibraciones longitudinales O-H) banda que se asigna al grupo COOH del hemisuccinato; a 1740 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) que pertenece a la cetona en C-17; a 1715 cm^{-1} (vibraciones longitudinales C=O) correspondiente a la cetona en C-3 y al carbonilo del COOH en el hemisuccinato. En R. M. N. a 60 Mc. presenta a $0.85\ \delta$ una señal sencilla que integra para 3H (CH_3 , en C-18); en $2.65\ \delta$ señal sencilla que integra para 4H del ($-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$); nuevamente en este caso en lugar del sistema AB aparece en $4.5\ \delta$ una señal sencilla que integra para 2H correspondientes al ($-\text{CH}_2-$) en C-19 y en $9.0\ \delta$ una señal sencilla ancha que desaparece con D_2O e integra para 1H el cual se asigna al COOH del hemisuccinato. El espectro de masas presenta ion molecular a $m/e\ 404$ que corresponde al peso molecular del compuesto (XVII) el cual quedó identificado satisfactoriamente.

RESUMEN

Se prepararon los C-19-Hemisuccinatos descritos a continuación, con objeto de que pudieran formarse conjugados con proteínas y éstos sirvieran como antígenos que generaran la producción de anticuerpos específicos contra las hormonas correspondientes.

Estos fueron los C-19-Hemisuccinatos de: testosterona (IX), de 5, α -dihidrotestosterona (X), de 4-androsteno-3, 17-diona (II) y 4-androsteno-3 β , 17 β -diol (XIV). Como se encontraron los C-19 Hemisuccinatos de 5 α -androstano-3 β , 17 β -diol (XIV) y el 5 α -androstano-3, 17-diona (XVII), además se contó con la obtención accidental del C-19 Hemisuccinato de -3, 5-androstadién-17 β -ol (XII).

Para la síntesis de estos compuestos hubo la necesidad de preparar el derivado metil éster correspondiente, debido a que los hemisuccinatos son compuestos muy polares y es difícil su purificación. Las reacciones utilizadas para la síntesis de los compuestos antes mencionados, son descritas en los esquemas 1, 2, 3 y 4.

B I B L I O G R A F I A

- (1) Boyd W. C., "Introduction to Immunochemical Specificity". Interscience., John Willey & Sons, Inc., N. York. (1962).
- (2) Landsteiner K., "The Specificity of Serological Reactions". Dover Publications, Inc., N. Y. (1962).
- (3) Sachs H. and A. Klopstock., Biochem. Z., 159, 491-501, (1925).
- (4) Mooser H. and R. K. Grilichess., Schweiz. Z. Allgem Pathol. u. Bakteriolog., 4. 375 - 380 (1941).
- (5) Landsteiner K., "Specificity of Serological Reactions". Cambridge Mass., Harvard University Press. (1946).
- (6) Sprunt D. H., A. D. Dulaney and R. Conger., Cancer Res. 11, 282 (1951).
- (7) Erlanger B. F., F. Borek, S. M. Beiser and S. Lieberman. Biol. Chem., 228, 713-727 (1957).
- (8) Erlanger B. F., F. Borek, S. M. Beiser and S. Lieberman. J. Biol. Chem., 234, 1090-1044 (1959).
- (9) Beiser S. M., B. Erlanger, F. Agate and S. Lieberman., Science., 129, 564-565 (1959).
- (10) Lieberman S., B. F. Erlanger, S. M. Beiser and F. Agate. Recent. Progr. Hormone Res., 15, 165-200 (1959)
- (11) Goodfriend L. and A. H. Schon., Canad. J. Biochem. Physiol., 36, 1177-1184 (1958).
- (12) Goodfriend L. and. A. H. Schon., Nature London., 185, 764-766 (1960).
- (13) Goodfriend L. and. A. H. Schon., Canad. J. Biochem. Physiol., 39, 941-960 (1961).

- (14) Abraham G. E., American Endocrine Society., 51, st Meeting (1969).
- (15) Abraham G. E. and Odell., "Immunological Methods in Steroids Determinations"., Appleton-Century-Crofts, N. Y. (1970).
- (16) Midgley A. R., Niswender G. D. and Rain J. S., Steroids 13, 731 (1970).
- (17) Jiang N. S. and Ryan R. J., Mayo Clinic Proc. 44, 461- (1969).
- (18) Caldwell, Scaramuzzi, Tillson and Thorney Croft., "Immunologic methods in steroids determination". Appleton Century-Crofts. (1970).
- (19) Norymberski J. K. and G. F. Woods., J. Chem. Soc., 3426, (1955).
- (20) Guzmán A., Tesis Doctoral U. N. A. M.
- (21) Chiadao Chen., Chem. C. Tetrahedron., 3, 43, (1958).
- (22) Kalvoda J., K. Heusler, H. Ueberwasser, G. Anner and A. Wettstein., Helv. Chim. Acta., 44, 1361 (1963).
- (23) Wicha J. and E. Caspi., J. Org. Chem., 45, 707 (1967).
- (24) Krakower G. W., J. W. Brown and J. Fried., J. Org. 27, 4710 (1962).
- (25) Dean P. D. G., J. Chem. Soc., 6655 (1965).
- (26) IUPAC comission on the nomenclature of Organic Chemes-try and IUPAC-IUB comission on Biochemical nomenclatu-re., Steroids, 13, 277-309 (1967).
- (27) Arndt F., Org. Syn., Coll. Vol 2, 461 y 165 (1943).
- (28) Ehrenstein M. and K. Otto., J. Org. Chem., 24, 2006-12, (1959).

- (29) Narasimha P. R. and L. R. Axelrod., J. Org. Chem., 27, 4694-6 (1962).
- (30) Wettstein A., G. Anner, K. Heusler, J. Kalvoda and H. Ueberwasser., (CIBA Corp.) U.S. Pat. 3, 007, 482 (1963).
- (31) Knox L.H., E. Blossey, H. Carpio, L. Cervantes, P. Crabbé, E. Velarde and J.A. Edwards., J. Org. Chem. Vol. 30., 2198-2205 (1965).
- (32) Heusler K., J. Kalvoda, Ch. Meystre, H. Ueberwasser, P. Wieland, G. Anner and A. Wettstein., (CIBA Corp.) Aktienges, Basel, Switz., Experientia 18, 464-6 (1962).
- (33) Alvarez F., (Syntex Corp. México) U.S. Pat. 3, 248, 407 (1966).
- (34) Klyne, W., "Química de los Esteroides"., Comp. Ed. Continental, S. A., España. (1970).
- (35) Fieser F. Louis and M. Fieser., "Steroids"., Reinhold Publishing Corp., N. Y., 165, (1959).
- (36) Pérez Tamayo R., C. Larralde., R. Kretschmer S., "Inmunología"., La Prensa Médica Mexicana., México (1968).
- (37) Fieser L. and M. Fieser., "Reagents for Organic Syntheses"., John Willey * Sons, Ed. Inc., N. Y. (1967).
- (38) Koji Nakanishi., "Infrared Absorption Spectroscopy"., Holden-Day, Inc., San Francisco (1962).
- (39) Joseph Nathan y E. Díaz., "Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear"., Ed. Limusa-Wiley S. A., México (1970).
- (40) Silverstein Robert M., and G. Clayton Bassler., "Spectrometric Identification of Organic Compounds"., John Willey & Sons, Inc., New York (1967).