



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Informe de la Síntesis de la 19-Diazoetil-5-Androst-2-Eno-17, 19-Diona

Síntesis de Conjugados de Albúmina de Suero de Bovino con Hemisuccinatos de 19-Hidroxiprogesterona y 19-Hidroxipregnenolona

380

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A
Elvia del Socorro Reynoso Herrera
MEXICO, D. F. 1976



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.

CLAS Tesis
AÑO 1976
FECHA _____
PROG. U.T.

362



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dra. Elvira Santos de Flores
VOCAL:	Dra. Rocio Pozas Horcasitas
SECRETARIO:	Dr. Victor Manuel Coronado Bravo
1er. SUPLENTE:	Quím. Mauro Cruz Martínez
2° SUPLENTE:	Quím. Irma Korkowski de Arnaud

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

FACULTAD DE QUIMICA

U.N.A.M.

SUSTENTANTE:	Elvia del Socorro Reynoso Herrera
ASESOR DEL TEMA: I	Dra. Elvira Santos de Flores
SUPERVISOR TECNICO:	Dr. Victor Manuel Coronado Bravo

A mis padres

a mis hermanas

a mis tías

a mi abuelito

a mis amigos

con mucho cariño

A la Dra. Elvira Santos de Flores y al Dr.
Victor Coronado, sinceramente muchas graci
cias por sus valiosos consejos.

De manera muy especial agradezco al Dr.
J. A. Bermúdez y a la Srta. Quím. Claud
dia León por su ayuda desinteresada.

C O N T E N I D O

PRIMERA PARTE

Informe de la síntesis de la 19-diazoetil-5-androst-2-eno-17-19-diona.

Bibliografía.

SEGUNDA PARTE

Introducción	I
Parte Teórica	II
Parte Experimental	III
Discusión y resultados	IV
Conclusiones	V
Bibliografía	VI

PRIMERA PARTE

INFORME DE LA

SINTESIS DE LA 19-DIAZOETIL-5-ANDROST-2ENO-17,19-DIONA.

En la tésis realizada por la Quím. Irma Korkowski, titulada: "Síntesis de un Modelo Esteroidal relacionado estructuralmente con la Isvarona", (Fig. 1), se trabajó con la 3 β , 19-dihidroxi-androst-5 en-17-ona (Fig. 2), como materia prima,

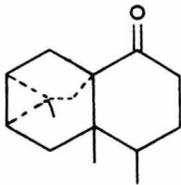


FIG. 1

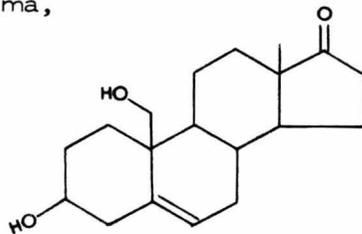
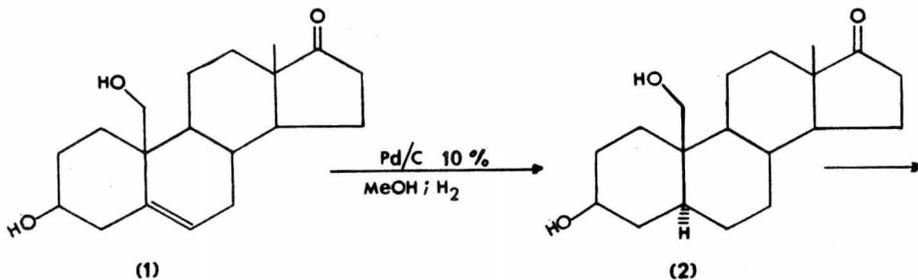
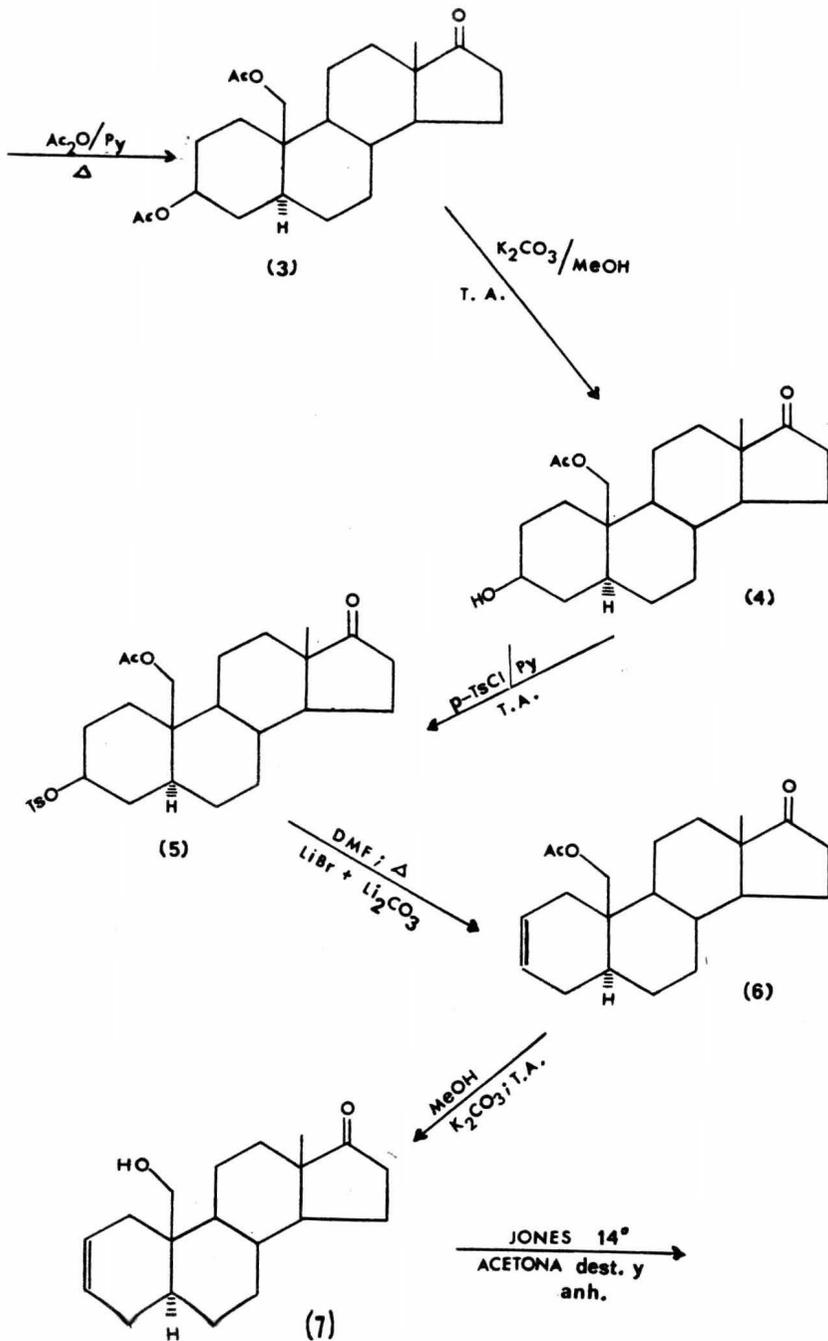
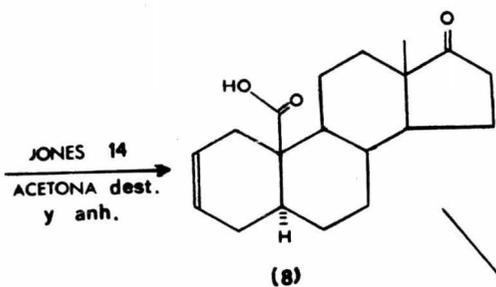


FIG. 2

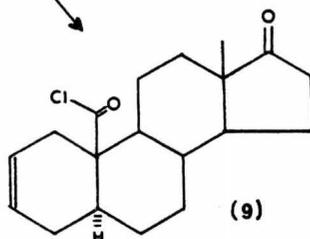
a éste se le hicieron diferentes modificaciones para tratar de llegar al compuesto deseado 12. El siguiente diagrama muestra la secuencia de reacciones seguidas:



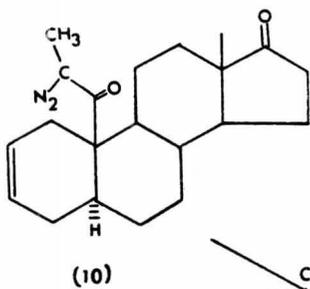




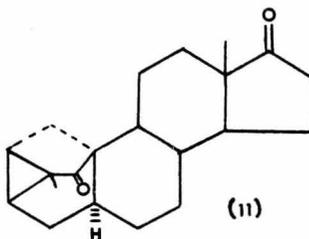
SOCl_2



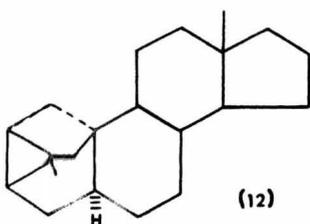
T. A.
 $\text{CH}_3\text{-CH-N}_2$



Δ Cu^0



W. K.



Se obtuvieron solamente los 8 primeros compuestos, identificándolos plenamente por medio de espectroscopía de I.R. y R.M.P.

Este trabajo tuvo por objeto completar el antes mencionado, es decir, obtener el compuesto 12, siguiendo la misma secuencia de reacciones. En algunos pasos que a continuación se citan, se hicieron varios cambios en las condiciones de reacción, purificación y se mejoraron también algunos rendimientos (ver Tabla 1).

T A B L A 1

REACTIVO	OBSERVACIONES
1. Pd/C, 10%; MeOH;H ₂	(1) La 3 β , 19-dihidroxi-androst-5-en-17-ona quedó completamente hidrogenada en 2 horas con 30 minutos, en vez de 90 horas.
2. K ₂ CO ₃ /MeOH;T.A.	(4) La hidrólisis se completó después de 2 horas y 30 minutos (en vez de 3 1/2 horas). El rendimiento fue de 74.1% contra 62.6% anterior.
3. p-Ts-Cl/Py;T.A.	(5) Para eliminar totalmente la piridina se le agregó una solución de sulfato de

cobre concentrada y se extrajo con acetato de etilo.

4. N-N,dimetil formamida (6) La eliminación del grupo tosilato /LiBr+Li₂CO₃; Δ. fue después de 6 horas (en vez de 7 hrs.). La purificación se hizo en columna y el rendimiento fue de 100%.
5. Jones/acetona dest. y anhidra. (8) La purificación de 900 mg. de producto se hizo por columna. De las fracciones recuperadas se obtuvo 0.022 g. del ácido puro y 0.518 g. de una sustancia que por I.R. parece ser una lactona.

Al oxidar el compuesto 7 (900 mg.) con el reactivo de Jones, se obtuvo solamente 22 mg. del ácido puro y 518 mg. de una sustancia no identificada en el trabajo de la Srita. Korkowski y el cual muestra bandas en el I.R. a: 3240, m(OH); 3030, d(=CH); 2930, i(CH₃); 2850, i(-CH₂-); 1790 m (C=O, lactona); 1750 i (C=O); 1725 m (C=O anillo de 5 miembros); 1250 a 1000 (bandas que corresponden a C-O); 670 m (CH=, de deformación).

y en su R.M.P. no se observan los hidrógenos vinílicos en:

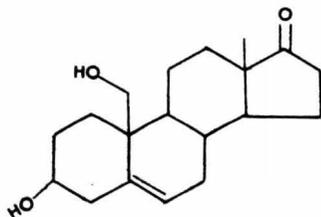
5.65 p.p.m.

La estructura de este producto quedó pendiente de momento.

Con los 22 mg. de ácido se preparó el cloruro correspondiente 9, y sin aislarlo se hizo reaccionar con diazoetano, sin embargo la pequeña cantidad de producto obtenido impidió su plena caracterización.

PARTE EXPERIMENTAL.

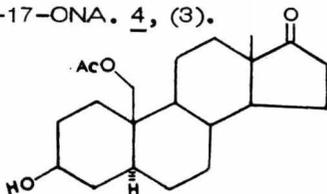
I. HIDROGENACION DE LA 3β , 19-DIHIDROXI-ANDROST-5-EN-17-ONA. 2. (2)



Se prehidrogenaron 3,68 g. del catalizador Pd/C al 10% en 276 ml. de metanol anh. a una presión de 30 psi. hasta que no absorbiera hidrógeno. Inmediatamente se le agregaron 9.2 g. del esteroide 3β , 19-dihidroxi-androst-5-en-17-ona y se hidrogenó a 30 psi; al principio la mezcla absorbió hidrógeno rápidamente y a las 2 horas 30 minutos el esteroide estaba completamente hidrogenado. Se siguió por cromatografía en capa fina la secuencia de la reacción en un sistema benceno-metanol (8:2). Se filtró 2 veces el catalizador sobre celita para que la solución quedara cristalina, teniendo cuidado de no dejar secar el catalizador, enjuagándolo varias veces con metanol. Se evaporó al vacío el disolvente. Se obtuvo un rendimiento de 7.9 g. (85,58%) de producto crudo.

Los datos espectroscópicos corresponden a los informados anteriormente (1).

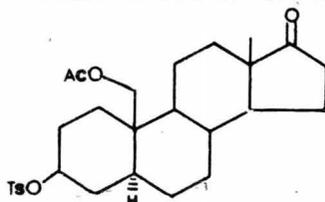
2. PREPARACION DE LA 3 β -HIDROXI-19-ACETOXI-5 α -ANDROSTAN-17-ONA. 4, (3).



Se disolvieron 2 g. de la 3 β ,19-diacetoxy-5 α -androstan-17-ona en 50 ml. de metanol puro y anhidro, se le agregó una solución de 1 g. de carbonato de potasio en un ml. de agua. La reacción se siguió por medio de cromatografía en capa fina en un sistema Benceno-AcOet 6:4 (corrida 2 veces); se completó la reacción después de 2 horas y 30 minutos.

Inmediatamente esta mezcla se vertió en 75 ml. de agua y se extrajo 4 veces con acetato de etilo, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío. Se obtuvo 2.52 g. del producto crudo con p.f. = 147-148°C, que recristalizado de acetona-hexano se obtuvo puro con un punto de fusión de 142-143°C y un rendimiento de 1.32 g. (74.1%).

3. PREPARACION DEL TOSILATO DE LA 3β -HIDROXI-19-
ACETOXI- 5α -ANDROSTAN-17-ONA. 5, (4).

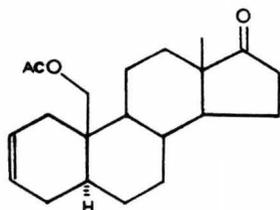


En un matraz se disuelven 1.32 g. de la 3β -hidroxi-19-acetoxi- 5α -androstan-17-ona con 6.6 ml. de piridina destilada y anhidra. A la mezcla se le añade 1.452 g. de cloruro de p-toluen sulfonilo purificado. La reacción se completó después de 18 horas a temperatura ambiente, siguiéndose por cromatografía en capa fina, teniendo como eluyente Benceno-AcOet 6:4 (corrida 2 veces). Se depositaron en el fondo del matraz unas agujas transparentes de clorhidrato de piridina. La mezcla de reacción se vertió en agua fría. Se dejó reposar y después se extrajo 4 veces con acetato de etilo; la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío.

Como quedaba algo de piridina se le agregó una solución de sulfato de cobre concentrada y se extrajo nuevamente con acetato de etilo, siguiéndose el mismo procedimiento.

El producto obtenido fue aceitoso, imposible de cristalizar de acetona-pentano. El rendimiento fue de 2.06 g.

4. PREPARACION DEL ACETATO DE LA 19-HIDROXI-5 α -
ANDROST-2-EN-17-ONA. 6, (5,6).



En 15.4 ml. de N-N-dimetil formamida recién destilada, se di
solvieron 2.46 g. del tosilato de la 3 β -hidroxi-19-acetoxi-5 α -
-androstan-17-ona.

Se le agregó 1.353 g. de bromuro de litio anhídrido y 1.353 g.
de carbonato de litio puro.

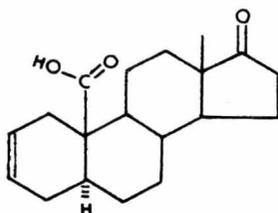
La mezcla se puso a reflujo y después de 6 horas se efectuó la
total eliminación del grupo tosilato dando lugar a la formación
de la doble ligadura, se estuvo controlando por cromatografía
en capa fina, usando como eluyente cloroformo (corrida dos ve
ces).

Inmediatamente después se filtró en caliente dicha mezcla para
eliminar el carbonato de litio y se vertió en una mezcla de hie-
lo-agua; se extrajo con acetato de etilo, se secó la fase orgáni-
ca con sulfato de sodio anhídrido y se concentró al vacío. El exce-
so de N,N-dimetil formamida existente en el residuo se elimi-
nó por medio del Hirschmann y a 0.1 m. Hg. de presión. Quedó

un aceite amarillo que se purificó por columna (80 gr. de sílica por 2 g. de producto por purificar), usando como eluyente benceno.

Se juntaron las fracciones obteniéndose un rendimiento de 1.78 g.

5. PREPARACION DE 5 α -ANDROST-2-EN-19-HIDROXI-17, 19-DIONA. 8, (7).



Se disolvieron 900 mg. de 19-hidroxi-5 α -androst-2-en-17-ona, en 100 ml. de acetona (destilada primero de KMnO_4 y después de reactivo de Jones en pequeñas porciones, se mantuvo la temperatura entre 10° y 15°C. Se dejó agitando por 2 horas 10 minutos, checando por cromatografía en capa fina (acetona-benceno 1:9) el transcurso de la reacción.

El exceso de reactivo de Jones se destruyó con unas gotas de isopropanol. Se filtraron las sales de cromo y se enjuagaron con acetona; se eliminó el disolvente en el rotavapor, teniendo cuidado de no subir la temperatura a más de 40°C. La cantidad de acetona que quedó se vertió en 30 ml. de agua y a esta mezcla se le agregó solución saturada de bicarbonato de sodio. Se extrajo con acetato de etilo y se procedió a hacer lo de costumbre. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío y en frío. Se purificó por columna (20 g. de sílice); se montó en seco, se agregó la muestra y después el eluyente (acetato de etilo-benceno 1:1).

De las fracciones obtenidas se recuperó 0.022 g. del ácido pu
ro y 0.518 g. de una sustancia que por I.R. parece ser una lac
tona:

BIBLIOGRAFIA

1. Korkowski, P. I., Síntesis de un Modelo esteroidal relacionado con la Isvarona, tesis, U.N.A.M., 1972.
2. J. Wicha and E. Caspi, *Canadian Journal of Chemistry*, 45, 710, 1967.
3. R. E. Counsell, Y. W. Adelstein, P. D. Klimstra, and B. Smith., *J. M. Chem.*, 9, 5, 685-9, 1966.
4. F. Sondheimer, R. Mechoulam and M. Spaecher, *Tetrahedron Letters*, 20, 2473-85, 1964.
5. A. Bowers, A. D. Cross, J. A. Edwards, H. Carpio, M. C. Calzada, and E. Denot, *J.M. Chem*, 6, 156, 1963.
6. M. J. Thompson, W. E. Robbins, J. N. Keplanis, Ch. F. Cohen, and S. M. Lancaster, *Steroids*, 16, 85, 1970.
7. IN. N. Nazarov, S. N. Ananchenko, and I. V. Torgov. Zhur, *Obshchei Khim.*, 26, 819-32, 1956.

Cfr. C.A., 50, 13844; 1956.

SEGUNDA PARTE

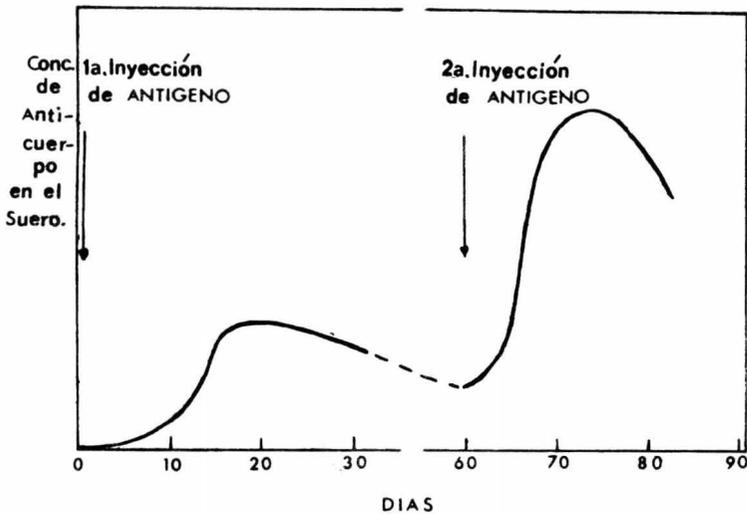
I. INTRODUCCION

La esencia de la Inmunología está en: la "memoria, especificidad y el reconocimiento de agentes extraños" en un organismo.

El ser humano raramente sufre dos veces algunas enfermedades tales como: sarampión, paperas, tosferina, varicela, etc. El primer contacto con un organismo infeccioso imprime alguna información, es decir, imparte alguna memoria, así el cuerpo está preparado efectivamente para repeler cualquier invasión posible por éstos organismos.

Esta protección es suministrada por anticuerpos originados por una respuesta hacia el agente infeccioso, que puede actuar como un antígeno. La combinación con el anticuerpo permite la eliminación del antígeno.

Así, se puede decir que, el desarrollo de inmunidad viene de la producción constante de anticuerpos durante los dos primeros contactos con el antígeno, por ejemplo, cuando se inyecta un toxoide estafilocócico en un conejo, después de varios días se pueden detectar los anticuerpos en la sangre, esta producción alcanza un máximo y luego disminuye como se puede ver en la gráfica, a esto se denomina respuesta primaria.



Ahora bien, si se deja descansar al animal y luego se le inyecta por segunda vez el toxoide, se podrá observar que, dentro de los dos o tres primeros días, el nivel de producción de anticuerpos en la sangre aumenta hasta alcanzar valores más altos que los obtenidos en la primera respuesta, a esto se denomina respuesta secundaria.

La segunda respuesta se considera más rápida y con una producción más abundante de anticuerpos, esto es, porque durante la primera exposición con el antígeno, se originó un sistema formador de anticuerpos provisto de un conjunto de células sensibilizadas.

El sistema utilizado en la vacunación sigue el principio antes mencionado, empleando antígenos relativamente atenuados (por ejemplo: virus muertos), como estímulo primario para imprimir memoria. Así las defensas del cuerpo están alertas y cualquier contacto subsecuente con la forma virulenta del organismo permitirá una segunda respuesta, más efectiva y con una producción muy grande de anticuerpos que protegerán al organismo para siempre contra dicha enfermedad.

La selectividad o especificidad de dicha reacción es de especial importancia, pues el establecimiento de memoria o inmunidad por un organismo, no confiere protección contra otro organismo distinto, por ejemplo: después de un ataque de sarampión el cuerpo queda inmune contra infecciones futuras, pero es susceptible hacia otros agentes, como virus de polio o paperas.

El cuerpo puede, de hecho, diferenciar específicamente entre dos organismos distintos (1).

No solamente los microorganismos son capaces de actuar como antígenos, sino que muchas sustancias de peso molecular elevado (mayor de 10,000) actúan provocando la inmunidad, como ejemplo de tales sustancias tenemos a los polisacáridos, las proteínas, polímeros sintéticos, etc.

Landsteiner (2) emitió una teoría llamada "teoría del hapteno", ésta consiste en conseguir formar anticuerpos que se unan a moléculas de peso molecular bajo; para ello, propone utilizar una molécula con características de antígeno como acarreador, y unir a ella covalentemente la molécula pequeña.

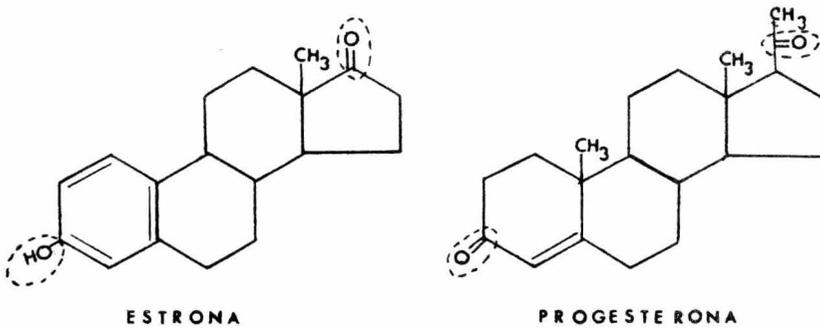
A las moléculas pequeñas unidas al acarreador y que por sí mismas no son antigénicas se les denomina "haptenos".

A las moléculas de peso molecular elevado unidas a sus haptenos covalentemente, se les conoce como "conjugados", por ejemplo: si queremos obtener anticuerpos contra esteroides, se puede utilizar como acarreador a la albúmina sérica de bovino (ASB); si se unen moléculas de esteroide a esta proteína, tendremos un conjugado Esteroide-ASB que actuará como antígeno, en cualquier caso al determinar el número de moléculas pequeñas unidas al acarreador se hace referencia a estos como residuos. Los anticuerpos que se obtienen en estas condiciones son capaces de unirse tanto a la proteína acarreadora como a la molécula pequeña que se utilizó como hapteno.

Actualmente uno de los principales intereses en el campo biomédico, es el de obtener anticuerpos específicos contra un determinado compuesto. Con estos anticuerpos se puede determinar de

manera cuantitativa la concentración de compuestos hormonales y otros metabolitos en los tejidos y flúidos biológicos (3), utilizando técnicas como el Radioinmunoanálisis.

Erlanger (5) introdujo la inmunogenicidad de los esteroides y encontró que podían funcionar como haptenos cuando se conjugaban con proteínas por medio de enlaces covalentes estables; para dicha unión se aprovechó la reactividad de los grupos funcionales presentes en la molécula de esteroide (Fig. 1).



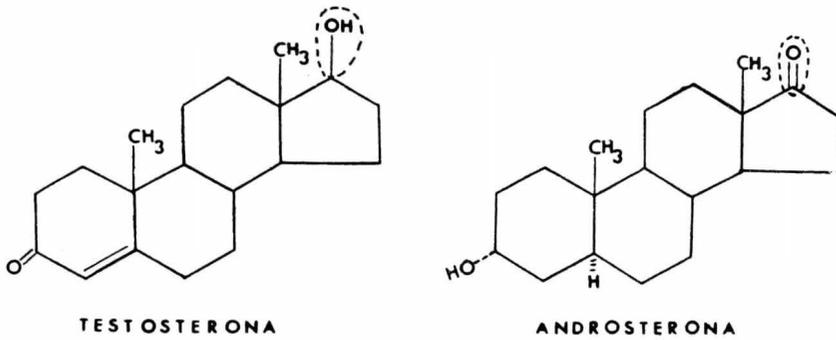


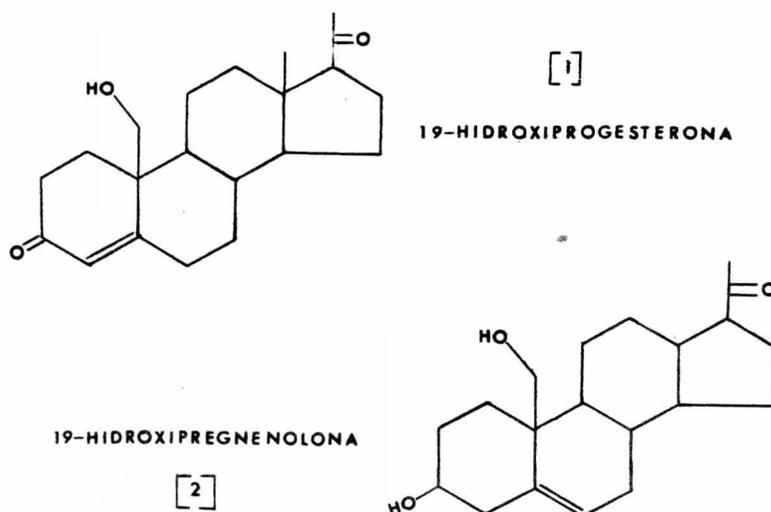
FIGURA 1.

Pero esto trajo como consecuencia la pérdida de información anti-
 génica importante (8), y como solución se propuso que el acopla-
 miento de los esteroides a las cadenas peptídicas de la proteína,
 se hiciera en posiciones diferentes de la molécula esteroideal, en
 las que no se involucraran componentes estructurales importantes,
 por ejemplo: los derivados acoplados a C-6, C-7 ó C-11 de los es-
 trógenos, progestágenos y andrógenos (6). (Fig. 2).

los conjugados de esteroide- proteína y así poder comprobar su capacidad antigénica inyectándolos en animales de laboratorio.

II. PARTE TEÓRICA

Como materia prima para la obtención de haptenos esteroidales, se utilizó a la 19-hidroxiprogesterona 1 y a la 19-hidroxipregnenolona 2.



En cada una de dichas moléculas, el único cambio que se lleva a cabo es el hidrógeno del oxhidrilo por la cadena del succinato.

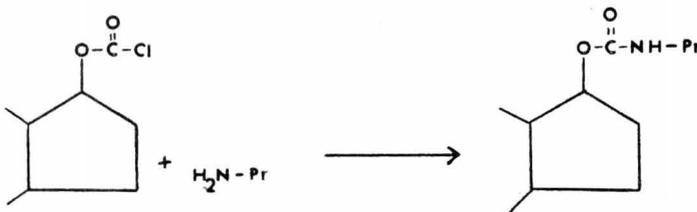
Uno de los motivos por el cual se seleccionó este modelo, fue que teniendo el hemisuccinato en posición axial en C-19, el final de la cadena con el grupo carboxilo se encuentra suficientemente alejado

de la molécula de esteroide para evitar interacciones intramoleculares entre la albúmina sérica de bovino y los grupos funcionales, los cuales se desean mantener libres, hasta que los anticuerpos correspondientes se hayan formado.

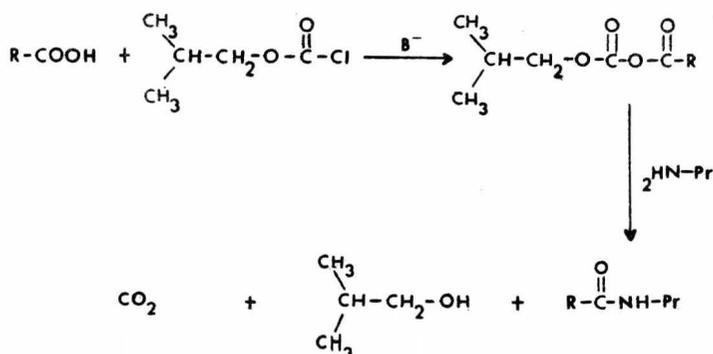
Cabe mencionar que para que se lleve a cabo la unión esteroide-proteína, Liebermann (7) sugirió que: a) la proteína se encontrara en forma pura; b) se conociera el contenido de aminoácidos de la proteína; c) la proteína acarreadora contuviera un número suficiente de grupos funcionales, en los cuales pudiera unirse el esteroide; d) la unión esteroide-proteína debiera ser por enlace covalente; e) la estructura del derivado esteroideal acoplado a la proteína, fuera lo más parecido a la hormona o metabolito del cual se deseara producir los anticuerpos.

Así que, teniendo en cuenta lo anterior, se tienen los métodos más usados para el acoplamiento de haptenos a proteínas, por medio de una unión amido:

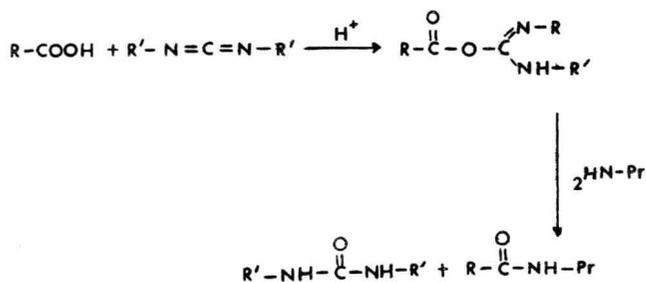
I. Schotten-Baumann (8)



II. Método del anhídrido mixto (9)



III. Reacción vía carbodiimida (10)



En la primera reacción I, al tratarse aminas o aminoácidos con cloruros de ácido se genera la formación de amidas.

En el método II se hace reaccionar un ácido carboxílico con cloro carbonato en presencia de base, formándose el anhídrido mixto, o sea, el anhídrido formado entre el ácido carboxílico y el éster del ácido carbónico.

El método III consiste en hacer reaccionar el ácido carboxílico con la amina o aminoácido y la carbodiimida, formándose la amida correspondiente y urea.

Los 19-hemisuccinatos se obtuvieron a partir de la 19-hidroxipregnenolona y la 19-hidroxiprogesterona con anhídrido succínico y piridina a reflujo. En el caso de la pregnenolona, se obtuvo primero el 3,19-dihemisuccinato, el cual después de la hidrólisis parcial selectiva en la posición 3 con carbonato de potasio y metanol a reflujo, durante 15 minutos dio el 19-hemisuccinato de pregnenolona, (fig. 3).

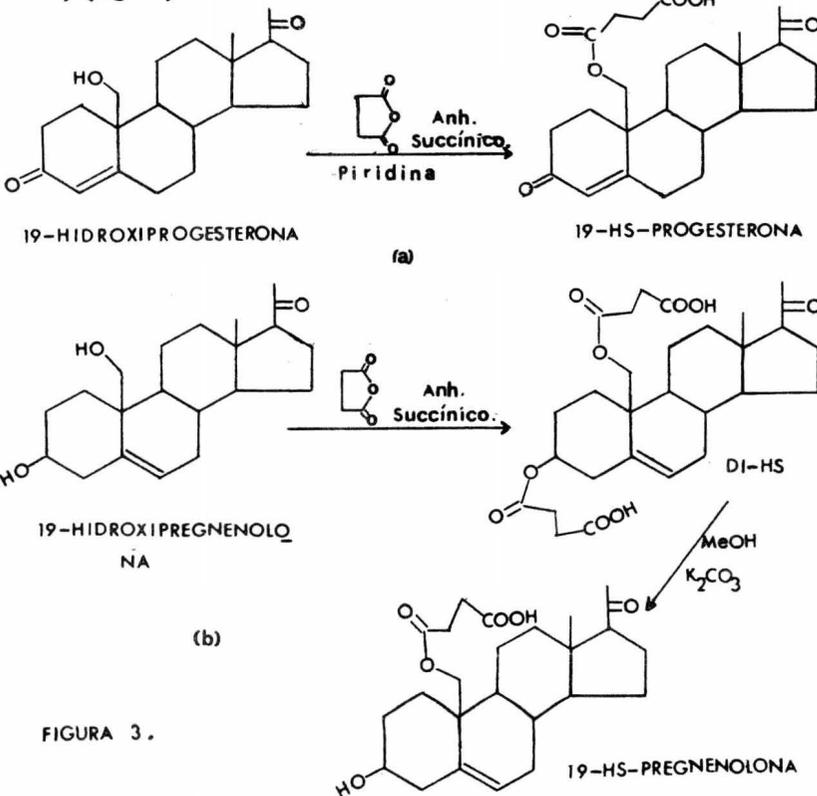
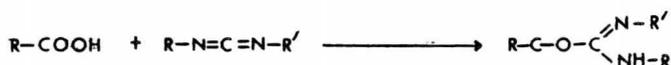


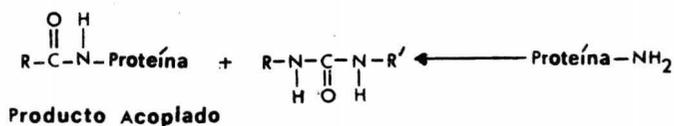
FIGURA 3.

El acoplamiento de cada uno de los hemisuccinatos con la proteí-
na ASB, se hizo en dimetil formamida y 1-etil-3-(3-dimetilami-
nopropil) carbodiimida en agua con agitación, añadiendo una mez-
cla de ASB en solución buffer de fosfatos.

El papel de la carbodiimida se considera que es el de activador
del grupo COOH como se ve en el esquema:



+



Una vez obtenidos los conjugados, se procedió a determinar el
número de residuos que se habían unido covalentemente a la pro-
teína, para ello se utilizó un método por espectroscopía en el U.V.

aprovechando que el Hemisuccinato de progesterona tiene $\lambda_{\text{máx}}^{\text{NaOH}} = 243$, $P_M = 68000$ y asumiendo la ley de aditividad con la ecuación de Lambert-Beer se determinó el coeficiente de extinción del conjugado y por diferencia con el coeficiente de extinción de la proteína pura se pudo saber el número aproximado de residuos que se unieron covalentemente.

En el caso de la pregnenolona se asumió que el número de residuos debe ser muy parecido por su estrecha relación con la progesterona.

N_{NaOH}	CONCENTRACION	A $\lambda = 250$	ϵ
0.1005	ASB 0.1402 mg/ml	0.385	186733
0.096517	HS-P 0.02926 mg/ml	1.01	15045.517
0.1005	Conjugado 1er. lote 0.0494 mg/ml	0.37	509311.74
0.1	Conjugado 2o. lote 0.04016 mg/ml	0.37	626494.02

CALCULO DE LOS RESIDUOS OBTENIDOS
EN LOS ACOPLAMIENTOS.

El método para calcular los residuos estuvo basado en la Extensión a la Ley de Lambert-Beer de aditividad de la absorbancia, para lo cual se tomaron en cuenta los siguientes datos:

Peso Molecular de la proteína (ASB)	68 000
Concentración de la proteína (ASB)	0.1402 mg/ml
Absorbancia de la proteína (ASB)	0.385
Coefficientes de extinción de la proteína.	186733
Peso Molecular del HS-Progesterona	432
Coefficiente de extinción del esteroide	14256
Concentración del Conjugado (HS-P-ASB), 1er. lote.	0.0494 mg/ml
Concentración del Conjugado (HS-P-ASB), 2° lote	0.04016 mg/ml
Absorción del U.V. del Conjugado (250 nm en NaOH 0.1005 N)	0.37

Primero. Se midió la absorbancia a concentración similar en mg/ml a la utilizada para la ASB, para esto se tomó una lectura a 0.0494 mg/ml (conc. del primer lote de Conjugados) y se

extrapoló ésta a 0.1402 que fue la concentración utilizada para la ASB. La diferencia se supone que se debe al incremento en la extinción debida a las moléculas de esteroide unidas covalentemente a la ASB.

Segundo. La diferencia 0.68 debe relacionarse con el incremento de la absorbancia esperada para la introducción de un mol de esteroide a la misma concentración, para esto se realizó la siguiente operación:

$$PM \text{ de la ASB} = 68000$$

$$\text{Conc. ASB} = 0.1402 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Absorbancia ASB} = 0.385$$

$$\epsilon \text{ ASB} = 186733$$

$$PM \text{ del HS-P} = 432$$

$$\epsilon \text{ del esteroide} = 14256$$

$$68000 + 432 = 68432$$

$$186733 + 14256 = 200989 \text{ de donde podemos determinar}$$

la absorbancia esperada para ASB-1 mol de esteroide.

$$A = \frac{c \epsilon}{PM}$$

sustituyendo valores:

$$A = \frac{0.1402 \times 200989}{68432} = 0.4117$$

el incremento de la absorbancia por cada residuo (o mol de es

teroiide) introducido es igual a la diferencia entre el valor anterior y la absorbancia de la ASB: $0.4117 - 0.385 = 0.0267$.

Tercero. Teniendo en la realidad una diferencia de Absorbancia de 0.68, el número de Residuos se calcula $0.68/0.0267 = 25.46$. Por lo tanto para el primer lote de Acoplamientos preparados se obtuvieron 25.46 Residuos.

Cuarto. Para el segundo lote de acoplamientos también se midió la absorbancia similar a la utilizada para la ASB en mg/ml.; se tomó una lectura a 0.04016 mg/ml., que es la concentración del segundo lote y se extrapólo a la lectura obtenida para una concentración de ASB igual a 0.1402 mg/ml. Se siguieron los mismos cálculos que para el primer lote, obteniéndose 34.49 Residuos.

Quinto. Los Residuos obtenidos en los dos lotes se refieren a los Conjugados de ASB-HS-Progesterona; suponemos que la cantidad de residuos obtenidos en los acoplamientos de ASB-HS-Pregnenolona es muy parecida por la estrecha similitud que hay entre ambos esteroides.

III. PARTE EXPERIMENTAL.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de U.V. se determinaron en un aparato Perkin-Elmer modelo 202, usando NaOH 0.1 N como disolvente.

Los espectros de I.R. se determinaron en un aparato Perkin-Elmer 337 en pastilla de KBr o en película, según se indique, las frecuencias se especifican en cm^{-1} . Las intensidades de las bandas se denotan de la siguiente manera: i=intensa; m=media; d=débil.

Los espectros de R.M.P. fueron determinados en un espectrómetro analítico Varian EM-360, empleando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, a menos que se indique otra cosa y se usó como referencia interna TMS. Se expresa el desplazamiento químico en partes por millón (ppm), usando el parámetro delta (δ). Las formas de las señales de los espectros en la parte experimental se expresaron de la siguiente manera: tipo de banda: s= singlete, d= doblete, t= triplete, m= multiplete; constante de acoplamiento (J), expresada en Hz y la asignación.

I. OBTENCION DEL HEMISUCCINATO DE LA 19-HIDROXI- PROGESTERONA.

Un gramo de 19-hidroxiprogesterona se puso a reaccionar con un gramo de anhídrido succínico y 5 ml. de piridina, dejándose a temperatura ambiente durante dos días, tiempo después del cual se vertió en agua y se aciduló con HCl hasta obtener un pH de 1; se extrajo varias veces con acetato de etilo, se lavó tres veces con HCl al 5%, después con agua hasta obtener una solución neutra; se decoloró con carbón. Se filtró la solución y se evaporó el disolvente a sequedad. El producto crudo se cristalizó de acetato de etilo-hexano obteniéndose un sólido blanco con punto de fusión de 128-130°C, siendo el rendimiento de 900 mg. que por recristalizaciones sucesivas de acetato de etilo-hexano dió una muestra analítica con punto de fusión de 129-130°C.

I.R. (KBr): 3450 a 3100 m (COOH); 3000 m (C-H vinílico); 2900 i (CH₃); 2850 i (CH₂); 1740 i (C=O del hemisuccinato y C=O en posición 20); 1710 i (C=O de COOH del hemisuccinato); 1670 i (C=O α , β insaturado en C-3); 1630 d (C=C); 1470 m (CH₂); 1450 m (CH₃); 1380 m (C-O); 1290 a 1230 m (AcO); 1150 i (C=O del éster); 1030 m (C-O).

R.M.P. (CDCl_3): 0.65 (s,3, CH_3 -18); 2.1 (s,3, CH_3 -C=O); 2.55 (s,4, $\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}$); sistema AB centrado en 4.42 integra para 2 H, $J=12$ cps, CH_2 -19; 5.9 (s,1, CH -4); 10.4 (s,1,que desaparece con D_2O , COOH).

2. OBTENCION DEL DI-HEMISUCCINATO DE LA 19-HIDROXIPREGNENOLONA.

Se puso a reaccionar un gramo de la 19-hidroxipregnenolona con 2 gramos de anhídrido succínico en 10 ml. de piridina, se calentó en baño de vapor durante 3 horas y se dejó reposar por 3 días.

La solución se vertió sobre agua, se aciduló a pH 1, dejándose reposar durante 2 horas, se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó varias veces, hasta obtener una solución neutra. El disolvente se evaporó al vacío obteniéndose un sólido que cristalizó de acetato de etilo-hexano. De la primera cristalización se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento de 1.193 gramos y en las aguas madres quedó un residuo blanco; estos dos sólidos se juntaron, se disolvieron en acetato de etilo, esta solución se decoloró con carbón activado, se filtró y cristalizó de acetato de etilo-hexano dando un rendimiento total de 1.238 gramos de un sólido blanco con punto de fusión de 152-153°C.

I.R. (KBr): 3500 a 3100 m (COOH); 3000 m (C-H vinílico); 2900 m (CH₃); 2850 m (CH₂); 1750 i (C=O del di-HS); 1700 i

(C=O de los COOH); 1480 m (CH₂); 1450 m (CH₃); 1370 m (C-O);
1210 m (Ac-O); 1154 i (C-O del di-éster); 990 m (C=C-H).

R.M.P. (CDCl₃): 0.65 (s,3,CH₃-18); 2.15 (s,3,CH₃-C=O-21);
2.63 (s,8,-CH₂-, de los dos HS); sistema AB centrado en 4.24
que integra para 2H, CH₂-19; 4.6 (señal ancha debida al H ba-
se del HS-3); 5.6 (s,1,H vinílico en C-6); 9.9 (s,2 ,que desa-
parece con D₂O y que corresponde al COOH de los dos HS).

3. OBTENCIÓN DEL 19-HEMISUCCINATO DE 3,19-DIHIDRO
XIPREG-5-EN-20-ONA.

A 500 mg. del dihemisuccinato de pregnenolona en 20 ml. de metanol se agregaron 500 mg. de K_2CO_3 en 10 ml. de agua; esta mezcla se calentó en baño de vapor hasta que el metanol se evaporó y se dejó durante dos horas más, se vertió en agua, se aciduló con HCl al 5% y se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro e inmediatamente se evaporó el disolvente al vacío.

Se cristalizó de acetato de etilo-hexano obteniéndose un sólido blanco con punto de fusión de 137-138°C.

I.R. (KBr): 3450 m (COOH en 19 y OH en 3); 2900 i (CH_3); 2850 i (CH_2); 1720 i (contiene a los tres carbonilos, de cetona en C-20, del éster y del ácido succínico); 1480 m (CH_2); 1440 m (CH_3); 1380 m (C-O); 1290 m (C-OH); 1160 m (C-O del hemisuccinato); 1050 m (C-O del éster).

R.M.P. ($CDCl_3$): 0.64 (s,3, CH_3 -18); 2.18 (s,3, CH_3 -C=O-21); 2.55 (s,4,corresponde a los dos $-CH_2-$ del HS); sistema AB centrado en 4.19 que integra para dos H, (CH_2 -19); 5.6 (s,1, H vinílico en C-6); 6.8 (s ancho,2, uno del OH en C-3 y otro

del COOH del HS).

4. OBTENCION DEL CONJUGADO DE ALBUMINA SERICA DE BOVINO CON EL HEMISUCCINATO DE LA 19-HIDROXIPROGESTERONA. (7).

Una mezcla de 100 mg. del hemisuccinato de la 19-hidroxiprogesterona en 9 ml. de dimetil formamida y 100 mg. de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida en 10 ml. de agua se agitó durante 20 minutos. Después de este tiempo se le añadió una solución de 200 mg. de la ASB en 10 ml. de solución buffer de fosfatos 0.05 M con pH 7.8. Esta mezcla se agitó durante tres días a una temperatura de 4°C, formándose un precipitado. El material se traspasó a una bolsa de celofán y se dializó un día contra una solución 0.05 M de bicarbonato de sodio (pH 8), durante este tiempo el precipitado se redisolvió; después se dializó durante 4 días contra agua corriente. El contenido de la bolsa se liofilizó.

La absorbancia en U.V. del producto es a 250 nm. en una solución 0.1 N de NaOH, obteniéndose 25.46 residuos mediante el cálculo mencionado anteriormente.

5. OBTENCION DEL CONJUGADO DE ALBUMINA SERICA DE BOVINO CON EL HEMISUCCINATO DE LA 19-HIDROXIPREGNENOLONA. (7).

Una mezcla de 100 mg. del hemisuccinato de la 19-hidroxipregnenolona en 9 ml. de dimetil formamida y 100 mg. de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida en 10 ml. de agua, se agitó durante 20 minutos. Después de este tiempo se le añadió una solución de 200 mg. de la ASB en 10 ml. de solución buffer de fosfatos 0.05 M con pH 7.8. Esta mezcla se agitó durante tres días a una temperatura de 4°C, formándose un precipitado. El material se traspasó a una bolsa de celofán y se dializó un día contra una solución 0.05 M de bicarbonato de sodio (pH 8), durante este tiempo el precipitado se redisolvió; después se dializó durante 4 días contra agua corriente. El contenido de la bolsa se liofilizó.

Como este conjugado no absorbe en U.V. se utilizó directamente para inmunización.

IV. DISCUSION Y RESULTADOS

El Hemisuccinato de la 19-hidroxiprogesterona se obtuvo haciéndolo reaccionar con anhídrido succínico en piridina a reflujo, el producto fue un sólido blanco que recristalizado de acetato de etilo-hexano fue identificado plenamente por sus características espectroscópicas.

En el I.R. presentó bandas a: 3450 muy ancha que corresponde al grupo carboxilo del hemisuccinato; 1740, señal intensa y ancha que incluye a los carbonilos del éster succínico, al carbonilo de la metil cetona en C-20 y al carboxilo del ácido; 1150 banda intensa que corresponde a vibración C-O del éster.

En R.M.P. usando CDCl_3 como disolvente, presentó a: 0.65 una señal simple que integra para tres hidrógenos y se asigna al CH_3 -18; 2.1 singulete que integra para tres protones y corresponde a CH_3 -C=O-21; 2.55 singulete que integra para cuatro protones, corresponde a $\text{O}=\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}$; sistema AB centrado en 4.42 que integra para dos protones, $J=12$ cps y que corresponde al CH_2 -19; 5.9, singulete que integra para 1 protón, corresponde al protón en posición 4; 10.4, singulete que integra para un protón, intercambia con D_2O , corresponde al

protón del carboxilo del ácido.

Se obtuvo el Di-hemisuccinato de la 19-hidroxipregnenolona, haciendo reaccionar a la 19-hidroxipregnenolona con anhídrido succínico en piridina en baño de vapor, el producto crudo fue un sólido amarillo que por recristalización dió un sólido blanco que se pudo identificar por sus características espectroscópicas en I.R. por presentar entre 3500 y 3100 una banda ancha correspondiente al grupo carboxilo de los hemisuccinatos; 1750 que corresponde a los carbonilos del succinato y a la metil cetona en C-20.

En R.M.P. presenta bandas en: 0.65 señal simple que integra para tres protones, corresponde a CH_3 -18; 2.15 singulete que integra para tres protones y que corresponde a CH_3 -C=O; 2.63 singulete, integra para 8 protones, corresponde a los cuatro $-\text{CH}_2-$ de los dos hemisuccinatos; sistema AB centrado en 4.24, $J=12$ cps que integra para dos protones, corresponde a CH_2 -19. En 4.6 presenta una deformación debida a que contiene la base del HS-3; 5.6 singulete que integra para un protón, corresponde al protón vinílico en posición C-6; 9.9 singulete que integra para dos protones, corresponde a los protones de los grupos ácido de los dos hemisuccinatos.

Para obtener el hemisuccinato de la 19-hidroxipregnenolona, se hizo reaccionar al dihemisuccinato con carbonato de potasio en metanol, en baño de vapor durante 15 minutos. Se obtuvo un sólido blanco que pudo identificarse por sus características espectroscópicas, pues en I.R. presenta en 3450 una banda intensa que corresponde al COOH en posición 19 y el oxhidrilo en posición 3; 1730 señal intensa que incluye a los carbonilos del éster succínico, al carbonilo de la metil cetona en C-20 y carboxilo del ácido; en 1290 banda media que corresponde a la unión C-OH; banda en 1050 que corresponde al carbonilo del éster.

En R.M.P. con CDCl_3 como disolvente, presenta en: 0.64 singulete que integra para tres protones, corresponde a CH_3 -18; 2.18, singulete que integra para tres protones, corresponde a CH_3 -C=O; 2.55 singulete, integra para cuatro protones, corresponde a los dos $-\text{CH}_2-$ del hemisuccinato; sistema AB centrado en 4.19 que integra para dos protones, $J=12$ Hz, corresponde a CH_2 -19 que presenta en 3.5 una deformación que explica la eliminación por hidrólisis del grupo hemisuccinato en posición C-3, dejando como base un OH; 5.6 singulete que integra para un protón, corresponde al protón vinflico en posición C-6; 6.8 singulete que integra para dos protones, uno del OH en C-3 y otro del gru

po COOH del hemisuccinato.

Los conjugados de la ASB con el hemisuccinato de la 19-hidro_xipregnenolona y la 19-hidro_xiprogesterona se obtuvieron haciéndolos reaccionar en una solución de DMF con carbodiimida y agregando después una solución Buffer de fosfatos de la ASB. Las mezclas se agitaron a 4°C durante varios días, separadamente, se dializaron un día contra una solución 0.05 M de NaHCO_3 (pH 8), después se dializaron contra agua corriente durante 4 días. Posteriormente los sobrenadantes se liofilizaron.

Se pudo verificar la existencia de residuos por medio de su absorción en espectroscopía de U.V. a 250 n.m. obteniéndose para el primer lote 25.46 y para el segundo lote 34.49 residuos respectivamente.

V. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo y caracterizó el Hemisuccinato de la 19-hidroxi-progesterona.
2. Se obtuvo y caracterizó el Dihemisuccinato de la 19-hidro-xipregnenolona.
3. También se obtuvo y caracterizó el 19-Hemisuccinato de la 19-hidroxipregnenolona.

Estos tres compuestos se analizaron a través de sus espectros de I.R., R.M.P. y U.V., los que están de acuerdo con la estructura.

4. Se prepararon los conjugados de ambos Hemisuccinatos con la albúmina sérica de bovino.
 - a) El acoplamiento del HS-19-hidroxiprogestero-
na con la ASB se comprobó por medio de su absorción en Espectroscopía de U.V.
 - b) El acoplamiento del HS-19-hidroxipregnenolona con ASB no se pudo comprobar por medio de U.V., ya que carece de cro

móforo (cetona α, β no saturado) y se supuso en principio que el resultado obtenido debía ser similar al del caso anterior, por tener una estereoquímica muy parecida. Se esperan los resultados de la inmunización para verificar su eficiencia como antígeno en cada caso.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Roitt, M. I. , Essential Immunology, (ps. 1-16), Blackwell Scientific Publications, Londres.
2. Landsteiner, K. , Specificity of Serological Reactions, Harvard University Press., Cambridge, Mass., 1946.
3. Bermúdez, J. A. , León, C. , Herrera, J. , Fundamento y estudio comparativo de dos métodos de análisis por saturación, Revista Médica del I.M.S.S. , (22), 11-22, 1974.
4. Carpenter, P. L. , Inmunología y serología, (ps. 25-58) ed. Faumier, México, D. F. , 1963.
5. Linder, H. R. , Perel, E. , Friedlander, A. , and Zeitin, A. , Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier, Steroids (9), 357-375, 1972.
6. Bermúdez, J. A. , Coronado, V.M. , Mijares, A. , León, C. , Velázquez, A. , Noble, P. , y Mateos, J. L. , Stereochemical approach to increase the specificity of steroid antibodies, Journal of Steroid biochemistry, (6), 283-290, 1975.
7. Lieberman, S. , Erlanger, F.B. , Beiser, S. M. , y Agate, F.J. , Recent Prog. Hormone Res. 15, 165-200, 1959.
8. Erlanger, B. F. , Borek, F. , Beiser, S. M. y Lieberman, S. , J. Biol. Chem, 228, 713, 1957.
9. Erlanger, B. F. , Borek, F. , Beiser, S. M. y Lieberman, S. , J. Biol, Chem 234, 1090, 1959.
10. Klansmer, Y. S. y Bodansky, N. , Coupling reagents in peptide Synthesis, Synthesis, 453, 1972.