



64
21.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

17-ALFA-HIDROXI-16-BETA-METIL-4,6-
PREGNADIEN-3,20-DIONA COMO UN
INTERMEDIARIO EN LA SINTESIS DE
ANTIANDROGENOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ANELLY MARTINEZ VELASCO



MEXICO, D. F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

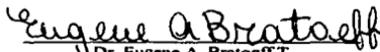
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROF. CASTILLO BOCANEGRA RAFAEL.
VOCAL: PROF. BRATOEFF TITEFF EUGENE ATHANAS.
SECRETARIO: PROF. AGUILAR LAURENTS MARIA ISABEL.
1er. SUPLENTE: PROF. SOTO HERNANDEZ RAMON MARCOS.
2do. SUPLENTE: PROF. DUARTE LISCI GEORGINA ARTEMISA.

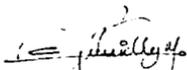
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Lab. 125, Edif. "E", Depto. de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:


Dr. Eugene A. Bratoeff T.

SUSTENTANTE:



Anelly Martínez Velasco

**17-HIDROXI-16-BETA-METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA
COMO UN INTERMEDIARIO EN LA SINTESIS DE
ANTIANDROGENOS**

**MIRA QUE TE MANDO QUE TE ESFUERCES
Y SEAS VALIENTE; NO TEMAS NI DESMAYES,
PORQUE JEHOVA TU DIOS
ESTARA CONTIGO EN DONDEQUIERA QUE VAYAS.**

Josué 1:9

A ALEIDA ZURISADAI:

Por ser el regalo más bello que Dios pudo concederme, por que sin merecerlo estás a mi lado

A MI MADRE:

OFELIA VELASCO AVILA.

Por tu apoyo, tu comprensión, por tu enorme deseo de motivarme a salir adelante, por tu fortaleza....; te quiero mucho!

A MI HERMANA:

LIDIA MARTINEZ VELASCO.

Por estar siempre a mi lado, por que nunca pierdes un milímetro, pero si aumentas metros.

A MI FAMILIA:

Por su ayuda y cariño, por estar siempre conmigo.

AL DR. EUGENE A. BRATOEFF T.:

Por que creyó en mí, por su confianza, por sus valiosos consejos, por la oportunidad de finalizar éste trabajo que constituye parte de usted.

A LA IGLESIA DEL NAZARENO EN XOCHIMILCO:

Por encaminar mis pasos a Dios y por que siempre me han dado muchas oportunidades.

A LA H. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO Y A LA FACULTAD DE QUIMICA:

Por brindarme una educación superior, por formarme como profesionista y sentirme orgullosa de ser parte de ella.

A MIS AMIGAS (OS):

Por todos los momentos que hemos pasado juntos y que nos han dejado bellos recuerdos.

- Alicia P.: Por la nobleza de tu corazón.
Alicia S.: Por que nunca te das por vencida.
Araceli : Por tu optimismo en emprender las cosas.
Cecilia : Por haber sido la primera en saber la "noticia"... por tu constante anhelo de ser tú misma.
Diana : Por seguir tus sentimientos.
Herminia: Por lograr lo que siempre has deseado.
Laura : Por compartir tu anhelo de servir al Señor, por estar siempre conmigo.
Leonor : Por ser una mujer de carácter.
Leticia : Por tener un gran corazón, por que siempre das mucho de ti.
Lilián : Por hacer las cosas siempre bien.
Sara : Por la "chispa" que hay en tu ser.
Elisco : Por que a pesar de mis errores siempre creíste en mí y me apoyaste...te llevo en mi corazón.
Fernando A: Por que siempre seremos "hermanos".
Fernando C: Por mostrarme los valores de tu corazón.

(Espero haber aprendido mucho de ustedes).

Desco manifestar mi más grande agradecimiento a quienes me apoyaron para alcanzar este gran anhelo:

AL DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA Y M.en C. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS:

Por su valiosa atención y sus sabios consejos.

A ELENA RAMIREZ LOPEZ:

Por enseñarme muchas cosas valiosas, por tus consejos, por tus ganas de ser feliz... por tu sonrisa.

A CESAR FLORES, GREGORIA FLORES, NORMA VALENCIA:

Por su enorme apoyo.

A TODA LA GENTE QUE TRABAJA EN EL LAB-125:

Por haberme permitido ser parte de ustedes.

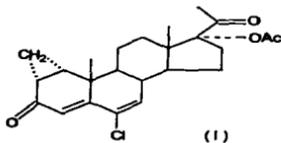
INDICE

OBJETIVO	1
INTRODUCCION	3
GENERALIDADES	7
ESQUEMA GENERAL DE SINTESIS	19
DISCUSION	21
EVALUACION FARMACOLOGICA	26
PARTE EXPERIMENTAL	28
ESPECTROSCOPIA	42
CONCLUSION	59
BIBLIOGRAFIA	60

OBJETIVO

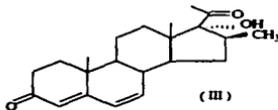
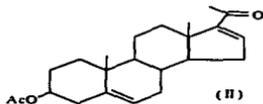
Dentro de la búsqueda de medicamentos eficaces que puedan ser empleados en la terapéutica del cáncer prostático e hiperplasia postática benigna, podrán tener una utilidad potencial los antiandrógenos, para el tratamiento de pacientes que producen altos niveles de testosterona (VIII), mecanismo que puede originar el cáncer de la próstata.

En la actualidad el acetato de ciproterona (I) es el antiandrógeno que se utiliza comercialmente para el tratamiento del cáncer de la próstata en el ser humano, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la actividad de la enzima que metaboliza el precursor del andrógeno en el órgano blanco; sin embargo, este fármaco presenta efectos adversos progestacionales que limitan su uso. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es el de obtener un compuesto que actúe como sustituto del acetato de ciproterona (I) que presente actividad antiandrogénica y los mínimos efectos colaterales no deseados posibles. Para esto se intenta sintetizar un análogo del acetato de ciproterona (I) con las características biológicas mencionadas haciendo los cambios necesarios en la estructura de la molécula.



Al hacer un análisis de la estructura química y la actividad biológica de una serie de compuestos relacionados con el acetato de ciproterona (I) se observa que su actividad antiandrógena se debe en parte a la presencia de un grupo electronegativo y una doble ligadura en C-6. Asimismo, un ciclopropano en los carbonos C-1 y C-2 eleva la actividad, así como el tamaño del sustituyente en C-17 y la presencia de un grupo alquilo en C-16.

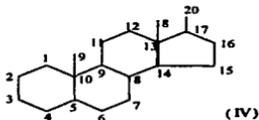
Considerando las características estructurales antes mencionadas se procedió a la síntesis de un nuevo derivado a partir del acetato de 16-dehidropregnenolona (II) con las siguientes modificaciones: introducción de dobles ligaduras en C-4 y C-6, con la conjugación de un grupo carbonilo en C-3, un grupo hidroxilo en C-17 y un grupo metilo en C-16. De esta manera se obtuvo como compuesto objetivo el derivado 17- α -hidroxi-16- β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (III).



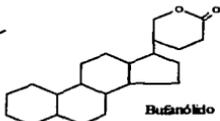
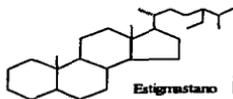
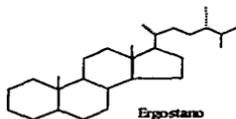
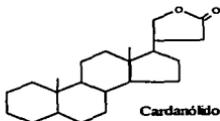
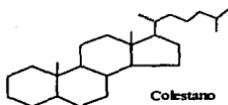
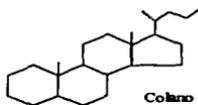
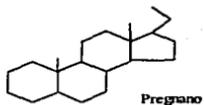
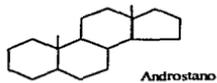
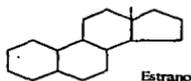
INTRODUCCION

Los esteroides son sustancias que constituyen un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza, se les puede encontrar tanto en el reino vegetal como en el animal, son compuestos que contienen en su estructura base el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno (IV). Este núcleo generalmente se encuentra sustituido en las posiciones C-10 y C-13 por grupos metilo, en C-17 es frecuente la presencia de una cadena lateral hidrocarbonada o bien de una función oxigenada, es frecuente también un grupo hidroxilo o carbonilo en C-3. Los esqueletos básicos en los que se clasifican los esteroides se muestran en el Esquema A, [1,2,3].

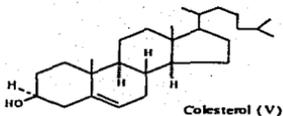
Los esteroides incluyen una gran variedad de compuestos de origen natural, entre los cuales se encuentran los esteroides (V), los ácidos biliares (VI), las hormonas sexuales (VII), las hormonas adrenocorticales, las sapogeninas, los glicósidos cardiotónicos y algunos alcaloides (4).



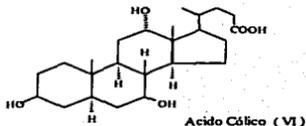
CLASIFICACION DE LOS ESTEROIDES



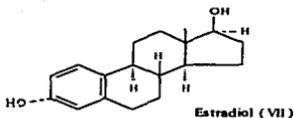
ESQUEMA A



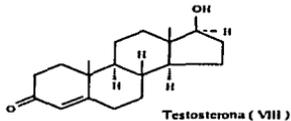
Colesterol (V)



Acido Cólico (VI)



Estradiol (VII)



Testosterona (VIII)

Debido a la amplia variedad en la que se encuentran presentes y a su importancia fisiológica, los esteroides han sido objeto de una extensa investigación química, cuyo estudio se ha visto sin duda estimulado por la diversidad de aplicaciones en el campo de la medicina. La naturaleza polifuncional de los esteroides ha permitido desarrollar una gran variedad de derivados esteroidales permitiendo hacer comparaciones y experimentar la influencia posible de un grupo químico sobre otro presentando propiedades químicas complejas. Esto ha llevado a obtener nuevos derivados esteroidales sintéticos que posean acción fisiológica y farmacológica y cuya eficacia pueda ser mayor sin descartar los efectos tóxicos para su uso prolongado.

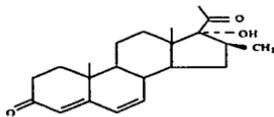
Actualmente, el antiandrógeno más potente comercialmente disponible en el mercado es el acetato de ciproterona (I); sin embargo, este fármaco presenta efectos secundarios progestacionales no deseados que limitan su uso en el tratamiento de pacientes del sexo masculino; razón por la cual, la investigación se ha enfocado hacia el desarrollo de nuevos fármacos que presenten el mínimo de efectos progestacionales posibles [5,6].

Por el análisis de la relación estructura-actividad biológica de los antiandrógenos esteroideos (acetato de ciproterona y sus derivados) se ha concluido que su actividad se debe a la estructura casi plana de la molécula, a la presencia del grupo 1- α -2- α -ciclometileno en C-1 y C-2 (o bien un doble enlace entre estos dos átomos de carbono presenta casi el mismo efecto), a los dobles enlaces entre los carbonos C-4 y C-5 y a los carbonos C-6 y C-7, al sustituyente electronegativo en C-6 y al grupo alfa acetoxi en C-17, así como a los dos grupos cetónicos en C-3 y C-20.

Se conoce que la relación de la estructura-actividad biológica encontrada en nuestro laboratorio es válida en la serie del pregnano. Todo esto nos llevó a proponer en la presente tesis el sintetizar un derivado del pregnano que reúna las características moleculares antes descritas sin contar con la presencia de un halógeno en C-6. Este compuesto se va a evaluar farmacológicamente o se va a usar como un intermediario en la síntesis de otros antiandrógenos. Por lo anteriormente expuesto se inició la síntesis del compuesto objetivo empleando como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona (II), misma que fue sometida a las siguientes modificaciones:

- a) Introducir un grupo metilo en la posición del carbono C-16,
- b) Introducción de dobles ligaduras en las posiciones de los carbonos C-4 y C-6.

Lo que finalmente nos llevó a obtener el compuesto



17- α -hidroxi-16- β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.

GENERALIDADES

De la actividad endocrina ejercida por las células de Leydig, mismas que se encuentran agrupadas en el tejido conectivo entre los túbulos seminíferos de los testículos, las hormonas elaboradas por estas células y que son liberadas hacia el torrente vascular se conocen como ANDROGENOS. El principal andrógeno es la testosterona (VIII) (página 5).

Los andrógenos son esteroides que regulan las características más importantes de fisiología y comportamiento sexual en varones [7], estos tienen tres efectos principales: regulan la función de la próstata y las vesículas seminales, actúan como anabólicos y son responsables de la expresión de características sexuales secundarias.

La elaboración de andrógenos se presenta en órganos como el hígado y la próstata cuya contribución fisiológica es en cantidades mínimas. En las mujeres, los ovarios y las glándulas suprarrenales secretan cantidades muy pequeñas de testosterona (VIII). La síntesis de andrógenos en los testículos se regula por estímulo de la hormona luteinizante (LH) en las células de Leydig y por la hormona folículo estimulante (FSH) en el epitelio germinal [8,9,10].

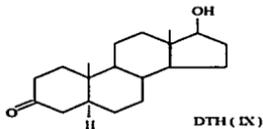
Los desórdenes patológicos relacionados con andrógenos se han clasificado en dos: uno en razón a una baja cantidad de andrógenos (hipoandrogenismo) y otro a altas cantidades (hiperandrogenismo) [11,12].

La secreción de testosterona (VIII) influye en el desarrollo del carcinoma de próstata (órgano sexual masculino primario), de manera que se trata de un cáncer hormonadependiente. Esta forma de tumor es activada por los andrógenos.

El cáncer prostático es un padecimiento muy común en hombres de edad avanzada (60 a 70 años) [13]. Como consecuencia de esto, la prostatectomía ocupa el segundo lugar entre las cirugías practicadas en hombres maduros. Aún cuando la prostatectomía resulta ser un tratamiento aceptable para este padecimiento es necesario contemplar los riesgos inherentes en los pacientes sometidos a dichas intervenciones quirúrgicas, en los cuales comúnmente se presentan enfermedades crónicas como: diabetes e hipertensión, mismos

que aumentan los riesgos de la cirugía, y hay que considerar que es una enfermedad recurrente [14], lo que permite justificar los esfuerzos realizados en el diseño y síntesis de compuestos en la terapéutica de esta enfermedad. Siendo que el cáncer prostático revela una alta incidencia y constituye un problema importante de salud, se han desarrollado una amplia gama de fármacos empleados para éste y otros padecimientos asociados con hiperandrogenismo, los cuales genéricamente se han clasificado como ANTIANDROGENOS.

Los antiandrogénos son sustancias químicas generalmente esteroides sintéticos o de origen endógeno, que previenen la expresión de los andrógenos en su sitio de acción, al bloquear los receptores androgénicos en los órganos blanco; esto debido al carácter antagonístico competitivo de los antiandrogénos frente a los andrógenos por unirse a la misma proteína receptora. Sin embargo, puede deberse también a que inhiben o modifican la entrada de testosterona (VIII) a la célula o bien a la inhibición de su conversión a su forma activa: 5- α -dihidrotestosterona (DTH) (IX) [10]. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de estas sustancias debe diferenciarse de aquellos compuestos que disminuyen la síntesis o liberación de gonadotropinas del hipotálamo y la hipófisis anterior o de aquellas que actúan directamente en las gónadas inhibiendo la biosíntesis o secreción de andrógenos. Es decir, los antiandrogénos en su función biológica, podrían bloquear la síntesis o el efecto de la testosterona endógena (VIII) mediante una acción sobre el receptor-antiandrogénico que impediría la formación del complejo andrógeno-receptor y así inhibiría la efectividad del andrógeno endógeno en el cuerpo humano.



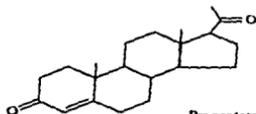
La aplicación de los antiandrógenos en la terapia médica se describe a continuación [15]:

APLICACION DE ANTIANDROGENOS
Tratamiento del cáncer de la próstata Hiperplasia prostática benigna Hipersexualidad en el hombre Anticonceptivos en el hombre Pubertad precoz en niños Virilización en la mujer Acné Calvicie prematura

Básicamente se conocen dos estrategias o métodos para sintetizar un esteroide antiandrogénico de acuerdo a su actividad biológica, como se describe a continuación:

I. Produciendo cambios en la molécula de la testosterona (VIII), de manera que se obtenga un efecto antagonístico, es decir, que el compuesto sintetizado interaccione con el receptor sin producir un efecto androgénico, bloqueando la formación del complejo andrógeno-receptor.

II. Modificando la molécula de la progesterona (X), pues la progesterona (X) (antiandrogénico natural) tiene cierto carácter antiandrogénico, pero por sus efectos gestacionales no puede ser utilizada como tal (para eliminar el efecto anabólico y aumentar el efecto antiandrogénico) [15].



Progesterona (X)

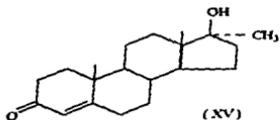
Dos ejemplos de compuestos con actividad antiandrogénica de acuerdo a los postulados anteriores, se mencionan a continuación:

DERIVADOS DE LA PROGESTERONA. Medrogesterona (XI), Anorprogesterona (XII), derivados con un grupo metileno en posición alfa en los carbonos C-1 y C-2 como el acetato de ciproterona (I) y compuestos con heteroátomos en la molécula (XIII), (XIV).

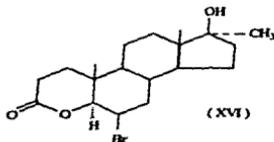
DERIVADOS DE LA TESTOSTERONA. 17-alfa-metil-19-nortestosterona (XV), compuestos más complejos estructuralmente (XVI).

ANTIANDROGENOS METODO I

DERIVADOS DE LA TESTOSTERONA

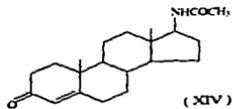
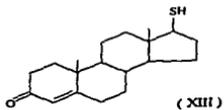
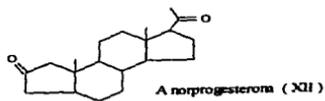
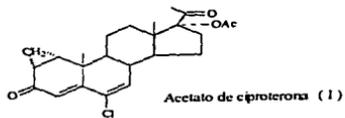
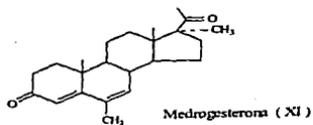


(XV)

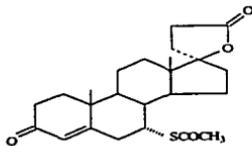


(XVI)

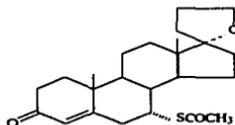
ANTIANDROGENOS METODO II
 DERIVADOS DE LA PROGESTERONA



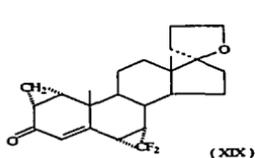
Se conocen antiandrógenos cuya síntesis no deriva de la progesterona (X), ni de la testosterona (VIII), como la espirolactona (XVII), la espirixazona (XVIII) y los que tienen características similares al acetato de ciproterona (XIX), (XX).



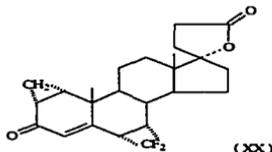
Espirolactona (XVII)



Espirixazona (XVIII)



(XX)



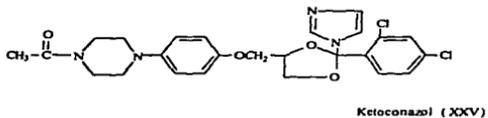
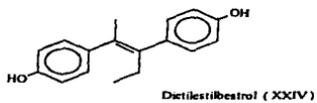
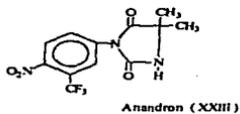
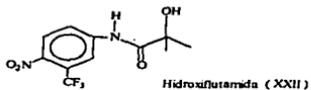
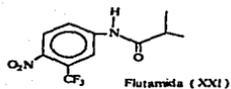
(XX)

Además, se han desarrollado numerosos fármacos de origen no esteroidal que muestran una variada gama de efectos antiandrogénicos, que a continuación se enlistan:

**ANTIANDROGENOS NO
ESTEROIDALES**

Flutamida (XXI)
Hidroxi-flutamita (XXII)
Anandron (XXIII)
Dietilestilbestrol (XXIV)
Ketoconazol (XXV)

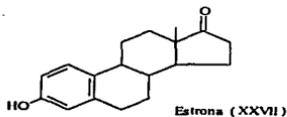
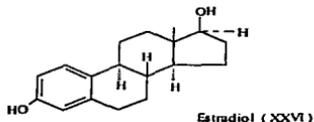
ANTIANDROGENOS NO ESTEROIDALES



Como se observa, existe una amplia gama de compuestos antiandrogénicos; pero es importante mencionar que la diversidad de compuestos ha estado determinada por cada variante de hiperandrogenismo, el grado de avance de la enfermedad, la vía de administración, las contraindicaciones de su utilización, y los efectos colaterales nocivos de cada fármaco. En mención de este último punto, este factor ha estimulado el esfuerzo en el búsqueda de nuevos fármacos con mayor potencia antiandrogénica y menor efecto colateral posible. Entre los efectos nocivos que reducen la utilidad clínica de antiandrogénos, se han evaluado los que se pueden presentar a corto y largo plazo, y a todos los niveles fisiológicos que van desde comportamiento sexual hasta anomalidades hormonales y atrofia celular. Muestra de ello se menciona en la siguiente tabla.

ANTIANDROGENO	EFEECTO NOCIVO
Estradiol (XXVI) [16]	Ginecomastia Retención de fluidos Náuseas Fallas cardíacas
Dietilestilbestrol (XXIV) [16]	Ginecomastia Retención de fluidos Náuseas Fallas cardíacas
Espiro lactona (XVII) [16]	Ginecomastia Pérdida de la libido Impotencia Anomalidades en el semen Irregularidades menstruales
Ketoconazol (XXV) [17]	Efectos hepatotóxicos
Flutamida (XXI) [18,19]	Náuseas severas
Acetato de ciproterona (I) [20]	Disminuye la libido Impotencia sexual Regresión de las características sexuales secundarias

Cabe mencionar que los estrógenos, hormonas sexuales femeninas, como el estradiol (XXVI) y la estrona (XXVII) fueron las opciones durante un tiempo en el tratamiento de enfermedades producidas por alteración del nivel de andrógenos, no se consideran antiandrogénos, ya que su acción es contrarrestar el estímulo androgénico de la hormona luteinizante (LH), es decir, inhiben en forma antigonadotrópica la producción de testosterona (VIII), mientras que los antiandrogénos antagonizan a los andrógenos en los tejidos blanco.



En virtud de la limitada utilidad clínica de varias de las opciones disponibles de antiandrogénos, se hace necesario el estudio de nuevas alternativas que en general disminuyan al máximo los efectos colaterales del fármaco, y que expresen mayor potencia antiandrogénica, lo que ha llevado a establecer las características de un antiandrogénico ideal [15]:

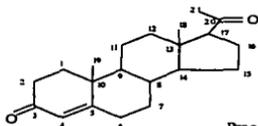
- No debe ser tóxico
- Debe tener baja actividad hormonal
- Debe tener elevada actividad antiandrogénica
- No debe disminuir la libido

Acerca de los requerimientos estructurales que una molécula debe cumplir para mostrar actividad antiandrogénica potencial, es prudente observar los compuestos que se obtienen por cada método de síntesis I y II (página 9), en los que se agrupan los antiandrógenos esteroidales más importantes. La primera aproximación que se puede realizar, es una clasificación de estos en derivados de la testosterona (VIII) (androstanos) y por otro lado derivados de la progesterona (X) (pregnanos), esta conclusión no es casual ya que se ha reconocido sin lugar a dudas la actividad antiandrogénica de la progesterona (X) [21]. Por lo tanto, la estrategia fue la obtención de derivados de la testosterona (VIII) que puedan antagonizar el efecto de ésta por competencia con su receptor, mientras que en los derivados del pregnano la intención es aumentar la actividad antiandrogénica y disminuir al máximo la actividad progestacional. Por lo que, para nuestro propósito, la razón de sintetizar en nuestro laboratorio una variedad de derivados de la progesterona (X) con actividad antiandrogénica, se ha basado en lo siguiente:

1. Siendo la pregnenolona un paso anterior en la biosíntesis de la progesterona (X) precursor inicial de la biosíntesis de otros esteroides con actividad biológica como: andrógenos, estrógenos y corticoides, parece razonable pensar en efectos combinados como resultado de su metabolismo.
2. La progesterona (X) es un buen punto de partida, dado que la actividad progestacional de ésta se puede manipular con facilidad [22]
3. La progesterona (X) efectúa la inhibición de la 5- α -reductasa, enzima que cataliza la formación de DHT (IX) que es un andrógeno más potente que la testosterona (VIII) [23].

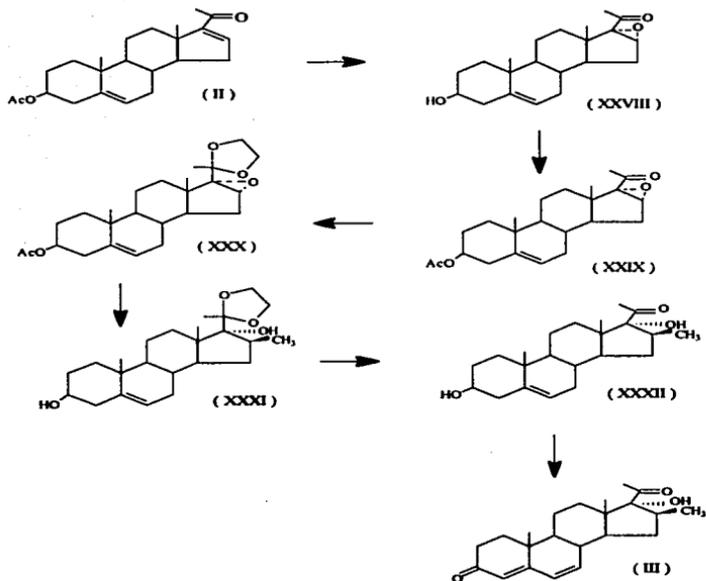
Basado en estos estudios, se ha podido establecer una relación empírica entre la actividad antiandrogénica del esteroide y su estructura molecular [24]. La siguiente tabla describe las modificaciones más importantes en la molécula de la progesterona que conducen a una actividad antiandrogénica más elevada.

**ESTRUCTURA MOLECULAR-ACTIVIDAD
FARMACOLÓGICA**



MODIFICACION	ACTIVIDAD
Doble ligadura en C-1 o un grupo ciclometileno entre C-1 y C-2	Aumenta
Reducción del carbonilo en C-3 o en C-20	Disminuye
Un grupo electronegativo en C-6	Aumenta
Reducción de la doble ligadura en C-4	Disminuye
Grupos voluminosos o electronegativos en C-17	Aumenta
Cualquier sustituyente que haga la molécula más plana	Aumenta
Anillos A-nor o D-homo	Disminuye
Grupo metilo o metileno en C-16	Aumenta

RUTA GENERAL DE SINTESIS



ESQUEMA B

NOTAS

DETERMINACION DE CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS

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

Los espectros de ultravioleta (UV), se determinaron con metanol en un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer 202.

Los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron sobre pastillas de bromuro de potasio o en solución en un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer Mod. 337.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), se determinaron en el espectrofotómetro Varian EM 390, utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS).

La cromatografía en capa fina (placas preparativas) se realizó usando gel de sílice Merck Art. 7730 sílica Gel 60GF.

DISCUSION

La ruta de síntesis, tal como se presenta en el Esquema B (página 19), se inició tomando como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA) (II), esteroide que presenta las funcionalidades químicas necesarias para su transformación en el compuesto objetivo. Como parte inicial, la materia prima se caracterizó mediante sus características físicas y espectroscópicas (Tabla 1, página 28): El espectro de UV (Espectro 1, página 43) mostró la existencia del cromóforo con λ max de 240 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-16-en-C-20-ona. Por su parte, el espectro de IR (Espectro 2, página 44) registró la existencia de dos señales en la zona de los carbonilos en 1662 cm^{-1} y 1730 cm^{-1} correspondientes a la cetona α,β -insaturada en C-20 y al carbonilo del acetoxi sobre C-3 respectivamente. En tanto, el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (Espectro 3, página 45) presentó las siguientes señales: dos singletes centrados en 1.0 ppm y en 1.2 ppm (3H para cada uno) asignadas a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente, así como dos señales en 2.1 ppm (3H) y 2.3 ppm (3H) perteneciendo al metilo C-21 y al metilo α -carbonilo del éster sobre C-3 respectivamente, además de observarse un multiplete en 4.3 ppm (1H) asignado al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se presenta un doblete en 5.4 ppm (1H) perteneciente al protón vinílico en C-6, así como un multiplete en 6.8 ppm (1H) asignado al protón vinílico en C-16.

El primer paso de la síntesis involucró la oxidación de la insaturación en C-16, la cual pertenece a un sistema cetona α,β -insaturada, lo que dará lugar a la formación del epóxido (XXVIII), en las posiciones C-16 y C-17. El método de elección en estos casos es la epoxidación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en medio básico, reacción que se favorece por la conjugación con el carbonilo en C-20 [25]; la base facilita la formación del anión hidropéroxido (HOO^-). Una eliminación posterior de (OH) da así el epóxido deseado (XXVIII). El compuesto obtenido se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas que se presentan en la Tabla 2 (página 30). El epóxido 16- α -17- α -epoxi-3- β -5-hidroxi-pregnen-20-ona (XXVIII) no presentó una absorción en UV debido a la falta de un cromóforo. El espectro de IR (Espectro 4, página 46) de este compuesto presenta una señal intensa correspondiente al epóxido en 805 cm^{-1} , también

se puede observar la señal del carbonilo perteneciente a la cetona en C-20 en 1692 cm^{-1} ; bandas en 2940 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} correspondientes a los metilos en C-18 y C-19. La banda en 3440 cm^{-1} perteneciente al grupo OH en la posición C-3, que se formó en el proceso de la epoxidación, momento en que el grupo acetoxi sufre hidrólisis. La señal en 3020 cm^{-1} se asignó a la insaturación en la posición C-5. También desaparece la señal en 1660 cm^{-1} de la cetona α,β -insaturada, la señal en 1050 cm^{-1} corresponde al enlace C-O del grupo epóxido. Por su parte, el espectro de RMN (Espectro 5, página 47) muestra evidencia de la reacción en función de la presencia de dos señales de protones base de funciones oxigenadas; una de ellas correspondiente a la base del epóxido en C-16 con un singulete en 3.3 ppm (1H) y la base del alcohol en C-3 con un singulete en 3.6 ppm (1H); además de la desaparición de la señal del protón vinílico correspondiente a la insaturación en C-16. En este mismo espectro se registran las señales correspondientes a los metilos angulares en 1.1 ppm (3H) y 1.2 ppm (3H) asignadas a los metilos C-18 y C-19 respectivamente, asimismo la señal del metilo α a la cetona en C-20 en 2.1 ppm (3H).

El siguiente paso de la síntesis consistió en la acetilación del alcohol en C-3 del compuesto (XXVIII), el cual al estar localizado en orientación ecuatorial favoreció la obtención de rendimientos cuantitativos. El método empleado consistió en una acetilación convencional mediante una mezcla de anhídrido acético y piridina. El producto acetilado (XXIX) se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la Tabla 3 (página 32). El espectro de IR (Espectro 6, página 48) indica la presencia de una señal en 1732 cm^{-1} asignada al carbonilo del acetoxi y una señal en 1698 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de cetona en C-20; la ausencia de la señal en 3440 cm^{-1} típica para el alcohol libre confirma la acetilación realizada. En el espectro de resonancia magnética nuclear (Espectro 7, página 49) mostró un singulete en 1.0 ppm (6H); correspondiente a los metilos C-18 y C-19. El singulete en 2.1 ppm (6H) se asignó al metilo del grupo acetilo sobre C-3 y al metilo en C-21 α a la cetona en C-20. La señal aguda en 3.7 ppm (1H) se asignó al protón base del epóxido en C-16. El multiplete en 4.5 ppm (1H) corresponde al protón base del acetoxi en C-3. El doblete en 5.3 ppm (1H) se asignó al protón en C-6.

El paso siguiente de la síntesis implicó la protección del carbonilo en C-20 del compuesto (XXIX), debido a que el próximo paso involucra la apertura del epóxido mediante un reactivo de Grignard. Esta reacción se efectuó empleando etilenglicol, ortoforniato de metilo, tolueno como disolvente y ácido p-toluenosulfónico para dar lugar a la formación del dioxolano (XXX) [27]. El cetal formado (XXX) se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas mostradas en la Tabla 4 (página 34). El espectro de IR de este compuesto (Espectro 8, página 50) refleja la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo cetónico en C-20, mostrando únicamente una señal intensa en 1720 cm^{-1} perteneciente al carbonilo del éster sobre C-3. El espectro de RMN (Espectro 9, página 51) del compuesto muestra dos singuletes en 1.0 ppm (3H) y 1.1 ppm (3H) correspondiente a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente. De igual manera se observa un singlete en 1.5 ppm (3H) asignado al metilo C-21. Se registra además, un singlete en 2.1 ppm (3H) perteneciente al metilo del acetoxi sobre C-3. En 3.3 ppm (1H) el espectro muestra un singlete correspondiente al protón base del epóxido en C-16. Como evidencia de la formación del grupo funcional etilendioxo desecado, se presenta un multiplete en 3.9 ppm (4H) asignado a los protones de los metilos del dioxolano sobre C-20. En 4.6 ppm (1H) se registra un multiplete perteneciente al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se observa un doblete en 5.3 ppm (1H) que se asignó al protón en C-6.

Para la apertura del epóxido, como siguiente paso de la síntesis, se buscó la inserción del metilo en C-16 β en el compuesto (XXX). La posición β del metilo resulta del mecanismo de la reacción, el cual se trata de una sustitución SN_2 en la apertura del epóxido que necesariamente debe ser una sustitución transdiaxial [28]. El compuesto metilado obtenido (XXXI), se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la Tabla 5 (página 36). El espectro de IR de dicho compuesto (Espectro 10, página 52) confirmó la presencia de una señal intensa en la zona del alcohol en 3416 cm^{-1} , banda correspondiente al hidroxilo que se presenta como resultado de la hidrólisis del acetilo por reactivo de Grignard; también se observa una señal aguda en la zona característica de alcoholes terciarios en 3576 cm^{-1} , correspondiente al hidroxilo en C-17, generado con la apertura del epóxido en C-16-C-17. El espectro de RMN (Espectro 11, página 53) presenta dos singuletes en 0.87 ppm (3H) y 0.98 ppm (3H) correspondientes a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente; un doblete en 1.17 ppm (3H, $J=1.5\text{ Hz}$), asignado al metilo adicionado en C-16 β ; el doblete resulta

del acoplamiento de este metilo con el protón en C-16. El singlete en 1.37 ppm (3H) corresponde al metilo α del dioxolano sobre C-20. En 3.5 ppm (1H) se presenta un multiplete perteneciente al protón base del alcohol en C-3. El multiplete en 4.0 ppm (4H) pertenece a los metilenos del grupo etilendioxi sobre C-20. Por último, en la zona de protones vinílicos se observa un doblete en 5.4 ppm (1H) perteneciente al protón vinílico en C-6.

El siguiente paso de la síntesis consistió en la hidrólisis del cetal (XXXI) para regenerar el carbonilo en C-20. Esta reacción se llevó a cabo mediante un reflujo moderado en medio ácido, cuidando el tiempo y la temperatura de reacción, en virtud de la labilidad del alcohol en C-17 α , que al ser un alcohol terciario con una configuración axial, fácilmente podía sufrir una reacción de eliminación en el medio ácido de la hidrólisis. Este compuesto hidrolizado obtenido (XXXII) se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas mostradas en la Tabla 6 (página 38). El espectro de IR de este compuesto (Espectro 12, página 54) mostró una señal intensa en 1696 cm^{-1} asignada al carbonilo de la cetona que se regeneró por la hidrólisis del cetal, también se observó una señal intensa en la zona de alcoholes en 3462 cm^{-1} correspondiente a los grupos oxidrilo en C-3 β y C-17 α . En tanto el espectro de RMN (Espectro 13, página 55) ratificó la ausencia del multiplete en 4.0 ppm que pertenecía a los metilenos del dioxolano hidrolizado. Los metilos en C-16 y C-18 aparecen como dos singletes sobrepuestos en 1.1 ppm (6H). También se observa un singlete en 1.3 ppm (3H) correspondiente al metilo angular C-19. En 2.1 ppm (3H) se presenta un singlete agudo perteneciente al metilo C-21. Por otro lado el multiplete en 3.5 ppm (1H) se asignó al protón base del alcohol en C-3, la señal en 5.3 ppm (1H) es característica para el protón vinílico en C-6.

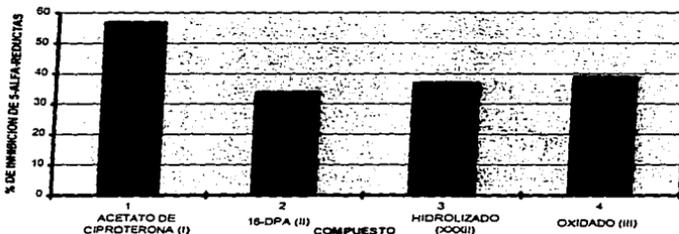
El último paso de esta síntesis constituyó la formación del sistema 4,6-dien-3-ona del compuesto (XXXII), cetona conjugada que se obtuvo oxidando el alcohol en C-3 β . Esta reacción evitó el realizar pasos adicionales de síntesis que serían indispensables en caso de oxidar primero el sistema 5-en-3-ol por la oxidación de Oppenauer para formar la función 4-en-3-ona [29] y la posterior introducción de la doble ligadura en C-6 mediante una deshidrogenación con cloranilo [30,31]. La reacción de bromación-deshidrobromación empleada se realizó utilizando bromo como agente oxidante, así como el carbonato de litio, base que abstraer el protón alílico en C-4, obteniéndose como

producto el sistema deseado 4,6-dien-3-ona. El compuesto oxidado obtenido (III) presentó cromóforo en cromatografía de capa fina y sus constantes físicas y espectroscópicas se enlistan en la Tabla 7 (página 40). La formación del cromóforo 4,6-dien-3-ona se confirmó por la presencia de un máximo de absorbancia en 284 nm (Espectro 14, página 56). El espectro de IR (Espectro 15, página 57) de este compuesto mostró la existencia de dos señales en la zona de carbonilos, una de ellas en 1662 cm^{-1} asignada al carbonilo $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3 y otro en 1702 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de cetona en C-20; también se observa una señal en el área de alcoholes en 3498 cm^{-1} asignada al hidroxilo en C-17 α . El espectro de RMN (Espectro 16, página 58) mostró señales evidentes del compuesto esperado; de las cuales, dos singuletes en 0.7 ppm (3H) y 0.9 ppm (3H), fueron asignados a los metilos C-18 y C-19 respectivamente, así como un doblete en 1.1 ppm (3H, J=1.5Hz) correspondiente al metilo en C-16 β . La señal intensa en 2.1 ppm (3H) se asignó al metilo C-21. En el espectro se observa también una señal intensa en 3.9 ppm producto del DMSO empleado para disolver el compuesto. En la zona de protones vinílicos se registró una señal en 5.3 ppm (1H) perteneciente al protón vinílico en C-6; un singlete en 5.6 ppm (1H) asignado al protón vinílico en C-4 y un triplete en 6.2 ppm (1H, J=1.5 Hz) asignada al protón en C-7, el triplete observado con este desplazamiento se debe al acoplamiento con el protón en C-8 y C-6.

EVALUACION FARMACOLOGICA

Para el ensayo *in vitro* de la actividad inhibitoria del compuesto final y de sus intermediarios de síntesis, se empleó el extracto de testículos de ratas wistar en virtud de ser el principal sitio de biosíntesis de testosterona y andrógenos relacionados, valorando la actividad de inhibición de la 5 α -reductasa como índice de actividad antiandrogénica potencial [7]. En la Gráfica 1 se aprecian los resultados obtenidos en el bioensayo empleando el extracto de testículos de rata. El acetato de ciproterona (I) inhibe la actividad de la 5 α -reductasa en un 56.6%, en tanto que la materia prima, 16-DPA (II) inhibe en un 33.5%, el compuesto hidrolizado (XXXII) presenta un valor de 37.0% y el compuesto oxidado (III) indica un valor de inhibición de 39.0%.

GRAFICA 1. EFECTO DE LOS INTERMEDIARIOS Y PRODUCTO FINAL SOBRE LA ACTIVIDAD DE 5-ALFA-REDUCTASA DE EXTRACTO DE TESTICULO DE RATA.



La actividad de los compuestos como inhibidores de la 5α -reductasa en extracto de testículo de rata reflejan buenos porcentajes con respecto al acetato de ciproterona que es el antiandrogéno esteroideal de elección en el mercado.

Para evaluar fisiológicamente la inserción del metilo en C-16 β es preciso el estudio *in vivo*, ya que se reconoce que esta funcionalidad protege al esteroide en contra de la acción de enzimas que reducen el carbonilo en C-20.

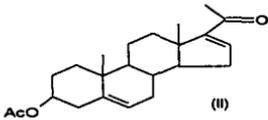
En el presente estudio se explora la actividad del compuesto final (III) como inhibidor de la 5α -reductasa y es preliminar; actualmente se realiza una valoración farmacológica detallada en el Instituto de Pediatría.

La actividad que presentó el compuesto final (III) *in vitro* lo propone como un buen candidato para realizar estudios farmacológicos adicionales, buscando su comparación frente a diversos compuestos como:

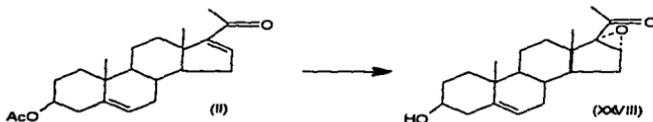
- compuestos esterificados en C-17 (al sustituir al hidroxilo),
- compuestos con la formación de epóxido en C-6 α -C-7 α , y
- compuestos con inserción de bromo en C-6; como intermediarios en la síntesis de antiandrogénos.

· PARTE EXPERIMENTAL

Para la obtención del compuesto contemplado como objetivo final (III), se siguió la ruta de síntesis que se puede observar en el Esquema B (página 19). En primer lugar se caracterizó espectroscópicamente la materia prima , 16-DPA (II).

TABLA I PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DE MATERIA PRIMA 16-DPA (II)	
 <p style="text-align: center;">(II)</p>	
pf	170 - 172 ° C
PM	356 uma
UV	
λ max 240 nm	cetona α,β insaturada en C-20
IR	
1380, 1455m 2945 cm ⁻¹	metilos y metilenos
1590 cm ⁻¹	doble enlace conjugado C-16
1662 cm ⁻¹	cetona α,β insaturada C-20
1730 cm ⁻¹	carbonilo de éster sobre C-3
RMN	
1.0 ppm	singlete (3H, metilo C-18)
1.2 ppm	singlete (3H, metilo C-19)
2.2 ppm	singlete (3H, metilo C-21)
2.3 ppm	singlete (3H, metilo del éster en C-3)
4.3 ppm	multiplete (1H, base del acetoxi C-3)
5.4 ppm	doblete (1H, protón vinílico C-6)
6.8 ppm	multiplete (1H, protón vinílico C-16)

A) SINTESIS DE 16- α -17- α -EPOXI-3- β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA. (XXVIII)

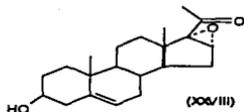


En un matraz bola de 100 ml se adicionó 1.0 g de compuesto 16-DPA (II), mismo que se disolvió en 40 ml de metanol a 5 °C, en seguida se agregaron 2 ml de una solución de hidróxido de sodio 4 N y 4 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas.

Terminado el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente aproximadamente a la tercera parte del volumen inicial, se mantuvo a 4 °C por espacio aproximado de 60 min., se filtró y el sólido obtenido se dejó secar. Una vez seco dicho sólido, se disolvió en 150 ml de cloroformo; en tanto el filtrado inicial se sometió a tres extracciones con 100 ml de cloroformo cada una, ambas fases orgánicas se lavaron con agua hasta pH neutro, se secaron con sulfato de sodio anhidro en reposo y se evaporaron a sequedad.

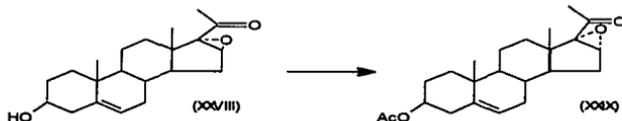
El sólido resultante se recrystalizó con metanol, obteniéndose un rendimiento del 99.0%.

TABLA 2
PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DEL
COMPUESTO (XXVIII)



pf	180 - 185°C
PM	330 uma
IR	
3462 cm ⁻¹	alcohol en C-3
2934 cm ⁻¹	metilos y metilenos
1692 cm ⁻¹	carbonilo en C-20
1653 cm ⁻¹	doble ligadura en C-5
1360 cm ⁻¹	metilos
806 cm ⁻¹	alargamiento para epóxido en C-16α-C-17α
RMN	
1.1 ppm	singlete (3H, metilo en C-18)
1.2 ppm	singlete (3H, metilo en C-19)
2.1 ppm	singlete (3H, metilo en C-21)
2.2 ppm	singlete (1H, alcohol en C-3)
3.3 ppm	singlete (1H, base del epóxido en C-16)
3.6 ppm	singlete (1H, base del alcohol en C-3)
5.3 ppm	doblete (1H, protón vinílico en C-6)

B) SINTESIS DE 3- β -ACETOXI-16- α -17- α -EPOXI-4-PREGNEN-20-ONA.
(XXIX)

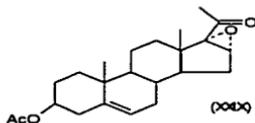


En un matraz bola de 50 ml se adicionaron 1.0 g del epóxido (XXVIII), 10 ml de anhídrido acético y 5 ml de piridina (seca). La mezcla de reacción se mantuvo 6 horas con agitación constante a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, se adicionaron lentamente 30 g de hielo, seguido de un tiempo de agitación aproximado de 5 minutos. El producto formado se filtró y se dejó secar. El sólido obtenido se disolvió en 150 ml de cloroformo; mientras tanto, el filtrado inicial se sometió a 3 extracciones de 50 ml de cloroformo cada una, las dos fases orgánicas se lavaron 3 veces con 15 ml de una solución de ácido clorhídrico al 8 % (p/v), posteriormente, la fase orgánica se neutralizó con una solución de bicarbonato de sodio saturada y finalmente se lavó con agua hasta llegar a pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a sequedad.

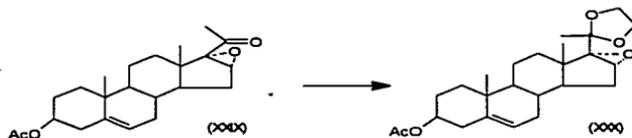
El sólido resultante se recrystalizó por par de disolventes acetato de etilo-éter isopropílico, obteniéndose un rendimiento del 100.0 %.

TABLA 3
PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DEL
COMPUESTO (XXDX)



pf	157 - 159° C
PM	358 uma
IR	
2954 cm ⁻¹	metilos y metilenos carbonilo del éster en C-3 cetona en C-20 epóxido en C-16α-C-17α
1732 cm ⁻¹	
1698 cm ⁻¹	
850 cm ⁻¹	
RMN	
1.1 ppm	singlete (6H, metilos en C-18 y C-19)
2.0 ppm	singlete (6H, metilo en C-21 y metilo de acetilo en C-3)
3.7 ppm	singlete (1H, base del epóxido en C-16)
4.6 ppm	multiplete (1H, base del acetilo en C-3)
5.3 ppm	doblete (1H, protón vinílico de C-6)

C) SINTESIS DE 3- β -ACETOXI-20-ETILENDIOXI-16- α -EPOXI-5-PREGNENO (XXX)

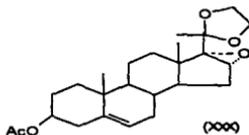


En un matraz de bola de 50 ml se colocaron 1 g de epoxiacetato (XXXIX) y 20 mg de ácido paratoluensulfónico, mismos que se disolvieron en 6 ml de tolueno, 3 ml de etilenglicol y 4 ml de ortoformiato de trimetilo. La mezcla de reacción se mantuvo 4 horas con agitación a una temperatura de 65°C (baño de aceite).

Una vez concluido este tiempo, se adicionaron 7 mg de acetato de sodio anhidro en un lapso de 3 min. con agitación, posteriormente, se extrajo 3 veces con 50 ml de cloroformo cada una. La fase orgánica se lavó con agua hasta llevarla a pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad.

El compuesto obtenido se purificó mediante recrystalización de metanol-éter isopropílico, obteniéndose un rendimiento del 74.0%.

TABLA 4
PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DEL
COMPUESTO (XXX)



pf	194 - 196 ° C
PM	416 uma
IR	
2900 cm ⁻¹	metilos y metilenos
1720 cm ⁻¹	carbonilo del éster en C-3
RMN	
1.0 ppm	singulete (3H, metilo en C-18)
1.1 ppm	singulete (3H, metilo en C-19)
1.5 ppm	singulete (3H, metilo en C-21)
2.1 ppm	singulete (3H, metilo del acetilo en C-3)
3.3 ppm	singulete (1H, base del epóxido en C-16)
3.9 ppm	singulete (4H, dioxolano en C-20)
4.6 ppm	multiplete (1H, base del acetilo en C-3)
5.3 ppm	doblete (1H, protón vinílico en C-6)

D) SINTESIS DE 3- β -17- α -DIHIDROXI-20-ETILENIOXI-16- β -METIL-5-PREGNENO. (XXXI)

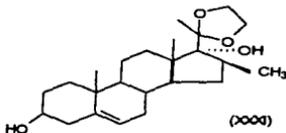


En un matraz bola de 50 ml se adicionaron 1 g del cetal (XXX), 300 mg de yoduro de cobre y 11 ml de cloruro de metilmagnesio. La mezcla de reacción se mantuvo 5 días a reflujo con agitación constante y bajo atmósfera de nitrógeno.

Al finalizar este tiempo, se adicionaron 20 ml de una solución de cloruro de amonio saturada de manera lenta y con precaución; en seguida se extrajo 3 veces con 100 ml de cloroformo cada una, y posteriormente se lavó con agua hasta obtener un pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a completa sequedad.

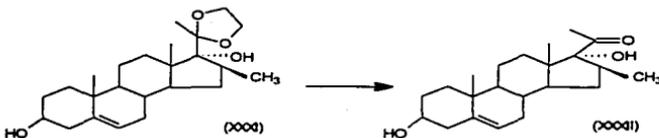
El producto obtenido se purificó mediante recristalización en metanol-éter isopropílico, obteniéndose un rendimiento del 60.0 %.

TABLA 5
PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL
COMPUESTO (XXXI)



pf	162 - 165 ° C
PM	390 uma
IR	
3576 cm ⁻¹	alcohol en C-17α
3416 cm ⁻¹	alcohol en C-3α
RMN	
0.87 ppm	singulete (3H, metilo en C-18)
0.98 ppm	singulete (3H, metilo en C-19)
1.17 ppm	doblete (3H, metilo en C-16)
1.37 ppm	singulete (3H, metilo en C-21)
3.5 ppm	multiplète (1H, base del alcohol en C-3)
4.0 ppm	multiplète (4H, etilendioxi C-20)
5.4 ppm	doblete (1H, protón vinílico en C-6)

**E) SINTESIS DE 3- β -17- α -DIHIDROXI-16- β -METIL-5-PREGNEN-20-ONA
(XXXII)**

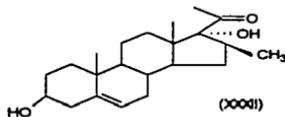


En un matraz de 50 ml se colocó 1 g del compuesto metilado (XXXI) que se disolvió en 4.5 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial y 10 ml de agua a 5 ° C. Dicha mezcla de reacción se mantuvo 3 horas bajo reflujo con agitación magnética a temperatura ambiente.

Transcurrido dicho tiempo, se llevó a una temperatura de 4 ° C y el precipitado obtenido se filtró y se secó a temperatura ambiente.

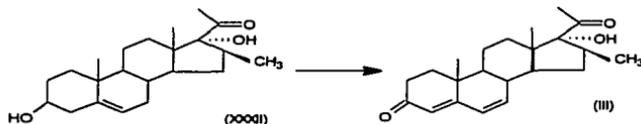
El compuesto resultante se recrystalizó en metanol, obteniéndose un rendimiento de 80.0 %

TABLA 6
PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL
COMPUESTO (XXXII)



pf	228 - 230 °C
PM	346 uma
IR	
1696 cm ⁻¹	carbonilo en C-20
3462 cm ⁻¹	alcoholes en C-3β y C-17α
RMN	
1.1 ppm	doblete (3H, metilo en C-16β)
1.1 ppm	singulete (3H, metilo en C-18)
1.3 ppm	singulete (3H, metilo en C-19)
2.1 ppm	singulete (3H, metilo en C-21)
3.5 ppm	multiplete (1H, base del alcohol en C-3)
5.3 ppm	doblete (1H, protón vinílico en C-6)

F) SINTESIS DE 17- α -HIDROXI-16- β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA.
(III)

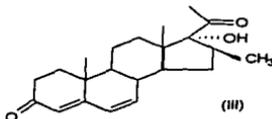


En un matraz de 50 ml se adicionó 1 g de compuesto hidrolizado (XXXII), 3 g de carbonato de litio, 2 g de bromuro de litio y 15 ml de dimetilformamida (DMF) los cuales se mantuvieron en agitación y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Terminado dicho tiempo, se adicionaron 0.92 g de bromo disueltos en 6.02 ml de dioxano. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a 80 °C durante 3 horas.

Una vez concluido este tiempo, la reacción se dejó enfriar, se filtró el producto y se lavó con DMF, posteriormente se adicionaron 65 ml de una solución de bicarbonato de sodio y bisulfito de sodio, se obtuvo un precipitado que se mantuvo a 4 °C, se filtró y dejó secar a temperatura ambiente.

El sólido obtenido se recrystalizó en acetona, obteniéndose un rendimiento de 85.0 %

TABLA 7
PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DEL
COMPUESTO (III)



pf	212- 215 °C
PM	354 uma
UV	
λ max 284 nm	cetona α,β,γ,δ conjugada en C-3
IR	
1702 cm ⁻¹	carbonilo en C-3
1662 cm ⁻¹	carbonilo en C-20
3498 cm ⁻¹	hidroxilo en C-17
RMN	
0.7 ppm	singulete (3H, metilo en C-18)
0.9 ppm	singulete (3H, metilo en C-19)
1.1 ppm	doblete (3H, metilo en C-16β)
2.1 ppm	singulete (3H, metilo en C-21)
3.9 ppm	multiplete (DMSO, disolvente)
5.3 ppm	doblete (1H, protón en C-6)
5.6 ppm	singulete (1H, protón en C-4)
6.2 ppm	triplete (1H, protón en C-7)

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIANDROGENICA.

La actividad antiandrogénica de los derivados sintetizados se llevó a cabo tomando como parámetro la potencia antiandrogénica de los compuestos, la capacidad para inhibir la actividad de la enzima 5α -reductasa, ya que ésta convierte la testosterona (VIII) a DHT (IX), que se considera un andrógeno más potente [14].

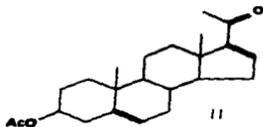
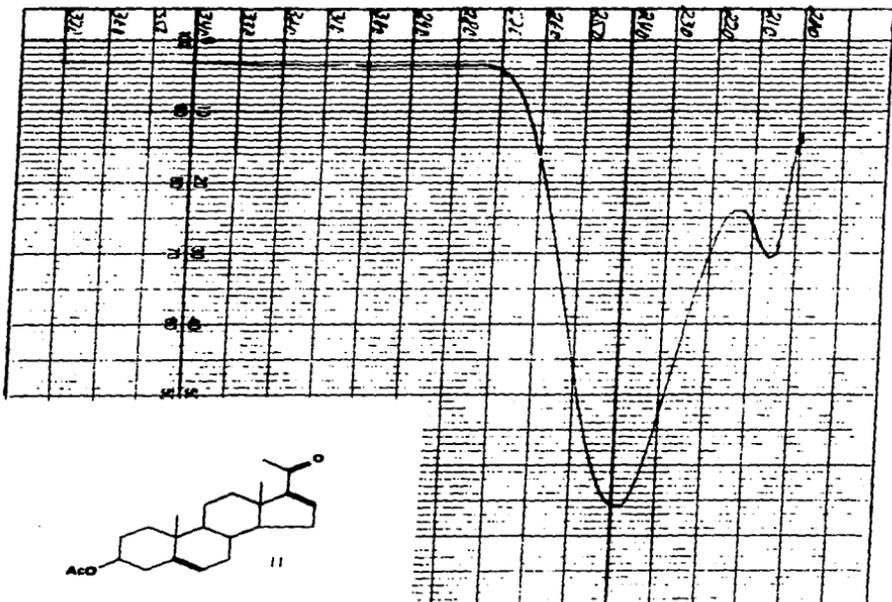
OBTENCION DEL EXTRACTO CONCENTRADO DE PROTEINAS.

Siguiendo técnicas de extracción de la enzima previamente publicadas [32, 33], se dispuso de 2 ratas macho de 250 g de peso, sacrificándolas por desnucamiento. Inmediatamente, fueron extraídos el hígado y los testículos. Estos tejidos se homogeneizaron por separado en 2 partes de solución de KCl 0.17 M. El extracto se filtró y centrifugó a 15,000 x g durante 30 min. se recuperó el sobrenadante y se saturó al 50 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en frío, el precipitado formado se dializó en contra de 1 l de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.3 durante 24 hrs. El dializado obtenido se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto concentrado de proteínas para realizar el ensayo enzimático. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C. La proteína del extracto se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina sérica de bovino como estándar [34].

CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD DE 5α -REDUCTASA.

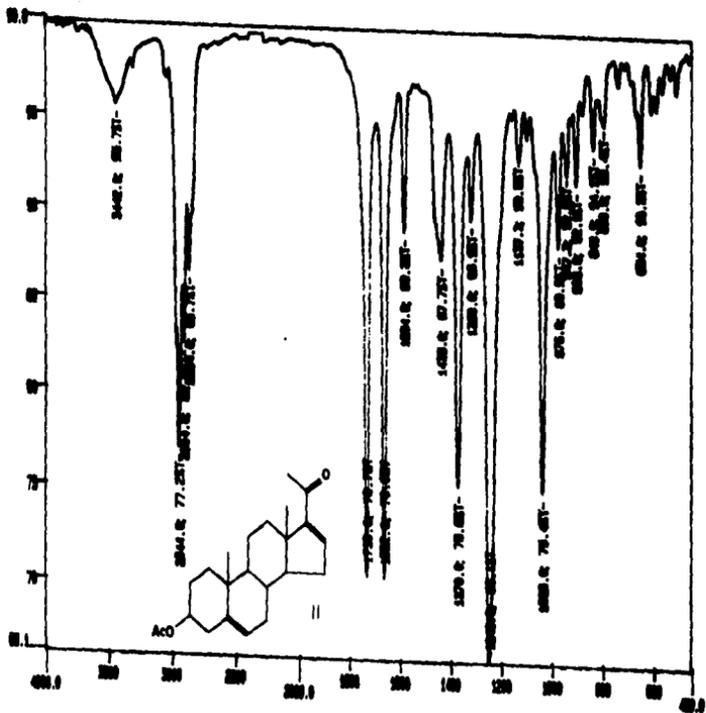
La cuantificación de actividad de 5α -reductasa se realizó incubando 100 μg de proteína del extracto concentrado obtenido, en un medio de reacción que contenía: testosterona 500 μM , buffer Tris-HCl 100 mM pH 7, NADPH 100 μM . Se incubó durante 30 min. a 37°C con agitación y se determinó la variación de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2.

ESPECTROSCOPIA



ESPECTRO I. ESPECTRO DE UV DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA

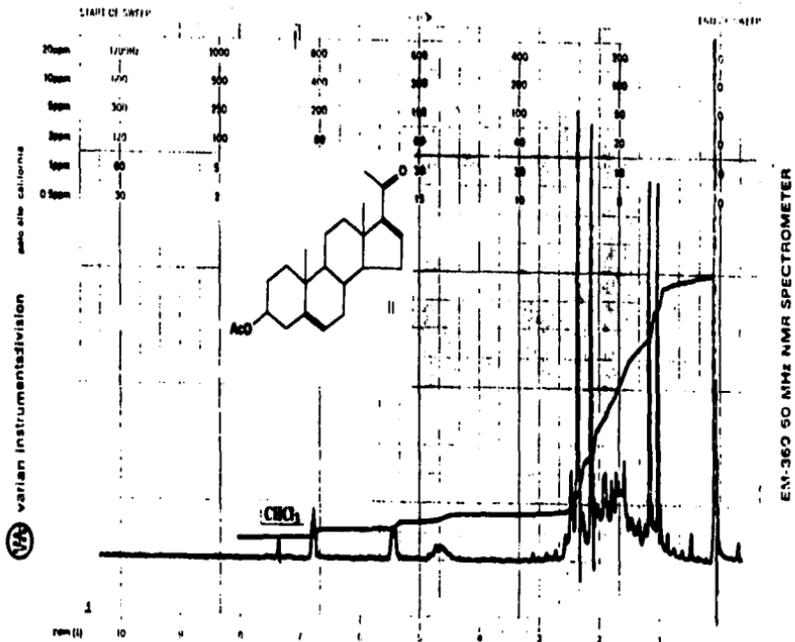
27



D-1

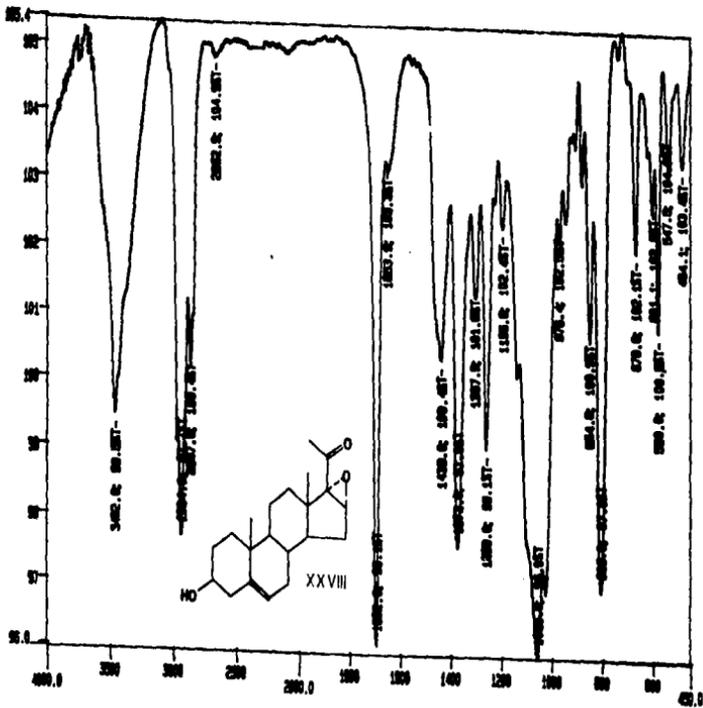
ESPECTRO 2. ESPECTRO DE IR DE ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA

44

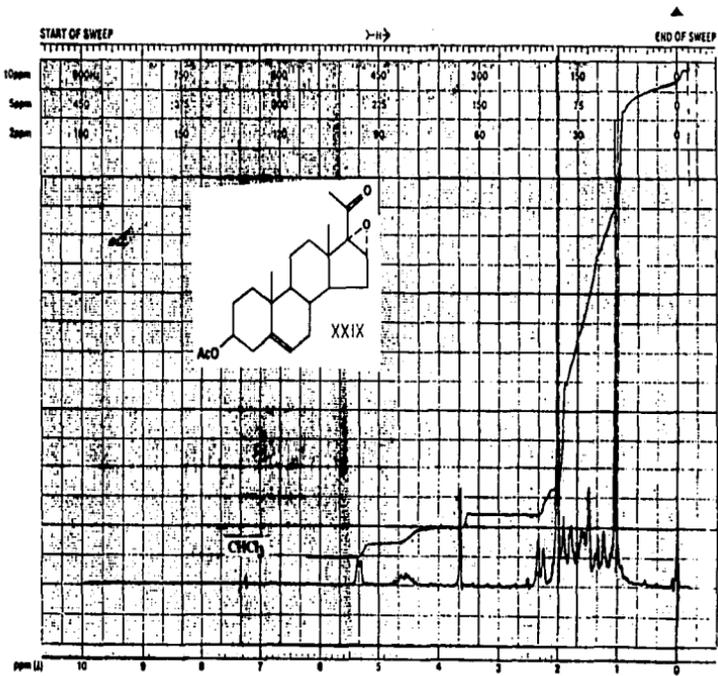


ESPECTRO 3. ESPECTRO DE RMN DEL ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA

IR

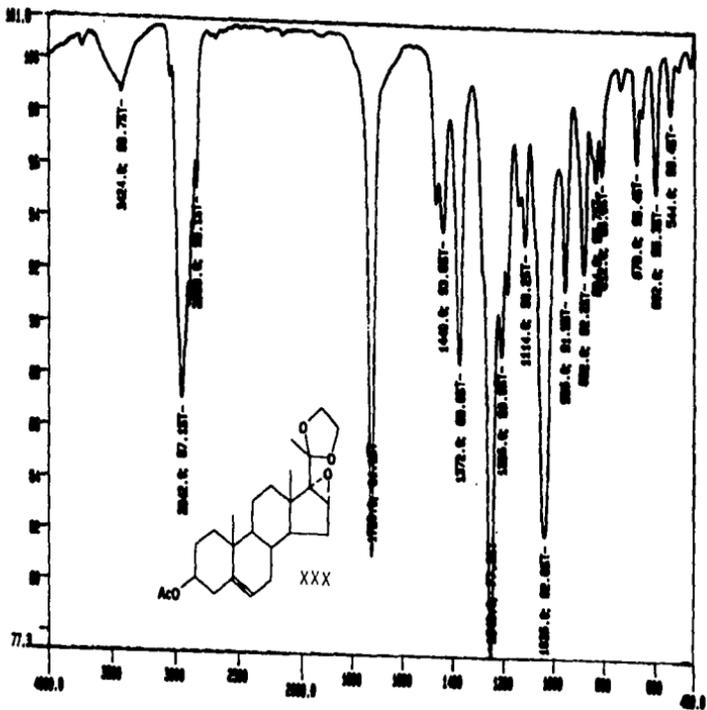


ESPECTRO 4. ESPECTRO DE IR DE 16α-17α-EPOXI-3β-HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA



ESPECTRO 7. ESPECTRO DE RMN DE 3β-ACETOXI-16α-17α-EPOXI-4-PREGNEN-20-ONA

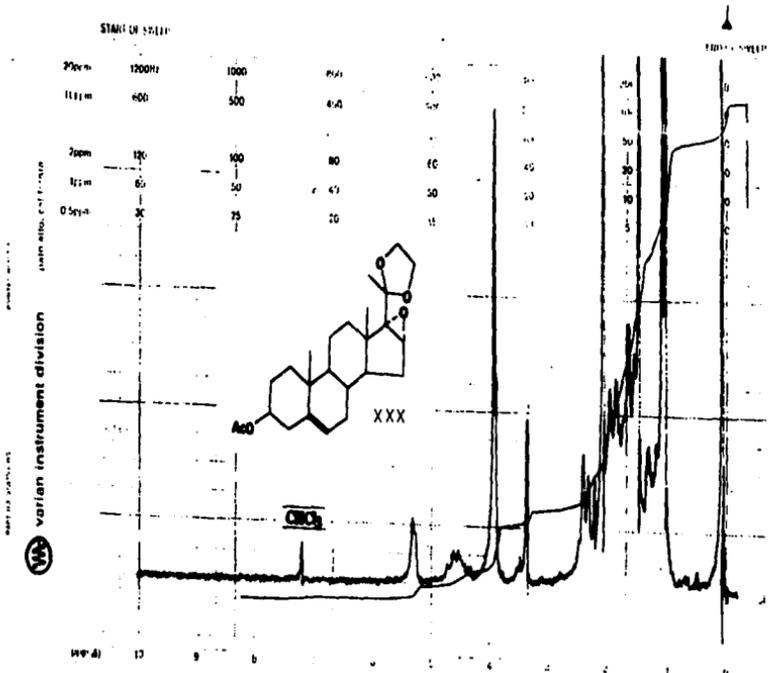
57



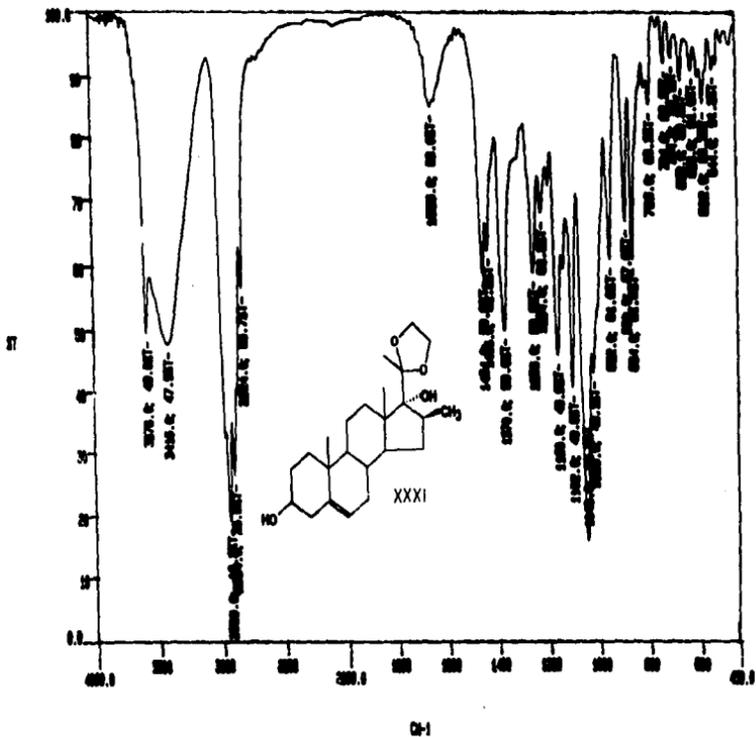
D-1

ESPECTRO R. ESPECTRO DE IR DE 3β-ACETONI-16α-17α-EPOXI-20-ETILENDIOXI-5-PREGNEÑO

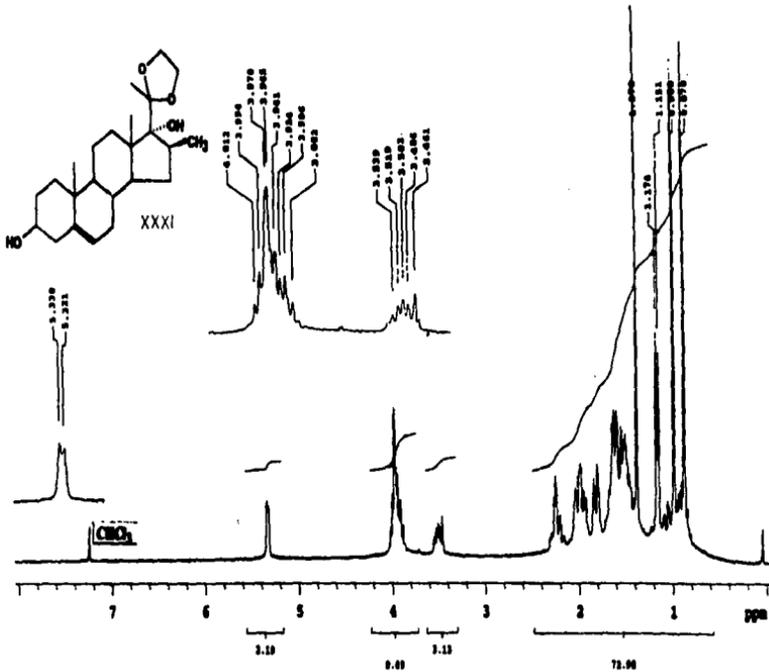
58



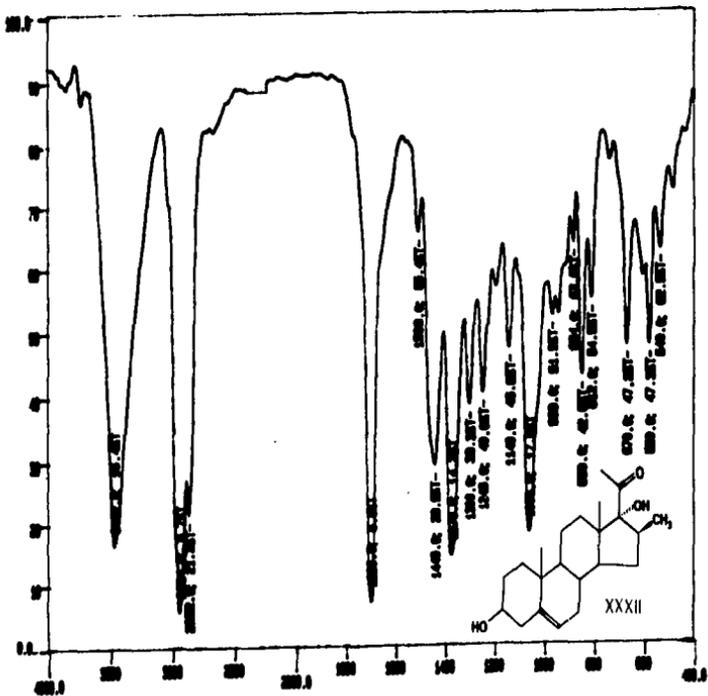
ESPECTRO 9. ESPECTRO DE RMN DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-20-ETILENDOXI-5-PREGNENO



ESPECTRO 10. ESPECTRO DE IR DE 20-ETILENDIONA-3β-17α-DIHIPOXI-16β-METIL-5-PREGNEÑO



ESPECTRO 11. ESPECTRO DE RMN DE 20-ETILENDOXI-16 α -DIHIDROXI-14 β -METIL-5-PREGNENO



ESPECTRO 12. ESPECTRO DE IR DE 3β-17α-DIHDROXI-16β-METIL-5-PREGNEN-20-ONA

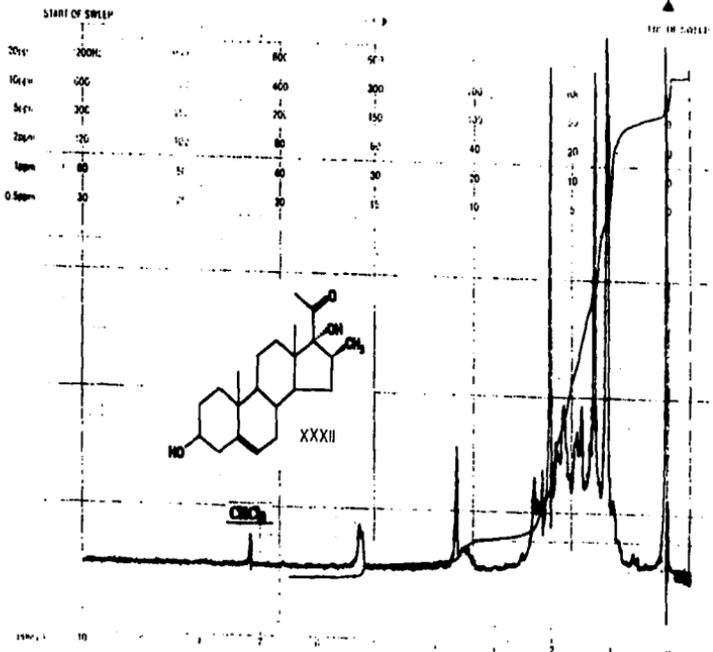
MM-200P-2 U.S.A.

VAR-100 SYSTEM 83



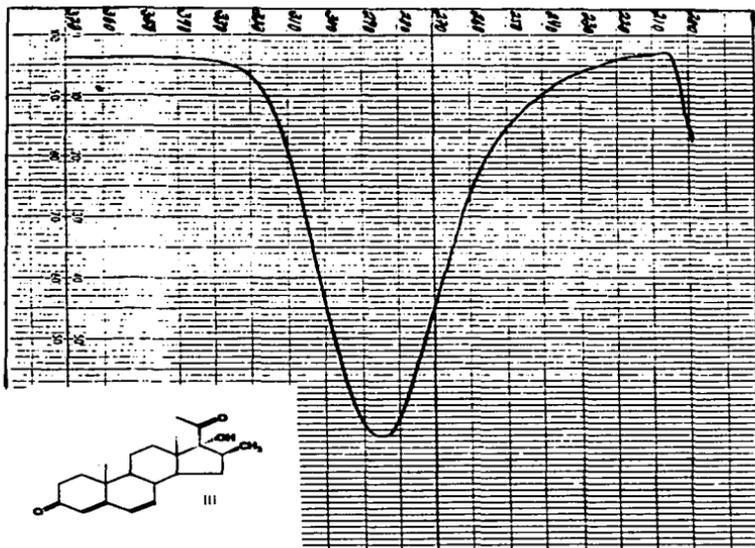
varian instrument division

patio alto, californie

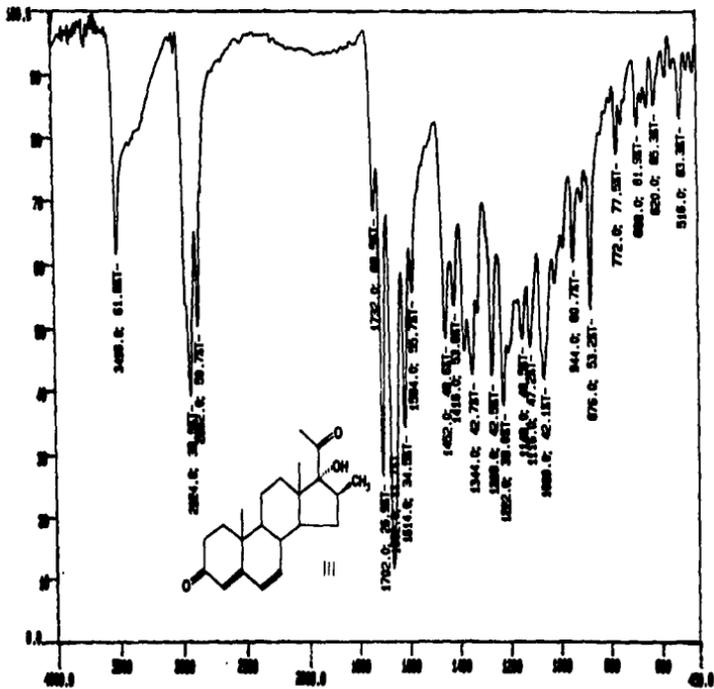


FM-360 60 MHz NMP SPECTROMETER

ESPECTRO 13. ESPECTRO DE RMN DE 3β-17α-DIHIDROXI-16β-METIL-5-PREGNEN-20-ONA

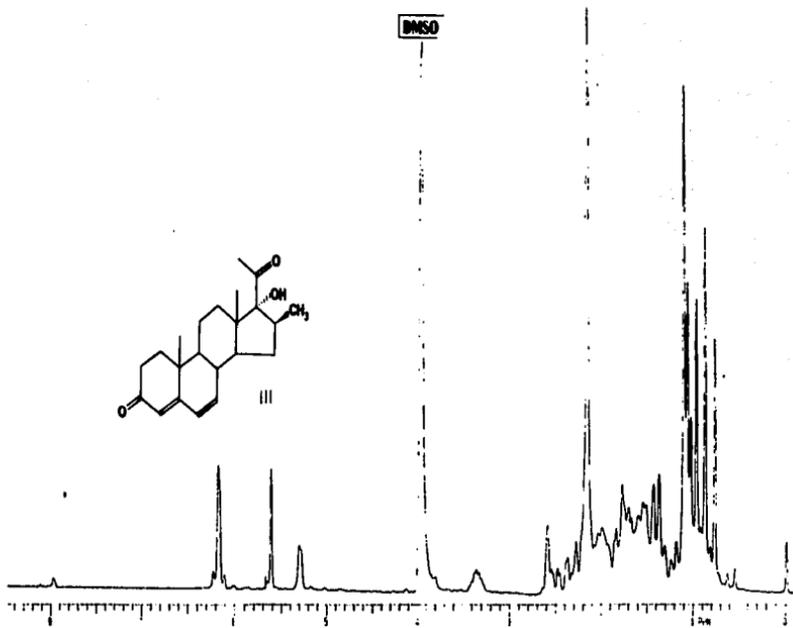


ESPECTRO 14. ESPECTRO DE UV DE 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA



Q-1

ESPECTRO 15. ESPECTRO DE IR 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA



ESPECTRO 16. ESPECTRO DE RMN DI 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA

CONCLUSION

Mediante las reacciones planteadas en la Ruta de Síntesis General (Esquema B, página 19), se logró obtener el compuesto 17- α -hidroxi-16- β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (III).

Lo anterior fue posible a partir del acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA) (II) como materia prima, en la que se buscó introducir dobles ligaduras en C-4 y C-6, con la conjugación del grupo carbonilo en C-3; un grupo hidroxilo en C-17 y un grupo metilo en C-16.

Las modificaciones realizadas para nuestro propósito muestran la semejanza de nuestro compuesto de interés (III) con el acetato de ciproterona (I), lo cual nos llevó a plantear la posible actividad farmacológica.

La evaluación farmacológica realizada a los intermediarios y al producto final se llevó a cabo tomando como parámetro la potencia antiandrogénica de los compuestos; es decir, la capacidad para inhibir la actividad de la enzima 5 α -reductasa, ya que ésta convierte la testosterona (VIII) a DHT (IX) que se considera un andrógeno más potente y estimula la formación del cáncer prostático.

En base a lo anterior, la actividad de los compuestos como inhibidores de la 5 α -reductasa en extracto de testículo de rata reflejan buenos porcentajes con respecto al acetato de ciproterona (I) que es el antiandrógeno esteroidal de elección en el mercado.

Lo que finalmente nos permite determinar que nuestro compuesto objetivo : 17- α -hidroxi-16- β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (III) sea considerado un intermediario en la síntesis de antiandrógenos.

BIBLIOGRAFIA

1. **Counsell, R.E.; Klimstra P.D.; and Burger, A. ; (1970);** Medicinal Chemistry; Parte II; 3th De.; Hohn Wiley & Sons. Inc.; U :S :A :; p. 923.
2. **Briggs H:H:; Brotherton J. ; (1970);** "Steroid Biochemistry in Pharmacology"; Vol. I; Academic Press ; Londres y N. York ; p. 30.
3. **Vietze G. ; (1976) ;** Psychiatr. Neurol. Med. Psychol (leipzig) 28.; parte II ; p. 684.
4. **Kline W. ; (1970) ;** "Química de los Esteroides" ; 1a. de.; Compañía Editorial Argentina. S :A :; Barcelona :
5. **Scott J. ; Engel L. Ville en C.A. ; Engel B :L : ; (1961) ;** "Mechanism of Action of Steroid Hormones"; Pregamon Press ; N. York. ; p.p.20.
6. **Wietzelt R. ; et al. ; (1967) ;** Arzneimittelforschung Vol. 17 ; p. 1103.
7. **Grower, C. ; (1984) ;** The role of citochrome P-450 in steroidogenesis and propeties of some of the steroid transforming enzymes in Biochemistry of steroids hormones ; edit. Makin ; H. L. ; ; Balckegeell Sci. Pub. 2nd. Edición ; p. 230-292.
8. **Foye, W :O : ; (1988) ;** "Principios de Química Farmacéutica" ; 1a. De. ; Edit. Reverté ; España.
9. **Goodman, G :A : ; Gilman, L :S : ; (1994) ;** "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" ; 8a de. Edit. Panamericana ; México, p. 1362-1382.
10. **Lietter, M. ; (1988) ;** "Farmacología Experimental y Clínica" ; 7a. Ed. ; Edit. El Atenco ; Argentina.
11. **Brooks, R. ; (1984) ;** Androgens : physiology ando pathology, in Biochemistry of steroid hormones. Edit. Makin, H :H : ; Balckwell Sci. Pub. 2nd Edición p. 565-594.
12. **Raymond, J ; Fiet, J ; et. al. (1987) ;** Desing of Antiandrogens and their mechanisms of action : A case study (Anandron). Hormone Res. 28 : 230-241.
13. **Muyrphy, G. (1985) ;**Current. Status of therapy in prostatic cancer in managements of prostatic diseases, p. 225-229.
14. **Mallamos, J. ; Pilling, G ; et.al. (1972) ;** Antiandrogenic steroidal sulfonyl heterocycles. Utily of Eslectrostatic Complementarity in defining bioisosteric sulfonyl heterocycles.J. Of Med. Chem. ; 35(10) : 1663-1670.
15. **Bratoeff, E ; Trejo, A ; Hernández, J ; Sánchez P ; (1992) ;**"Síntesis de derivados del pregnano con un grupo metilo en posición -16"; Revista Mexicana de las Ciencias Farmacéuticas ; Vol. 22. No. 6 ; p. 14-18.
16. **Biffignandi, P ; Molinatti, G ; et.al. (1987) ;** Antiandrogens ando hirsutism, Hormone Res. 28 :242-249.

17. **Ell, C. ; (1992) ;** Ketoconazole binds to the humane androgen receptor, *Horro. Metab. Res.* 24 :367-370.
18. **Donn, F. Becker, H ; (1989) ;** Effect of cyproterone acetate in comparison to flutamide on the ventral prostate of adult male castrated Copenhagen-Fisher rats on Dunning B-3327H tumors, *Andrologia*, 21(5) :462-467.
19. **Mukherjee, M ; Chattopadhyay, S ; et. al. (1992) ;** Effect of Flutamide on the physiological status epididymis and epididymal sperms, *Andrologia*. 24 :113-116.
20. **Migally, N. (1982) ;** Effect of LHRH on cyproterone acetate injected adenohipophysys of castrated mice, *Archives of andrology*, 8 :247-250.
21. **Wakeling, A ; (1987) ;** Anti-hormones and other steroid analogues, *Steroid Hormones, A practical Approach*, De. By B. Green ; R.E. leake, IRL Ress, Washington, D.C. ; p.p.219-236.
22. **Deghenghi, R ; Revesz, C ; et. al. (1963) ;** New synthesis and structure activity relationship in the 17-alkylated progesterone series ; *J. Med. Chem. ;* 6 :301-304.
23. **Tymoczko, J ; Liao, S ; (1976) ;** Androgen receptors and molecular bases for the action of antiandrogens in the ventral prostate ; *J. Reprod. Fert. Suppl.* 24 :147-162.
24. **Bratoeff, E, Ramirez, E ; Flores, G ; Flores, C ; Calderón, D ; and Hernández, E ; (1997) ;** Synthesis of New 5 α -Reductase Inhibitors ; *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, en prensa.
25. **Meyer, J ; et. Al ; (1950) ;** *J. Am. Chem. Soc. ;* 72 :5145-5147.
26. **Löken, B ; Kaufmann, S ; Rosenkranz, G ; Sondheimer, F ; (1956) ;** *J. Am. Chem. Soc. ;* 78 :1738.
27. **Dauben, H ; Löken, B ; Ringold, J ; (1954) ;** *J. Am. Chem. Soc. ;* 76 :1359.
28. **Bernstein, S ; Littell, R. (1960) ;** *J. Am. Chem. Soc. ;* 82 :1235.
29. **Djerassi, C. ; (1951) ;** *Organic Reactions ;* 6 :207.
30. **Agnello, E ; Laubach, G ; (1960) ;** The dehydrogenation of corticosteroids with chloranil ; *J. Am. Chem. Soc. ;* 82 :4293.
31. **Sprencht, H ; Jahn, H ; Stachowiack, A ; (1966) ;** Preparation of delta 4,6-3-oxosteroids, *C :A ;* ; 64 :4245.
32. **Frederiksen, D ; Wilson, J ; (1971) ;** Partial Characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: delta-4-3-ketosteroide, 5 α -oxidoreductase of rat prostate, *J. of Biol. Chem.*, 246 : 2584-2593.
33. **Usul, T ; Ishibe, T ; et. al. ; (1987) ;** Effect of Diethylstilbestrol diphosphate on activity of 5 α lfa-reductase in human prostate, *Archives of andrology*, 19: 229-235.
34. **Bradford, M ; (1984) ;** A rapid an sensitive method of the cuantification of microquantities of protein; *Am. Biochem.*; 72:248.