



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO DE SAPOGENINAS REORDENADAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO**

PRESENTA:

**IGNACIO VÁZQUEZ RAMÍREZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA**

**MÉXICO, D.F.**

**2008**



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. Elvira Santos Santos
Vocal	Prof. José Manuel Méndez Stivalet
Secretario	Prof. Martín Andrés Iglesias Arteaga
1er. Suplente	Prof. Martha Menes Arzate
2º. Suplente	Prof. Daniel Méndez Iturbide

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 4-D del Edificio A de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga

Sustentante: Ignacio Vázquez Ramírez

El contenido de esta tesis esta recogido en el artículo  *$^1H$  and  $^{13}C$  NMR characteristics of synthetic derivatives of steroid sapogenins Part III.  $16\beta,23:23,26$ -Diepoxy side chains*. Steroids 2008, 73, 642–651 del que el sustentante es primer autor, (se adjunta una copia del articulo).

## **INDICE**

<b>INDICE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Planteamiento del problema. ....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Objetivos.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Hipótesis.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Marco teórico. ....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Sapogeninas esteroidales, distribución en la naturaleza.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Características estructurales.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. La cadena lateral espirostánica. ....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 .Primeras reacciones en sapogeninas esteroidales. ....</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Reactividad de las sapogeninas esteroidales espirostánicas. ....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. Sapogeninas esteroidales con actividad antitumoral.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Material y métodos. ....</b>	<b>24</b>
<b>4. Resultados. ....</b>	<b>27</b>
<b>5. Discusión. ....</b>	<b>39</b>
<b>6. Resumen. ....</b>	<b>48</b>
<b>7. Conclusiones. ....</b>	<b>50</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>51</b>
<b>9. Artículo. ....</b>	<b>57</b>

## 1. Introducción.

### 1.1. Planteamiento del problema.

En la actualidad la temática de las sapogeninas esteroidales concentra la atención y esfuerzo de numerosos científicos dedicados al desarrollo de nuevos procesos de síntesis, así como al estudio de la actividad biológica de nuevos integrantes de esta familia.

Las sapogeninas esteroidales tienen interés farmacéutico debido a que se pueden convertir en hormonas sexuales, anticonceptivos, agentes anabólicos y drogas del tipo de la cortisona, además de que muchas de ellas presentan actividades biológicas, tales como la reducción de los niveles de glucosa en la sangre ó la inhibición de la proliferación de varios tipos de células tumorales malignas *in vitro*.<sup>1-4</sup>

Las características de la reactividad química de las sapogeninas esteroidales han sido tratadas ampliamente. En el caso de la síntesis de fármacos a partir de estas fuentes, un paso común es la degradación, eliminación o modificación de la cadena lateral espirocetálica, es por ello que nos hemos enfocado a la síntesis de sapogeninas esteroidales con la cadena modificada para probar si tienen actividad antitumoral.

Por tal motivo, en el presente trabajo se propone la síntesis y caracterización de nuevos derivados de sapogeninas esteroidales a partir de 23-oxosapogeninas y 23-oxosapogeninas reordenadas.

El estudio de estas reacciones de sapogeninas esteroidales permitirá verificar si la transformación de la cadena lateral influye también en la actividad biológica.

## **1.2. Objetivo.**

- Sintetizar y caracterizar nuevos derivados de sapogeninas esteroidales a partir de 23-oxosapogeninas y 23-oxosapogeninas reordenadas.

## **1.3. Hipótesis.**

Es posible sintetizar nuevos derivados de sapogeninas esteroidales que presenten estructuras análogas a las de sapogeninas con actividad antitumoral a partir de 23-oxosapogeninas y 23-oxosapogeninas reordenadas.

## **2. Marco teórico.**

### **2.1. Sapogeninas esteroidales, distribución en la naturaleza.**

Las sapogeninas esteroidales, son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; suelen estar presentes en representantes del género vegetal marino y terrestre, en forma de glicósidos denominados saponinas, que están constituidas por una o varias unidades de diferentes sacáridos condensados con la unidad esteroidal y que al ser sometidos a hidrólisis producen la sapogenina y los sacáridos en sus formas libres.

Las más conocidas son las sapogeninas obtenidas de algunas especies de la familia de las liliáceas (añañuca, violeta del campo, huilli) y la diosgenina (1), importante materia prima que se obtiene de diversas especies de *Dioscorea*. Otras sapogeninas importantes desde el punto de vista industrial son las obtenidas de *Panax ginseng* (el ginseng), con los que se elabora una amplia gama de productos.

La dioscórea es uno de los géneros de plantas más conocido, conociéndose de 600 a 800 especies.<sup>5</sup> Los túbulos de dióscorea han sido utilizados en muchas partes de mundo como alimento y como medicina herbal. Estas raíces son la fuente de agentes empleados para tratar un gran número de padecimientos tales como inflamaciones, dolores de articulaciones, diabetes e infecciones. Los compuestos farmacológicamente activos de la especie *Dioscorea* incluyen a la diosgenina (1), la cual es una sapogenina esteroidal, y la dioscina (2), una saponina de la diosgenina (1) con azúcares unidos a su estructura.





Figura 1. Raíces y túbulos característicos del género *Dioscorea tokoro*.

La diosgenina (1) (Figura 2), una de las sapogeninas esteroidales más importantes fue aislada por primera vez de un extracto de *Dioscorea tokoro*. Posteriormente, Tsukamoto, et al.<sup>6-8</sup> propusieron una estructura para este compuesto que contenía un doble enlace 5,6 y un grupo hidroxilo en la posición del C-3 presentando una configuración  $\beta$  al igual que el colesterol.

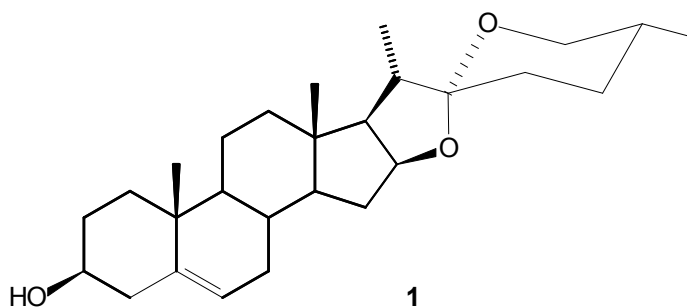


Figura 2. Estructura de la diosgenina.

## 2.2. Características estructurales.

Las sapogeninas esteroidales, según el tipo de esqueleto carbonado, pueden ser clasificadas como espirostanos, furostanos y furoespirostanos. Las de tipo espiroestánico, que son las más comunes, constan de un esqueleto de tipo

ciclopentanoperhidrofenantreno unido a una cadena lateral constituida por dos anillos oxigenados unidos a través de un puente cetálico que involucra las posiciones C-16, C-22 y C-26. Esta agrupación conforma el sistema espirocetálico, característica distintiva del núcleo básico estirostano y es responsable de un grupo de reacciones específicas y características de este tipo de compuestos.

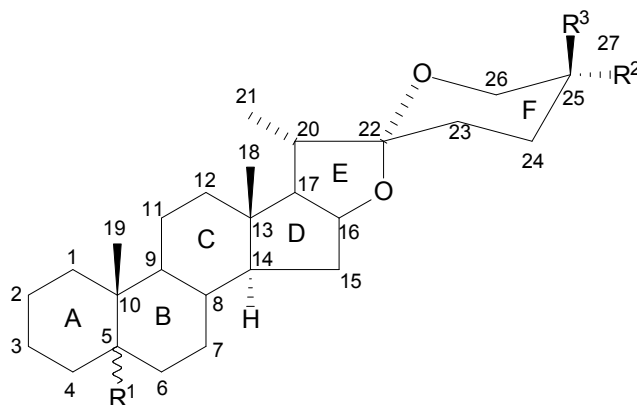
El término estirostano tiene su origen en la disposición espacial que ocupa el anillo F de tipo tetrahidropiránico con respecto al E de tipo tetrahidrofuránico. Estos dos anillos están dispuestos en planos perpendiculares debido a la hibridación  $sp_3$  de C-22.

El grupo de sapogeninas esteroidales estirostánicas pueden ser dividido a la vez en compuestos  $5\alpha$ -estirostánicos y  $5\beta$ -estirostánicos.

*5 $\alpha$ -estirostanos:* En estos compuestos, la fusión entre el anillo A y el anillo B es *trans* y el hidrógeno de C-5 tiene una orientación  $\alpha$ , los compuestos de este tipo se clasifican como el grupo de la serie  $5\alpha$ .

*5 $\beta$ -estirostanos:* La fusión *cis* de los anillos A y B genera esta serie en la cual el átomo de hidrógeno en la posición C-5 adquiere la orientación  $\beta$ . Estos compuestos se conocen como el grupo de la serie  $5\beta$ .

Además, dependiendo de la orientación axial ó ecuatorial del metilo-27, los estirostanos también se han agrupado en series  $25R$  o  $25S$ , respectivamente. (Figura 3).



- 1.1  $R^1 = \alpha\text{-H}$ ;  $5\alpha$ -espirostanos  
 1.2  $R^1 = \beta\text{-H}$ ;  $5\beta$ -espirostanos  
 1.3  $\Delta^{5(6)}$ ;  $\Delta^5$ -espirostanos

- 25R 1.1  $R^1 = R^3 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{Me}$   
 25S 1.1  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{Me}$

**Figura 3. Esqueleto básico de saponinas esteroidales espiroestánicas.**

La unión de los anillos A y B puede ser *cis* ( $5\beta$ ) ó *trans* ( $5\alpha$ ) ó puede involucrar la insaturación en C-5. Un grupo hidroxilo está casi siempre presente en la posición C-3, y grupos hidroxilo ó cetónicos pueden estar presentes en las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 11, 12 ó 15.

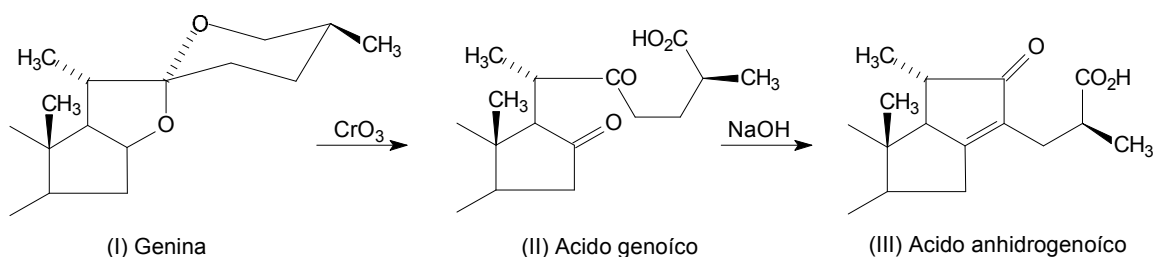
Diferentes combinaciones de isómeros son posibles dependiendo de los centros quirales C-20, C-22 y C-25, pero la mayoría de las saponinas nativas tienen una configuración  $20S, 22R$ .

La química de los espirostanos ha sido estudiada exhaustivamente en el último siglo debido al descubrimiento de las cefalostatinas y algunos compuestos citotóxicos relacionados.

### **2.3. La cadena lateral espiroestánica.**

La formulación espirocetálica I de la parte terminal de la cadena lateral de las saponinas esteroidales fue establecida por Marker<sup>9</sup> después de una serie de investigaciones inicialmente dirigidas a la transformación de ácido sarsapogenoico (II) (Figura 4).

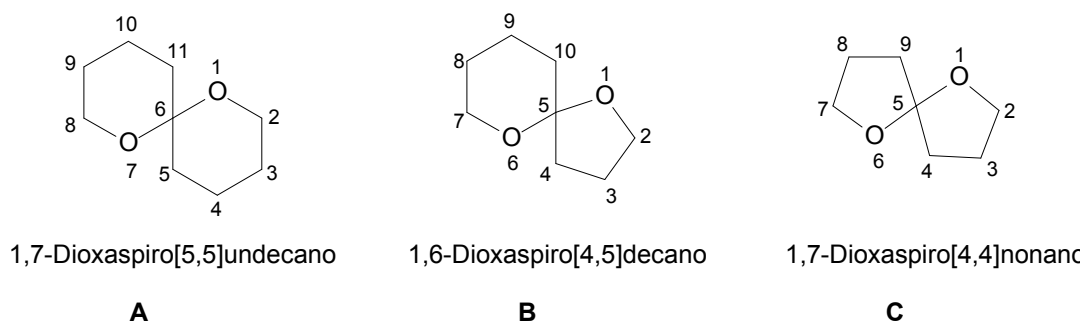
Este ácido, el cual corresponde al ácido tigogenoico de Tschesche<sup>10</sup> había sido obtenido por Fieser y Jacobsen<sup>11</sup> por una oxidación controlada con ácido crómico del acetato de sarsasapogenina. Después se encontró que en presencia de una base, este compuesto podía sufrir una condensación para generar un compuesto anhídrido (III) caracterizado como un ácido  $\gamma,\delta$ -insaturado.



**Figura 4. Esquema sintético de Marker para verificar la estructura de la cadena espirocetálica.**

Los espiroacetales se encuentran presentes como subunidades estructurales de metabolitos importantes como feromonas y fitoestrógenos, por ello han recibido una atención sintética considerable.<sup>9,12,13</sup>

La mayor parte de los productos naturales poseen sistemas espirocetálicos con las estructuras A, B ó C (Figura 5).

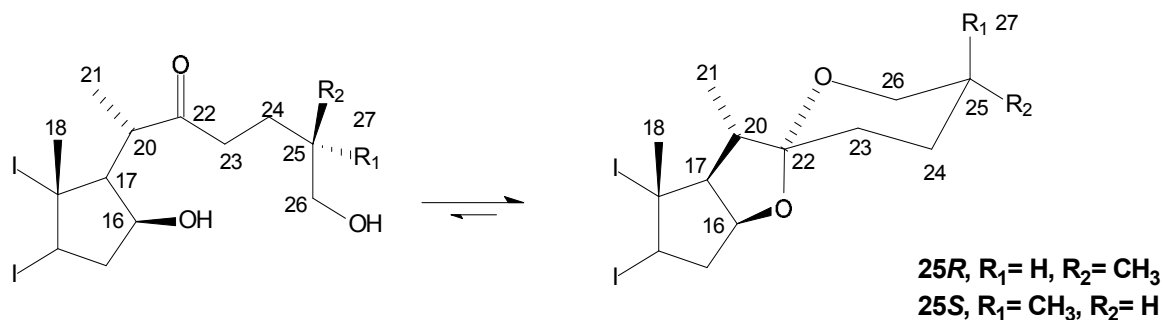


**Figura 5. Sistemas espirocetálicos más comunes.**

A mediados del siglo pasado se estudió ampliamente la reactividad de los sistemas espirocetálicos de las sapogeninas.<sup>9</sup> Como consecuencia de lo anterior, algunos miembros de esta familia sirvieron como materias primas para la preparación de esteroides con actividad biológica y más recientemente han sido

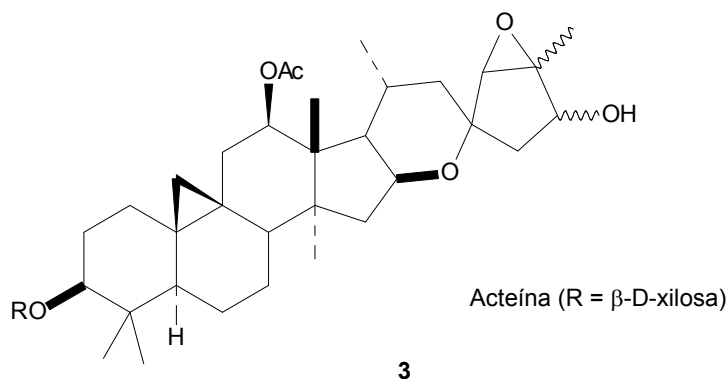
utilizados en la síntesis de análogos esteroídicos y furostánicos de brasinoesteroides con modificaciones en la cadena lateral.<sup>14</sup> Todos los procedimientos sintéticos empleados para estos fines involucran la degradación ó modificación de la cadena lateral esteroídica.

Las series 25R y 25S de las sapogeninas esteroídicas se caracterizan por la presencia de una estructura espirocetálica debida a la cetalización de la función 22-ceto que involucra los grupos hidroxilo en las posiciones 16β y 26 (Figura 6). Este fragmento estructural le confiere una reactividad especial a las sapogeninas esteroídicas



**Figura 6. La cadena lateral esteroídica.**

Una estructura espirocetálica similar también se ha encontrado en algunas saponinas triterpenoides, por ejemplo: acetina (**3**)<sup>15</sup>, aislada por primera vez de la raíz de *Cimicifuga simplex* la cual muestra una potente actividad inmunosupresora. En estos compuestos, la unidad espiránica está unida al C-23 en el anillo D.



**Figura 7. Estructura de la acetina (3).**

La espectroscopia de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  ha sido empleada para elucidar la estructura de las diversas sapogeninas esteroidales, lo anterior ha permitido realizar el análisis de cambios configuracionales en C-5 y C-25.

#### **2.4. Primeras reacciones en sapogeninas esteroidales.**

Las sapogeninas esteroidales han sido objeto de muchos estudios como precursores para la síntesis de hormonas sexuales y cortisona.

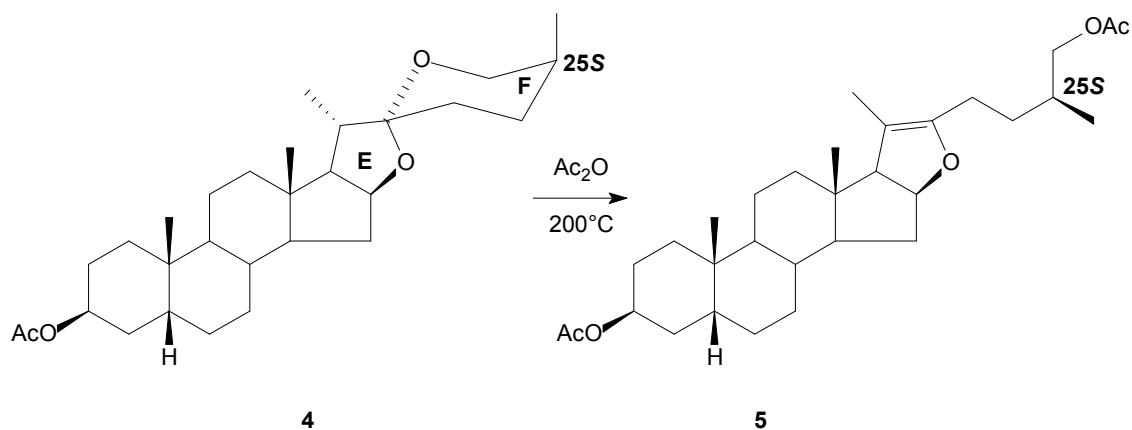
Marker realizó estudios de plantas del género *Dioscorea* en los bosques del norte y centroamérica en busca de sapogeninas esteroidales que pudieran transformarse químicamente en hormonas sexuales. Encontró rizomas de dioscóreas en las selvas tropicales del sureste mexicano de donde aisló la diosgenina. Con esta sustancia como materia prima, preparó progesterona (**9**), la hormona de la gestación, e inició en México la industria esteroidal asociado con los doctores Emeric Somlo y Frederick Lehmann en los laboratorios Syntex, S.A. Sus descubrimientos fueron innovadores para la industria de los esteroides, con sus aportaciones comenzaron la elaboración masiva de hormonas a bajos costos con reducciones notables de precios y múltiples programas de investigación que dieron como resultado las hormonas corticales y la “píldora” anticonceptiva.

Los químicos de esteroides se refieren a los años 30's con el nombre de la década de las hormonas sexuales porque en este período se determinaron las estructuras de las hormonas masculinas y femeninas, y además fueron introducidas por primera vez como fármacos en la práctica médica.

La progesterona (**9**) acaparó mucho la atención debido a su uso en el tratamiento de desórdenes menstruales; sin embargo, su alto costo restringía su uso. El costo de la progesterona y de otros importantes esteroides disminuyó drásticamente en la década de los 40's con la creación de la industria mexicana de esteroides Syntex.

Marker, propuso una estructura para la cadena lateral de la sarsasapogenina (**4**),<sup>16</sup> una sapogenina esteroideal aislado de la planta de la sarsaparilla. En la estructura de Marker, la cadena lateral era químicamente reactiva debido a los dos átomos de oxígeno unidos al mismo átomo de carbono.

Los estudios llevados a cabo por Marker y otros<sup>9,16-23</sup> sobre la transformación de la cadena espirocetálica de sapogeninas generaron principalmente pseudosapogeninas,<sup>11,23-28</sup> lo que indicaba que existía una gran selectividad en la ruptura del anillo F.

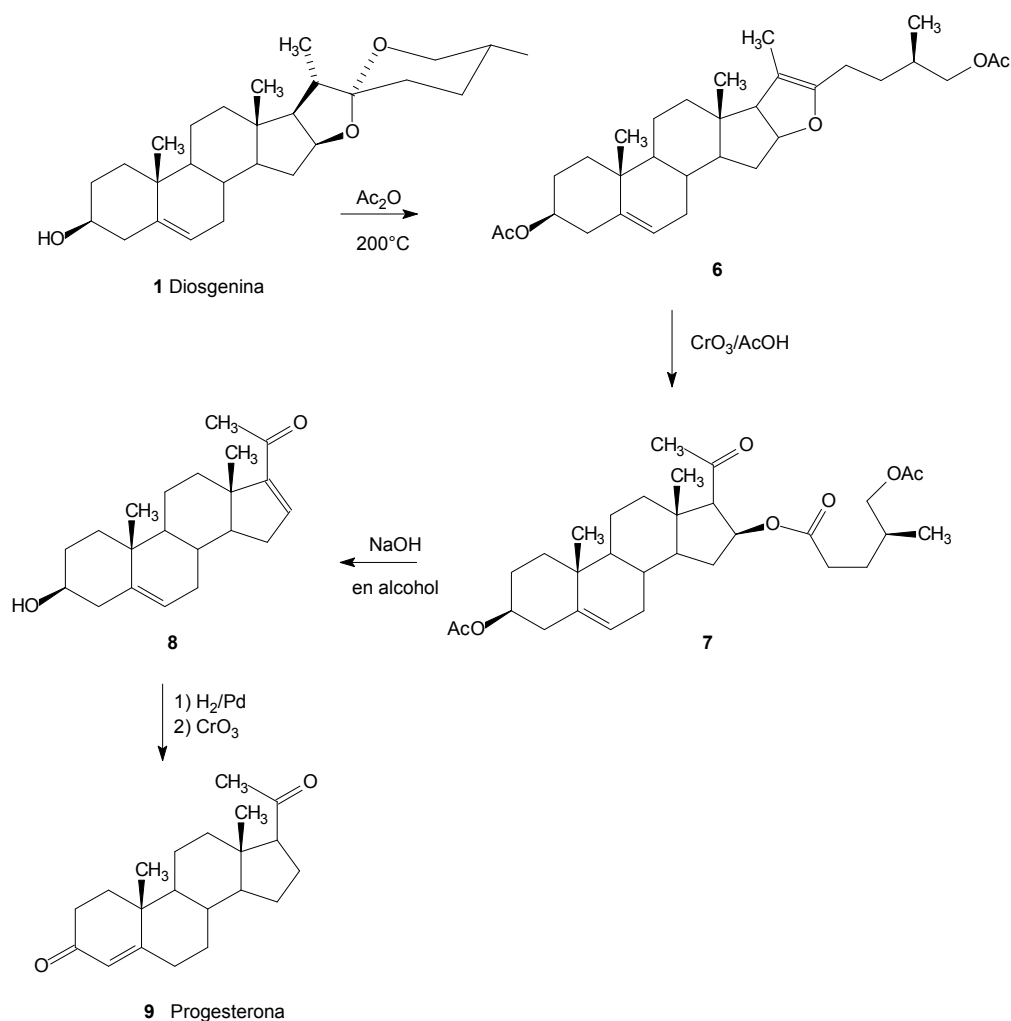


**Figura 8. Síntesis del diacetato de pseudosarsasapogenina (5).**

Utilizando esta reactividad como ventaja, Marker diseñó una secuencia de reacciones químicas que permitían eliminar la mayoría de los átomos de la cadena lateral. La parte que permanecía era idéntica a la cadena lateral de la progesterona (los químicos llamaron a esta serie de reacciones degradación de Marker). Subsecuentes modificaciones químicas en el núcleo esteroideal permitieron obtener la progesterona.<sup>29,30</sup>

Debido al alto costo de la sarsasapogenina (**4**), Marker comenzó a buscar una sapogenina esteroideal con una estructura similar a la de la progesterona y la encontró en la diosgenina (**1**). La disponibilidad de la diosgenina (**1**) y el hecho de que contenía un doble enlace 5,6 en su núcleo sugería que era un compuesto ideal para aplicar las reacciones que habían sido aplicadas a la sarsasapogenina y

a otras sapogeninas esteroidales, para eliminar la cadena lateral y producir los derivados de las series de androstano y pregnano (Figura 9).



**Figura 9. Esquema de degradación de la cadena lateral de Marker para la diosgenina (1).**

Marker renunció a su posición universitaria en Estados Unidos y se trasladó a México, con lo que el país se convirtió en centro mundial para la producción, investigación y patentes de hormonas esteroidales en la década de los 60's.<sup>31</sup>

La diosgenina (1) continúa siendo una materia prima de gran utilidad para la producción de hormonas sintéticas, incluyendo la cortisona, noretindrona (el primer anticonceptivo oral), progesterona (9) y pregnenolona.<sup>32,33</sup>



## 2.5. Reactividad de las sapogeninas esteroideas espiroestánicas.

Recientemente se han descrito nuevas transformaciones en este fragmento estructural; se ha descubierto que algunas de estas reacciones producen una transposición de la cadena lateral hacia la lactona C-22→16 (lactona bisnorcolánica).<sup>34-37</sup> Estos últimos compuestos han llamado la atención de los científicos debido a su importante actividad biológica.<sup>38</sup> Algunos reportes muestran que tales compuestos pueden obtenerse con bajos rendimientos mediante el tratamiento de la sapogenina correspondiente con  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{HNO}_3$  o como un subproducto de la reacción con  $\text{NaNO}_2$  y  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  en ácido acético.<sup>39-42</sup>

Una de las alternativas sintéticas para la obtención de dichas lactonas es la reacción de Baeyer-Villiger de acetatos de 23-oxosapogeninas. El tratamiento de 23-oxosapogeninas (**10**) con AMCPB produce la mezcla de las lactonas bisnorcolánicas 22→16 (**11**) y los carbonatos de pregnan-16,20-diol (**12**) (Figura 10) después de largos tiempos de reacción (4 semanas para las 25*R*-oxosapogeninas y 9 semanas para las 25*S*-sapogeninas).<sup>43</sup>

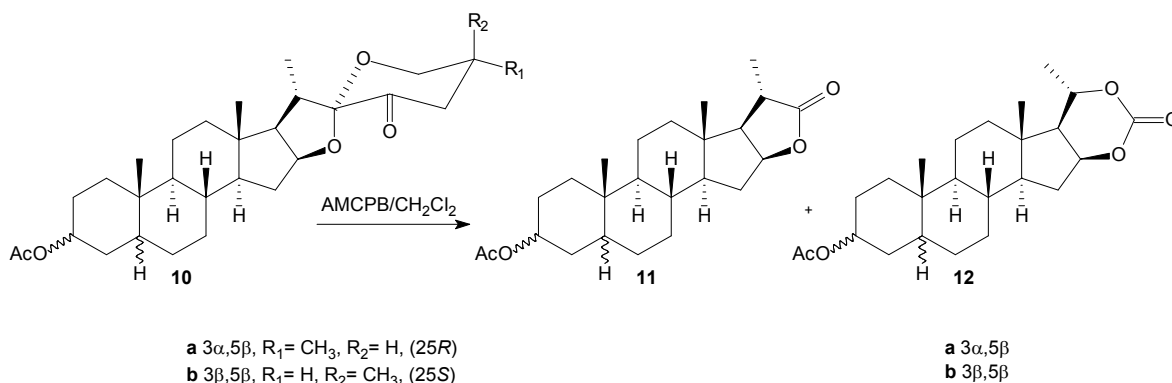
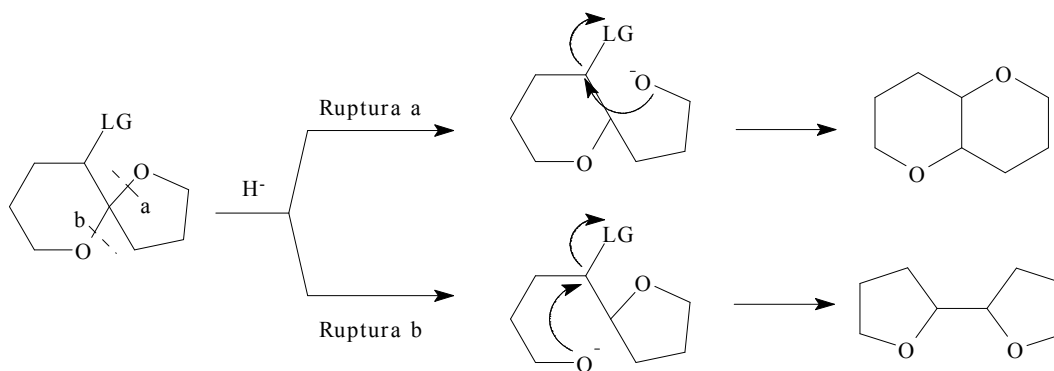


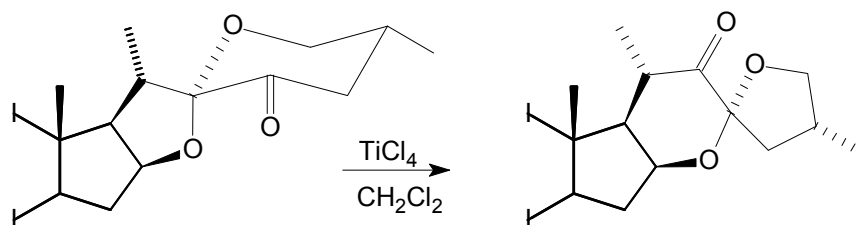
Figura 10. Reacción de Bayer-Villiger de 23-oxosapogeninas.

La transformación de espirocetales en 1,6-dioxadecalina o en 2'2-tetrahidrofuranos unidos es un ejemplo de transformación química que puede tener utilidad sintética:



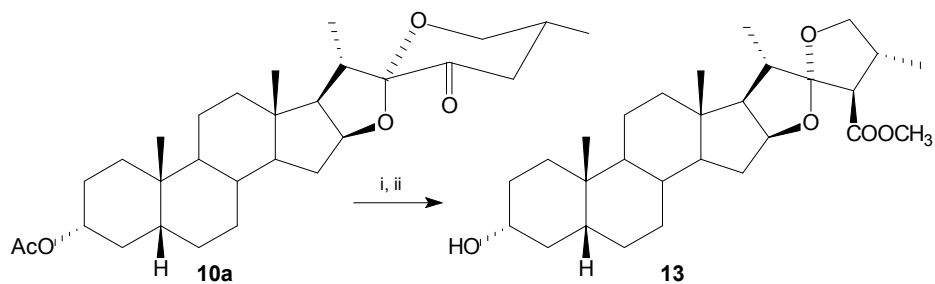
**Figura 11. Rearreglo reductivo de espiroacetales.**

La búsqueda de nuevas reacciones de la cadena lateral espiroestánica ha convertido a esta familia en la fuente principal de nuevos compuestos, que pueden presentar tanto interés biológico como sintético. En particular, Suárez y colaboradores<sup>44,45</sup> reportaron que el tratamiento de 23-oxosapogeninas con  $\text{TiCl}_4$  produce el reordenamiento de la cadena lateral espirocetálica de las sapogeninas esteroidales en un nuevo esqueleto generando una unidad  $16\beta,23:23,26$ -diepoxi-22-ona (Figura 12). Un rearrreglo similar, pero con un menor rendimiento, fue observado por Morzycki y colaboradores cuando las 23-oxosapogeninas eran tratadas con  $\text{BF}_3 \cdot \text{EtO}_2$  en THF.<sup>46</sup>



**Figura 12. Reordenamiento de 23-oxosapogeninas.**

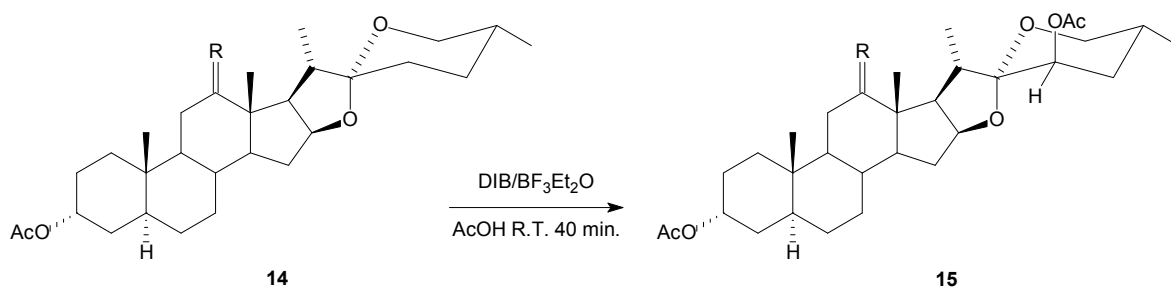
Los reactivos de yodo hipervalente también han recibido considerable atención. Cuando la  $(25R)$ -3 $\alpha$ -acetoxi-5 $\beta$ -espirostan-23-ona (Acetato de 23-oxo-3-epi-esmilagenina **10a**)<sup>47</sup> fue tratada con  $\text{KOH}/\text{MeOH}$  y diacetoxiyodobenceno (DIB), se obtuvo el nuevo heterocompuesto  $(25S,23R,25R)$ -23-metoxicarbonil-22,26-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -furostan-3 $\alpha$ -ol (**13**) con buenos rendimientos (Figura 13).



i) KOH/MeOH a reflujo. ii)  $C_6H_5I=O$ , a temperatura ambiente.

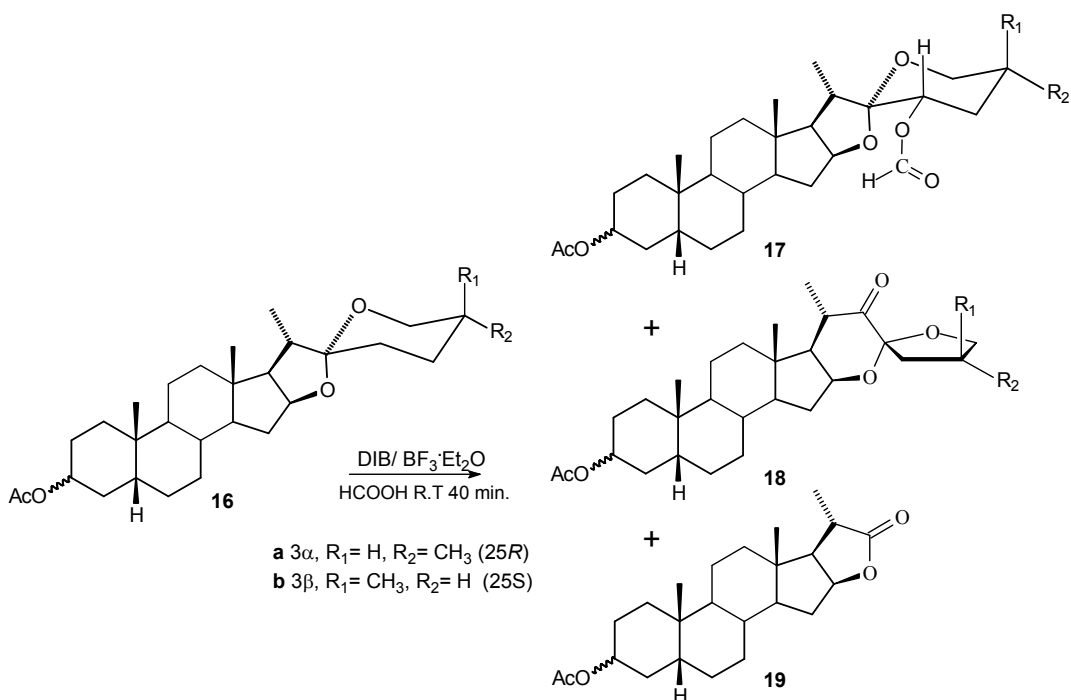
**Figura 13. Obtención de (25S,23R,25R)-23-metoxicarbonil-22,26-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -furostan-3 $\alpha$ -ol. (13)**

Se conoce que el diacetoxiyodobenceno (DIB) produce una amplia variedad de transformaciones dependiendo del sustrato y las condiciones de reacción. En particular, recientemente se ha reportado la introducción en un solo paso de un grupo acetoxilo axial en la posición C-23 de la cadena lateral de una sapogenina esteroideal mediante el tratamiento de tales compuestos con DIB y  $BF_3 \cdot Et_2O$  en ácido acético.<sup>48</sup>



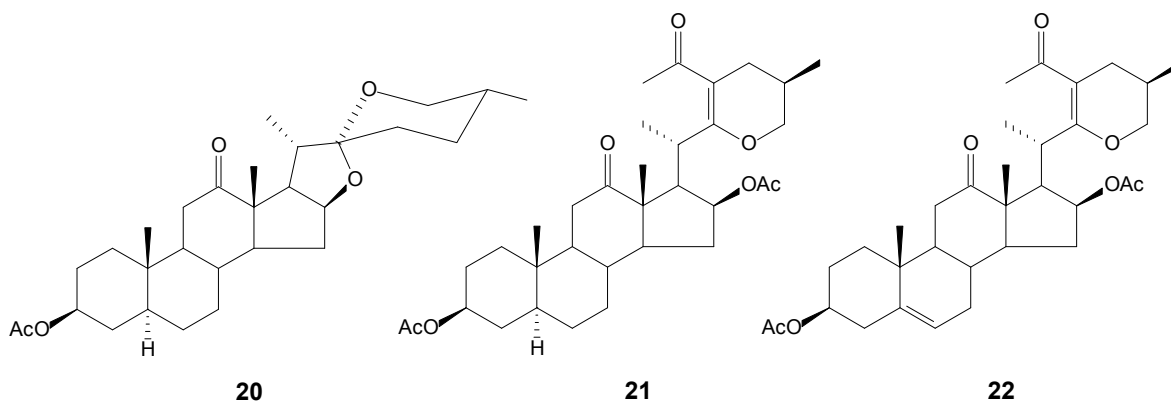
**Figura 14. Introducción de un grupo acetoxilo axial en la posición C-23 en un solo paso.**

Recientemente se reportó<sup>49</sup> que el tratamiento del acetato de epiesmilagenina (**16a**) con DIB y  $BF_3 \cdot Et_2O$  en ácido fórmico a temperatura ambiente producía la conversión total de la materia prima en una mezcla de los compuestos: el compuesto con un grupo formiloxilo ecuatorial en la posición 23 (**17**), la 16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxi-22-ona (**18**) y la lactona bisnorcolánica (**19**). La misma reacción con acetato de sarsasapogenina (**16b**) produjo resultados similares.



**Figura 15.** Curso inesperado de la reacción de saponinas esteroidales con DIB y  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  en ácido fórmico.

Otros reportes recientes<sup>50,51</sup> han demostrado la alta reactividad del átomo de oxígeno del tetrahidropirano en **20** que favorece la ruptura del anillo E prácticamente bajo las mismas condiciones de reacción, lo cual provee acceso a nuevas cadenas laterales esteroidales que contienen cetonas  $\alpha, \beta$ -insaturadas  $\beta$ -alcoxi sustituidas (**21** y **22**), las cuales son susceptibles a una variedad de reacciones (Figura 16).



**Figura 16.** Cetonas  $\alpha, \beta$ -insaturadas  $\beta$ -alcoxi sustituidas (**21** y **22**).

### *Caracterización de una sapogenina esteroidea.*

Las técnicas espectroscópicas usuales, tales como el infrarrojo, el ultravioleta, resonancia magnética nuclear, dispersión óptica rotatoria y la espectrometría de masas han sido extensivamente utilizadas con especial atención en el sistema espirocetálico de las sapogeninas.

La caracterización de una sapogenina no es una tarea sencilla, en este sentido, el análisis espectroscópico por RMN de  $^{13}\text{C}$  provee un método no destructivo para la caracterización de la misma.

Una recopilación sistemática de los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de alrededor de 400 derivados esteroidales ha sido publicada por Blunt y Stothers<sup>52</sup> pero sólo incluye ocho sapogeninas esteroidales.

Para la elucidación de la estructura de un nuevo compuesto por estudios de RMN de  $^{13}\text{C}$  es siempre deseable comparar los datos observados con los datos reportados para compuestos relacionados o similares. En 1975, Djerassi y Eggert<sup>53</sup> reportaron las características de RMN de la cadena lateral espiroestánica. Sin embargo, dado que los datos de desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  RMN eran aún escasos en la literatura y no había recopilación sistemática, Agrawal et al.<sup>41</sup> decidieron tabular los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  RMN de las sapogeninas y saponinas esteroidales publicados hasta 1983 y presentar algunos datos que podrían ser utilizados para determinar estructuras de éstos y otras categorías de productos naturales.

Estudios posteriores reportaban todas las asignaciones de  $^{13}\text{C}$ -RMN y las señales más importantes de  $^1\text{H}$ -RMN de 25R-5 $\alpha$ -espirostanos oxigenados en la posición 23 y los correspondientes compuestos sin sustituyentes en C-23<sup>37</sup> y de 25S-espirostanos con funciones oxigenadas ó funciones poco comunes como

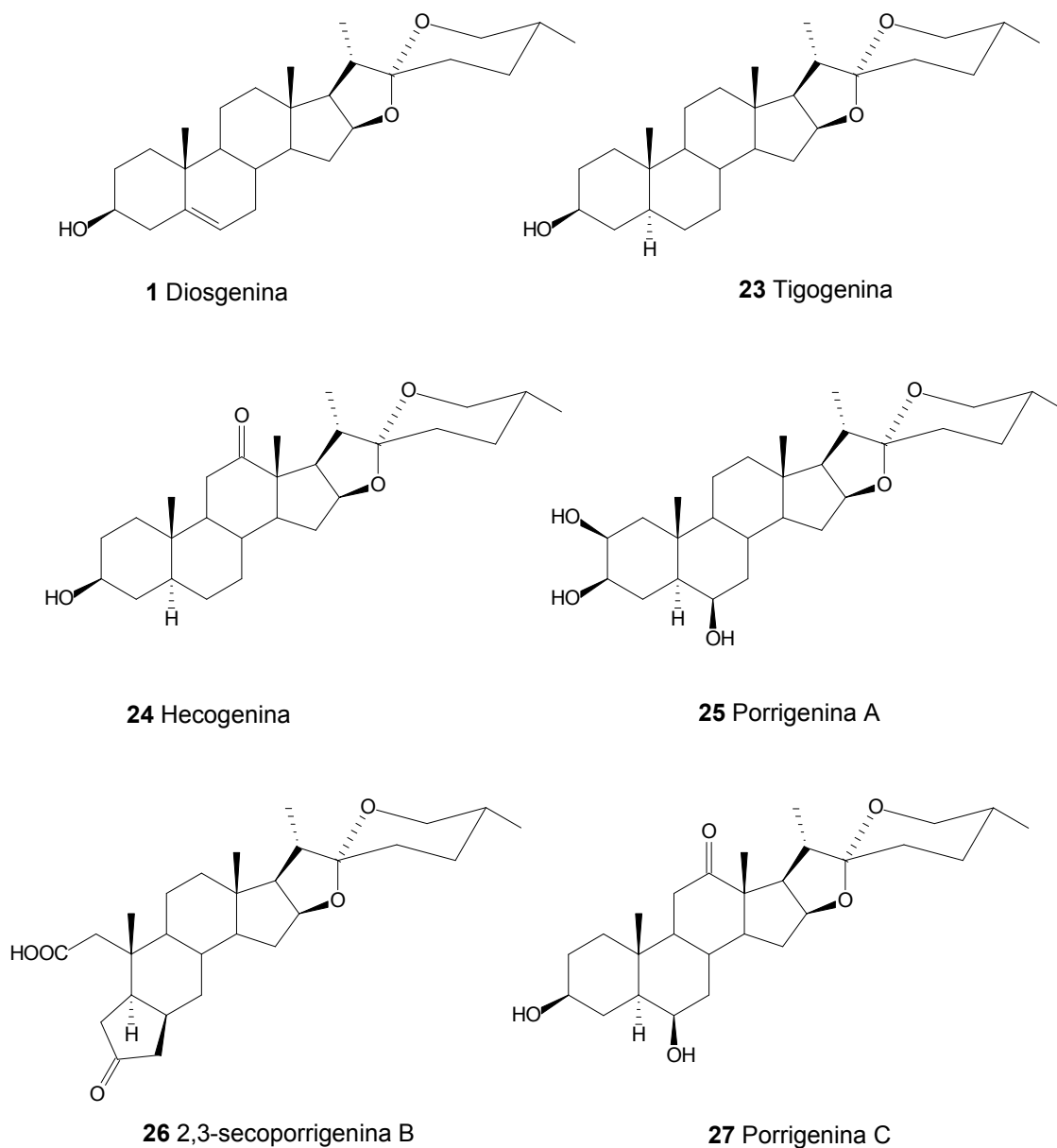
sustituyentes en C-23,<sup>54</sup> así como los principales cambios observados en los desplazamientos químicos derivados de estas sustituciones.

## **2.6. Sapogeninas esteroidales con actividad antitumoral.**

Estudios recientes sugieren que en cantidades bajas, algunas sapogeninas esteroidales pueden disminuir los niveles de colesterol en la sangre, reducir los niveles de azúcar en sangre y disminuir las inflamaciones, además de ofrecer la posible protección en contra de bacterias y ciertos tipos de cáncer.<sup>1-4</sup>

Los esteroides de plantas han sido descritos ampliamente debido a sus propiedades farmacológicas, incluyendo hipocolesterolémicas<sup>55</sup>, antidiabéticas<sup>56</sup> y su actividad antioxidante.<sup>57,58</sup> Se le ha dado particular atención a su potencial para la prevención del cáncer, especialmente como inductores de apoptosis.<sup>59-61</sup>

Estudios *in vitro* han mostrado que algunas sapogeninas esteroidales poseen actividad citotóxica y antiproliferativa en líneas celulares derivada de tumores, como el melanoma humano (IGR-1), el fibrosarcoma murino (WEHI-164), las leucemias murina (P-388) y de monolitos murinos (J-774).<sup>1,2,4</sup> Otros estudios demostraron que algunas sapogeninas esteroidales inhiben el crecimiento de células de osteosarcoma humano (línea celular 1547), al disminuir el ciclo celular en la fase G1 e inducir apoptosis principalmente por incrementar la expresión de la oncoproteína p53, supresora de tumores. Este efecto es similar en líneas celulares de cáncer como el laringocarcinoma (Hep-2) y el melanoma (M4Beu).<sup>3</sup>



**Figura 17. Principales sapogeninas esteroidales con actividad antitumoral.**

El crecimiento de células derivadas de cáncer pancreático humano también se ve afectado por la presencia de sapogeninas esteroidales en el medio de cultivo.<sup>4</sup> Recientemente, Raju, demostró que el empleo de sapogeninas esteroidales en la dieta, en modelos murinos, reduce o retarda la aparición de lesiones preneoplásicas de cáncer de colon.<sup>62,63</sup>

Por otra parte, en sinoviocitos derivados de artritis reumatoide humana, las sapogeninas esteroidales causan inhibición del crecimiento celular e inducen apoptosis. Estos hallazgos sugieren una potencial actividad anti-inflamatoria de las sapogeninas esteroidales.<sup>64</sup>



### 3. Material y métodos.

#### 3.1 Reactivos

1. Esmilagenona ( $C_{27}H_{42}O_3$ ).
2. Acetato de epiesmilagenina (acetato de (25*R*)-5β-espirostan-3α-ol) ( $C_{29}H_{46}O_4$ ).
3. Dioxano. Mallinckrodt.
4. Hexano ( $C_6H_{14}$ ). Reproquifin.
5. Acetato de etilo ( $C_3H_6O_2$ ). Reproquifin.
6. Diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ). Reproquifin.
7. Metanol ( $CH_3OH$ ). Reproquifin.
8. Etanol ( $C_2H_5OH$ ). Reproquifin.
9. Benceno ( $C_6H_6$ ). Reproquifin.
10. Acetona ( $C_3H_6O$ ). Reproquifin.
11. Acido acético glacial ( $CH_3COOH$ ). Baker.
12. Acido clorhídrico (HCl). Baker.
13. Acido perclórico ( $HClO_4$ ). Mallinckrodt.
14. Piridina ( $C_5H_5N$ ). Baker.
15. Anhídrido acético ( $(CH_3CO)_2$ ). Baker.
16. 4-Dimetilaminopiridina ( $C_7H_{10}N_2$ ). Fluka.
17. Tetracloruro de titanio ( $TiCl_4$ ). Sigma-Aldrich.
18. Nitrito de sodio. ( $NaNO_2$ ). Baker.
19. Borhidruro de sodio ( $NaBH_4$ ). Química Barsa.
20. Trifluoruro de boro eterato ( $BF_3 \cdot EtO_2$ ). Fluka.
21. Hidróxido de potasio (KOH). Baker.
22. Sulfato de sodio anhidro. ( $Na_2SO_4$ ). Reproquifin.
23. Cloruro de sodio (NaCl).
24. Bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ).
25. Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ).
26. Alúmina con actividad Brockmann III. Merck.
27. Sílica gel Kiesegel 60. Macherey-Nagel.

28. Placa cromatográfica Alugram SIL G/UV254. Macherey-Nagel.

29. Vainillina. Química JVC.

### **3.2 Equipo**

1. Balanza analítica. Sartorius.
2. Columnas para cromatografía.
3. Canastilla de calentamiento. Eseve.
4. Parrilla de agitación. IKA RH-KT/C.
5. Barras de agitación magnética.
6. Aparato Fisher-Johns. Melt-Temp II.
7. Rotavapor. Büchi.
8. Matraz bola de 25 mL.
9. Matraz bola de 50 mL.
10. Matraz bola de 100 mL.
11. Matraz bola de 250 mL.
12. Matraz bola de 500 mL.
13. Probeta graduada de 5 mL.
14. Probeta de 5 mL.
15. Probeta de 25 mL.
16. Probeta de 50 mL.
17. Probeta de 100 mL.
18. Pipeta graduada 1 mL.
19. Pipeta graduada 5 mL.
20. Propieta.
21. Pipeta Pasteur.
22. Embudos Büchner de diverso diámetro.
23. Matraz Kitasato 250 mL.
24. Matraz Kitasato 1000 mL.
25. Matraz Erlenmeyer 50 mL.

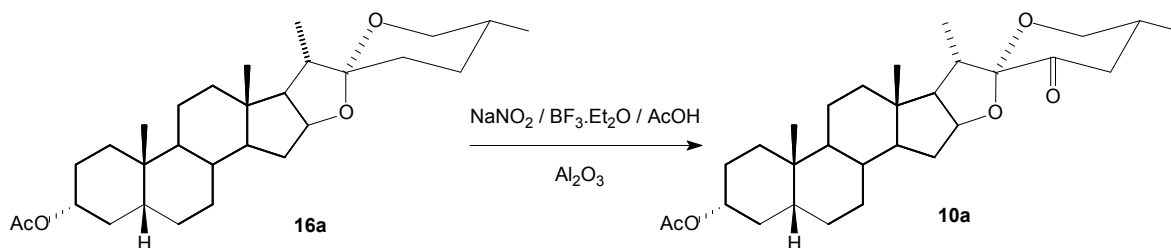
26. Matraz Erlenmeyer 250 mL.
27. Embudo de filtración rápida.
28. Cámara de elución.
29. Soporte universal.
30. Pinzas para soporte.

### **3.3 Técnicas experimentales**

Las reacciones fueron seguidas haciendo uso de cromatografía de capa fina en láminas de ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV254 de MACHEREY-NAGEL, las cuales fueron rociadas con una solución al 30% de vainillina en HClO<sub>4</sub> y calentadas hasta aparición de color. Los espectros de RMN fueron obtenidos en un espectrómetro Varian Unity INOVA 300 MHz usando como referencia al TMS para <sup>1</sup>H y el CDCl<sub>3</sub> para <sup>13</sup>C. Los espectros de masas fueron obtenidos en el espectrómetro Jeol SX-102-A. Los puntos de fusión fueron medidos en el equipo Melt-Temp II.

## 4. Resultados

### Síntesis de (25*R*)-3 $\alpha$ -acetoxi-5 $\beta$ -espirostan-23-ona (10a):



A una solución de acetato de (25*R*)-5 $\beta$ -espirostan-3 $\alpha$ -ol (**16a**) (6 g) en ácido acético glacial (160 mL) se le adicionaron 3.5 mL de BF<sub>3</sub>·EtO<sub>2</sub> y de manera seguida durante 15 minutos se adicionaron 1.80 g de NaNO<sub>2</sub>, pasados los 15 minutos se adicionaron 3.4 mL BF<sub>3</sub>·EtO<sub>2</sub>. Concluida la reacción (que se siguió por CCF) la mezcla se vertió sobre una mezcla de agua/hielo, se filtró a vacío y se lavó con abundante agua. El sólido se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se evaporó y el sólido obtenido se disolvió en una cantidad mínima de benceno/hexano 1:1 y se hizo pasar por una columna de alúmina Brockmann con actividad III utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 8:1 para poder hidrolizar el compuesto nitroimino formado durante la reacción. Se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

**Rendimiento** 79%. **Punto de fusión** 155–157 °C (de acetato de etilo).

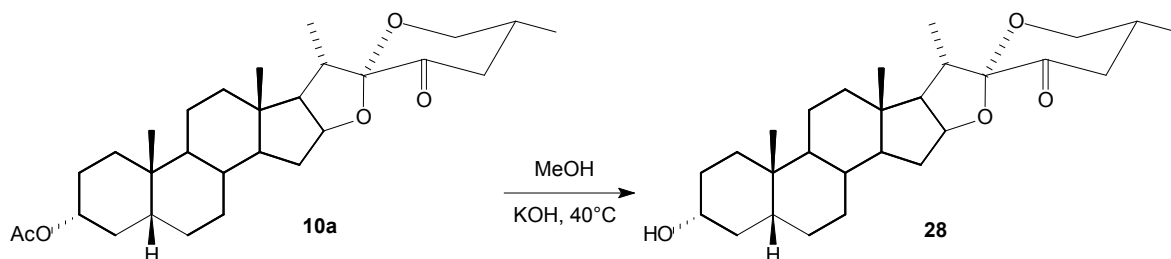
**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.70 (tt J 4.7 Hz, 1H, H-3); 4.59 (m, 1H, H-16); 3.77 (dd, J 11.2 Hz, 11.2 Hz, 1H, H-26 ax); 3.57 (dd, 1H, J 4.2 Hz, 11.2 Hz, H-26 eq); 2.86 (q, J 7.0 Hz, 1H, H-20); 2.27 (m, 1H, H-25); 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acetato); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.92 (d, J 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0.93 (d, J 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 0.74 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.0; C-2 26.5; C-3 74.2; C-4 32.2; C-5 41.6; C-6 26.9; C-7 26.6; C-8 35.4; C-9 40.5; C-10 34.7; C-11 20.5; C-12 39.9; C-13 41.1; C-14 56.4; C-15 31.7; C-16 83.4; C-17 61.8; C-18 16.1; C-19 23.3; C-20 34.7; C-21

14.3; C-22 109.8; C-23 201.8; C-24 45.2; C-25 35.8; C-26 65.6; C-27 17.0; CH<sub>3</sub> acetato 21.4; C=O acetato 170.5.

**Espectrometría de masas** (70 eV) 472 M<sup>+</sup>, 444 (M<sup>+</sup>-C=O), 389, 329, 315, 255, 147, 93, 56, 43.

### Síntesis de (25*R*)-3α-hidroxi-5β-espirostan-23-ona (28):



A una solución de (25*R*)-3α-acetoxi-5β-espirostan-23-ona (**10a**), (200 mg) en MeOH absoluto seco (10 mL) se le agregaron 150 mg de KOH, y se agitó en un baño de agua a 40 °C hasta desaparición de la materia prima (50 minutos). Al producto se le agregó agua y se extrajo con AcOEt (4x10 mL); se lavó con solución saturada de NaCl (2x10 mL) y se lavó con sol. saturada de NaCl (para eliminar el MeOH) (3x10 mL). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

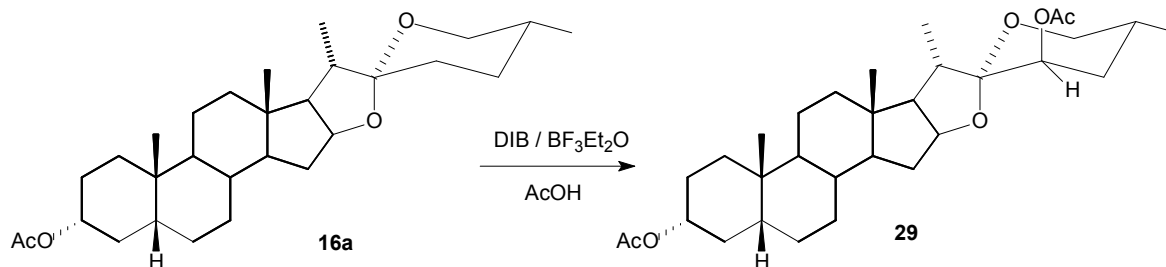
**Rendimiento** 75%. **Punto de fusión** 182–184 °C (de acetato de etilo).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.60 (m, 1H, H-16); 3.79 (dd, 1H, H-26 ax); 3.59 (dd, 1H, H-26 eq); 2.87 (q, 1H, H-20); 2.29 (m, 1H, H-25); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.93 (3H, CH<sub>3</sub>-21); 0.76 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.3; C-2 30.5; C-3 71.7; C-4 36.4; C-5 41.9; C-6 27.0; C-7 26.6; C-8 35.4; C-9 40.5; C-10 34.7; C-11 20.5; C-12 40.0; C-13 41.1; C-14 56.5; C-15 31.7; C-16 83.4; C-17 61.8; C-18 16.1; C-19 23.3; C-20 34.7; C-21 14.3; C-22 109.8; C-23 201.9; C-24 45.3; C-25 35.8; C-26 65.6; C-27 17.0.

**Espectrometría de masas** (70 eV) 431 HM<sup>+</sup>, 402 (M<sup>+</sup>-C=O), 329, 273, 255, 154, 97, 83, 69, 57.

**Síntesis de diacetato de (23R,25R)-5β-espirostan-3α,23-diol (29):**



A una solución de acetato de (25R)-5β-espirostan-3α-ol (**16a**) (644 mg) en ácido acético glacial (20 mL) se le adicionaron 644 mg de DIB y 3.5 mL de BF<sub>3</sub>·EtO<sub>2</sub> y se agitó hasta desaparición de la materia prima (20 min). La mezcla de reacción se vertió en una solución saturada de NaCl (50 mL) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x30 mL). Los extractos combinados se lavaron con agua (5x15 mL), con disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% (hasta que no se observara el desprendimiento de CO<sub>2</sub>) y con solución saturada de NaCl (2x20 mL). Se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se evaporó y se obtuvo un compuesto aceitoso de color amarillo el cual fue disuelto en una mínima cantidad de metanol caliente, al enfriar se observó la precipitación de la 23-acetoxisapogenina sólida la cual fue filtrada y lavada con metanol frío. Tras evaporar las aguas madres y la purificación por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 1/0-9/1) se obtuvo una cantidad adicional del compuesto aceitoso, la cual fue cristalizada en metanol.

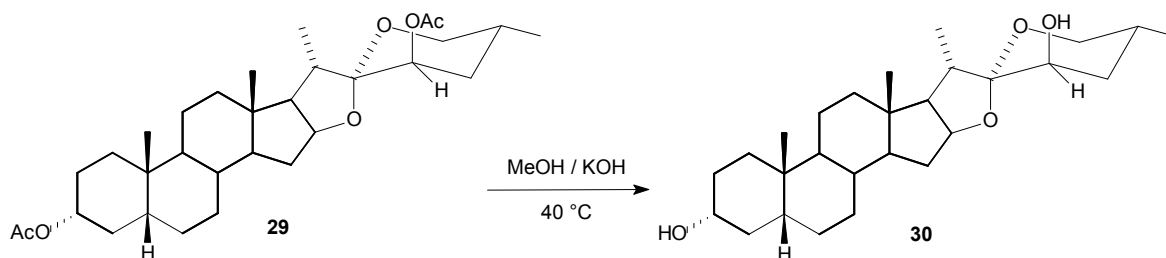
**Rendimiento** 67%. **Punto de fusión** 162–164 °C (de etanol). 162-164 °C se encuentra reportado<sup>48</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.82 (dd, 1H, J 2.6, 2.6 Hz, H-23); 4.70 (m, 1H, H-3); 4.46 (ddd, 1H, J 5.5, 7.8 Hz, J 7.9 Hz, H-16); 3.54 (m, 1H, H-26 equiv); 3.43 (dd, 1H, J 11.2, 11.2 Hz, H-26 ax); 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acetato); 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acetato); 1.03 (d, 3H, J 7.0 Hz CH<sub>3</sub>-21); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.77 (d, 3H, J 6.7 Hz, CH<sub>3</sub>-27); 0.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18).

<sup>13</sup>C RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.0; C-2 26.5\*; C-3 74.3; C-4 32.2; C-5 26.8; C-6 26.8; C-7 26.5\*; C-8 35.5; C-9 40.5; C-10 34.7; C-11 20.4; C-12 39.7; C-13 41.0; C-14 56.4; C-15 31.8; C-16 81.5; C-17 64.0; C-18 16.1; C-19 23.3; C-20 40.3; C-21 16.1; C-22 107.0; C-23 72.1; C-24 33.6; C-25 24.7; C-26 66.4; C-27 16.6; CH<sub>3</sub> acetato 21.2; C=O acetato 170.6 y 170.3. (\*Intercambiables)

**Espectrometría de masas** (70 eV) 517 HM<sup>+</sup>, 389 (M<sup>+</sup>-127), 329, 315, 255, 197, 147, 107, 85, 43.

### Síntesis de (23R,25R)-5β-espirostan-3α,23-diol (30):



A una solución de diacetato de (23R,25R)-5β-espirostan-3α,23-diol (**29**), (200 mg) en MeOH absoluto (10 mL) se le agregaron 150 mg de KOH, y se agitó en un baño de agua a 40 °C hasta desaparición de la materia prima (50 minutos). Al producto se le agregó agua y se extrajo con AcOEt (4x10 mL); se lavó con solución saturada de NaCl (2x10 mL) y se lavó con sol. saturada de NaCl (para eliminar el MeOH) (3x10 mL). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

**Rendimiento 64%. Punto de fusión** 174-175 °C (de acetato de etilo).

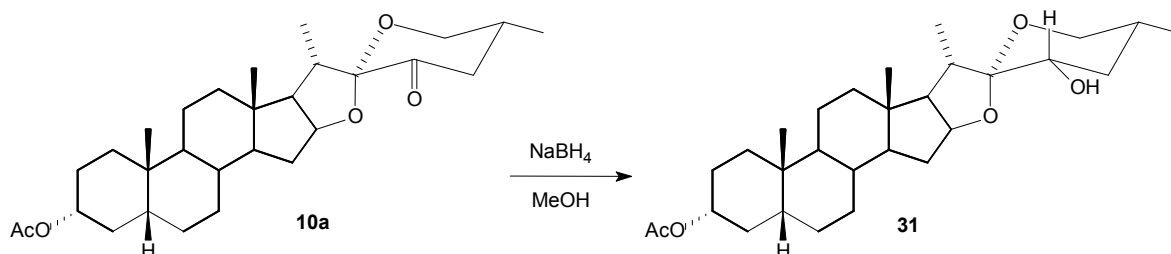
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.84 (dd 1H, H-23); 4.46 (m, 1H, H-16); 3.42 (dd, 1H, H-26 ax); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18).

<sup>13</sup>C RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 34.9; C-2 26.6; C-3 71.8; C-4 41.5; C-5 26.8; C-6 26.5; C-7 26.5; C-8 35.4; C-9 40.4; C-10 34.8; C-11 20.6; C-12 39.7; C-13

40.9; C-14 56.5; C-15 31.9; C-16 81.5; C-17 61.8; C-18 16.1; C-19 23.3; C-20 35.9; C-21 14.1; C-22 109.7; C-23 67.0; C-24 40.1 67.4; C-25 68.1; C-26 65.4; C-27 16.7.

**Espectrometría de masas (70 eV)** 433 HM+, 389, 329, 315, 255, 147, 93, 69, 57, 55.

### Síntesis de 3-monoacetato de (23S,25R)-5β-espirostan-3α,23-diol (31):



A una solución de (25R)-3α-acetoxi-5β-espirostan-23-ona (**10a**) (0.5 mmol, 236 mg) en MeOH seco (15 mL) se le agregó lentamente y a temperatura ambiente, NaBH<sub>4</sub> (2 mmol, 77.2 mg) y se agitó hasta desaparición de materia prima (15 minutos). Al producto se le agregó agua, y se extrajo con AcOEt, después se lavó con sol. saturada de NaCl (3x10 mL) (para eliminar el MeOH). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. Se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 6:1.

**Rendimiento 57% . Punto de fusión** 171-173 °C (de acetato de etilo).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.72 (tt, 1H, H-3); 4.47 (m, 1H, H-16); 3.42 (dd, 1H, H-26 eq); 3.26 (dd, 1H, H-26 ax); 2.54 (q, 1H, H-20); 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acetato); 0.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.94 (3H, H-21); 0.79 (s, 3H, H-18).

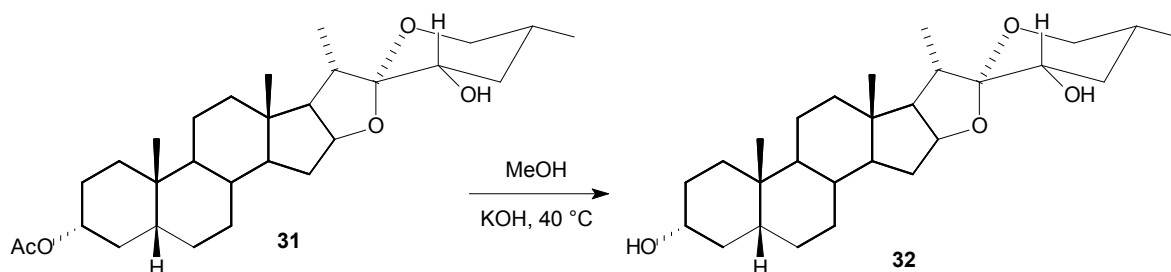
**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.0; C-2 26.5; C-3 74.2; C-4 32.2; C-5 41.7; C-6 26.9; C-7 26.6; C-8 35.2; C-9 40.4; C-10 34.7; C-11 20.5; C-12 38.4; C-13 41.1; C-14 56.2; C-15 31.7; C-16 81.6; C-17 61.6; C-18 16.5; C-19 23.3; C-20 35.5;



C-21 14.0; C-22 110.5; C-23 67.0; C-24 40.2; C-25 30.7; C-26 65.9; C-27 16.6;  
CH<sub>3</sub> acetato 21.4; C=O acetato 170.6.

**Espectrometría de masas** (70 eV) 474 M+, 389, 329, 315, 255, 154, 85, 69, 67, 55.

**Síntesis de (23S,25R)-5β-espirostan-3α,23-diol (32):**



A una solución de 3-monoacetato de (23S,25R)-5β-espirostan-3α,23-diol (**31**) (200 mg) en MeOH absoluto seco (10 mL) se le agregaron 150 mg de KOH, y se agitó en un baño de agua a 40 °C hasta desaparición de la materia prima (50 minutos). Al producto se le agregó agua y se extrajo con AcOEt (4x10 mL); se lavó con solución saturada de NaCl (2x10 mL) y se lavó con sol. saturada de NaCl (para eliminar el MeOH) (3x10 mL). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

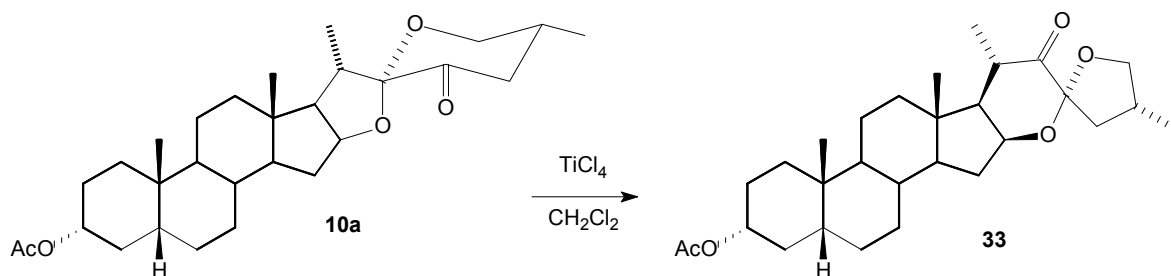
**Rendimiento** 74%. **Punto de fusión** 189-191 °C (de acetato de etilo).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.50 (m, 1H, H-16); 3.62 (m, 1H, H-3); 3.41 (dd, 1H, H-26 ax); 3.25 (dd, 1H, H-23 eq); 2.54 (q, 1H, H-20); 2.29 (m, 1H, H-25); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.79 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.2; C-2 26.6; C-3 71.5; C-4 31.6; C-5 41.9; C-6 27.0; C-7 26.6; C-8 35.5; C-9 40.5; C-10 34.6; C-11 20.5; C-12 38.2; C-13 41.0; C-14 56.2; C-15 30.7; C-16 81.6; C-17 61.6; C-18 16.4; C-19 23.3; C-20 36.1; C-21 14.0; C-22 110.5; C-23 66.9; C-24 40.2; C-25 68.1; C-26 65.8; C-27 16.5.

**Espectrometría de masas** (70 eV) 433 HM+, 389, 329, 315, 255, 154, 95, 85, 69, 67, 57, 55.

**Síntesis de (25R)-3 $\alpha$ -acetoxi-16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxicoprostan-22-ona (33):**



A una solución de (25R)-3 $\alpha$ -acetoxi-5 $\beta$ -epirostan-23-ona (**10a**) (1 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (20 mL) se le agregó lentamente y a temperatura ambiente,  $\text{TiCl}_4$  (0.3 mL) y se agitó por 45 minutos a esta temperatura. La mezcla de reacción se vertió en una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Los extractos combinados se lavaron primeramente con una solución de HCl al 10% (1x15 mL), posteriormente se lavaron con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2x15mL), se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporó el disolvente. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

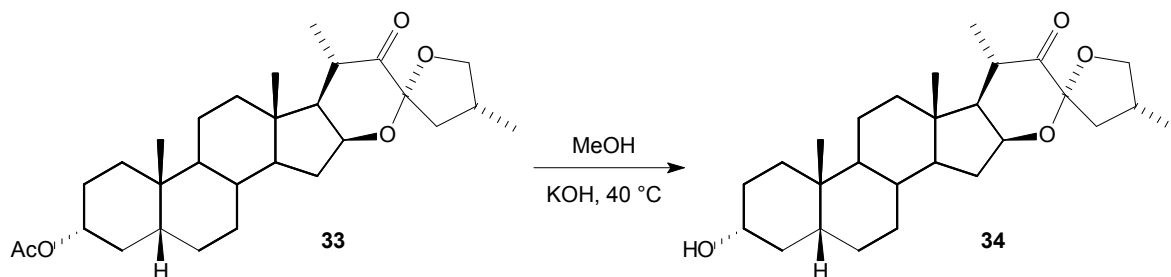
**Rendimiento 95%. Punto de fusión** 170-172 °C (de acetato de etilo).

**$^1\text{H RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.70 (m, 1H, H-3); 4.35 (dt, J 8.10 Hz, 8.09 Hz, 6.32 Hz 1H, H-16); 4.12 (dd, J 7.59 Hz, 7.59 Hz, 1H, H-26 ax); 3.52 (dd, 1H, J 8.95 Hz, 8.20 Hz, 1H, H-26 eq); 2.79 (qd, J 9.96 Hz, 6.45 Hz, 6.43 Hz, 6.43 Hz, 1H, H-20); 2.40 (m, 1H, H-25); 2.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  acetato); 1.07 (d, J 6.43 Hz, 3H, H-21); 1.03 (d, J 6.68 Hz, 3H, H-27); 0.94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 0.94 (s, 3H, H-18).

**$^{13}\text{C RMN}$**  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): C-1 34.9; C-2 26.5; C-3 74.1; C-4 32.9; C-5 41.7; C-6 26.5; C-7 26.8; C-8 35.4; C-9 40.4; C-10 34.6; C-11 20.6; C-12 40.1; C-13 42.9; C-14 53.1; C-15 32.1; C-16 72.9; C-17 57.6; C-18 14.7; C-19 23.3; C-20 39.9; C-21 12.9; C-22 213.1; C-23 107.9; C-24 43.8; C-25 33.3; C-26 75.2; C-27 16.4;  $\text{CH}_3$  acetato 21.4; C=O acetato 170.6.

**Espectrometría de masas (70 eV)** 472 M<sup>+</sup>, 413, 395, 344, 329, 327, 315, 311, 154, 136, 91, 73, 56.

**Síntesis de (25R)-3 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxicoprostan-22-ona (34):**



A una solución de (25R)-3 $\alpha$ -acetoxi-16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxi-22-ona (**33**), (200 mg) en MeOH absoluto seco (10 mL) se le agregaron 150 mg de KOH, y se agitó en un baño de agua a 40 °C hasta desaparición de la materia prima (50 minutos). Al producto se le agregó agua y se extrajo con AcOEt (4x10 mL); se lavó con solución saturada de NaCl (2x10 mL) y se lavó con sol. saturada de NaCl (para eliminar el MeOH) (3x10 mL). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

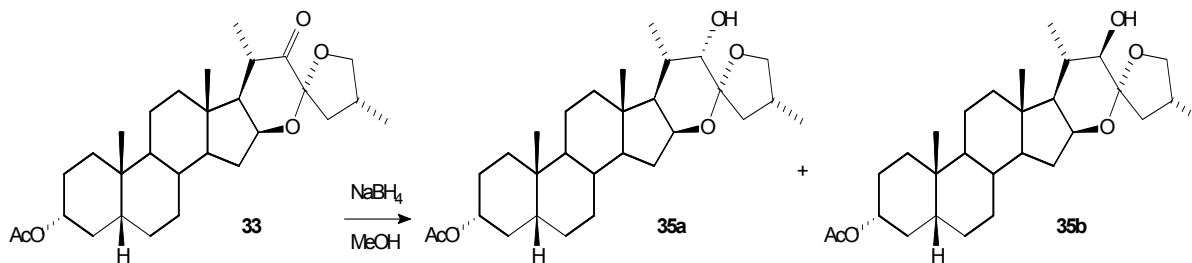
**Rendimiento 74%. Punto de fusión** 117-119 °C (de acetato de etilo).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.37 (m, 1H, H-16); 4.13 (dd, 1H, H-26 ax); 3.63 (m, 1H, H-3) 3.54 (1H, H-26 eq); 2.80 (q, 1H, H-20); 2.40 (m, 1H, H-25); 0.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.95 (3H, CH<sub>3</sub>-21); 0.76 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.3; C-2 30.4; C-3 71.7; C-4 36.4; C-5 41.9; C-6 27.0; C-7 26.6; C-8 35.4; C-9 40.5; C-10 34.6; C-11 20.6; C-12 40.1; C-13 42.9; C-14 53.1; C-15 32.9; C-16 73.0; C-17 57.6; C-18 14.7; C-19 23.3; C-20 39.9; C-21 12.9; C-22 213.1; C-23 107.9; C-24 43.8; C-25 33.3; C-26 75.3; C-27 16.5.

**Espectrometría de masas (70 eV):** 430 M<sup>+</sup>, 402 (M<sup>+</sup>-C=O), 341, 281, 221, 147, 95, 83, 69, 57.

### Reducción de (25*R*)-3 $\alpha$ -acetoxi-16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxicoprostan-22-ona (**33**):



A una solución de (25*R*)-3 $\alpha$ -acetoxi-16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxicoprostan-22-ona (**33**) (0.5 mmol, 236 mg) en MeOH seco (15 mL) se le agregó lentamente y a temperatura ambiente, NaBH<sub>4</sub> (2 mmol, 77.2 mg) y se agitó hasta desaparición de materia prima (15 minutos). Al producto se le agregó agua, y se extrajo con AcOEt, después se lavó con sol. saturada de NaCl (3x10 mL) (para eliminar el MeOH). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. Se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 6:1, obteniéndose los compuestos **35a** y **35b**

### 3-monoacetato de (25*R*)-16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxicoprostan-3 $\alpha$ ,22 $\alpha$ -diol (**35a**).

**Rendimiento 70%. Punto de fusión** 136-138 °C (de acetato de etilo).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.70 (m, 1H, H-3); 4.31 (dt, J 7.88 Hz, 7.84 Hz, 5.53 Hz 1H, H-16); 3.97 (dd, J 7.45 Hz, 7.45 Hz, 1H, H-26 ax); 3.55 (dd, 1H, J 10.22 Hz, 8.17 Hz, 1H, H-26 eq); 3.45(d, J 1.60 Hz, 1H, H-22) 2.22 (m, 1H, H-25); 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acetato); 1.13 (d, J 6.89 Hz, 3H, H-21); 1.02 (d, J 6.49 Hz, 3H, H-27); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.75 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.0; C-2 26.6; C-3 74.1; C-4 32.2; C-5 41.8; C-6 26.9; C-7 26.5; C-8 35.3; C-9 40.6; C-10 34.7; C-11 20.6; C-12 40.4; C-13 41.4; C-14 53.3; C-15 33.6; C-16 73.3; C-17 52.8; C-18 14.8; C-19 23.3; C-20 33.8; C-21 15.4; C-22 76.3; C-23 108.3; C-24 45.1; C-25 29.4; C-26 74.3; C-27 18.0; CH<sub>3</sub> acetato 21.5; C=O acetato 170.7.

**Espectrometría de masas (70 eV):** 474 M<sup>+</sup>, 457 (M<sup>+</sup>-OH), 315, 255, 154, 121, 97, 81, 57, 55.

**3-monoacetato de (25R)-16β,23:23,26-diepoxicoprostan-3α,22β-diol (35b).**

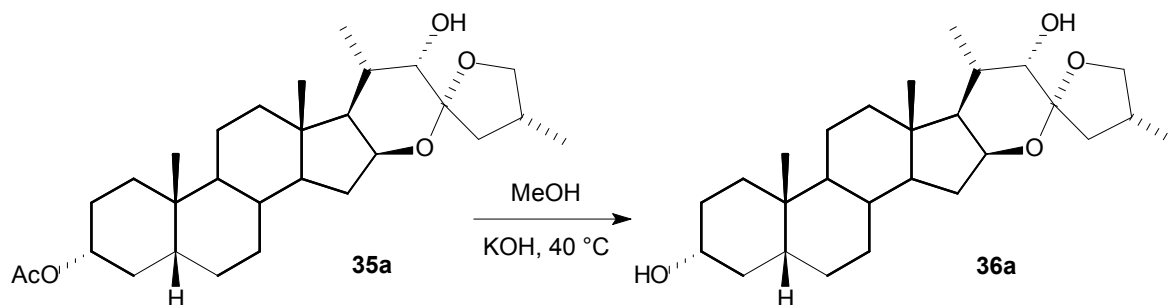
**Rendimiento 23%. Punto de fusión 128-130 °C** (de acetato de etilo).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.70 (m, 1H, H-3); 4.18 (dt, J 7.74 Hz, 7.62 Hz, 5.48 Hz 1H, H-16); 3.90 (dd, J 7.48 Hz, 7.48 Hz, 1H, H-26 ax); 3.41 (dd, 1H, J 10.25 Hz, 8.27 Hz, 1H, H-26 eq); 3.51(d, J 11.77 Hz, 1H, H-22) 2.16 (m, 1H, H-25); 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acetato); 1.03 (d, J 6.59 Hz, 3H, H-21); 1.01 (d, J 6.49 Hz, 3H, H-27); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.80 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.0; C-2 26.6; C-3 74.3; C-4 32.2; C-5 41.8; C-6 26.9; C-7 26.4; C-8 35.3; C-9 40.5; C-10 34.6; C-11 20.5; C-12 40.3; C-13 41.9; C-14 53.5; C-15 33.5; C-16 71.7; C-17 60.3; C-18 14.9; C-19 23.3; C-20 34.8; C-21 15.9; C-22 76.0; C-23 112.2; C-24 40.4; C-25 30.9; C-26 73.4; C-27 16.9; CH<sub>3</sub> acetato 21.4; C=O acetato 170.6.

**Espectrometría de masas (70 eV):** 475 HM<sup>+</sup>, 315, 255, 107, 95, 81, 57, 55.

**Síntesis de (25R)-16β,23:23,26-diepoxicoprostan-3α,22α-diol (36a):**



A una solución de 3 monoacetato de (25R)-16β,23:23,26-diepoxicoprostan-3α-22α-diol (**35a**), (200 mg) en MeOH absoluto seco (10 mL) se le agregaron 150 mg de KOH, y se agitó en un baño de agua a 40 °C hasta desaparición de la materia prima (50 minutos). Al producto se le agregó agua y se extrajo con AcOEt (4x10 mL); se lavó con solución saturada de NaCl (2x10 mL) y se lavó con sol. saturada de NaCl (para eliminar el MeOH) (3x10 mL). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. El producto obtenido se

purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

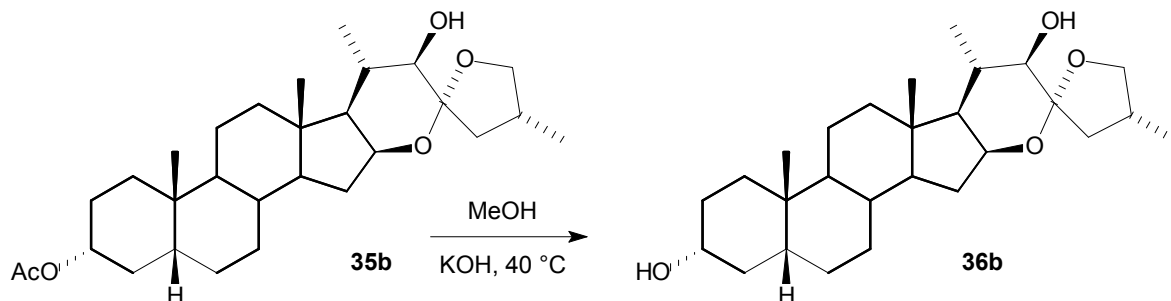
**Rendimiento 76%. Punto de fusión** 184-186 °C (de acetato de etilo).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.31 (m, 1H, H-16); 3.96 (dd, 1H, H-26 ax); 3.62 (m, 1H, H-3); 3.55 (dd, 1H, H-26 eq); 3.46 (d, 1H, H-22); 2.30 (m, 1H, H-25); 1.11 (d, 3H, H-21); 1.02 (d, 3H, H-27); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.74 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.2; C-2 30.5; C-3 71.9; C-4 36.4; C-5 42.0; C-6 27.0; C-7 26.6; C-8 35.5; C-9 40.5; C-10 34.6; C-11 20.7; C-12 40.0; C-13 42.8; C-14 53.1; C-15 32.9; C-16 72.9; C-17 57.6; C-18 14.6; C-19 23.3; C-20 33.8; C-21 15.4; C-22 76.4; C-23 108.4; C-24 45.1; C-25 29.4; C-26 74.3; C-27 18.0.

**Espectrometría de masas (70 eV):** 432 M<sup>+</sup>, 327, 257, 147, 109, 97, 83, 71, 57, 51.

#### Síntesis de (25*R*)-16β,23:23,26-diepoxicoprostan-3α,22β-diol (**36b**):



A una solución de 3 monoacetato de (25*R*)-16β,23:23,26-diepoxicoprostan-3α-22β-diol (**35b**), (200 mg) en MeOH absoluto seco (10 mL) se le agregaron 150 mg de KOH, y se agitó en un baño de agua a 40 °C hasta desaparición de la materia prima (50 minutos). Al producto se le agregó agua y se extrajo con AcOEt (4x10 mL); se lavó con solución saturada de NaCl (2x10 mL) y se lavó con sol. saturada de NaCl (para eliminar el MeOH) (3x10 mL). Los extractos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se evaporó el disolvente. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt 4:1.

**Rendimiento 23%. Punto de fusión** 123-125 °C (de acetato de etilo).

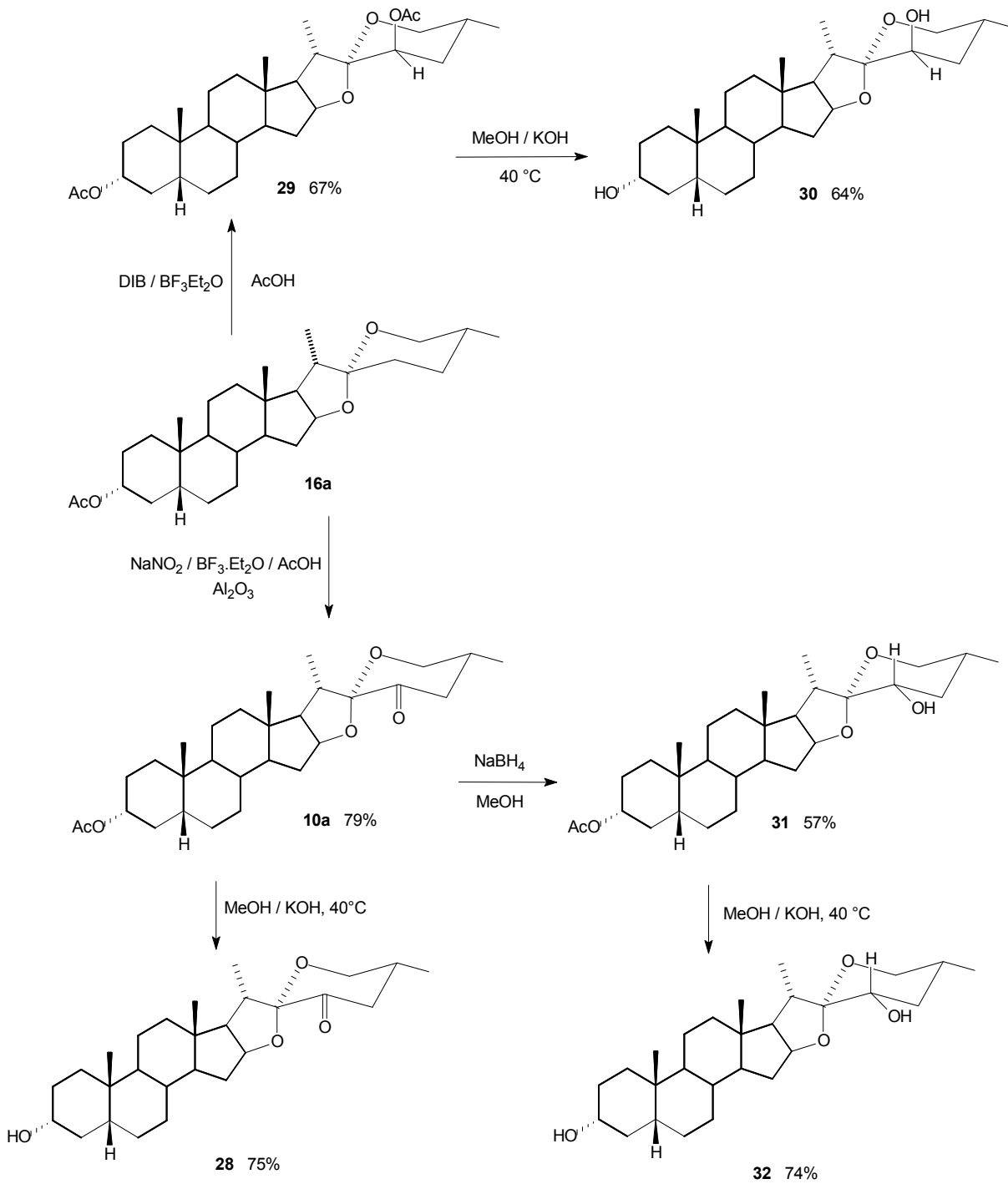
**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.19 (m, 1H, H-16); 3.90 (dd, 1H, H-26 ax); 3.62 (m, 1H, H-3); 3.50 (d, 1H, H-22); 3.42 (dd, 1H, H-26 eq); 2.17 (m, 1H, H-25); 1.03 (d, 3H, H-21); 1.01 (d, 3H, H-27); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.80 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1 35.4; C-2 30.6; C-3 72.0; C-4 36.5; C-5 41.8; C-6 27.0; C-7 26.6; C-8 35.5; C-9 40.5; C-10 34.6; C-11 20.7; C-12 40.0; C-13 42.8; C-14 53.1; C-15 32.9; C-16 72.9; C-17 57.6; C-18 14.6; C-19 23.3; C-20 33.8; C-21 15.4; C-22 76.4; C-23 108.3; C-24 45.3; C-25 29.7; C-26 74.3; C-27 18.0.

**Espectrometría de masas (70 eV):** 432 M<sup>+</sup>, 327, 257, 147, 95, 83, 69, 57, 55, 34.

## 5. Discusión.

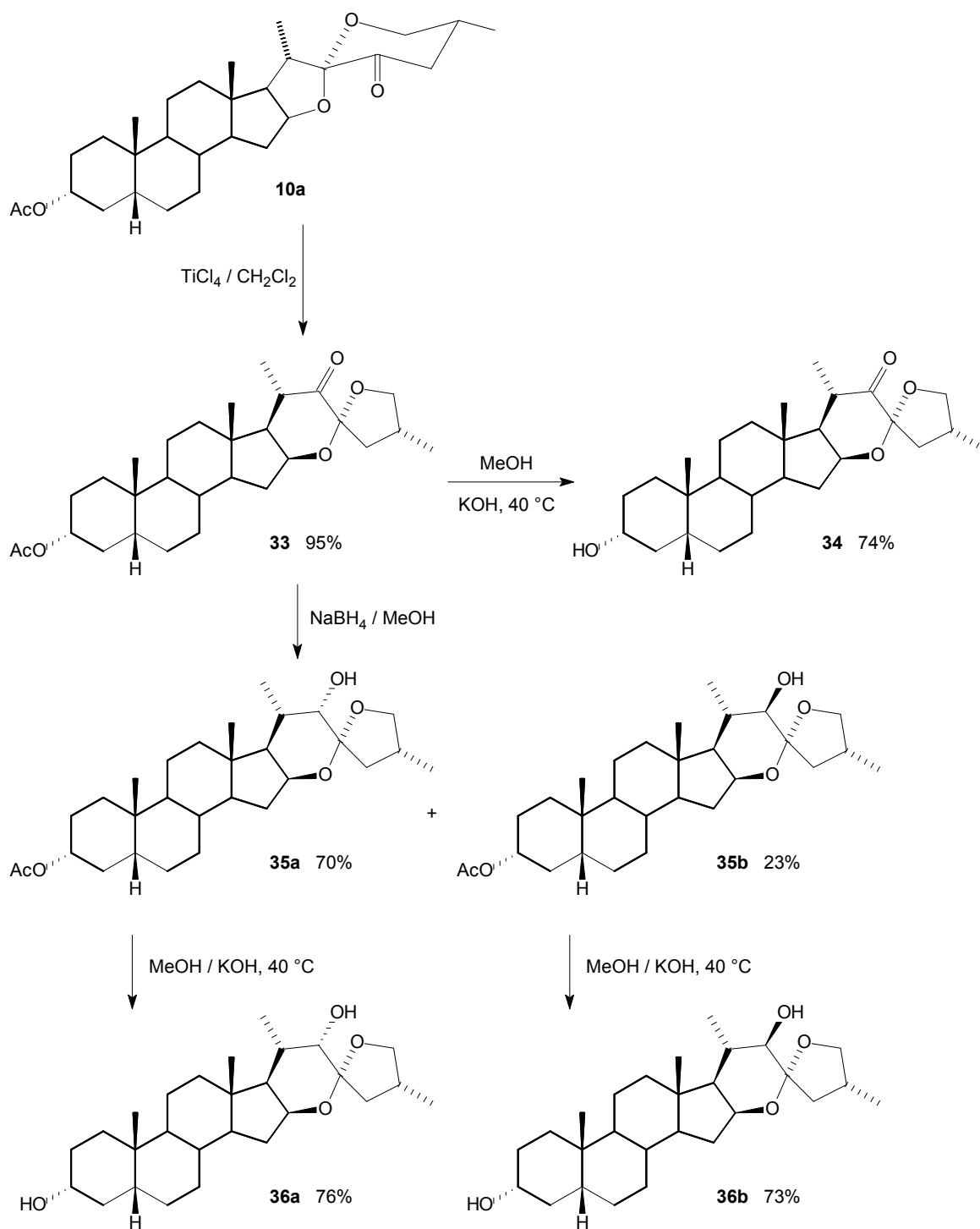
El primer esquema de síntesis realizado se presenta a continuación:



Esquema 1.



Posteriormente se continuó con otro esquema sintético, que involucraba las siguientes reacciones:



Esquema 2.

Una vez purificados cada uno de los compuestos sintetizados, se procedió a realizar estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas. Los espectros de RMN fueron obtenidos utilizando un espectrómetro Varian INOVA de 300 MHz y usando tetrametilsilano (TMS), para los estudios de  $^1\text{H}$  ó  $\text{CDCl}_3$  para el caso de  $^{13}\text{C}$  como señales de referencia.

También fueron determinados los rendimientos para cada paso de reacción de los esquemas de síntesis, así como los puntos de fusión de cada uno de los compuestos sintetizados.

Diversos reportes escritos hasta la fecha<sup>14,67-69</sup> han estudiado las características de RMN de sapogeninas esteroidales naturales y sintéticas. Gracias a ellos se ha logrado reunir una gran cantidad de datos que han permitido analizar y discutir los efectos de las modificaciones estructurales de este tipo de compuestos. Haciendo uso de esta información fue posible identificar cada uno de los productos obtenidos en este trabajo.

En contraste con la RMN- $^{13}\text{C}$ , los espectros de  $^1\text{H}$  son más complicados debido al pequeño rango de desplazamientos químicos y a la gran cantidad de acoplamientos interprotónicos existentes. Sólo unas pocas señales, p.ej. los singuletes de los grupos metilo angulares (18,19) y los dobletes para los grupos metilo secundarios (21, 27), y señales que aparecen en campo bajo (3 ppm) pueden ser reconocidas fácilmente.

El resto de las señales en RMN- $^1\text{H}$  se localizan en la región de 1 a 2 ppm como series de multipletes traslapados. La asignación completa de hidrógenos para un esteroide de bajo grado de funcionalización es difícil porque más de 20 protones tienen desplazamientos químicos en esta región.

El primer paso de reacción llevado a cabo consistió en la introducción de una función carbonílica en la posición C-23 del acetato de 3-epiesmilagenina **16a**. Gracias a esta reacción se logró sintetizar el acetato de 23-cetoesmilagenina

**10a**. De esta reacción se obtuvieron rendimientos similares a los ya descritos en la literatura.<sup>35</sup>

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H del acetato de 23-cetoepiesmilagenina (**10a**) mostró el desplazamiento a campo bajo de las señales de los hidrógenos H-26 ax. y H-26 eq. Al mismo tiempo, la desprotección de H-16 y H-20 ha sido señalada como uno de los principales efectos debido a la presencia del grupo carbonilo en C-23.<sup>37,54</sup> El desplazamiento a campo bajo del H-26 ha sido atribuido a la anisotropía magnética de la función carbonílica.<sup>37,54</sup>

El espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **10a** se caracterizó de manera sencilla, la introducción del carbonilo en la posición del C-23 provocó la aparición de una señal característica para este grupo químico. Además, se pudo observar la protección de C-20 (provocada por una compresión de van der Waals), la desprotección de C-24 (que se encuentra en posición  $\alpha$  con respecto a la función carbonílica presente en C-23) y la desprotección de C-25 debida la pérdida de la interacción con el H-23 axial.

El tratamiento del acetato de 3-epismilagenina (**16a**) con DIB y BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O en AcOH produjo la 23R-acetoxisapogenina correspondiente con rendimientos moderados a buenos. Las señales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de la 23R-acetoxisapogenina **29** concuerdan con los datos previamente reportados.<sup>48</sup> La orientación axial del grupo acetoxilo y por tanto la configuración 23R pueden ser fácilmente corroboradas por los patrones de acoplamiento dd del H-23 ecuatorial en el cual dos constantes de acoplamiento pequeñas ( $J$  2.6, 2.6 Hz) indican los acoplamientos ecuatorial-axial y ecuatorial-ecuatorial de H-23 con los protones H-24 axial y ecuatorial. Adicionalmente, el desplazamiento a campo alto de casi 5 ppm de C-25 (del valor normal de 30.0 ppm in 25R-sapogeninas sin grupos funcionales en C-23) indica una interacción diaxial 1,3 entre el grupo acetoxilo en C-23 y H-25 que se considera para la asignación de la configuración 23R.

El producto de hidrólisis del acetato de 23-cetoepiesmilagenina (**28**), fue caracterizado por comparación con los espectros de **10a**. En el caso del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , se aprecia la desaparición de las señales correspondientes a C=O y  $\text{CH}_3$  del acetato, la señal de C-3 se desplaza a campo alto y se aprecia la desprotección de C-1, C-2 y C-4, que son los carbonos vecinos a C-3.

La reacción de reducción de **10a** produjo el alcohol ecuatorial **31**. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  de este compuesto se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo carbonilo en C-23. La orientación ecuatorial del grupo hidroxilo en C-23 del compuesto **31** puede corroborarse por la observación del patrón de acoplamiento de H-23, el cual indica los acoplamientos axial $_{\text{H-23}}$ -ecuatorial $_{\text{H-24}}$ .

La hidrólisis de los compuestos **29** y **31** produjo los compuestos libres del grupo acetato en la posición C-3, **30** y **32**. En el caso de los productos de hidrólisis de **29** y **31** se observa en los espectros de  $^{13}\text{C}$  la desaparición de las señales que pertenecían al grupo carbonilo y al metilo del acetato mientras que el resto de las señales sufrieron cambios de desplazamiento mínimos.

#### *Efectos del reordenamiento.*

El reordenamiento del acetato de 23-cetoepiesmilagenina **10a** se llevó a cabo mediante el método descrito por Suárez<sup>44,45</sup> para generar el acetato de la 16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxicoprostan-22-ona correspondiente (producto de reordenamiento **33**).

Además de los efectos esperados en las posiciones C-22 (desprotección) y C-23 (protección), la conversión de la 23-oxosapogenina **10a** en la 16 $\beta$ ,23:23,26 diepoxi-22-ona **33** provoca cambios significativos en otras señales de  $^{13}\text{C}$  de la cadena lateral. La transformación del anillo E en un anillo de seis miembros genera una interacción 1,3-diaxial entre el O-26 y H-16 la cual produce un fuerte efecto de protección en C-16. Este reordenamiento también implica la transformación del anillo F en uno de cinco miembros lo que lleva a la pérdida de

la interacción 1,3-diaxial entre O-16 y H-26 pro *R*, lo que justifica la desprotección de C-26. Además, la desprotección observada de la señal de C-20 corresponde de manera clara al efecto de la función carbonílica vecinal.

*Efectos de la reducción (ver Tabla 1).*

La reducción del compuesto **33** produjo una mezcla de los compuestos epiméricos 22-hidroxi **35a** y **35b**, que se separaron con facilidad utilizando la técnica de cromatografía en columna.

Además del desplazamiento a campo alto esperado para C-22, la reducción del carbonilo en C-22 produce la protección de C-20, que está asociada a la baja electronegatividad de la función vecinal. La desprotección de C-21 en los alcoholes **35a** y **35b** puede ser atribuida a la ausencia del efecto protector de la anisotropía magnética de la función carbonílica (esto lo podemos apreciar al comparar las señales de C-21 de los compuestos **10a** y **33**). Al mismo tiempo, un efecto similar de desprotección puede justificar el desplazamiento a campo bajo de C-17 en **35b**; en el compuesto **35a**, la orientación  $\alpha$ -axial del grupo hidroxilo en C-22 produce una compresión electrónica en H-17 lo que explica el desplazamiento a campo alto de C-17. La protección de C-24 en el compuesto **35b** puede ser atribuida a la compresión electrónica ejercida sobre H-24 pro *R* por el grupo hidroxilo  $\beta$  en C-22.

**Tabla 1. Efectos de las diferentes transformaciones en RMN-<sup>13</sup>C de la cadena lateral ( $\Delta$ , ppm).**

C#	<b>33</b> (22-C=O)	<b>35a</b> (22 $\alpha$ -OH)	<b>35b</b> (22 $\beta$ -OH)
<b>16</b>	-10.5	+0.4	-1.2
<b>17</b>	-4.2	-4.8	+2.7
<b>18</b>	-1.4	+0.1	+0.2
<b>20</b>	+5.2	-6.1	-5.1
<b>21</b>	-1.4	+2.5	+3.0
<b>22</b>	+103.3	-136.8	-137.1
<b>23</b>	-93.9	+0.4	+4.3
<b>24</b>	-1.4	+1.3	-3.4
<b>25</b>	-2.5	-3.9	-2.4
<b>26</b>	+9.6	-0.9	-1.8
<b>27</b>	-0.6	+1.6	+0.5

La hidrólisis de los compuestos **33**, **35a** y **35b** produjo los productos **34**, **36a** y **36b** respectivamente. Al igual que en las reacciones de hidrólisis de las 23-oxosapogeninas, los productos de reacción fueron fácilmente identificados mediante los estudios de RMN. En los espectros de  $^{13}\text{C}$  pudimos apreciar en los tres casos la desaparición de las señal correspondientes al grupo carbonilo y al metilo del acetato en la posición C-3. El resto de las señales sufrieron desplazamientos mínimos

La identificación de los protones diasterotópicos en C-26 de los compuestos **33**, **35a** y **35b** no es sencilla debido a la orientación pseudoecuatorial de ambos protones. La realización de experimentos de correlación NOE a los compuestos **33**, **35a** y **35b** nos proporcionó criterios apropiados para la diferenciación del par diasterotópico H-26. (*Ver figuras 18 y 19*).

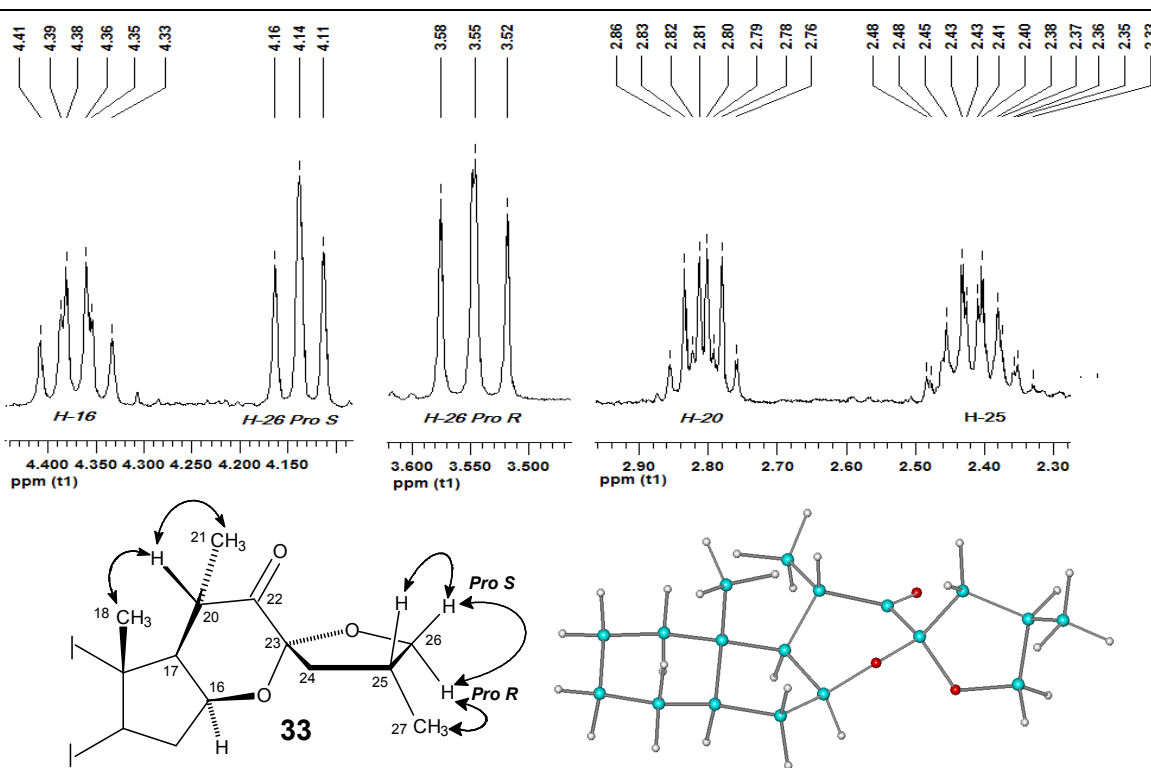
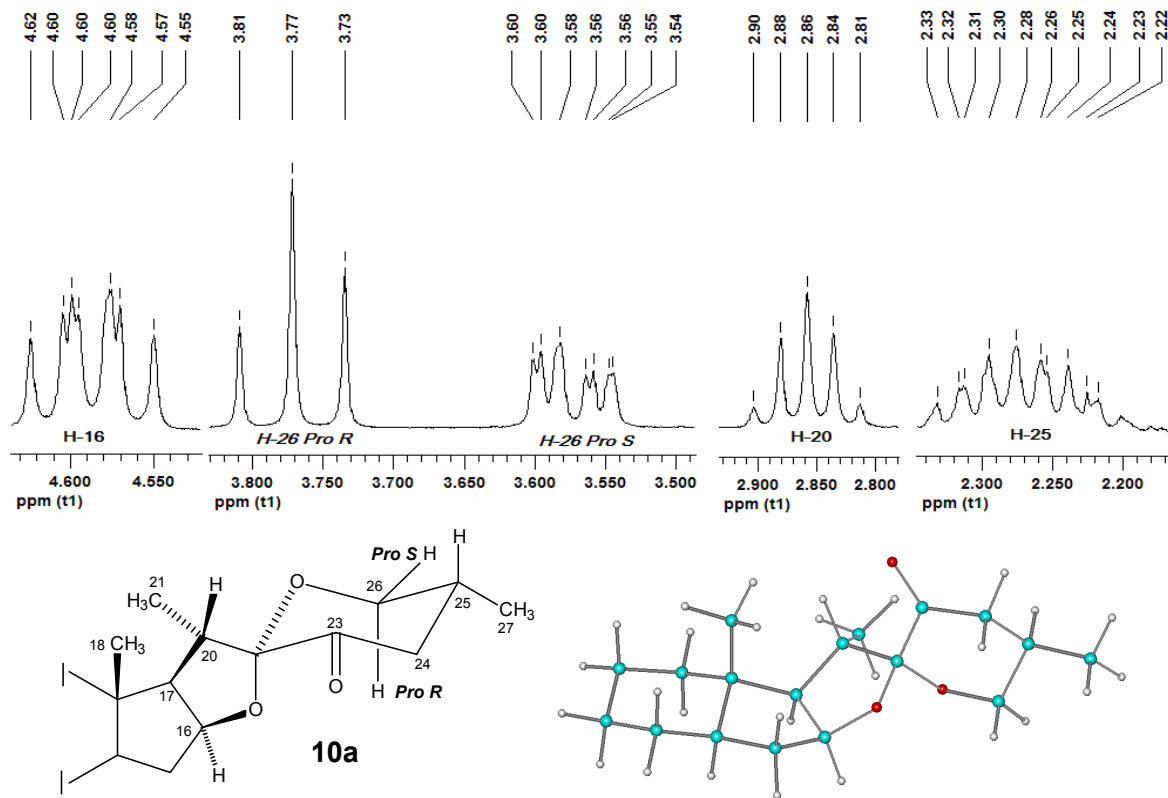


Figura 18. Señales selectas de  $^1\text{H}$ , correlaciones NOE y modelos de las cadenas laterales de las (25*R*)-cetonas 10a y 33.

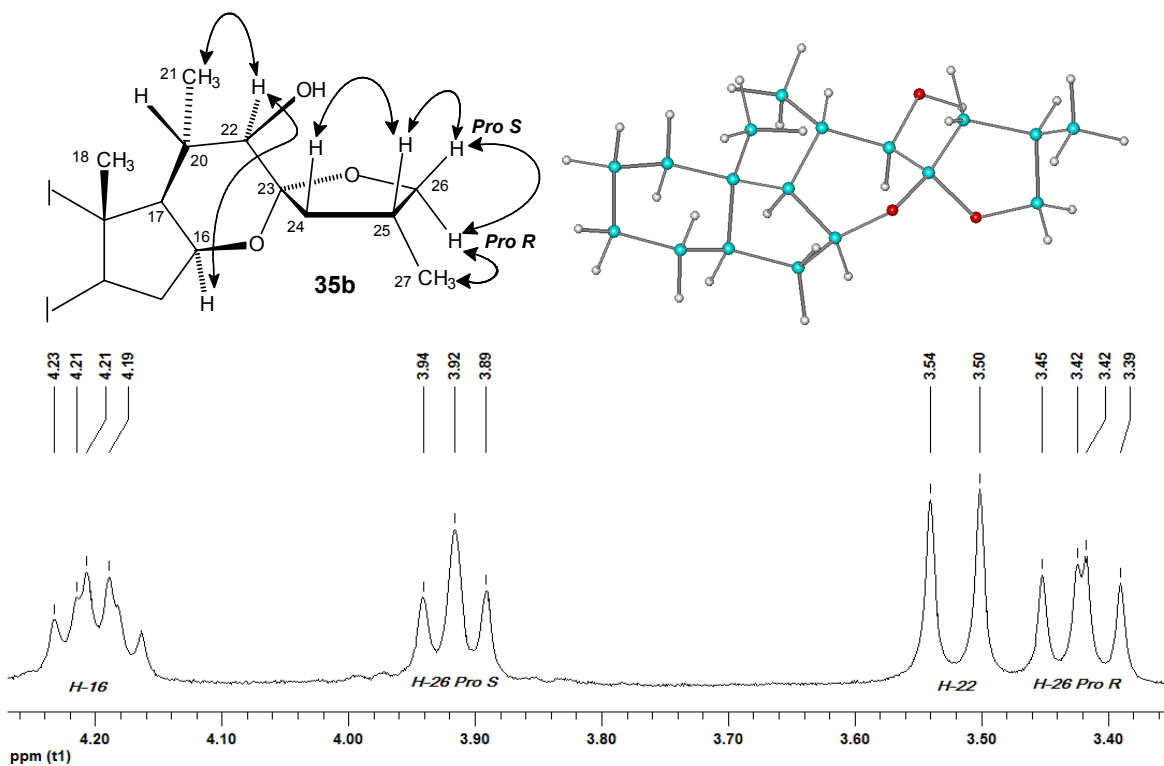
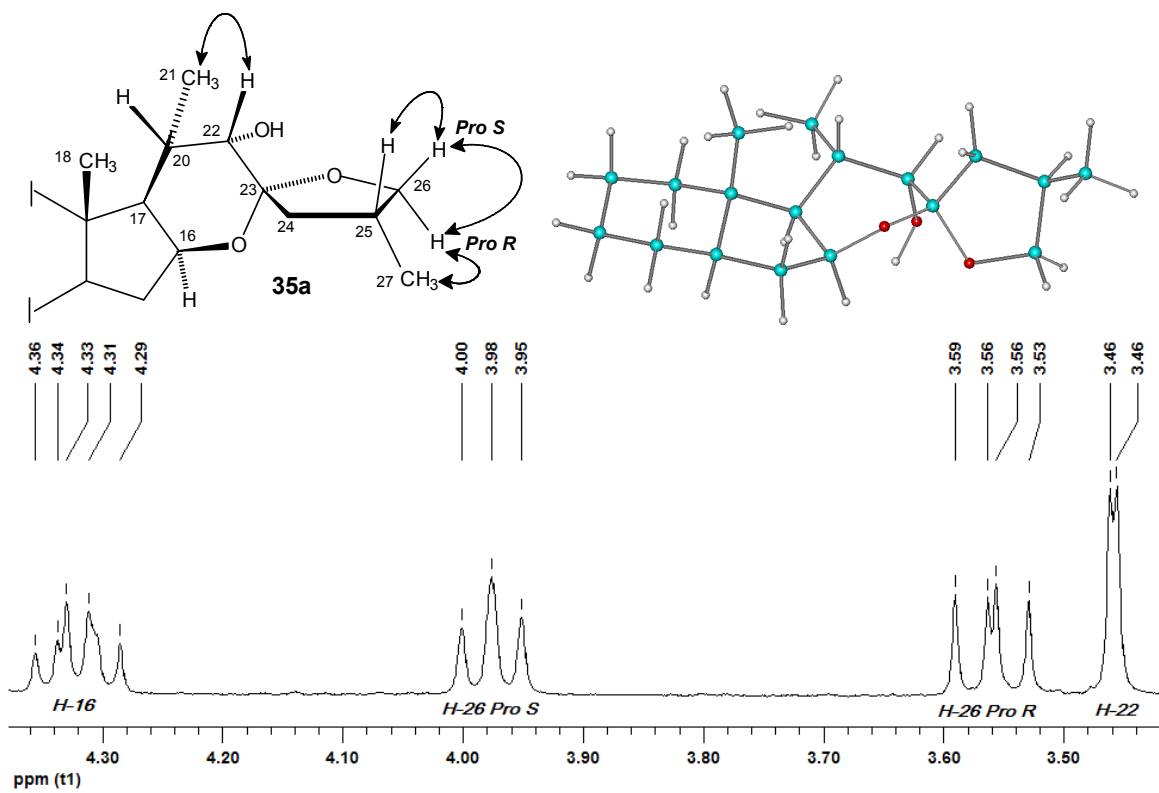


Figura 19. Señales selectas de  $^1\text{H}$ , correlaciones NOE y modelos de las cadenas laterales de los *(25R)*-alcoholes **35a** y **35b**.



## 6. Resumen.

Las sapogeninas esteroideas constituyen una inagotable fuente de materias primas para la síntesis de compuestos esteroideos con diferentes actividades biológicas y farmacológicas.

El objetivo de este trabajo fue sintetizar nuevos derivados de sapogeninas esteroideas a partir de 23-oxosapogeninas y 23-oxosapogeninas reordenadas.

Los resultados mostraron que es posible llevar a cabo reacciones donde pueden incorporarse sustituyentes en la posición C-23 de sapogeninas espiroestánicas y que constituyen la clave para la transformación de la cadena lateral.

El reordenamiento de la 23-oxosapogenina produjo la (25*R*)-16 $\beta$ ,23:23,26, diepoxi,22-ona correspondiente, que fue utilizada también como materia prima para la obtención de otra serie de derivados de sapogeninas esteroideas.

Con el propósito de elucidar y proponer estructuras para los compuestos obtenidos se realizaron estudios de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El posterior análisis de los derivados sintetizados por la técnica de espectrometría de masas contribuyó a corroborar las estructuras propuestas.

Los efectos del reordenamiento así como de la reducción de la 23-oxosapogenina reordenada fueron analizados con ayuda de la técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

En los análisis de RMN de  $^1\text{H}$  fue posible observar que los desplazamientos químicos de los protones de la cadena lateral dependen en gran medida de la sustitución, naturaleza y orientación de los sustituyentes presentes sobretodo, en los anillos E y F.

En el caso de la RMN de  $^{13}\text{C}$ , las señales correspondientes a los átomos de carbono pertenecientes a la cadena lateral muestran diferente grado de dependencia de la sustitución y orientación de los sustituyentes de dicha cadena.

## **7. Conclusiones.**

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se han obtenido nuevos derivados de 23-oxosapogeninas y 23-oxosapogeninas reordenadas

Nuestros resultados muestran que los cambios estructurales de la cadena lateral espiroestánica se observan en los experimentos de RMN-<sup>1</sup>H y de RMN-<sup>13</sup>C. Los espectros de RMN contribuyeron en gran medida a la elucidación de las estructuras de los compuestos sintetizados.

El estudio de reacciones de sapogeninas y sapogeninas reordenadas constituye un campo extenso de investigación. Con este trabajo se han sentado las bases que permitirán a futuro, optimizar las reacciones efectuadas así como proponer y desarrollar esquemas de síntesis que lleven a la obtención de nuevos productos de interés químico y biológico.

Como perspectiva de este trabajo queda realizar el estudio correspondiente de la actividad biológica de los derivados obtenidos para verificar posibles efectos farmacológicos.

## 8. Bibliografía.

1. Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; Tagliatela-Scafati, O. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*: 4904-4908.
2. Carotenuto, A.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; Carnuccio, R.; D'Acquisto, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *53*: 3401-3406.
3. Corbiere, C.; Liagre, B.; Terro, F.; Beneytout, J.L. *Cell Research*, **2004**, *14*: 188-196.
4. Corbiere C., Liagre, B.; Bianchi, A.; Bordji, K.; Dauca, M.; Netter, P.; Beneytout, J.L. *Int. J. Oncol.* **2003**, *22*: 899-905.
5. Norton, S.A. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1998**, *38*: 256-259.
6. Tsukamoto, T., Ueno, Y., Ohta, Z. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1936**, *56*: 135.
7. Tsukamoto, T., Ueno, Y., Ohta, Z. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1937**, *57*: 9.
8. Tsukamoto, T., Ueno, Y., Ohta, Z., Tschesche, R. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1937**, *57*: 283
9. Marker, R.E., *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*: 2656.
10. Tschesche, R., *Ber.* **1936**, *69*: 1665.
11. Fieser, L.F.; Fieser, M. *Natural products related to phenanthrene*, American Chemical Society monograph series, Nueva York, 3ra. Ed., **1949**.
12. Hiromochi, H.; Nakao, I. *J. Pharmacobio-Dyn.* **1980**, *3*: 643.
13. Hiromochi, H. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1981**, *32*: 565.
14. Iglesias-Arteaga, M.A.; Pérez Gil R.; Pérez Martínez C.; Coll Manchado F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *1*: 261-266.
15. Anagnostopoulos, C. E.; Fieser, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*: 532.
16. Marker, R. E., Applezweig, N., *Chem. Eng. News* **1949**, *27*: 3348.
17. Marker, R. E.; Wagner, R. B.; Ulshafer, P. R.; Wittbecker, E. L.; Goldsmith, D. P. J.; Ruof, C. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*: 2167-2230.
18. Marker, R.E.; Wagner, R.B.; Ruof, C.H.; Ulshafer, P.R.; Goldsmith, D.P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*: 1658-1659.

19. Marker, R.E.; Wagner, R.B.; Ruof, C.H.; Ulshafer, P.R.; Goldsmith, D.P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*: 739.
20. Marker, R.E.; Wagner, R.B.; Ruof, C.H.; Ulshafer, P.R.; Goldsmith, D.P.J.; Wittbecker, E.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*: 2395-2397.
21. Marker, R.E.; Wagner, R.B.; Ruof, C.H.; Ulshafer, P.R.; Goldsmith, D.P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*: 1247.
22. Marker, R.E.; Rohrmann, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*: 586-587.
23. Marker, R.E.; Jones, E.M.; Krueger, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, *62*: 2532-2536.
24. Cameron, A.F.B.; R. M. Evans, R.M.; Hamlet, J.C.; Hunt, J.S., Jones, P.G.; Long, A.G., *J. Chem. Soc.* **1955**, 2807-2816.
25. Dauben, W.G.; Fonken, G.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*: 4618-4619.
26. Gould, D.H.; Staeudle, H.; Hershberg, E.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, *74*: 3685-3658.
27. Wall, M.E.; Kenney, H.E.; Rothman, E.S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*: 5665-5668.
28. Doukas, H.M.; Fontaine, T.D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*: 591-592.
29. Marker, R.E.; Rohrmann, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*: 3592-3593.
30. Marker, R.E.; Krueger, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*: 3349-3350.
31. Djerassi, C. *Science*. **1992**, *258*: 203-204.
32. Rao, A.; Rao, A.R.; Kale, R.K. *Indian J. Exp. Biol.* **1992**, *30*: 367-370.
33. Djerassi, C. *Steroids*. **1992**, *57*: 631-641.
34. Morzycki, J. W.; Jastrzebska, I. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*: 5989.
35. Anulewicz-Ostrowska, R.; Morzycki, J. W.; Jastrzebska, I.; Wojcik, J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*: 6916.
36. Iglesias-Arteaga, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Mata-Esma, M. Y.; Viñas-Bravo, O.; Bernès, S. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* : 4921.
37. Iglesias-Arteaga, M.A.; Pérez-Martínez, C.S.; Coll Manchado F. *J. Chem.*

Res. **1999** 48.

38. Mola Garate, J.L.; Suárez García, L.; Pérez Martínez, C.S.; Iglesias Arteaga M.A.; Coll Herrera, D.; Coll Manchado, F. *Synth. Commun.* **2003**, 33: 1203.
39. Jastrzebska, I.; Morzycki, J. W.; Trochimowicz, U. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45: 1929-1932.
40. Corcoran, J. W.; Hirschmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78 :2325.
41. Agrawal, P.K.; Jain, D.C.; Gupta, R.K.; Thakur, R.S. *Phytochemistry.* **1985**, 24: 2479-2496.
42. Barton, D.H.R.; Sammes, P.G.; Taylor, M. V.; Werstiuk, E. *J. Chem. Soc.* **1970**, 1977-1981.
43. Iglesias-Arteaga, M.A.; Velázquez-Huerta, G.A.; Méndez-Stivalet, J.M.; Galano, A., Alvarez-Idaboy, J.R. *Arkivoc.* **2005**, VI: 109-126.
44. Hernández, R.; Marrero-Tellado, J.J.; Prout, K.; Suárez, E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 275-277.
45. Betancor, C.; Dorta, R.L.; Freire, R.; Martín, A.; Prangé, T.; Suárez, E. *J. Org.Chem.* **1998**, 63: 6335-6362.
46. Cyranski, M.K.,; Frelek, J.; Jastrzebska, I; Morzycki, J. W. *Steroids.* **2004**, 69: 395-400.
47. Iglesias-Arteaga, M.A.; Velázquez-Huerta, G.A.; *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46: 6897-6899.
48. Iglesias-Arteaga, M.A.; Arcos-Ramos, R.O. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48: 7485-7488.
49. Iglesias-Arteaga, M.A.; Arcos-Ramos, R.O.; Méndez-Stivalet, J.M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47: 8029–8031.
50. Sandoval-Ramírez, J.; Castro, A.; Meza-Reyes, S; Reyes, F.; Santillán, R.L.; Farfán, N. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40: 5143-5146.
51. Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; del Río, R.E., Hernández-Linares, G.; Suárez-Rojas, A.; Rincón, S.; Farfán, N.; Santillán, R.L. *Steroids*, **2003**, 68: 199-204.
52. Blunt, J.W.; Stothers, J.B. *Org. Magn. Reson.* **1977**, 9: 430.
53. Eggert, H.; Djerassi, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 42: 3655.

54. Viñas-Bravo, O.; Hernández-Linares, G.; Mata-Esma, M.Y.; Martínez-Pascual, R.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Bernès, S.; Sandoval-Ramírez, J.; Iglesias-Arteaga, M.A.; *Arkivoc.* **2003**, *XI*: 163-171.
55. Sirtori, C.R.; Lovati, M.R.; Manzoni C, *J. Nutr.* **2004**, *134*: 18-23, 2004.
56. Attele, A.S.; Zhou, Y.P.; Xie, J.T.; *Diabetes.* **2002**, *51*: 1851-1858.
57. Turchan, J.; Pocernich, C.B.; Gairola, C. *Neurology.* **2003**, *60*: 307-314.
58. Priyadarshi, S.; Valentine, B.; Han, C. *Kidney Int.* **2003**, *63*: 1785-1790.
59. Chang, L.C.; Tsai, T.R.; Wang, J.J.; Lin, C.N.; Kuo, K.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*: 21-25.
60. Popovich, D.G.; Kitts, D.D. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *406*: 1-8.
61. Hibasami, H.; Moteki, H.; Ishikawa, K. *Int. J. Mol. Med.* **2003**, *11*: 23-26.
62. Liang, C.H.; Liu, L.F.; Shiu, L.Y.; Huang, Y.S.; Chang, L.C.; Kuo, K.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*: 751-758.
63. Raju, J.; Patlolla, J.M.R.; Swamy, M.V.; Rao, C.V. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, *13*: 1392-1398.
64. Raju, J.; McCarthy, B.; Bird, R.P. *Int. J. Cancer.* **2002**, *100*: 635-641.
65. Liagre, B.; Vergne-Salle, P.; Corbiere, C.; Charissoux, J.L.; Beneytout, J.L. *Arthritis Res. & Therap.* **2004**, *6*: R373-R383.
66. Morzycki, J.W.; Paradowska, K.; Karolina Dabrowska-Balcerzak, K.; Jastrzebska, I.; Siergiejszyk, L.; Wawer, I. *J. Mol. Struc.* **2005**, *744*: 447-455.
67. Agrawal, P.K.; Bunsawansong, P.; Morris, G.A. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*: 441-446.
68. Agrawal, P.K.; Jain, D.C.; Pathak, A.K. *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*: 923-953.
69. Iglesias-Arteaga, M.A.; Pérez, R.; Pérez, C.S.; Coll, F. *Steroids.* **2002**, *67*: 159-163.
70. Agrawal, P.K. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*: 965-968.
71. Agrawal, P.K.; Bunsawansong, P.; Morris, G.A. *Phytochemistry.* **1997**, *347*:

255-267.

72. LaCour, T.G.; Tong, Z.; Fuchs, P.L., *Org. Lett.* **1999**, *1*: 1815-1818.
73. Moriarty, R. M.; Prakash, O. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*: 244-250.
74. Prakash, O.; Singh, P.S.. *Aldrichim. Acta.* **1994**, *27*, 15-23;
75. Varvoglis, A. *Tetrahedron.* **1997**, *53*: 1179-1255.
76. Moriarty, R.M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*: 2893-2903.
77. Moriarty, R. M.; John, L.S.; Du, P.C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 641-642.
78. Turuta, A.M.; Kamernitzky, A. V.; Fadeeva, T.M.; Zhulin, A.V. *Synthesis*, **1985**, 1129-1131.
79. Daum, S.J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*:4725-4728.
80. Moriarty, R.M.; Prakash, I. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*: 5867-5870.
81. Rosenkranz, G., Pataki, J., and Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*: 4055.
82. Rosenkranz, G., Djerassi, C., *Nature*, **1950**, *166*: 104.
83. Djerassi, C., Martinez, H., Rosenkranz, G., *J. Org. Chem.* **1951**, *16*: 1278.
84. Lee, E.; Liu, Y-T.; Solomon, P.H.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*: 1634-1635.
85. Iglesias-Arteaga, M.A., Jastrebska, I; Morzycki, J.W. *Polish J. Chem.* **2006**, *80*: 667-671.
86. Iglesias-Arteaga, M.A.; Alvarado-Nuño, A.A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*: 5351-5353.
87. Karnick, C.R. *Quart J. Crude Drug Res.* **1969**, *9*: 1372-1391.
88. Karnick, C.R. *Planta Med.* **1971**, *20*: 257-262.
89. Coursey, D.G. *World Crops.* **1965**, 74-82. Taylor, W.G.; Elder, J.L.; Chang, P.R. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*: 5206-5210.
90. Hostettmann, K.; Marston, A. *Saponins. Chemistry and Pharmacology of Natural Products.* Cambridge University Press; Cambridge, Inglaterra. **2001**.



91. Fieser, L.; Fieser, M. *Steroids*. Reinhold. San Francisco, **1959**.

ARTICULO



ELSEVIER

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/steroids](http://www.elsevier.com/locate/steroids)

# $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR characteristics of synthetic derivatives of steroid sapogenins

## Part III. $16\beta,23:23,26$ -Diepoxy side chains

Ignacio Vázquez-Ramírez, Mariana Macías-Alonso, Rafael O. Arcos-Ramos, Karen M. Ruíz-Pérez, Diana O. Solano-Ramírez, Martín A. Iglesias Arteaga\*

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2007

Received in revised form

22 January 2008

Accepted 28 January 2008

Published on line 12 February 2008

Dedicated to Professor José Luis Mola Garate on occasion of his 75th birthday.

#### Keywords:

NMR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$

COSY

HetCor

NOESY

23-Oxosapogenins

$16\beta,23:23,26$ -Diepoxy-coprostanes

### ABSTRACT

The full assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signals of steroids bearing the  $16\beta,23:23,26$ -diepoxy side chain are provided. Differentiation of the diastereotopic H-26 pair was achieved with the aid of NOESY experiments. The main substituent and steric effects associated with this moiety and their influence on the chemical shifts of the neighboring atoms are discussed.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Over nearly a century steroid sapogenins (SS) have attracted considerable interest due their intrinsic biological activity [2–8] or their suitability as starting materials for the synthesis of biologically active compounds such as sex hormones [9], ecdysteroids [10], and more recently, spirostane [11–13] and

furostane analogs [14–17] of brassinosteroids and cephalostatins [18].

Structurally, spirostane SS are grouped into two classes, the 25R- and 25S-spirostanes, both characterized by the presence of the spiroketal moiety that results from the ketalization of a 22-keto function involving the hydroxyl groups at positions  $16\beta$  and 26 (Fig. 1) [19].

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223704; fax: +52 55 56223722.

E-mail address: [martin.iglesias@servidor.unam.mx](mailto:martin.iglesias@servidor.unam.mx) (M.A. Iglesias Arteaga).  
0039-128X/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.steroids.2008.01.027

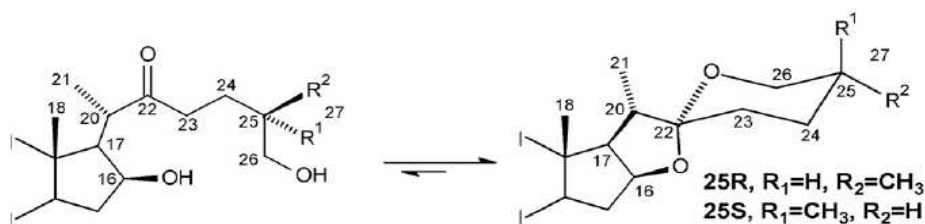


Fig. 1 – The spirostane side chain.

This structural fragment confers a special reactivity on SS. The search of new reactions of the spirostane side chain has converted this family into an important source of new compounds [20–39] that can be of biological or synthetic interest. In particular, Suarez and coworkers reported that treatment of 23-oxosapogenins with  $\text{TiCl}_4$  produces the rearrangement of the 5/6 spiroketal characteristic of SS into a new skeleton bearing a  $16\beta,23:23,26$ -diepoxy-22-one moiety [21,22]. The same rearrangement has been observed when 23-oxosapogenins were treated with  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  in THF [27] or formic acid (Fig. 2) [28].

Although previous reports related with the synthesis and reactivity of the  $16\beta,23:23,26$ -diepoxy side chain have provided clear evidence on the identity of such compounds [20,21,26–28], no detailed assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts related to this moiety have been made. As a part of our project on the synthesis of bioactive compounds derived from SS we became interested on the full characterization of a series of steroids that are used as starting materials in the synthesis of new potentially bioactive steroids. Herein, we report on the detailed assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  signals associated with the rearranged 25R and 25S- $16\beta,23:23,26$ -diepoxy side chains bearing different oxygenated groups at position C-22.

## 2. Discussion

The rearrangement of (25R)-23-oxosapogenin 1a, carried out as described by Suarez [20], afforded the corresponding (25R)- $16\beta,23:23,26$ -diepoxy-22-one 2a. Reduction of 2a with  $\text{NaBH}_4$  in methanol led to an easily separable mixture of the epimeric 22-hydroxy compounds 3a and 4a. A similar sequence applied to the (25S)-23-oxosapogenin 1b afforded the corresponding compounds 2b, 3b and 4b (Scheme 1).

Several reports have dealt with the NMR characteristics of naturally occurring steroid and synthetic SS and the cop-

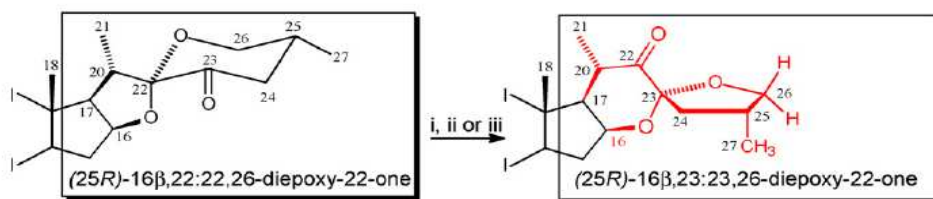
ious data available have been collected, analyzed and the effects of structural modifications have been discussed and systematized [1,40–47]. Meanwhile the identification of the diastereotopic protons at C-26 in 23-oxo-SS 1a and 1b can easily be carried out by observation of their coupling patterns [1,11–13,44,45], the differentiation of the diastereotopic protons attached to C-26 in the rearranged compounds 2 to 4 is not trivial due their pseudoequatorial orientation. Fortunately NOESY experiments with the rearranged compounds 2 to 4 of both the 25R and 25S series provided an appropriate criterion for the differentiation of the H-26 diastereotopic pair (see Figs. 3–6). Tables 1 and 2 show the assignment of the  $^1\text{H}$  signals of the (25R)- and (25S)-derivatives 1 to 4. Table 3 shows the assignments of the  $^{13}\text{C}$  signals of compound 1 to 4.

## 3. Effects of the rearrangement (see Table 4)

In addition to the expected effects on positions C-22 (deshielding) and C-23 (shielding), the conversion of the 23-oxosapogenins to the  $16\beta,23:23,26$ -diepoxy-22-ones produces significant changes on the signals of other  $^{13}\text{C}$  nuclei of the side chain. The transformation of the E-ring into a six-membered ring results on a 1,3 diaxial interaction between O-26 and H-16 which produces a strong shielding effect in C-16. This rearrangement also implies the transformation of the F ring into a five-membered ring which leads to the loss of the 1,3-diaxial shielding interaction between O-16 and pro-R H-26, which justifies the observed deshielding of C-26. In addition, the observed deshielding of the C-20 signal clearly corresponds to the effect of the vicinal carbonyl function.

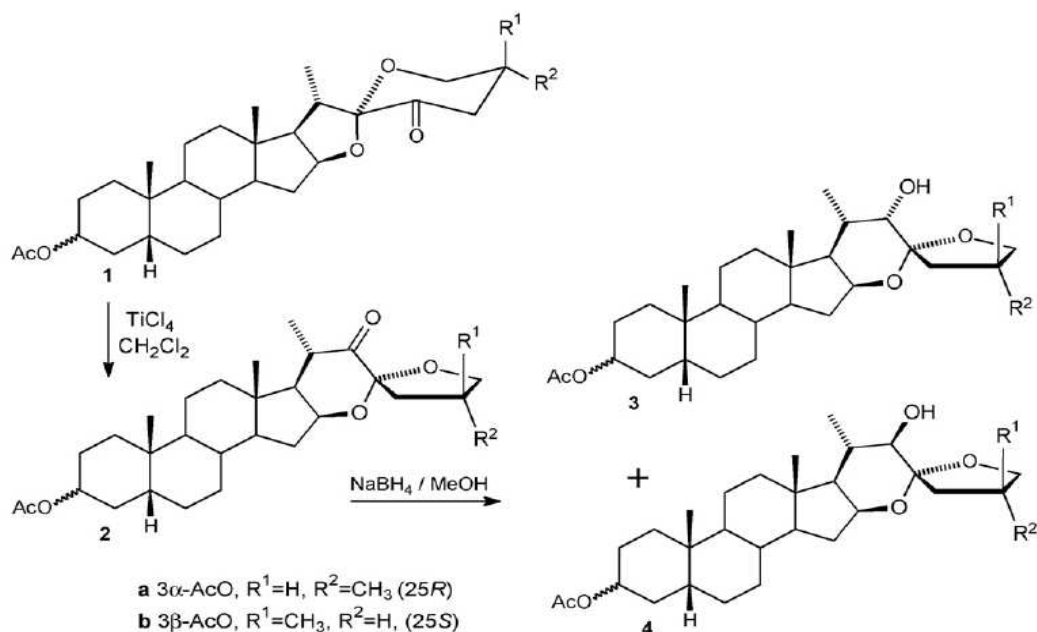
## 4. Effects of the reduction (see Table 4)

In addition to the expected upfield shift of C-22, the reduction of the carbonyl at C-22 also produces the shielding of C-20 that



i)  $\text{TiCl}_4$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ii)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  in THF, iii)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  in formic acid

Fig. 2 – Rearrangement of 23-oxosapogenins.



Scheme 1

Table 1 – <sup>1</sup>H chemical shifts (ppm) of (25R)-derivatives

Proton	1a	2a	3a	4a
H-3	4.70 (m)	4.70 (m)	4.70 (m)	4.70 (m)
H-16	4.59 (m)	4.35 (dt, <i>J</i> =8.10, 8.09, 6.32)	4.31 (dt, <i>J</i> =7.88, 7.84, 5.63)	4.18 (dt, <i>J</i> =7.74, 7.62, 5.48)
CH <sub>3</sub> -18	0.74 (s)	0.94 (s) <sup>a</sup>	0.75 (s)	0.80 (s)
CH <sub>3</sub> -19	0.93 (s)	0.94 (s) <sup>a</sup>	0.93 (s)	0.93 (s)
H-20	2.86 (q, <i>J</i> =7.0)	2.79 (qd, <i>J</i> =9.96, 6.45, 6.43, 6.43)		
CH <sub>3</sub> -21	0.93 (d, <i>J</i> =6.6)	1.07 (d, <i>J</i> =6.43)	1.13 (d, <i>J</i> =6.89)	1.03 (d, <i>J</i> =6.59) <sup>a</sup>
H-22	–	–	3.45 (d, <i>J</i> =1.60)	3.51 (d, <i>J</i> =11.77)
H-25	2.27 (m)	2.40 (m)	2.21 (m)	2.15 (m)
H-26 pro-S	3.57 (dd, <i>J</i> =11.2, 4.2)	4.12 (dd, <i>J</i> =7.59, 7.59)	3.97 (dd, <i>J</i> =7.45, 7.45)	3.90 (dd, <i>J</i> =7.48, 7.48)
H-26 pro-R	3.77 (dd, <i>J</i> =11.2, 11.2)	3.52 (dd, <i>J</i> =8.95, 8.20)	3.55 (dd, <i>J</i> =10.22, 8.17)	3.41 (dd, <i>J</i> =10.25, 8.27)
CH <sub>3</sub> -27	0.92 (d, <i>J</i> =6.4)	1.03 (d, <i>J</i> =6.68)	1.02 (d, <i>J</i> =6.49)	1.01 (d, <i>J</i> =6.67) <sup>a</sup>
CH <sub>3</sub> -acetyl	2.01 (s)	2.00 (s)	2.02 (s)	2.01 (s)

NMR spectrum of compound 4a also shows the signal of H-24 pro-R (2.59 (dd, *J*=12.91, 8.48) deshielded by a  $\delta$ -syn interaction with the  $\beta$ -hydroxyl group attached to H-22.

<sup>a</sup> overlapped.

Table 2 – <sup>1</sup>H chemical shifts (ppm) of (25S)-derivatives

Proton	1b	2b	3b	4b
H-3	5.05 (m)	5.06 (m)	5.06 (m)	5.05 (m)
H-16	4.60 (dt, <i>J</i> =6.2, 7.7 Hz)	4.36 (dt, <i>J</i> =8.09, 8.08, 6.34)	4.32 (dt, <i>J</i> =7.96, 7.86, 5.58)	4.18 (dt, <i>J</i> =7.84, 7.80, 5.36)
CH <sub>3</sub> -18	0.76 (s)	0.95 (s)	0.75 (s)	0.80 (s)
CH <sub>3</sub> -19	0.97 (s)	1.00 (s)	0.97 (s)	0.97 (s)
H-20	2.88 (m)	2.77 (qd, <i>J</i> =9.88, 6.43, 6.36, 6.36)		
CH <sub>3</sub> -21	1.06 (d, <i>J</i> =7.0)	1.09 (d, <i>J</i> =6.44)	1.13 (d, <i>J</i> =6.91)	1.04 (d, <i>J</i> =4.13) <sup>a</sup>
H-22	–	–	3.62 (d, <i>J</i> =1.85)	3.58 (d, <i>J</i> =11.77)
H-25	2.38 (m)	2.57 (m)	2.59 (qd, <i>J</i> =14.26, 7.02, 6.98, 6.98)	2.55 (qd, <i>J</i> =14.23, 7.13, 7.13, 7.10)
H-26 pro-S	3.40 (dd, <i>J</i> =2.0, 11.1)	3.62 (dd, <i>J</i> =7.86, 7.86)	3.44 (dd, <i>J</i> =8.05, 6.70)	3.38 (m)
H-26 pro-R	4.26 (dd, <i>J</i> =2.8, 11.2)	4.14 (dd, <i>J</i> =7.67, 7.67)	4.11 (dd, <i>J</i> =8.04, 7.00 Hz)	4.04 (dd, <i>J</i> =7.75, 7.75)
CH <sub>3</sub> -27	0.94 (d, <i>J</i> =7.0)	1.06 (d, <i>J</i> =6.69)	1.02 (d, <i>J</i> =6.79)	1.02 (d, <i>J</i> =4.42) <sup>a</sup>
CH <sub>3</sub> -acetyl	2.03 (s)	2.05 (s)	2.04 (s)	2.03 (s)

<sup>a</sup> overlapped.

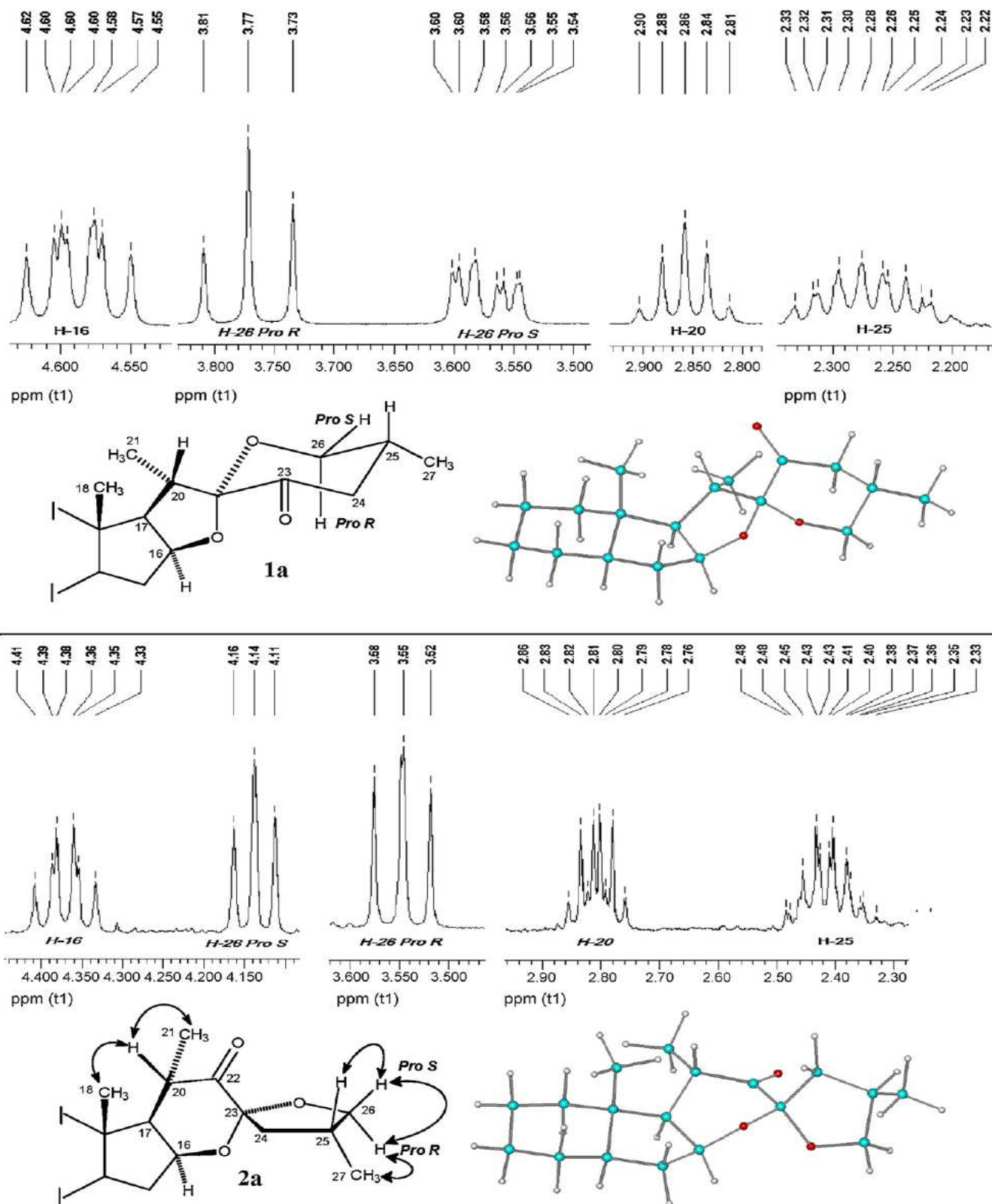


Fig. 3 – Selected <sup>1</sup>H signals [48], NOE correlations and models [49,50] of the side chains of (25R)-ketones 1a and 2a.

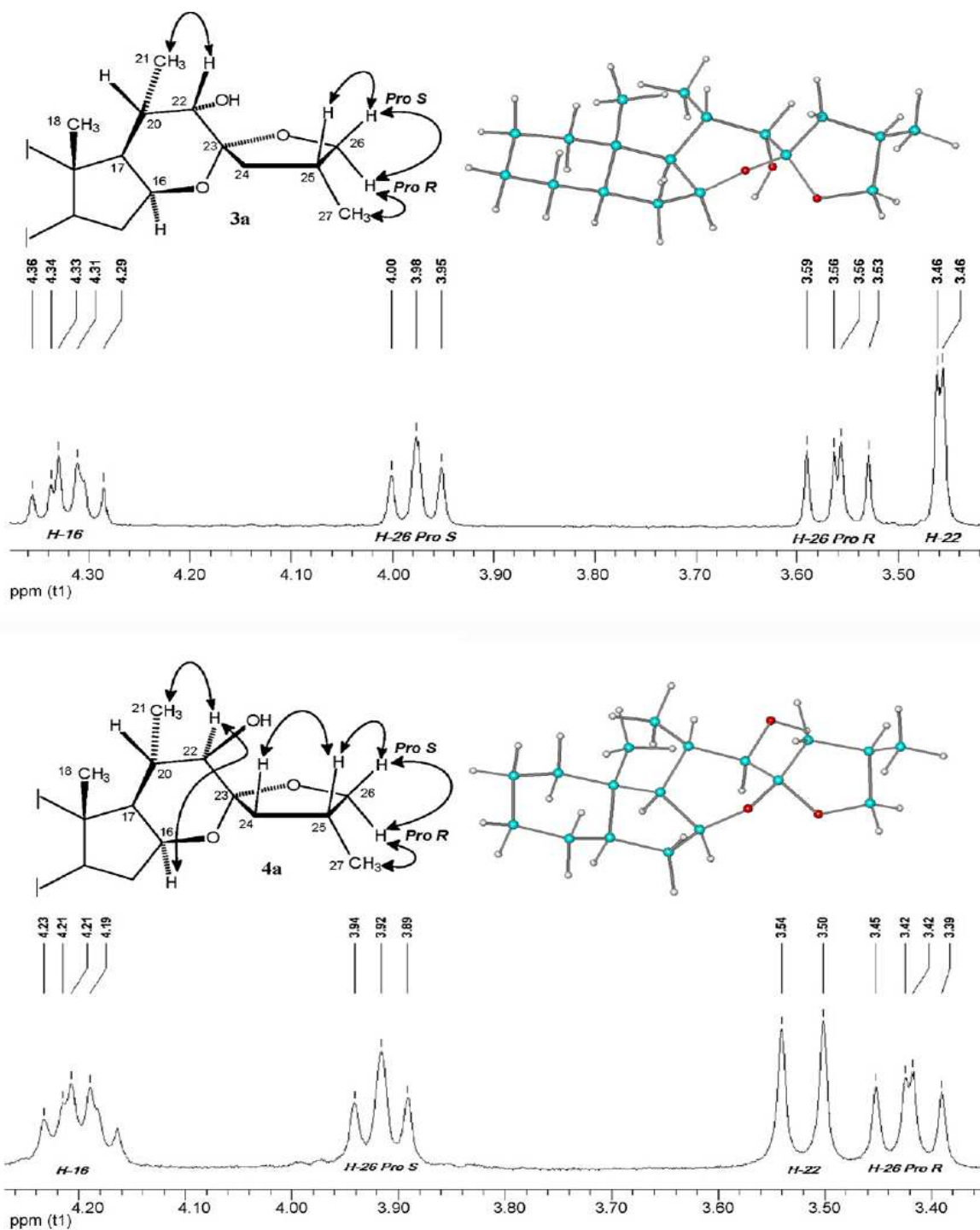


Fig. 4 – Selected  $^1\text{H}$  signals [48], NOE correlations and models [49,50] of the side chains of (25R)-alcohols 3a and 4a.

is associated with the lower electronegativity of the vicinal function. Deshielding of C-21 in the alcohols 3a,b and 4a,b may be attributed to the absence of the shielding effect of the magnetic anisotropy of carbonyl function (see shieldings in C-21 of 1a,b compared to this of 2a,b). Meanwhile a similar deshielding effect can be claimed to justify the downfield shift

of C-17 in 4a and 4b, in compounds 3a and 3b; the  $\alpha$ -axial hydroxyl group at C-22 produces electronic compression in H-17 that explains the upfield shift of C-17. Shielding of C-24 in compounds 4a and 4b may be attributed to the electronic compression exerted over H-24 pro-R by the  $\beta$ -hydroxyl group at C-22.

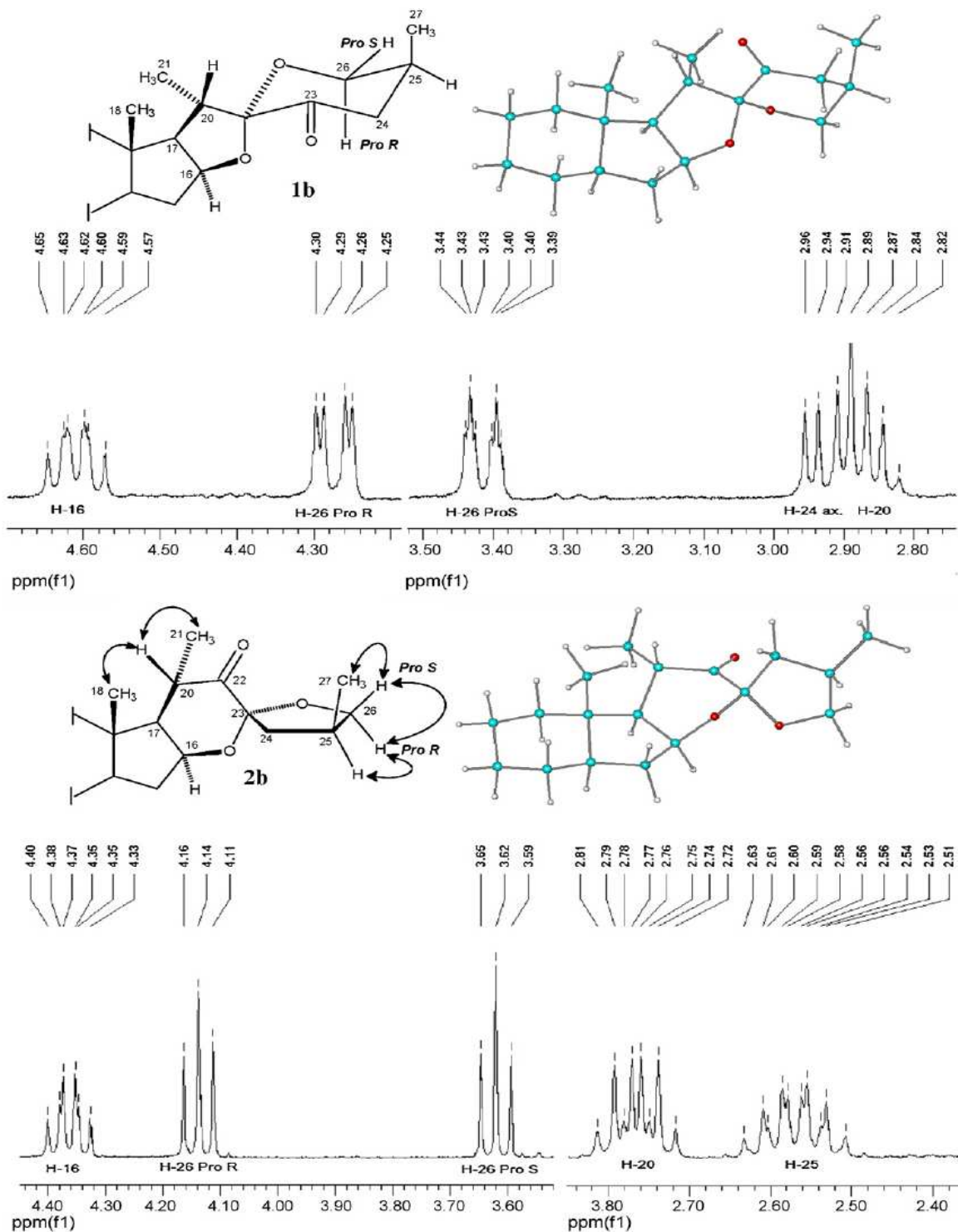


Fig. 5 – Selected  $^1\text{H}$  signals [48], NOE correlations and models [49,50] of the side chains of 25S-ketones 1b and 2b.

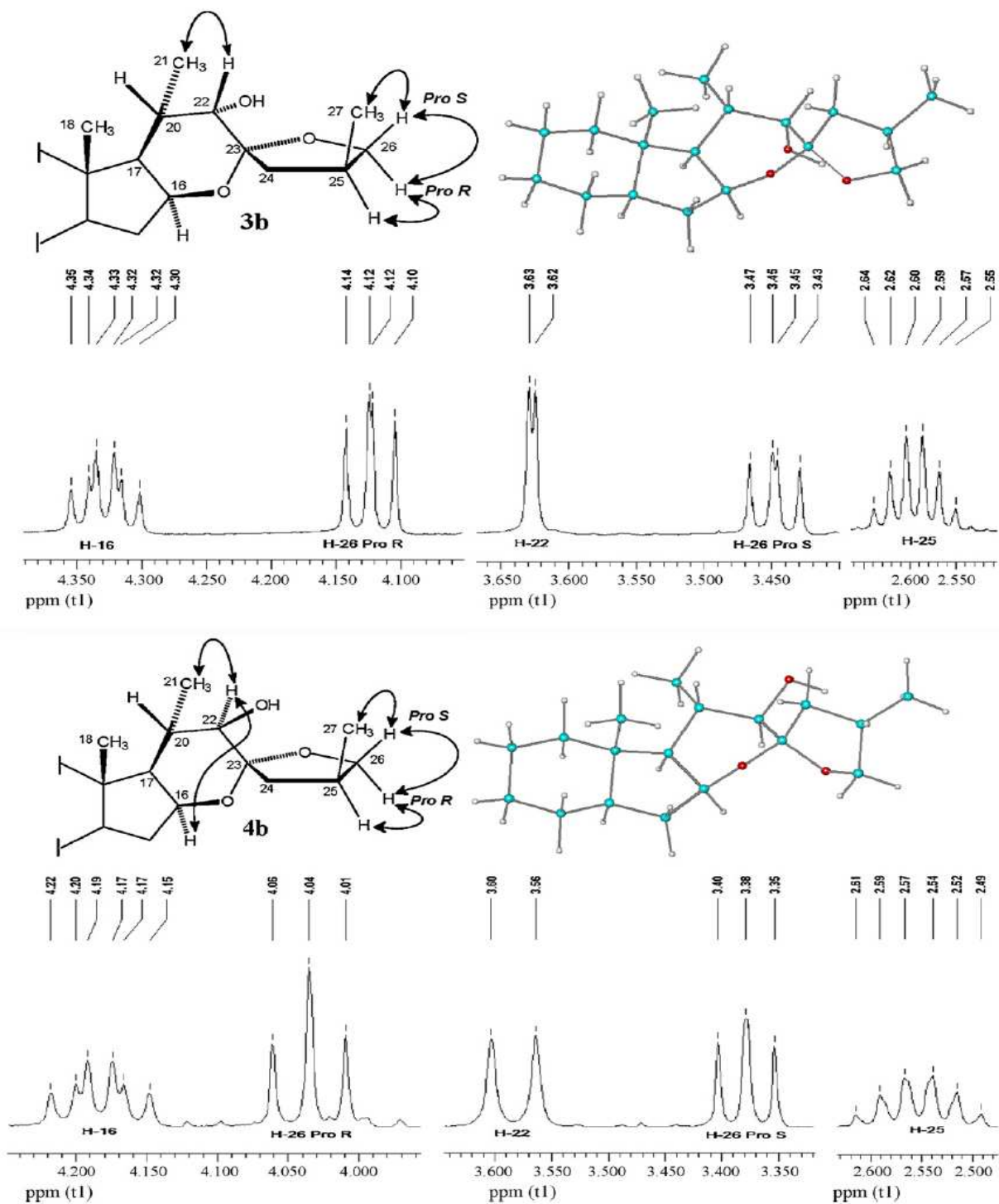


Fig. 6 – Selected <sup>1</sup>H signals [48], NOE correlations and models [49,50] of the side chains of (25S)-alcohols 3b and 4b.



**Table 3 –  $^{13}\text{C}$  chemical shifts (ppm) of 23-oxosapogenins and rearranged products**

C#	25R				25S			
	1a	2a	3a	4a	1b	2b	3b	4b
1	35.0	34.9	35.0	35.0	30.6	30.5	30.6	30.5
2	26.5	26.5	26.6	26.6	25.0	24.9	25.0	24.9
3	74.2	74.1	74.1	74.3	70.6	70.5	70.7	70.7
4	32.2	32.9	32.2	32.2	30.7	30.6	30.7	30.7
5	41.6	41.7	41.8	41.8	37.3	37.2	37.3	37.3
6	26.9	26.5	26.9	26.9	26.4	26.3	26.4	26.3
7	26.6	26.8	26.5	26.4	26.4	26.3	26.5	26.4
8	35.4	35.4	35.3	35.3	35.2	35.2	35.2	35.1
9	40.5	40.4	40.6	40.5	40.0	40.5	40.1	40.0
10	34.7	34.6	34.7	34.6	35.0	34.9	35.0	34.9
11	20.5	20.6	20.6	20.5	20.8	20.8	20.8	20.7
12	39.9	40.1	40.4	40.3	40.0	40.0	40.4	40.3
13	41.1	42.9	41.4	41.9	41.2	42.9	41.5	41.9
14	56.4	53.1	53.3	53.5	56.5	53.1	53.4	53.5
15	31.7	32.1	33.6	33.5	31.7	32.8	33.6	33.4
16	83.4	72.9	73.3	71.7	83.5	72.1	72.5	70.8
17	61.8	57.6	52.8	60.3	61.8	57.4	52.9	60.2
18	16.1	14.7	14.8	14.9	16.2	14.7	14.8	14.9
19	23.3	23.3	23.3	23.3	23.8	23.8	23.9	23.8
20	34.7	39.9	33.8	34.8	35.1	39.8	33.3	31.5
21	14.3	12.9	15.4	15.9	14.2	13.0	17.8	17.1
22	109.8	213.1	76.3	76.0	110.7	213.3	76.8	74.7
23	201.8	107.9	108.3	112.2	202.3	107.6	107.9	111.9
24	45.2	43.8	45.1	40.4	43.9	44.3	45.6	38.5
25	35.8	33.3	29.4	30.9	33.7	32.7	30.1	32.1
26	65.6	75.2	74.3	73.4	64.5	76.1	74.3	74.1
27	17.0	16.4	18.0	16.9	17.7	17.1	17.9	18.1
CH <sub>3</sub> Ac	21.4	21.4	21.5	21.4	21.5	21.5	21.5	21.5
C=O Ac	170.5	170.6	170.7	170.6	170.7	170.7	170.7	170.7

**Table 4 – Effects of different transformations on  $^{13}\text{C}$  NMR of the side chain ( $\Delta$ , ppm)**

C#	25R			25S		
	2a (22-C—O) <sup>a</sup>	3a (22 $\alpha$ -OH) <sup>b</sup>	4a (22 $\beta$ -OH) <sup>b</sup>	2b (22-C—O) <sup>a</sup>	3b (22 $\alpha$ -OH)	4b (22 $\beta$ -OH) <sup>b</sup>
16	-10.5	+0.4	-1.2	-11.4	+0.4	-1.3
17	-4.2	-4.8	+2.7	-4.4	-4.5	+2.8
18	-1.4	+0.1	+0.2	-1.5	+0.1	+0.2
20	+5.2	-6.1	-5.1	+4.7	-6.5	-8.3
21	-1.4	+2.5	+3.0	-1.2	+4.8	+4.1
22	+103.3	-136.8	-137.1	+102.6	-136.5	-138.6
23	-93.9	+0.4	+4.3	-94.7	+0.3	+4.3
24	-1.4	+1.3	-3.4	+0.4	+1.3	-5.8
25	-2.5	-3.9	-2.4	-1.0	-2.6	-0.6
26	+9.6	-0.9	-1.8	+11.6	-1.8	-2.0
27	-0.6	+1.6	+0.5	-0.6	+0.8	+1.0

<sup>a</sup> From the corresponding 23-oxosapogenin **1a** or **1b** (see Table 3).

<sup>b</sup> From the corresponding 16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxy-22-one **2a** or **2b** (see Table 3).

## 5. Conclusions

We here provide and rationalize the main NMR characteristics of steroids bearing the 16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxy moiety that constitute interesting starting materials for the synthesis of steroids containing highly functionalized side chains. Although steroid sapogenins containing the 16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxy side chains have not been isolated from natural sources, the results presented in the paper provide useful cri-

teria for the identification and analysis of similar spirocyclic compounds of either natural or synthetic origin.

## Acknowledgements

We thank Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) for financial support via project IN200105. We are indebted to Rosa I. del Villar Morales and Victor M. Arroyo Sánchez (USAI-UNAM) for registering NMR spectra. One of the

authors, M.M.A., thanks CONACyT for a scholarship. Thanks are due to Professors José M. Mendez-Stivalet and John Boulton for correction of the manuscript.

## REFERENCES

- Viñas-Bravo O, Hernández-Linares G, Mata-Esma MY, Martínez-Pascual R, Montiel-Smith S, Meza-Reyes S, et al.  $^{1}\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of synthetic steroid sapogenins. Part II. C-23 Substituted derivatives of (25S)-spirostanes. *Arkivoc* 2003;XI:163–71.
- Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, Tagliatalata-Scafati O. Sapogenins of *Allium porrum* L. *J Agric Food Chem* 1998;46:4904–8.
- Carotenuto A, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, De Feo V, Carnuccio R, et al. Porrigenin A and B, novel cytotoxic and antiproliferative sapogenins isolated from *Allium porrum*. *J Nat Prod* 1997;60:1003–7.
- Carotenuto A, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, Carnuccio R, D'Acquisto F. 12-Keto-porrigenin and the unique 2,3-seco-porrigenin, new antiproliferative sapogenins from *Allium porrum*. *Tetrahedron* 1997;53:3401–6.
- Corbiere C, Liagre B, Terro F, Beneytout JL. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell Res* 2004;14:188–96.
- Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, Bordji K, Dauca M, Netter P, et al. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 2003;22:899–905.
- Raju J, Patlolla JMR, Swamy MV, Rao CV. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1392–8.
- Liagre B, Vergne-Salle P, Corbiere C, Charissoux JL, Beneytout JL. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synovial cells with cyclooxygenase-2 overexpression. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R373–83.
- Torgov IV. Chemistry of spirostanols. Russia: Nauka; 1986.
- Lee E, Liu YT, Solomon PH, Nakanishi K. Stereospecific conversion of diosgenin to  $\alpha$ -ecdysone. *J Am Chem Soc* 1976;98:1634–5.
- Iglesias-Arteaga MA, Leliebre-Lara V, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F. Síntesis de Espirobrasinoesteroides análogos de la 6-desoxocastasterona. *Quim Nova* 1997;20:361–4.
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F. Spirostanic analogues of teasterone. Synthesis, characterization and biological activity of laxogenin, (23S)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin). *J Chem Soc Perkin Trans* 2001;1:261–6.
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F. Spirostanic analogues of castasterone. *Steroids* 2002;67:159–63.
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Leliebre-Lara V, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F. (22R,25R)-5 $\alpha$ -furostan-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,26-triol. *J Chem Res (S)* 1996:504–5.
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Leliebre-Lara V, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F. Synthesis of (22R,25R)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ , 26-trihydroxy-5 $\alpha$ -furostan-6-one. *Synth Commun* 1998;28:1779–84.
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Leliebre-Lara V, Pérez-Martínez CS, Rosado A, Coll-Manchado F. Synthesis of (22R,25R)-3 $\beta$ ,26-dihydroxy-5 $\alpha$ -furostan-6-one. *Synth Commun* 1998;28:1381–6.
- Romero-Avila M, de Dios-Bravo MG, Mendez-Stivalet JM, Rodríguez-Sotres R, Iglesias-Arteaga MA. Synthesis and biological activity of furostanic analogues of brassinosteroids bearing the 5 $\alpha$ -hydroxy-6-oxo moiety. *Steroids* 2007;72:955–9.
- Gryszkiewicz-Wojtkielewicz A, Jastrzebska I, Morzycki JW, Romanowska DB. Approaches towards the synthesis of cephalostatins, ritterazines and saponins from *Ornithogalum saundersiae*—new natural products with cytostatic activity. *Curr Org Chem* 2003;7:1257–67.
- Fieser L, Fieser M. *Steroids*. USA: Reinhold; 1959.
- Hernández R, Marrero-Tellado JJ, Prout K, Suárez E. Lewis acid-mediated isomerisation of (25R)-3 $\beta$ -acetoxy-5 $\alpha$ -spirostan-23-one, a C-22 spiroacetal: an approach to the synthesis of C-23 spiroacetal steroidal sapogenins. *J Chem Soc Chem Commun* 1992: 275–7.
- Betancor C, Dorta RL, Freire R, Martín A, Prange T, Suárez E. Stereospecific synthesis of 1,6-dioxadecalins and 2,2'-linked ditetrahydrofurans by rearrangement of steroidal spiroacetals. *J Org Chem* 1998;63:6355–62.
- LaCour TG, Tong Z, Fuchs PL. Consequences of acid catalysis in concurrent ring opening and halogenation of spiroketals. *Org Lett* 1999;1:1815–8.
- Cheng MS, Wang QL, Tian Q, Song HY, Liu YX, Li Q, et al. Total synthesis of methyl protodioscin: a potent agent with antitumor activity. *J Org Chem* 2003;68:3658–62.
- Sandoval-Ramírez J, Meza-Reyes S, del Río RE, Hernández-Linares G, Suárez-Rojas A, Rincón S, et al. Regioselective cleavage of rings E and F in sarsasapogenin. *Steroids* 2003;68:199–204.
- Meza-Reyes S, Sandoval-Ramírez J, Montiel-Smith S, Hernández-Linares G, Viñas-Bravo O, Martínez-Pascual R, et al.  $\beta$ -Alkoxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone systems in steroidal frameworks, and their conversion to 23,24-bisnorcholanolactones. *Arkivoc* 2005;VI:307–20.
- López L, Santillán R, Farfán N. New bisfuran derivative from sarsasapogenin: an X-ray and NMR analysis. *Steroids* 2006;71:12–7.
- Cyranski MK, Frelek J, Jastrzebska I, Morzycki JW. Rearrangement of 23-oxospirostanes to the 22-oxo-23-spiroketal isomers promoted by Lewis acids—X-ray crystal structure of (23R,25S)-3 $\beta$ -acetoxy-16 $\beta$ ,23:23,26-diepoxy-5 $\beta$ -cholestan-22-one. *Steroids* 2004;69:395–400.
- Iglesias-Arteaga MA, Arcos-Ramos RO, Méndez-Stivalet JM. The unexpected course of the reaction of steroid sapogenins with diacetoxyiodobenzene and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  in formic acid. *Tetrahedron Lett* 2007;48:7485–8.
- Morzycki JW, Jastrzebska I. Novel transformation of 23-bromosapogenins. Synthesis of (22S,23R)-22-hydroxy-23,26-epoxyfurostanes. *Tetrahedron Lett* 2001;42:5989–91.
- Anulewicz-Ostrowska R, Morzycki JW, Jastrzebska I, Wojcik J. An assisted solvolysis of 23-spirostanyl bromides and tosylates. A new rearrangement of spirostanes to the bisfuran systems. *J Org Chem* 2002;67:6916–24.
- Iglesias-Arteaga MA, Sandoval-Ramírez J, Mata-Esma MY, Viñas-Bravo O, Bernès S. Abnormal Beckmann rearrangement in 23-hydroxyiminodiosgenin acetate. *Tetrahedron Lett* 2004;45:4921–6.
- Jastrzebska I, Morzycki JW, Trochimowicz U. Lead tetraacetate-iodine oxidation of 23-spirostanols. *Tetrahedron Lett* 2004;45:1929–32.

- [33] Jastrzëbska I, Morzycki JW. Unusual Baeyer-Villiger oxidation of 23-oxosarsapogenin acetate. *Polish J Chem* 2005;79:1245–8.
- [34] Morzycki JW, López Y, Płoszyńska J, Santillan R, Siergiejszyk L, Sobkowiak A. *J Electroanal Chem* 2007;610:205–10.
- [35] Iglesias-Arteaga MA, Velázquez-Huerta GA, Méndez-Stivalet JM, Galano A, Álvarez-Idaboy JR. The Baeyer-Villiger reaction of 23-oxosapogenins. *Arkivoc* 2005;VI:109–26.
- [36] Iglesias-Arteaga MA, Velázquez-Huerta GA. Favorskii rearrangement of 23-oxo-3-epi-smilagenin acetate induced by iodosobenzene. *Tetrahedron Lett* 2005;46:6897–9.
- [37] Iglesias-Arteaga MA, Jastrzëbska I, Morzycki JW. Reactions of sapogenins with *m*-chloroperoxybenzoic acid catalyzed by Lewis acids. *Polish J Chem* 2006;80:667–71.
- [38] Iglesias-Arteaga MA, Alvarado-Nuño AA.  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  induced Beckmann rearrangement of 23-hydroxyiminosapogenins. A shortcut to bisnorcholanolic lactones. *Tetrahedron Lett* 2006;47:5351–3.
- [39] Iglesias-Arteaga MA, Arcos-Ramos RO. One-step axial acetoxylation at C-23. A new method for the functionalization of the side chain of steroid sapogenins. *Tetrahedron Lett* 2006;47:8029–31.
- [40] Eggert H, Djerassi C.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of sapogenins. *Tetrahedron Lett* 1975;16:3635–8.
- [41] Tori K, Seo S, Yoshihiro T, Nishikawa J. Carbon-13 NMR spectra of 5 $\beta$ -steroidal sapogenins. Reassignment of the F-ring carbon signals of (25S)-spirostans. *Tetrahedron Lett* 1981;22:2405–8.
- [42] Agrawal PK, Jain DC, Gupta RK, Thakur RS. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry* 1985;24:2479–96.
- [43] Agrawal PK, Jain DC, Pathak AK. NMR Spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins: an update. *Magn Reson Chem* 1995;33:923–53.
- [44] Agrawal PK, Bunsawansong P, Morris GA. Complete assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of steroidal sapogenins: smilagenin and sarsasapogenin. *Magn Reson Chem* 1997;35:441–6.
- [45] Agrawal PK, Morris GA, Bunsawansong D. Dependence of the  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of ring F resonances on the orientation of the 27-methyl group of spirostane-type steroidal sapogenins. *Phytochemistry* 1998;47:255–7.
- [46] Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Martínez CS, Pérez-Gil R, Coll-Manchado F.  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectra of synthetic (25R)-5 $\alpha$ -spirostanes. *J Chem Res (S)* 1999:48–9.
- [47] Agrawal PK. 25R/25S stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F. *Magn Reson Chem* 2003;41:965–8.
- [48] All NMR spectra were recorded at room temperature using a Varian Unity INOVA spectrometer operating at resonance frequencies of 400 and 100 MHz for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclei, respectively. Samples were prepared in 0.5 mm tubes by dissolving the steroid (50 mg) in  $\text{CDCl}_3$  (0.5 ml). The references employed were TMS for  $^1\text{H}$  experiments and the  $\text{CDCl}_3$  signal at 77.0 ppm for  $^{13}\text{C}$  experiments.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra were processed and displayed using the NMR processing system MestReC v. 4.9.9.6. [www.mertrelab.com](http://www.mertrelab.com).
- [49] Optimized geometries of the side chains fragment were obtained using PM3 implemented in, MOPAC 6.00, QCPE 455, 1990 Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods. I. Method. *J Comput Chem* 1989;10:209–20.
- [50] All molecular graphics displayed with HyperChem v. 5.02 for Windows 95/NT. HyperCube; 1997.