



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIPROLIFERATIVA DE COMPUESTOS HÍBRIDOS DEL PREGNANO
CON AINES EN C-21”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

Q.F.B. ALFONSINA REYES MOSSO

TUTOR: DR. EUGENE BRATOEFF[†]
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2015



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

Dr. Alfonso Romo del Vivar	Presidente
Dr. Gustavo Alberto García de la Mora	Vocal
Dra. Rosa Luisa Santillán Baca	Vocal
Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas	Vocal
Dr. Alejandro Cordero Vargas	Secretario

LUGAR DÓNDE SE LLEVÓ A CABO EL PROYECTO:

Laboratorio 125, edificio E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Unidad de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, UNAM.

ASESOR:

Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff †

SUPERVISOR:

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Alfonsina Reyes Mosso

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Química por permitir mi formación y enriquecerme de valores sustantivos para mi vida.

Al Posgrado en Ciencias Químicas por darme la oportunidad de superarme académicamente.

Al Dr. Eugene Bratoeff[†] por todo el apoyo brindado, por haber sido un ejemplo de superación constante en mi vida y por confiar sus brillantes ideas en mis manos. Siempre lo recordare, fue un honor haber sido su alumna y haber tenido la oportunidad de aprender de usted (Q.E.P.D.).

Al Dr. Rafael Castillo y a la Dra. María Alicia Hernández Campos por el apoyo tan incondicional brindado ante las circunstancias más difíciles, por sus valiosas aportaciones en mi trabajo tanto escrito como experimental. Gracias por ser las murallas que nos protegieron.

A la Dra. Elena Ramírez por el apoyo moral brindado, por su cariño, confianza y amistad. Gracias por permitirme desarrollar en este trabajo una de sus ideas.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios para mejorar la calidad del trabajo escrito.

Al personal de USAI por la realización de la espectroscopia de IR, UV y RMN.

A la M. en C. Ma. Teresa Obdulia Ramírez Apan por la realización de las pruebas biológicas.

A la Dra. Adela Rodríguez, Coordinadora del Posgrado en Ciencias Químicas y a la Q.F.B. Josefina Tenopala, auxiliar de la Coordinación de Posgrado, por el apoyo brindado para que se llevara a cabo la realización de la espectroscopia de masas que permitió concluir mi trabajo de tesis.

Al personal del IQ por la realización de los espectros de masas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me brindó durante mis estudios de posgrado (Número de Becario / CVU: 511127/288907)

A los proyectos PAIP (439002) y CONACYT (CB2011/165049) por financiar el presente proyecto.

*A mis padres, gracias por tanto amor, gracias por ser mi fuerza, gracias por todo,
espero ser la mitad de buena que ustedes cuando sea mi turno.*

A mi familia, siempre serán mi mayor motivo.

A Iván

A mis amigos de 125.

ABREVIATURAS

5α-R	5 α -reductasa
AcOEt	Acetato de etilo
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AIP	Atrofia inflamatoria proliferativa
ATF	Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
CaP	Cáncer de próstata
CMSP	Células mononucleares del sistema periférico
COX	Ciclooxigenasa
DART	Direct Analysis in Real Time
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilurea
DHT	Dihidrotestosterona
DIB	Diacetoxiyodobenceno
4-DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAB	Fast Atom Bombardment
HPB	Hiperplasia prostática benigna
INF γ	Interferón gamma
NADPH	Fostato de nicotinamida y adenina dinucleótido
NF-κB	Factor nuclear activador de células B
NIP	Neoplasia intraepitelial prostática
RA	Receptor androgénico
T	Testosterona
TMS	Tetrametilsilano
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Hormonas esteroidales	9
2.2 Próstata	11
2.3 Andrógenos y su papel en la próstata	13
2.4 Terapia hormonal para el tratamiento de HPB Y CaP	14
2.5 Inflamación	17
2.6 COX y cáncer de próstata	19
2.7 AINES y el cáncer de próstata	20
2.8 Hibridación	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos particulares	24
6. RUTA DE SÍNTESIS	25
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	26
7.1 Parte química	26
7.2 Parte biológica	36
8. CONCLUSIONES	40
9. DESARROLLO EXPERIMENTAL	41
9.1 Parte química	41
9.2 Síntesis química de intermediarios (2 - 5)	42
9.3 Síntesis química de híbridos (6a – 6e) y derivados: Benzoico y acético (6f y 6g)	50
9.4 Ensayos biológicos	66
9.4.1 Ensayo de actividad antiproliferativa en líneas celulares PC-3 y LNCaP	66
9.4.2 Evaluación de citotoxicidad en células mononucleares (sanas)	66
9.4.1 Ensayo de actividad antiinflamatoria con ATF	67
9.5 Parámetros fisicoquímicos calculados	68
10. REFERENCIAS	69
ANEXOS	72

Espectros de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxipregn-5-en-20-ona (1.1-1.4)	73
Espectro 1.1 IR	73
Espectro 1.2 RMN ¹ H.....	73
Espectro 1.3 RMN ¹³ C.....	74
Espectro 1.4 EM	74
Espectros de 16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (2.1-2.5)	75
Espectro 2.1 IR	75
Espectro 2.2 UV.....	75
Espectro 2.3 RMN ¹ H.....	76
Espectro 2.4 RMN ¹³ C.....	76
Espectro 2.5 EM	77
Espectros de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-eno-3-ona (3.1-3.5)	77
Espectro 3.1 IR	77
Espectro 3.2 UV.....	78
Espectro 3.3 RMN ¹ H.....	78
Espectro 3.4 RMN ¹³ C.....	79
Espectro 3.5 EM	79
Espectros de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-diona (4.1-4.6)	80
Espectro 4.1 IR	80
Espectro 4.2 UV.....	80
Espectro 4.3 RMN ¹ H.....	81
Espectro 4.4 RMN ¹³ C.....	81
Espectro 4.5 EM	82
Espectro 4.6 RMN intercambio con D ₂ O.....	82
Espectros de 21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (5.1-5.4)	83
Espectro 5.1 IR	83
Espectro 5.2 RMN ¹ H.....	83
Espectro 5.3 RMN ¹³ C.....	84
Espectro 5.4 EM (DART).....	84
Espectros de 21-((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoiloxi)-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (6.1-6.4)	85
Espectro 6.1 IR	85
Espectro 6.2 RMN ¹ H.....	85
Espectro 6.3 RMN ¹³ C.....	86

Espectro 6.4 EM (DART).....	86
Espectros de 21-(2-(3-benzoilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (7.1-7.2).....	87
Espectro 7.1 IR	87
Espectro 7.2 RMN ¹ H	87
Espectro 7.3 RMN ¹³ C.....	88
Espectro 7.4 EM (DART).....	88
Espectros de 21-(1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina)carboxiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (8.1-8.4).....	89
Espectro 8.1 IR	89
Espectro 8.2 RMN ¹ H.....	89
Espectro 8.3 RMN ¹³ C.....	90
Espectro 8.4EM (DART).....	90
Espectros de 21-(2-((1Z)-5-fluoro-2-metil-1-(4-(metilsulfinil)benziliden))-1H-inden-3-il)acetoxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (9.1-9.4).....	91
Espectro 9.1 IR	91
Espectro 9.2 RMN ¹ H.....	91
Espectro 9.3 RMN ¹³ C.....	92
Espectro 9.4 EM (DART).....	92
Espectros de 21-benzoilato-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (10.1-10.4).....	93
Espectro 10.1 IR	93
Espectro 10.2 RMN ¹ H.....	93
Espectro 10.3 RMN ¹³ C.....	94
Espectro 10.4 EM (DART).....	94
Espectros de 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (11.1-11.4)	95
Espectro 11.1 IR	95
Espectro 11.2 RMN ¹ H.....	95
Espectro 11.3 RMN ¹³ C.....	96
Espectro 11.4 EM (DART).....	96
Espectro 12. IR de Ácido (R,S)-2-(4-isobutilfenil) propionico (IBUPROFENO).....	97
Espectro 13. IR de Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico (NAPROXENO)	97
Espectro 14. IR de Ácido (R,S)-2-(3-benzofenil) propanoico (KETOPROFENO).....	98
Espectro 15. IR de Ácido (\pm)-1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina) carboxílico (KETOROLACO).....	98
Espectro 16. IR de Ácido 2-((1Z)-5-fluoro-2metil-(4-metilsulfinil-benziliden)-1H-inde-3-il) acético (SULINDACO)	99

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Estructura base de las hormonas esteroidales. Ciclopentanoperhidrofentreno.....	9
Figura 2. Biosíntesis de esteroide a partir del colesterol.....	11
Figura 3. Esquema representativo de la morfología y ubicación de la próstata.....	12
Figura 4. Progresión de las lesiones AIP y NIP en el desarrollo de células cancerígenas en las capas del epitelio prostático.....	13
Figura 5. Mecanismo de acción de los andrógenos en las células prostáticas.....	14
Figura 6. Ilustración simplificada de la síntesis de esteroides y los diferentes sitios de acción la terapia androgénica	15
Figura 7. Inhibidores comerciales de la enzima CYP17A.....	16
Figura 8. Inhibidores comerciales de la enzima 5 α -reductasa.....	16
Figura 9. Inhibidores comerciales del receptor de androgénico.....	17
Figura 10. Proceso inflamatorio involucrado en la progresión del cáncer.....	18
Figura 11. Acción de la inducción de COX en células inmunitarias y periféricas.....	19
Figura 12. Acción de la COX su papel en el desarrollo de la inflamación.....	20
Figura 13. Técnicas de hibridación utilizadas para generar nuevos fármacos que presente acción sobre uno o más receptores.....	21
Figura 14. Moléculas híbridas de un compuesto esteroidal y un AINE.....	22
Figura 15. Características estructurales de los híbridos derivados del núcleo 16 α ,17-epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona propuestos.....	23
Figura 16. Ácidos extraídos de tabletas comerciales (AINES).....	51

LISTA DE ESQUEMAS	Página
Esquema 1. Conversión de andrógenos por la acción de 5 α -R.....	13
Esquema 2. Ruta sintética propuesta y derivados híbridos a obtener.....	25
Esquema 3. Primer paso de la ruta sintética. Epoxidación de un doble enlace electrofílico.....	26
Esquema 4. Mecanismo de reacción de la epoxidación del doble enlace del carbonilo α,β -insaturado.....	26
Esquema 5. Segundo paso de la ruta sintética. Oxidación de alcohol en C-3.....	27
Esquema 6. Mecanismo de reacción de la oxidación de Oppenauer.....	27
Esquema 7. Tercer paso de la ruta sintética. Hidroxilación en C-21.....	28
Esquema 8. Mecanismo de reacción para la obtención de un grupo –OH en C-21.....	29
Esquema 9. Cuarto paso de la ruta sintética. Desprotección del cetral en C-20.....	30
Esquema 10. Quinto paso de la ruta sintética. Esterificación de Steaglich.....	31
Esquema 11. Mecanismo de la esterificación de Steaglich, entre el alcohol en C-21 del esteroide y el ácido correspondiente.....	31

LISTA DE GRÁFICAS	Página
Gráfica 1. Porcentaje de inhibición del edema en oreja inducido por ATF de cada compuesto....	36
Gráfica 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las células de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP y de células mononucleares (CM) de los compuestos sintetizados.....	37

LISTA DE TABLAS	Página
Tabla 1. Acción de las hormonas esteroideas.....	10
Tabla 2. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregnen-5-en-20-ona.....	43
Tabla 3. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	45
Tabla 4. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona.....	47
Tabla 5. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	49
Tabla 6. Características de los ácidos extraídos.....	51
Tabla 7. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16 α -17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	53
Tabla 8. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 21- ((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoiloxi) -16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	55
Tabla 9. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 21- (2-(3-benzoilfenil)propanoiloxi)- 16 α -17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	57
Tabla 10. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 21-(1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolisina)caroxiloxi)-16 α -17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	59
Tabla 11. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 21-(2-((1Z)-5-fluoro-2-metil-1-(4-(metilsulfinil)benziliden)) -1H-inden-3-il)acetoxi)-16 α -17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	61
Tabla 12. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 21-benzoilato-16 α -17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	63
Tabla 13. Propiedades espectroscópicas y espectométricas de 21-acetoxi-16 α -17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.....	65
Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos de las moléculas.....	68

1. RESUMEN

Debido a la relación que existe entre la inflamación y el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, ha sido relevante el estudio de la interrupción del proceso inflamatorio, para prevenir o disminuir el efecto proliferativo de las células cancerígenas. Se sabe también que los corticoides y sus derivados son moduladores inmunológicos y por lo tanto también ejercen un efecto antiinflamatorio en los tejidos afectados.

Es por ello que en este trabajo se sintetizaron cinco moléculas híbridas del pregnano, con un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) comercial en C-21, siendo estos el ibuprofeno, el naproxeno, el ketoprofeno, el ketorolaco y el sulindaco.

Estas moléculas fueron evaluadas en líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y LNCaP) a 50µM. El método empleado para la evaluación antiproliferativa de los compuestos, fue determinado a través del método de sulforrodamida. Por otro lado se evaluó la toxicidad de las moléculas obtenidas en células sanas (células mononucleadas).

También, se evaluó la actividad antiinflamatoria de los híbridos mediante el modelo de edema inducido en oreja de ratón por el método de ATF (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol).

Los resultados mostraron que las moléculas híbridas presentaron actividad antiinflamatoria y que el núcleo esteroideo sin el AINE unido, fue activo en tanto existiera un grupo hidroxilo en C-21.

Para la actividad antiproliferativa sobre células cancerosas, tanto dependientes de andrógenos (LNCaP), como independientes de ellos (PC-3), la mayor actividad la tuvieron el híbrido de ibuprofeno y el alcohol libre del esteroide en

C-21. De forma general los híbridos presentaron un efecto antiproliferativo mayor al 50 %, esto fue más evidente en las líneas de cáncer PC-3.

También, se observó que en células sanas ninguno de los compuestos presentó un efecto citotóxico. Esto implicó que es posible que se haya encontrado una molécula líder (21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona), cuya capacidad de inhibición proliferativa es alta y su toxicidad es nula, siendo estas características importantes para proponer estudios que diluciden su mecanismo de acción, o permitan la síntesis de nuevos derivados esteroideos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hormonas esteroidales

Las hormonas esteroidales son moléculas que están clasificadas como lípidos insaponificables, ya que no experimentan hidrólisis a diferencia de las grasas, aceites y ceras. Tienen una estructura tetracíclica base denominada ciclopentanoperhidrofenantreno, formada por 4 anillos que se designan como A B C y D, comenzando con el anillo inferior izquierdo; los átomos de carbono de la estructura, se numeran a partir del anillo A y terminando por los dos grupos metilo (**Figura 1**).¹ Estas hormonas poseen grupos funcionales como carbonilo e hidroxilo, por lo que las moléculas tienen partes hidrofílicas e hidrofóbicas (carácter anfipático).

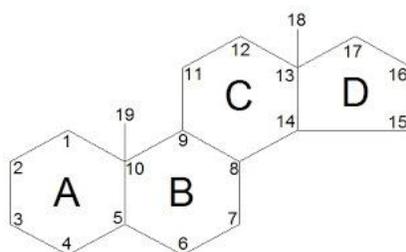


Figura 1. Estructura base de las hormonas esteroidales. Ciclopentanoperhidrofenantreno

Debido a la naturaleza de las hormonas esteroidales, estas no se encuentran disueltas en la sangre, así que son acarreadas por un transportador proteico específico y son transportadas desde su sitio de liberación, hasta el tejido donde ejercen su acción (tejido blanco). La distribución de sus receptores es amplia en el organismo, presentando receptores de membrana, para realizar su función de segundos mensajeros y receptores nucleares, que al unirse permiten la síntesis de proteínas con funciones específica.²

Las hormonas esteroidales son sintetizadas a partir del colesterol y por la acción catalítica de enzimas como hidroxilasas, desmolasa, deshidrogenasas e isomerasas, cambian su estructura, esto les confiere diferentes funciones biológicas. Esto ocurre dentro de las células, ya sea en mitocondria o el retículo endoplasmático (**Figura 2**).

De acuerdo a la estructura y función de las hormonas esteroidales estas se dividen en: Hormonas adrenocorticales, que son sintetizadas en las glándulas suprarrenales y en hormonas sexuales, que son sintetizadas en ovarios y testículos principalmente. En la siguiente tabla se muestran las generalidades de estas hormonas.

CLASE	HORMONAS	TEJIDO DIANA PRIMARIO	EFFECTOS PRINCIPALES
Progestágenos (Hs) Moléculas de 21 carbonos	Progesterona Pregnenolona	Útero Receptores neuronales ³	Mantenimiento del embarazo a través de efectos proliferativos en endometrio y pared uterina
Andrógenos (Hs) Moléculas de 19 carbonos	Testosterona 5 α -dihidrotestosterona	Órganos masculinos sexuales primarios y secundarios. Tejido muscular.	Espermatogénesis, características masculinas secundarias, maduración ósea y virilización.
Estrógenos (Hs) Moléculas de 18 carbonos	Estradiol Estrona	Órganos femeninos sexuales primarios y secundarios.	Ovulación, mantenimiento del ciclo menstrual y feminización.
Mineralocorticoides (Ha) Moléculas de 21 carbonos	Aldosterona 11-desoxicortecosterona	Túbulos renales	Mantenimiento de homeostasis entre sodio y potasio
Glucocorticoides (Ha) Moléculas de 21 carbonos	Cortisol Corticosterona	Músculo e Hígado Células inmunológicas	Catabolismo protéico y gluconeogenesis, bloqueo de respuestas inmunológicas e inflamatorias

Tabla 1. Acción de las hormonas esteroides (Tomado de: DEVLIN THOMAS, M. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas, 4^a Ed, Editorial REVERTÉ: España, 2004, pag. 962-965.) **Hs: Hormona sexual, Ha: Hormona adrenocortical.**

En el caso de las hormonas sexuales, se puede observar que su principal función es el desarrollo y mantenimiento de órganos sexuales para permitir la reproducción, sin embargo, se ha estudiado que el desajuste en el metabolismo de estas hormonas, genera diversas enfermedades que comprometen al sistema inmunológico y pueden desencadenar enfermedades graves como el cáncer. Esto ocurre principalmente, en aquellos tipos de cáncer que involucran glándulas y tejidos que poseen un nivel alto de renovación celular y que son dependientes de las hormonas sexuales para desempeñar funciones fisiológicas, tal es el caso del cáncer de mama, de útero y de próstata.

Cuando las hormonas esteroidales se aislaron por primera vez, se creía que ninguna hormona sintética podría rivalizar con la gran potencia de los esteroides naturales. Sin embargo, en los últimos veinte años se han obtenido una gran variedad de esteroides sintéticos, que han presentado mayor potencia (cientos o miles de veces más) que los esteroides naturales. Esto ha generado un campo amplio en el estudio del mecanismo de acción de las hormonas, que permitan conocer los efectos en el organismo y así permitir el tratamiento de enfermedades donde intervienen de forma importante

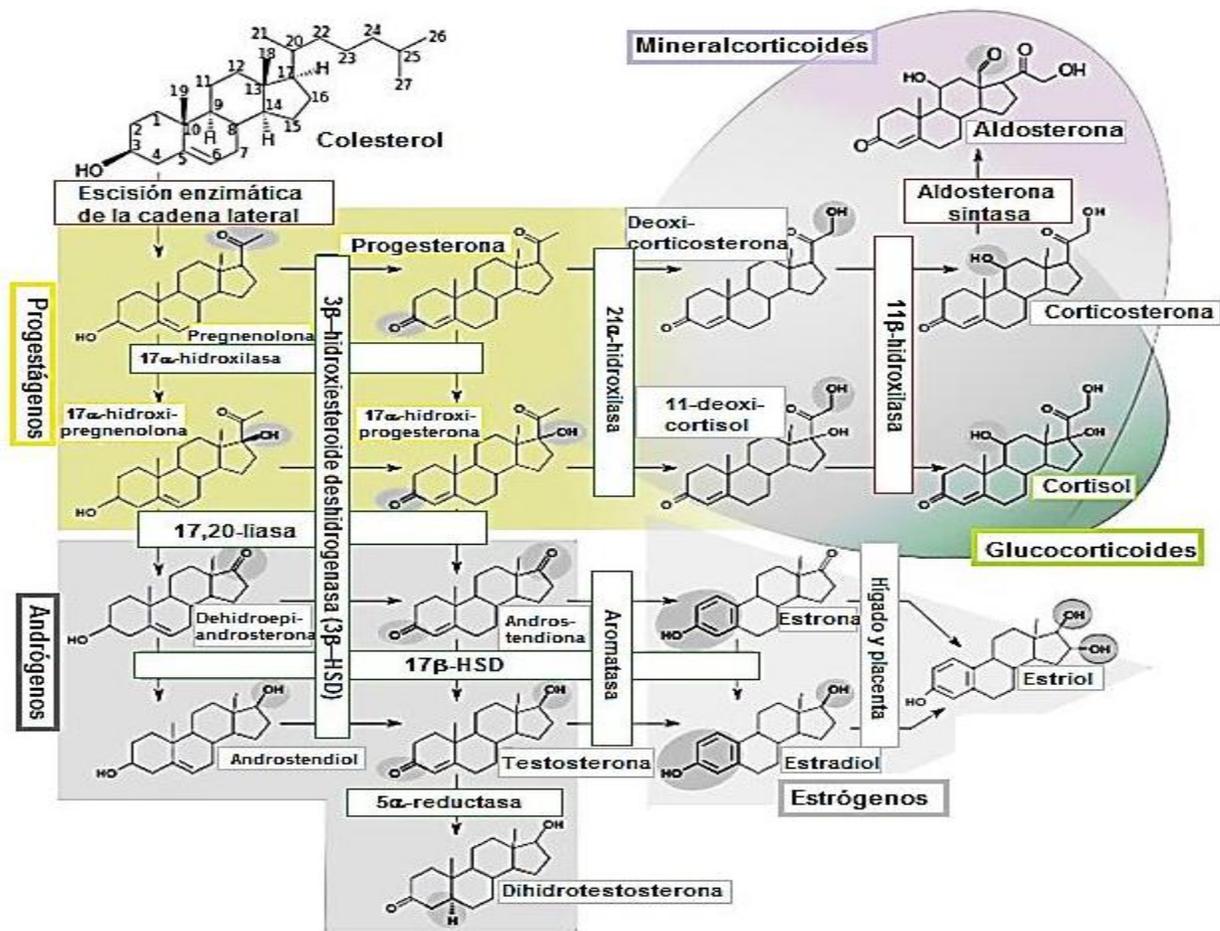


Figura 2. Biosíntesis de esteroides a partir de colesterol. Adaptado y traducido de: Boron, W; Boulpaep, E. Medicinal physiology: A celular and molecular approach, 2ª Ed, Editorial Saunders Elsevier: USA. 2009; 1,300.

2.2 Próstata

La próstata es una glándula que tiene el tamaño de una nuez y forma parte de los órganos de reproducción masculinos, se encuentra por debajo de la vejiga, y rodea la primera porción de la uretra (**Figura 3**). Su principal función es enriquecer el semen con secreciones que contienen varios componentes químicos, el más relevante de estos es el antígeno específico prostático (PSA). La función primordial del PSA es licuar el semen, facilitando la motilidad de los espermatozoides para fertilizar el óvulo.

Normalmente la próstata se desarrolla durante la adolescencia, su crecimiento y función se encuentra bajo el control de andrógenos tales como la testosterona (T) y su producto reducido dihidrotestosterona (DHT).⁴

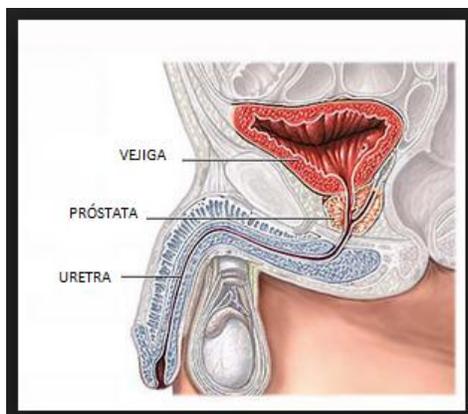


Figura 3. Esquema representativo de la morfología y ubicación de la próstata.⁵

Los desórdenes más comunes, referidos a la próstata en los hombres mayores, son la hiperplasia prostática benigna (HBP) y el cáncer de próstata (CaP).

La HBP es descrita como un crecimiento benigno, causado por el incremento en la proliferación de células estromales (células que forman el tejido de sostén que rodea a la próstata y principalmente alrededor de la uretra) y afecta al 50% de los hombres de entre 50 y 60 años. El desarrollo de esta afección tisular toma varios años hasta la aparición de los síntomas, estos están ligados principalmente a problemas durante la micción como: disuria, nocturia, urgencia miccional y sensación de falta de vaciamiento de la vejiga; si no se trata a tiempo, genera disfunciones en la vejiga y complicaciones renales.⁶ En México el 61% de la población reporta sintomatología prostática, a partir de los 55 años.⁷

El CaP es una afección que suele ser asintomática a diferencia de la HBP. Su desarrollo está estrechamente relacionado con la edad, su inicio y progresión están influenciados por la interacción de múltiples factores ambientales, fisiológicos, moleculares y hereditarios. Entre los factores ambientales involucrados, uno de los más estudiados es el desarrollo de inflamación crónica en la próstata debido a un daño o lesión en las células epiteliales (células que forman parte del revestimiento interno del tejido prostático).

La progresión de células sanas a células cancerosas en la próstata aun no ha sido completamente elucidada, pero hay dos tipos de lesiones relevantes que se generan en las células epiteliales y están relacionadas con el desarrollo de CaP.

La primera es la atrofia inflamatoria proliferativa (AIP), que es un proceso celular que se caracteriza por la infiltración de macrófagos en el ambiente prostático, contribuyendo con ello, al proceso inflamatorio crónico. La segunda es la neoplasia intraepitelial prostática (NIP), que es una lesión cuya característica es la alteración del genoma y crecimiento descontrolado de las células; posteriormente esta neoplasia se transforma en una lesión cancerosa, que si no es tratada a tiempo, podría derivar en metástasis ⁸ (**Figura 4**). En México el CaP es el tipo de cáncer más común en hombres mientras que a nivel mundial es la segunda causa de muerte.⁹

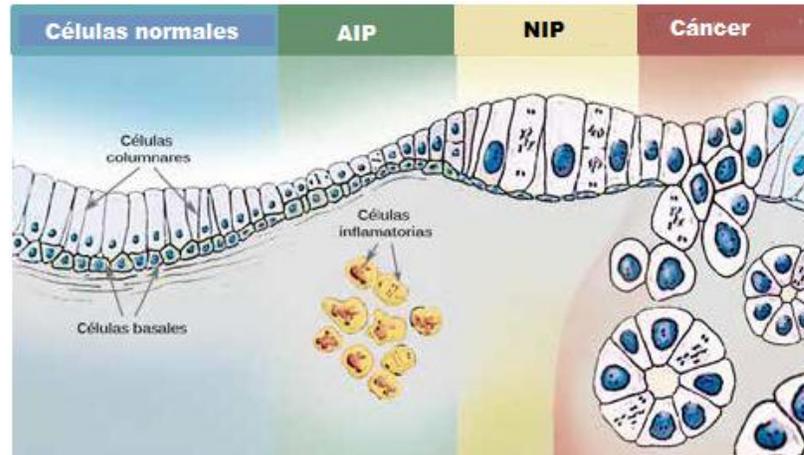


Figura 4. Progresión de las lesiones AIP y NIP para el desarrollo de células cancerígenas en las capas del epitelio prostático.

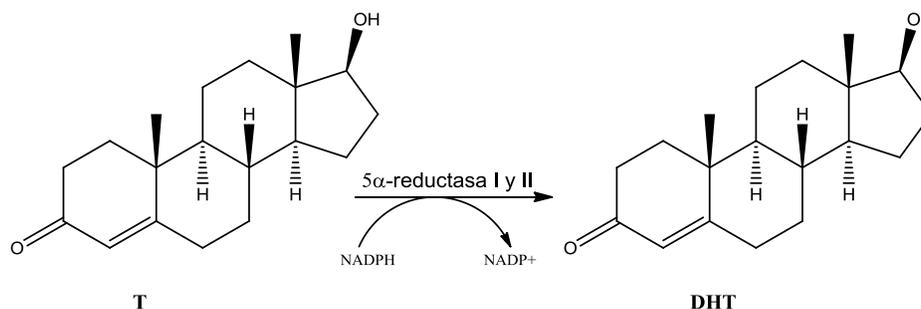
Adaptado de: Benedetti, I.; Reyes, N. Proliferative inflammatory atrophy: Potential precursor lesion for prostatic adenocarcinoma. *Rev. Cienc. Biomed.* **2014**, 5, 91.

2.3 Andrógenos y su papel en la próstata

Como se describió anteriormente, la función y desarrollo de la próstata es dependiente de los andrógenos, ya que las células epiteliales y estromales del tejido prostático, expresan el receptor androgénico (RA).

La testosterona (T) es producida principalmente en las células de Leydig, localizadas en los testículos y en menor cantidad por las glándulas adrenales. La T es transportada hacia la próstata donde se difunde sobre la membrana celular hacia el citoplasma, se une al RA, se trasloca al núcleo y activa genes de transcripción. Por otro lado la dihidrotestosterona (DHT) es el andrógeno más importante en la próstata, ya que tiene una afinidad 10 veces mayor por el RA, debido a que se disocia de manera más lenta del receptor e induce una conformación más resistente a la degradación que la T.¹⁰

La enzima 5 α -reductasa (5 α -R) que se expresa en el tejido prostático, reduce de manera irreversible la T a DHT. El mecanismo involucra la donación directa de un hidruro del NADPH a la posición 5 α de la T; es por ello que existe una concentración mayor de DHT dentro de las células prostáticas (**Esquema 1**).



Esquema 1. Conversión de andrógenos por la acción de la enzima 5 α -R.

En una célula de tejido prostático sano, una parte de la T se convierte a DHT y ambas se unen al RA, que se encuentra en el citoplasma como monómero y está inactivo debido a su unión con proteínas chaperonas que impiden su actividad transcripcional, pero que al mismo tiempo, inducen una conformación de alta afinidad para el ligando. Cuando la DHT o T se unen al RA, este promueve un cambio conformacional que genera la disociación de las proteínas chaperonas y el RA es fosforilado (sólo así se transloca al núcleo). Una vez en el núcleo, el complejo RA-andrógeno se dimeriza y se une a secuencias específicas del DNA, conocidas como elementos de respuesta a andrógenos, para llevar a cabo la transcripción y activación de genes, para la posterior síntesis de proteínas; que dan lugar a señalizaciones de proliferación celular y de apoptosis (**Figura 5**).¹¹

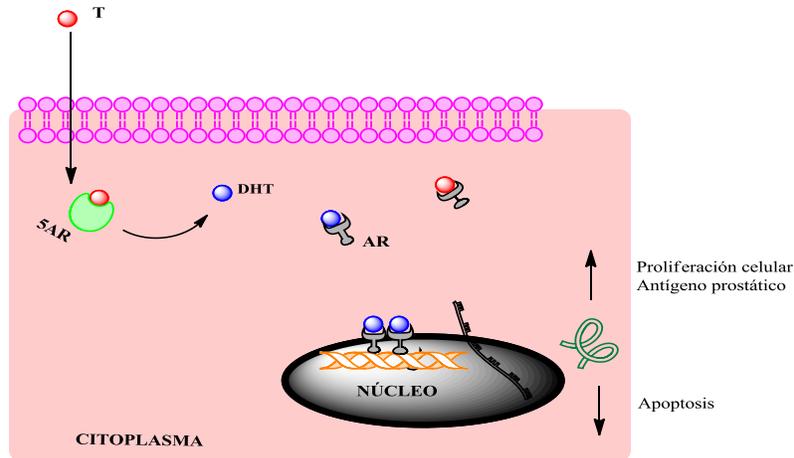


Figura 5. Mecanismo de acción de los andrógenos en las células prostáticas. Adaptado de: Rittmaster, Roger S. 5α-reductase inhibitors in benign prostatic hiperplasia and prostate cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, 22, 390.

En los padecimientos como HPB y CaP, se ha observado que las células prostáticas generan una sobreexpresión de la enzima 5α-R, lo que promueve un aumento de DHT y un aumento del número de RA en células estromales; todo esto genera un incremento en la proliferación celular y desencadena diversos efectos celulares que implican daño en la homeostasis génica.¹²

2.4 Terapia hormonal para el tratamiento de HPB Y CaP

Ha sido descrito que la HPB responde al tratamiento hormonal y sólo en casos avanzados es necesaria la cirugía, por lo que los pronósticos suelen ser buenos. Sin embargo, el CaP es un padecimiento más agresivo; por tanto, la cirugía representa el tratamiento de primera línea, pero los pacientes son renuentes, ya que existen efectos secundarios que modifican de manera general el estilo de vida tales como incontinencia urinaria, impotencia sexual y baja de líbido entre otros. Algunos tipos de tratamientos que pueden o no acompañar a la cirugía son la crioterapia, la radioterapia y la quimioterapia.

La terapia de supresión androgénica se utiliza en los primeros estadios del CaP, debido a que en esta etapa la enfermedad es andrógeno-dependiente, y por lo tanto, es sensible a la supresión de andrógenos; también se emplea cuando la enfermedad se encuentra diseminada, o bien, como complemento de alguno de los tratamientos locales.

Debido a esto, se han desarrollado diversas moléculas sintéticas a partir de compuestos esteroidales y no esteroidales, que detienen el mecanismo de acción de T y DHT, ya sea por medio de la inhibición de las enzimas involucradas en su biosíntesis o por la acción directa en el RA.¹² (Figura 6)

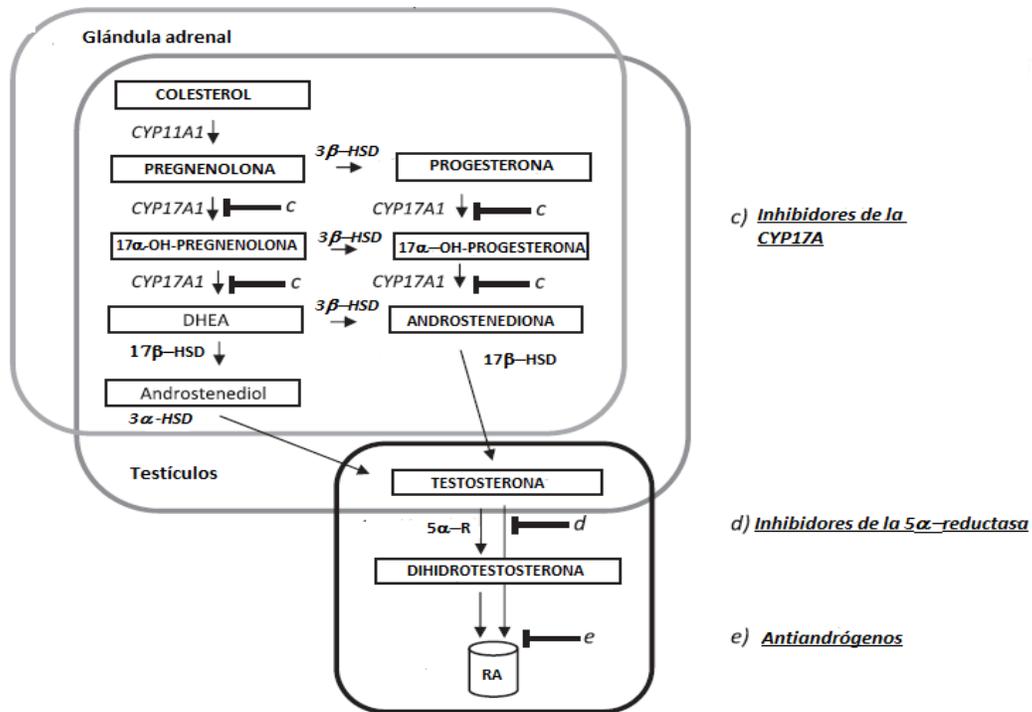


Figura 6. Ilustración simplificada de la síntesis de esteroides y los diferentes sitios de acción la terapia de supresión androgénica. CYP11A1: Colesterol 20-22 desmolasa; CYP17A: 17α-hidroxilasa/12,20-liasa; 17β-HSD: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5α-R 5α-reductasa; RA: Receptor androgénico. Traducido de: Welen, K.; Damber J.E. Prostate diseases- role of sex steroids and their inhibitors. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011, 24, 359.

2.4.1 Inhibidores de la Cyp17A

La enzima Cyp17A es una monooxigenasa que se ubica en el retículo endoplasmático de la glándula adrenal, testículos y ovarios. Su actividad de liasa en la posición 17 y 20 del esteroide, permite la biosíntesis de andrógenos a partir de 17α-hidroxipregnenolona y de 17α-hidroxiprogesterona, en donde rompe el grupo acetilo en el anillo D para convertir los derivados hidroxilados a deshidroepiandrosterona y androstenediona, que posteriormente se convierten en testosterona.¹³ Los inhibidores comerciales más empleados son: la abiraterona y el TOK-001, que son esteroides sintéticos que contienen un heterociclo nitrogenado en la posición C-17. Por otro lado, el ketoconazol, un inhibidor no esterooidal usado comúnmente como antimicótico (Figura 7).¹⁴

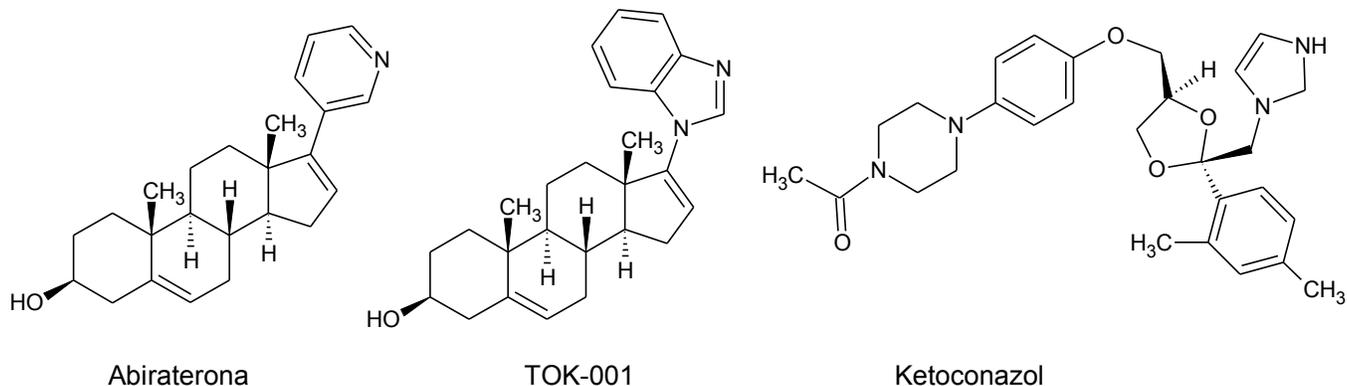


Figura 7. Inhibidores comerciales de la enzima CYP17A.

2.4.2 Inhibidores de la 5 α -reductasa

La 5 α -reductasa o 3-oxo-esteroide-4-eno deshidrogenasa es una enzima hidrofóbica que tiene 2 isoformas, la tipo 1 que se encuentra en la piel, el hígado y la próstata y cuyo pH óptimo de acción es básico. La isoforma tipo 2 que se expresa en próstata, epidídimo y otros tejidos reproductivos, su pH de actividad es ácido. El mecanismo de acción de la enzima involucra la donación directa de un hidruro de NADPH a la posición 5 α de la testosterona, lo que permite la formación de un enolato en C-3 que es estabilizado por interacciones de residuos electrofílicos de la enzima, permitiendo una polarización de la molécula favoreciendo la donación del hidruro de NADPH hacia C-5 para la formación de DTH y la liberación de NADP⁺.

Los inhibidores comerciales más utilizados son los azaesteroides como la finasterida que inhibe selectivamente a la isoforma 2 de 5 α -R y la dutasterida que inhibe a ambas isoformas la 1 y 2 de la esta enzima (Figura 8).¹⁵

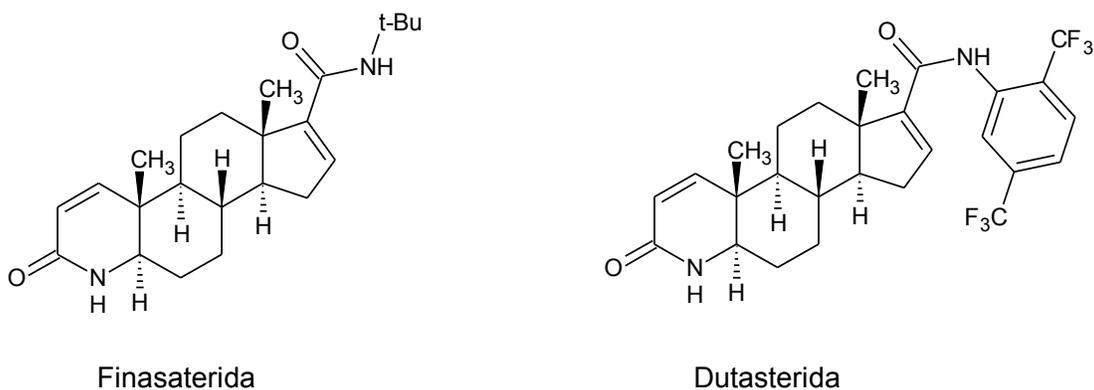


Figura 8. Inhibidores comerciales de la enzima 5 α -reductasa.

2.4.3 Antagonistas del receptor de andrógenos

Los inhibidores de este receptor se unen de manera competitiva y con gran afinidad, irrumpiendo el mecanismo de los andrógenos en el núcleo. Los antagonistas no esteroideos más empleados son la flutamida y la enzalutamida, y el compuesto esterooidal sintético más utilizado es el acetato de ciproterona (**Figura 9**).¹⁶

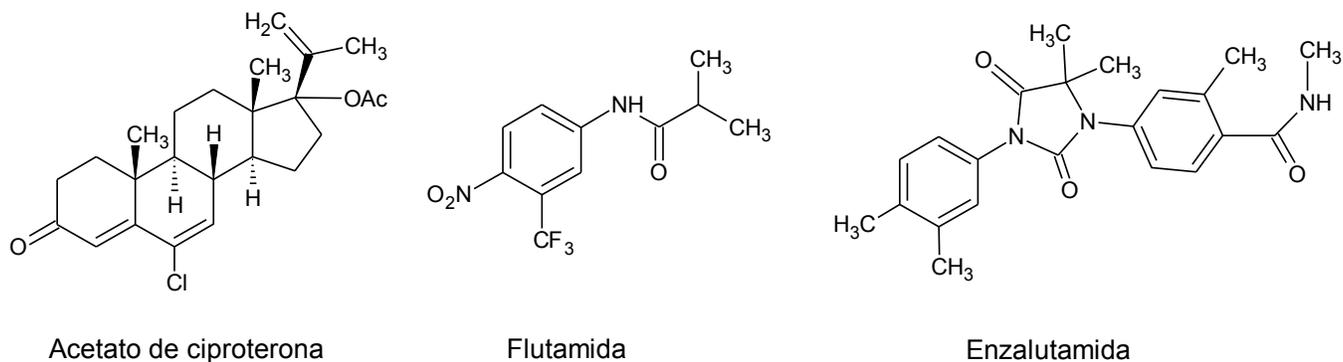


Figura 9. Inhibidores comerciales del receptor androgénico.

Se ha descrito que el RA juega un papel importante no sólo en el desarrollo del CaP dependiente de andrógenos, sino también, en aquel que es independiente de andrógenos. Una de las causas a la que se le atribuye lo anterior es por la pérdida de sensibilidad del RA hacia los andrógenos, debido a algún tipo de mutación.¹⁷

2.5 Inflamación

El proceso inflamatorio es una respuesta fisiológica a diversos estímulos, tales como infecciones o lesión tisular. En general, la reacción inflamatoria aguda tiene un inicio rápido y dura poco, suele acompañarse de una respuesta generalizada, que se conoce como reacción de fase aguda y tiene como característica la alteración de varias proteínas plasmáticas. En algunas patologías que involucran la activación inmunológica persistente, se puede generar inflamación crónica, que a menudo tiene consecuencias más graves.

La acumulación de macrófagos constituye la piedra angular de la inflamación crónica, debido a que pueden producir fibrosis o granulomas (porciones de tejido que comienza a cambiar su morfología por el acumulación de colágeno y fibroblastos). Las dos citocinas que secretan los macrófagos y que se encuentran sobreexpresadas en la inflamación crónica son INF- γ (glucoproteína de interferón) y TNF- α (factor de necrosis tumoral). La primera genera la liberación de moléculas activas de oxígeno y nitrógeno que dañan a los tejidos circundantes y pueden promover mutación en las cadenas de ADN; la segunda produce una degeneración celular general como necrosis, apoptosis o acumulación de grasas en el citoplasma, así como un cambio en la proliferación celular y angiogénesis.¹⁸

Los corticosteroides son empleados en el tratamiento de la inflamación crónica y aguda, ya que generan la disminución de las respuestas inmunológicas, por la inducción en el aumento del inhibidor de transcripción de NF- κ B, que es un factor que promueve la acción de citocinas. También reducen la capacidad fagocítica y secretora de los macrófagos y además bloquean la acción de la fosfolipasa.¹⁹

2.5.1 Inflamación y cáncer de próstata

La patología descrita como AIP, es el trastorno clave que relaciona la inflamación y el cáncer de próstata. Los mediadores de la inflamación crónica en las células prostáticas, contribuyen a la tumorigénesis y metástasis, ya que la infiltración de las células del sistema inmunológico tales como macrófagos, linfocitos y fibroblastos, preceden a la aparición de mediadores oncogénicos en las células epiteliales como la lesión descrita como NIP. La compleja relación que existe entre el microambiente celular, debido a la activación de diversas vías señalizadoras por los elevados niveles de citocinas y los factores de crecimiento, con el incremento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producen daño en el ADN y por consiguiente, la proliferación e invasión de células malignas (Figura 10).²⁰

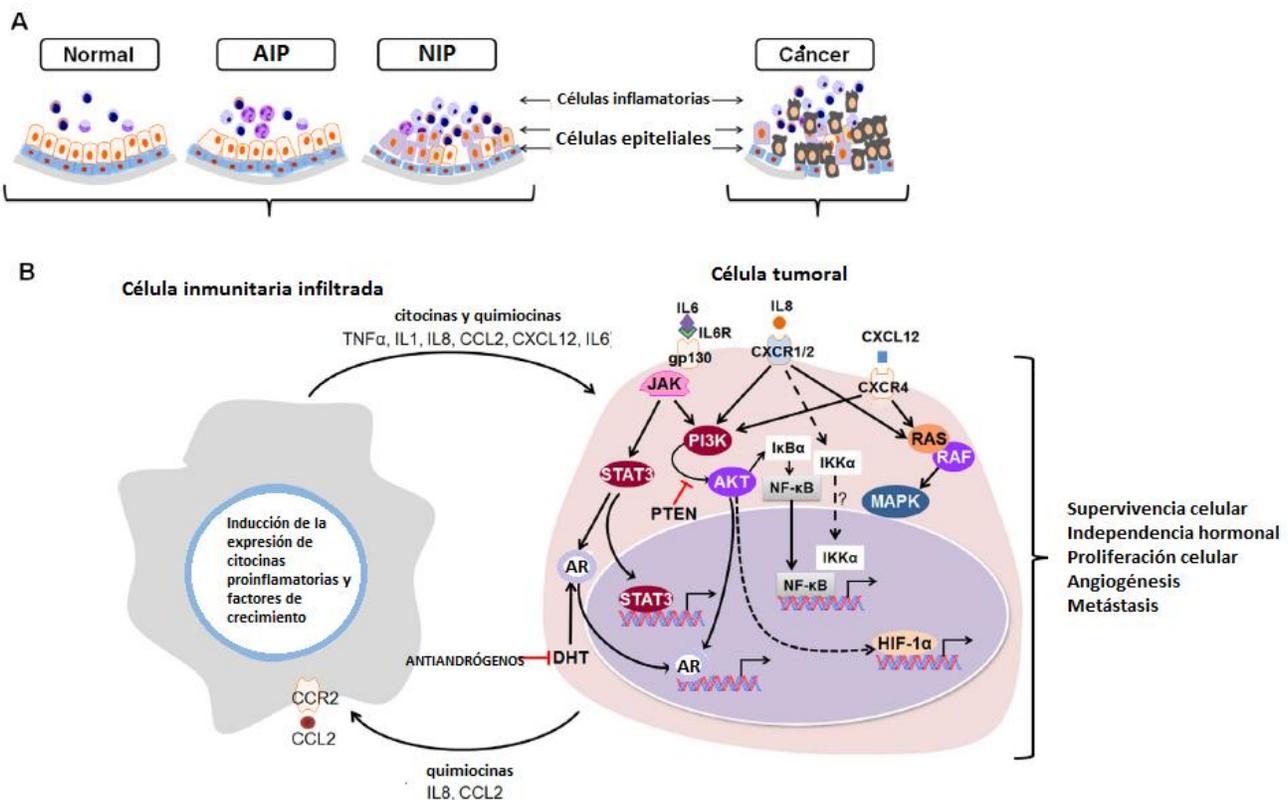


Figura 10. Proceso inflamatorio involucrado en la progresión del cáncer: (A) Ilustración sistemática que muestra las lesiones prostáticas que son consideradas como precursoras del CaP. (B) Mediadores proinflamatorios que inducen tumorigénesis, a través de vías de señalización de citocinas y quimiocinas, por la infiltración de células inmunitarias en el microambiente de la próstata. Cabe enfatizar que en respuesta a la supresión androgénica, las citocinas también pueden desencadenar la activación del RA mediante factores de transcripción específicos que promueven inflamación, angiogénesis y metástasis. Adaptado y traducido de: Thapa, D.; Gosh, R. Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *94*, 56.

Se ha informado que el receptor de glucocorticoides está implicado en la progresión de CaP hormono-independiente. Estudios publicados, demostraron que el uso de dexametasona (glucocorticoide) en este tipo de cáncer, inhibió la angiogénesis a través de la regulación vascular endotelial y mediante diversos señalizadores celulares como p27 y NF- κ B principalmente; además se produjo una disminución en la proliferación celular. La evaluación de este estudio, sugirió que existe una sobreexpresión del receptor de glucocorticoides como una compensación celular ante las mutaciones del RA que generan la resistencia androgénica.²¹

2.6 COX y cáncer de próstata

La enzima ciclooxigenasa (COX) es una enzima que cataliza la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos, los cuales generan un aumento en la permeabilidad celular, así como la quimiotaxia de neutrófilos y macrófagos en la reacción inflamatoria sobre las células epiteliales y endoteliales, promoviendo así, la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis. Se ha informado que en células cancerígenas o en aquellas expuestas a inflamación crónica esta enzima se encuentra sobreexpresada.²²

Existen 3 isoformas conocidas de esta enzima, la isoforma 1 que se encuentra de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos; la isoforma 2 que se encuentra sujeta a la inducción de citocinas y se encuentra expresada en macrófagos, células epiteliales y endoteliales; ambas isoformas se encuentran involucradas en el proceso inflamatorio, proliferación celular, regulación de promotores tumorales y factores de crecimiento (**Figura 11**). La isoforma 3 se encuentra expresada en neuronas y se le atribuye el efecto antipirético de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES).²³

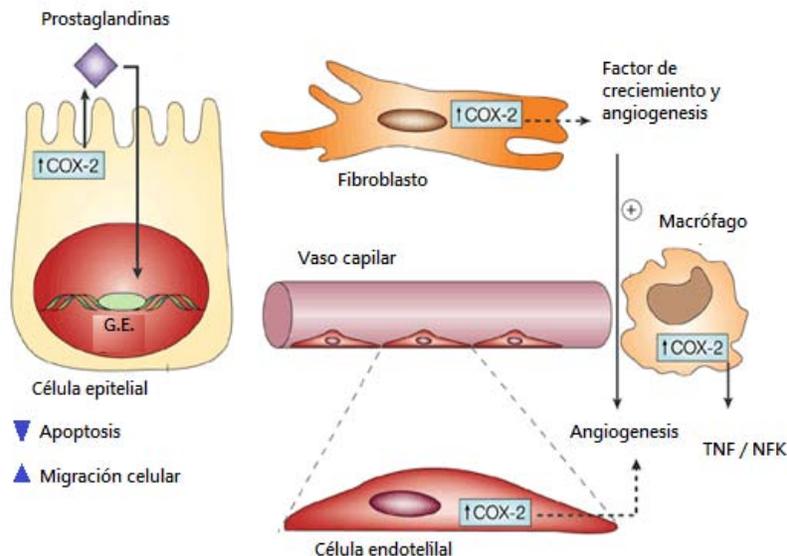


Figura 11. Acción de la inducción de COX en células inmunitarias y periféricas.

Traducido de: Gupta, R.A.; DuBois R.N. Colorectal cancer prevention and inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer*, 2001, 1, 16.

2.7 AINES y el cáncer de próstata

Los AINES, son moléculas que inhiben la acción de la ciclooxigenasa, por unirse al sitio activo e inhibir de forma competitiva, reversible o no reversible, impidiendo así que se lleve a cabo la respuesta inflamatoria, al disminuir la liberación de los factores descritos anteriormente (**Figura 12**).

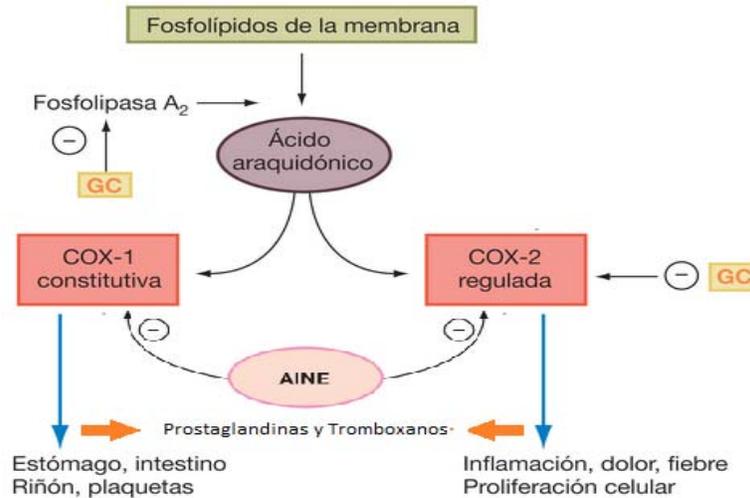


Figura 12. Acción de la ciclooxigenasa y su papel en el desarrollo de inflamación GC: glucocorticoide.
Adaptado de: Kindt, T.; Goldsby, R.; Osborne, B. Inmunología de Kuby, 6ª ed. Editorial Mc Graw Hill: México, 2007, 345.

Por otro lado, se sabe que existen otros mecanismos por los que los AINES participan en el proceso inflamatorio y que son independientes de la inhibición de ciclooxigenasa; aunque no han sido elucidados completamente, se conoce que su actividad está relacionada con la intervención en los mecanismos y proteínas del ciclo celular, principalmente de la vía apoptótica.

Para el cáncer de próstata, se han estudiado blancos importantes que pueden estar altamente relacionados con el desarrollo de la patología como son las proteínas Bcl-Bax, NF- κ B y NAG-1. La Bcl-Bax pertenece a una familia de proteínas que están implicadas en el mecanismo de apoptosis; las fallas en la cascada de señalización de esta proteína, generan una resistencia intrínseca a los factores mediadores de la apoptosis, resultando en un aumento de la proliferación celular. Se ha descrito que los AINES pueden interactuar para evitar el cambio en las funciones de Bcl-Bax. Para NF- κ B; se sabe que algunos AINES bloquean la fosforilación de su inhibidor. Para la NAG-1 que es una citocina que esta sobreexpresada en algunos tipos de cáncer como colon, próstata y ovario, está relacionada con la producción de moléculas de adhesión intracelular, lo que facilita el reclutamiento de células en la reacción inflamatoria crónica; los AINES interrumpen la función de esta citocina.²⁴

En el desarrollo de las células neoplásicas en CaP, la supresión de la actividad catalítica de COX-2 es un blanco potencial para prevenir el progreso de AIP a NIP mostrado que los AINES pueden tener un efecto tanto preventivo como coadyuvante en el tratamiento de éste cáncer.²⁵

2.8 Hibridación

La Hibridación molecular es un método de modificación estructural para obtener múltiples ligandos o porciones farmacofóricas, obteniendo una mayor ventaja farmacocinética que la administración concomitante de los fármacos por separado.

Un compuesto híbrido, ofrece diversas ventajas, como su capacidad para activar diferentes receptores, aumentando así la eficacia terapéutica por la acción sinérgica, debido a la actividad biológica intrínseca de sus componentes, también permite cambiar el perfil de biodisponibilidad después de ejercer sus efectos y además disminuyen toxicidad.

El proceso de hibridación está estrechamente relacionado con la estrategia de obtención de un profármaco mixto, con la diferencia que su actividad no depende de la activación "in vivo" de sus componentes.

Los compuestos híbridos, se pueden sintetizar mediante la vinculación directa de los fármacos, mediante la unión de las unidades farmacofóricas o con agentes separadores (linker) de estas unidades (**Figura 13**).²⁶

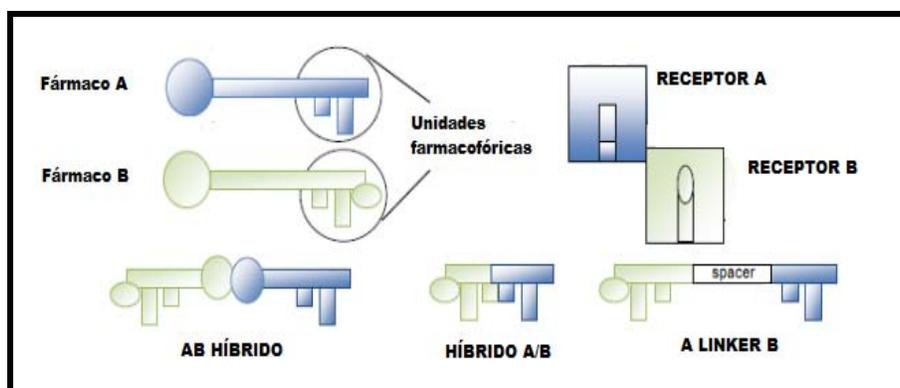


Figura 13. Técnicas de hibridación utilizadas para generar nuevos fármacos que presenten acción sobre uno o más receptores.
Traducido de: Longhin, P.; Ferreira, T.; Oliviera, E.; Dos Santos, J.; Chin, M. Anti-inflammatory drug design using a molecular hybridiation approach. *Pharm. Chem. J.* **2011**, *4*, 1453.

Las técnicas de hibridación en esteroides han sido principalmente empleadas para desarrollar nuevos antiinflamatorios, con el fin de obtener compuestos con mayor potencia. Por otro lado, se han sintetizado compuestos híbridos de AINES con el fin de disminuir el daño a la mucosa gastrointestinal, que es un efecto secundario común en estos fármacos (**Figura 14**).

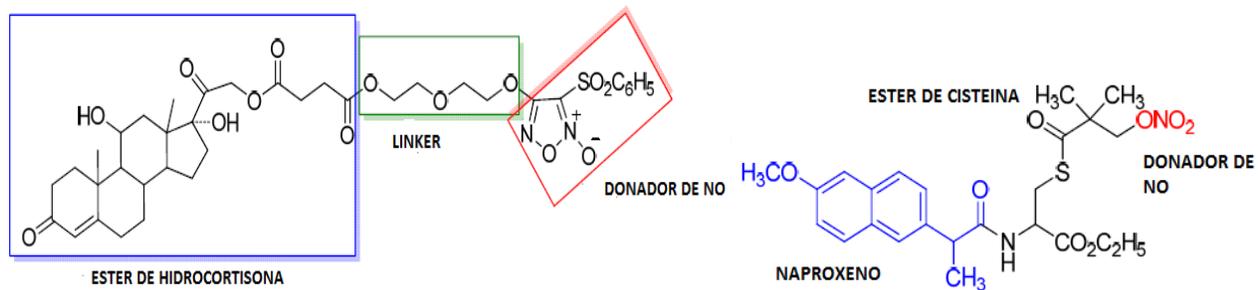


Figura 14. Moléculas híbridas de un compuesto esteroidal y un AINE.

Traducido de: Longhin, P.; Ferreira, T.; Oliviera, E.; Dos Santos, J.; Chin, M. Anti-inflammatory drug design desing using a molecular hybridiation approach. *Pharm. Chem. J.* 2011, 4, 1450-1474.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el CaP y la HPB representan un problema de salud importante a nivel nacional y mundial, la terapia hormonal ha tenido un auge importante para el tratamiento de estos padecimientos, debido a la estrecha relación con el desajuste en el metabolismo normal de las hormonas androgénicas.

En proyectos anteriores, se ha descrito que los núcleos de pregnano, progesterona y la desoxicortecosterona (moléculas de 21 carbonos), tienen un efecto contrario a los andrógenos ya sea por un efecto antagonista en el RA o por inhibición de la síntesis de DHT, ya que pueden competir con el sitio activo de la enzima 5α -R a través del carbonilo α,β insaturado en C-3.²⁷

En un trabajo se publicó, que las modificaciones estructurales y electrónicas en hormonas sintéticas y que favorecen la actividad antiandrogénica, son aquellas que implican la introducción de grupos voluminosos en el C-1, así como también la existencia de grupos que produzcan una baja densidad en C-5, como carbonilos α,β -insaturados, a fin de que puedan permitir una adición tipo Michael, que asemejen a los sustratos naturales tanto de 5α -R como la inhibición del RA.²⁸ También se han realizado estudios que indican que las células de próstata que muestran la patología descrita como AIP y las células de CaP, presentan una sobreexpresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), que promueve procesos proliferativos e inflamatorios y que se encuentran estrechamente relacionado con el incremento y rápida diseminación de las células cancerígenas, por lo que su inhibición mediante el empleo de AINES ha mostrado un efecto tanto preventivo como auxiliar en el desarrollo y proliferación celular.²⁹

Conociendo estos antecedentes, el diseño de moléculas que ayuden en el tratamiento de CaP y HPB mediante cambios estructurales de los núcleos esteroidales e hibridación de moléculas activas conocidas, pueden conducir a un aumento de actividad biológica, así como la disminución de efectos secundarios. Por ello, en el presente trabajo se muestra la síntesis de un núcleo de pregnano modificado, que contiene un grupo α,β -insaturados en C-3, un hidroxilo en C-21 y que por medio de un éster contiene en su estructura AINES conocidos y de alta comercialización, como son ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, sulindaco y ketorolaco generando así cinco estructuras híbridas (**Figura 12**).

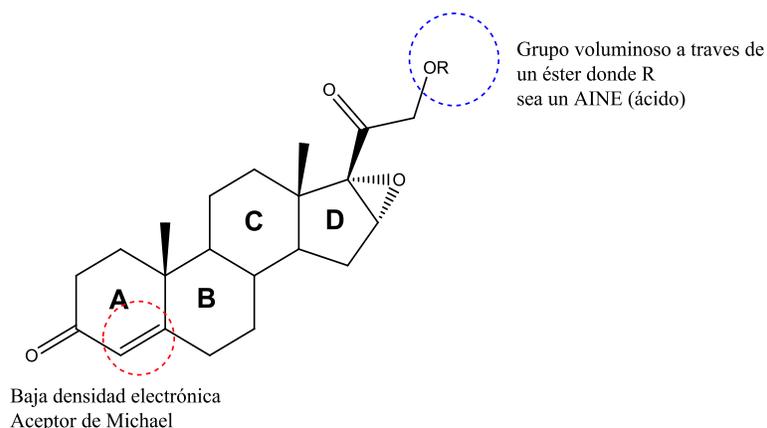


Figura 15. Características estructurales de los híbridos derivados del núcleo 16α -, 17 -epoxi- 21 -hidroxipregn- 4 -eno- $3,20$ -diona propuestos.

4. HIPÓTESIS

Si la proliferación de células cancerígenas en la próstata depende tanto de la actividad androgénica como del desarrollo de un proceso inflamatorio crónico en la glándula prostática y que esta mediado por la sobreexpresión de COX, entonces la síntesis de moléculas híbridas formada por un fragmento esteroidal con características antiandrogénicas y un AINE en C-21 del esteroide, podrían presentar actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares de cáncer de próstata dependiente e independiente de andrógenos LNCaP y PC-3.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Sintetizar y evaluar la actividad antiproliferativa de compuestos híbridos del pregnano con diferentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) en C-21.

5.2 Objetivos particulares

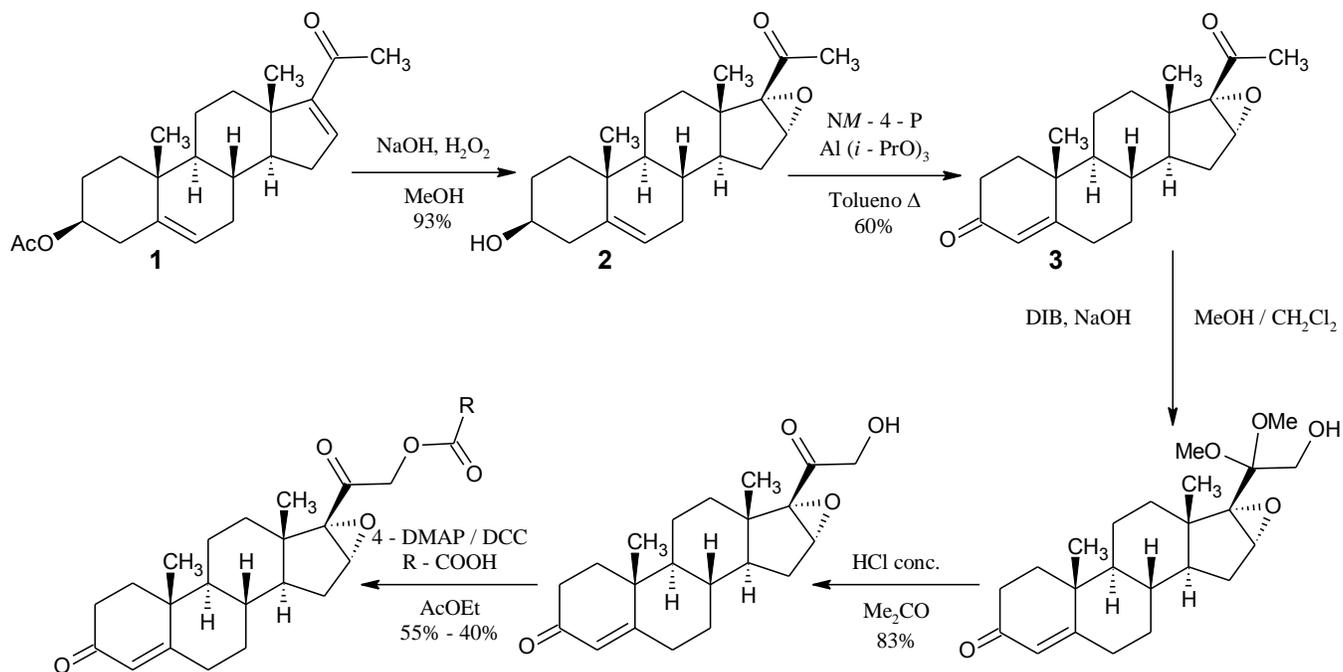
Sintetizar y caracterizar los compuestos intermediarios y los compuestos híbridos del pregnano con ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ketorolaco y sulindaco en C-21 a través de un éster.

Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos obtenidos en líneas celulares de cáncer de próstata PC3 (independiente de andrógenos) y LNCaP (dependiente de andrógenos).

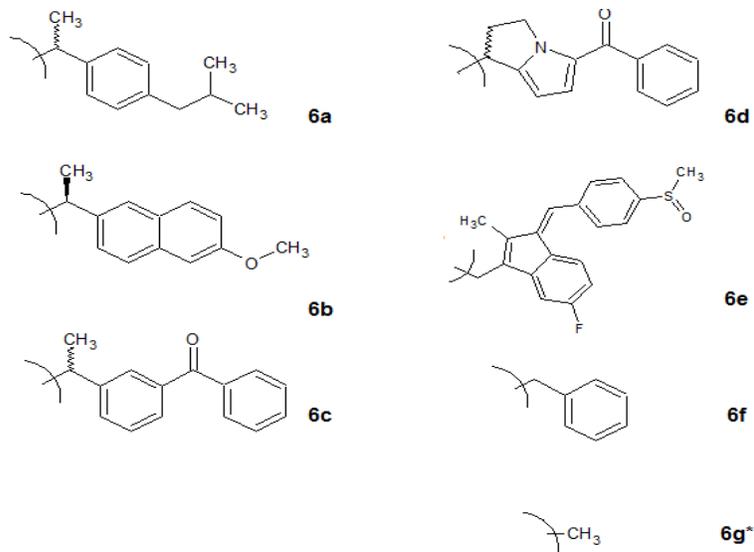
Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos obtenidos en células mononucleares, como modelo de células sanas.

Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los compuestos obtenidos mediante la prueba de inducción del edema auricular por esteres de forbol en ratón.

6. RUTA DE SÍNTESIS



R=



Esquema 2. Ruta sintética propuesta y derivados híbridos a obtener.

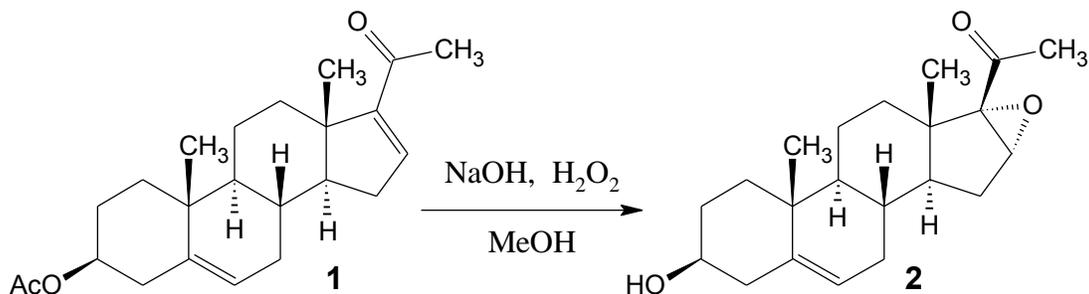
El compuesto acetilado ($6g^*$) será obtenido a través del anhídrido acético.

4-DMAP = 4-dimetilaminopiridina; DCC = diclohexilcarbodiimida; DIB = diacetoxiyodobenceno; NM-4-P = N-metil-4-piperidona.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

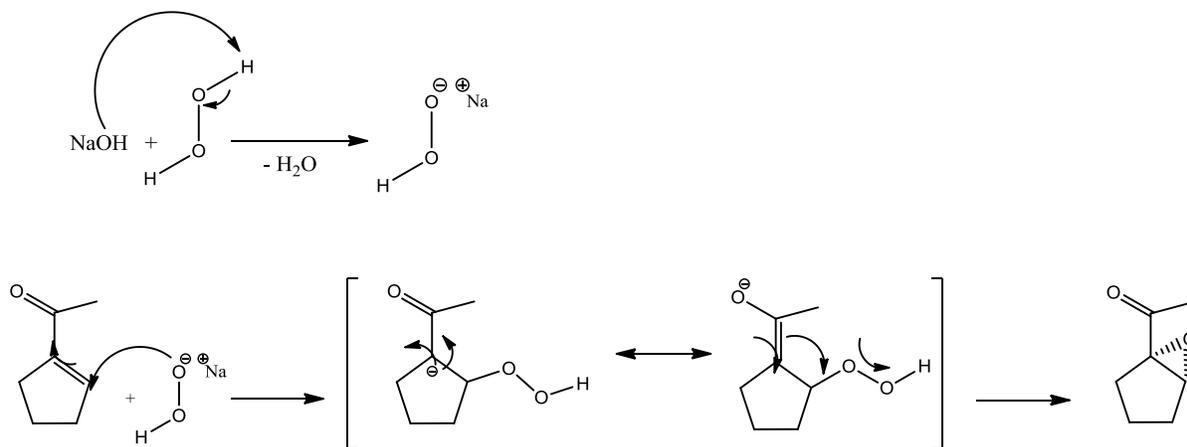
7.1 Parte química

El núcleo de pregnano utilizado presenta señales características en los espectros; en IR las bandas de estiramiento C-H de metilos y metilenos se encuentran entre $2969 - 2863 \text{ cm}^{-1}$, la señal de cetona en C-20 producida por la vibración entre el enlace C-O se encuentra en 1690 cm^{-1} , y para el enlace producido por la vibración C-C entre el carbono de carbonilo en C-20 con el carbono α a este se observa una señal aguda en 1365 cm^{-1} . Para RMN ^1H los protones vinílicos se encuentran alrededor de 5.7 ppm y los protones de metilos C-19 y C-18 se observan a campo alto en 1.03 y 1.01 ppm, aproximadamente. Por otro lado, para RMN ^{13}C el carbono del carbonilo en C-20 está aparece en campo bajo en 204 ppm, estas señales fueron observadas a lo largo del análisis de los productos obtenidos, de la ruta sintética



Esquema 3. Primer paso de la ruta sintética. Epoxidación de un doble enlace.

Como se observa en el **Esquema 3** se realizó como primer paso la epoxidación quimioselectiva de un doble enlace con baja densidad electrónica, el carbonilo α,β -insaturado del esteroide en C-16 y C-17.



Esquema 4. Mecanismo de reacción de la epoxidación del doble enlace del carbonilo α,β insaturado.

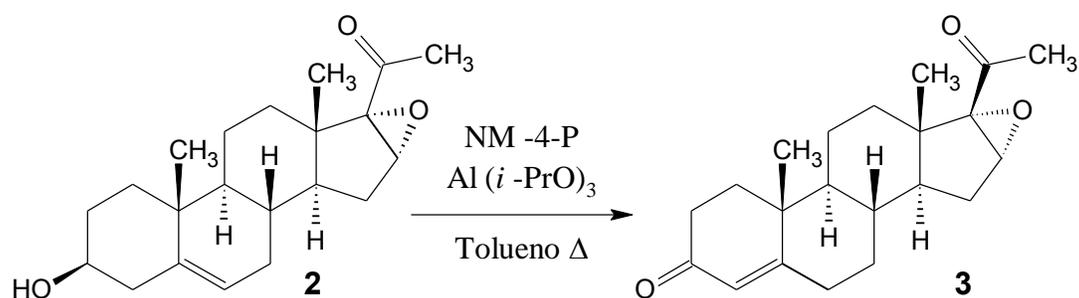
El mecanismo de reacción implicó un ataque nucleofílico por parte del anión del hidropéroxido, que tiene como intermediario la formación de un enolato de peróxido y la liberación de un hidróxilo (**Esquema 4**). Debido al impedimento estérico, generado por el metilo en el anillo D, el ataque se da

por la cara α , dando una reacción estereoselectiva que se estableció por el método de difracción de rayos X sin el esteroisómero β .³⁰ También, debido a que la reacción se llevó a cabo en un medio básico se hidrolizó el grupo acetilo en C-3, generando un alcohol en esta posición.

Para el producto **2** se observó en IR una banda aguda en 3343 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del O-H y otra en 1243 cm^{-1} que corresponde al epóxido, por el estiramiento de C-O-C.

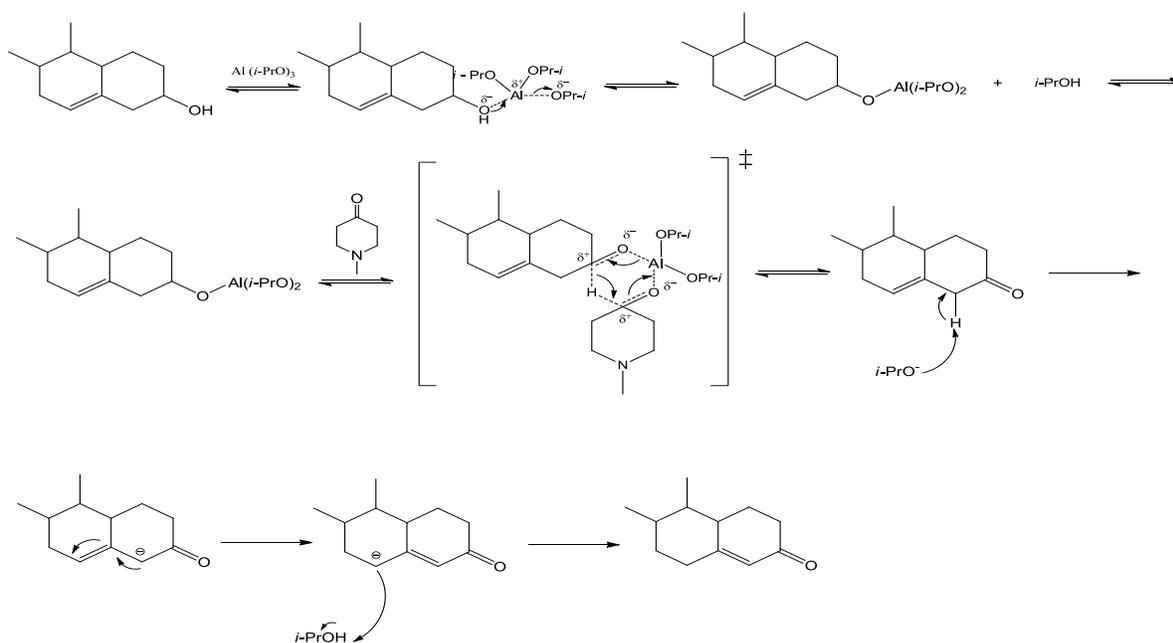
La espectroscopía en RMN ^1H presentó una señal correspondiente al protón base del -OH de C-3 en 3.49 ppm (m, 11.5 Hz, 1H), en 3.66 ppm (s, 1H) del protón en C-16 como un singulete ancho, en 5.32 ppm (d, $J= 5.1\text{ Hz}$, 1H) del protón vinílico correspondiente a C-6. Por otro lado en RMN ^{13}C los carbonos en C-16 y C-17, así como C-3 que tienen oxígeno (C-O) se observaron en 60, 71 y 71.5 respectivamente.

El siguiente paso en la ruta fue la reacción de Oppenauer que consistió en la oxidación de un alcohol secundario a una cetona α,β insaturada (**Esquema 5**).



Esquema 5. Segundo paso de la ruta sintética. Oxidación de alcohol en C-3.

Esta reacción oxida tanto a alcoholes primarios, como secundarios y es reversible por lo que un exceso de la cetona es necesario en la mezcla de reacción; además de que necesita ser llevada a cabo en un medio anhidro para evitar la desactivación del $\text{Al}(i\text{-PrO})_3$.

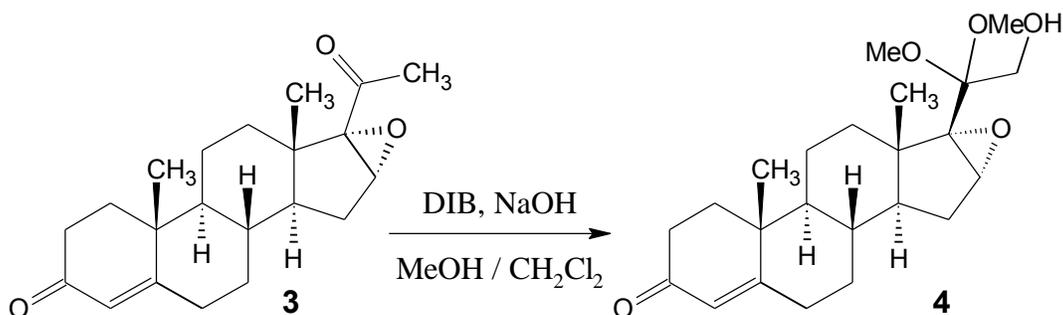


Esquema 6. Mecanismo de reacción de la oxidación de Oppenauer.

La reacción consiste principalmente en la formación de un complejo entre la cetona (NM-4-P), el alcohol del esteroide en C-3 y el ión metálico (aluminio). El alcohol se une como si fuese un alcóxido, mientras que la cetona se coordina con el aluminio y promueve la transferencia de hidruro, esta transferencia ocurre a través de un estado de transición con la formación de un anillo de 6 miembros; posteriormente, se produce una alcoholólisis, teniendo así la oxidación del alcohol en cetona en el C-3.³¹ Para la formación del carbonilo α,β -insaturado, el mecanismo propuesto implica que al encontrarse una base fuerte en el medio (isopropóxido), este desprotona al hidrógeno ácido α al carbonilo, cuya base conjugada está estabilizada por los sistemas π adyacentes, el movimiento de electrones permite la formación de un anión en el C-6 del esteroide, que toma nuevamente el hidrógeno del isopropanol formado en el medio (**Esquema 6**).³²

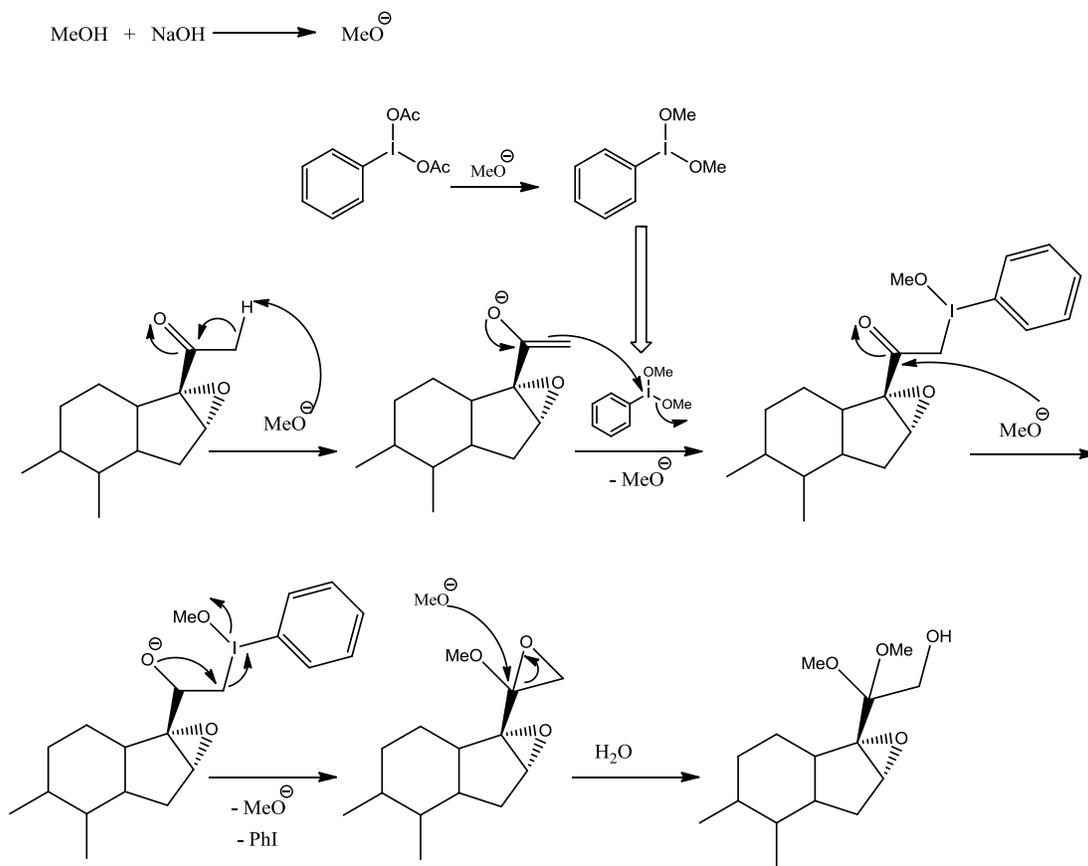
Para el producto formado **3**, en el espectro de IR se observó la presencia de la banda del carbonilo α,β -insaturado en 1658 cm^{-1} , así como una absorbancia máxima de UV a 239.7 nm . Para RMN ^1H se encontró a 5.7 ppm (s, 1H) el H-4 que correspondía a la insaturación; se mantuvo la señal del protón del epóxido en C-16 a 3.68 ppm (s, 1H) y también se observó la ausencia de la señal del protón en C-3. En RMN ^{13}C la señal de C-3 de carbonilo se encontró a campo bajo en 199 ppm , así como la señal de C-4 en 124 ppm que correspondía al enlace doble.

Siguiendo con la ruta, la siguiente reacción consistió en una oxidación en C-21 en medio básico y metanol, lo que también llevó a la formación del acetal en C-20 (**Esquema 7**).



Esquema 7. Tercer paso de la ruta sintética. Hidroxilación de C-21

La oxidación empleando compuestos con yodo hipervalente (DIB) en medio básico es un método eficiente para formar α -hidroxidimetilacetales³³ (**Esquema 8**).

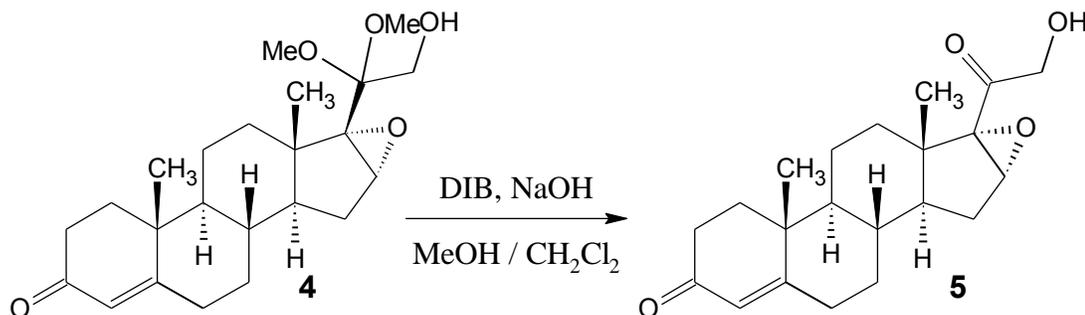


Esquema 8. Mecanismo de reacción para la obtención de un grupo OH en C-21.

El mecanismo de reacción depende totalmente de la formación en exceso del metóxido en el medio básico, ya que esta especie interviene en varios pasos del mecanismo de reacción; primeramente, el metóxido desprotona al carbono α de la cetona en C-20 formando un enol, que posteriormente lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el compuesto de yodo hipervolente metoxilado; por lo tanto, el carbonilo de la cetona en C-20 queda altamente electropositivo tanto por el epóxido en C-16 y C-17, como por el efecto del grupo yodado, esto facilita un ataque nucleofílico del metóxido a la cetona en C-20 y permite que el oxígeno con carga negativa producido por la adición del metóxido en C-20, ataque al C-21 para tener como grupo saliente al yodobenceno (PhI), permitiendo con esto que se formara un epóxido entre C-20 y C-21 que se rompe tras el ataque de otro metóxido, dando lugar finalmente a la formación del acetal en C-20 y quedando oxidado el C-21.

Para el producto **4** formado se observó en el espectro de IR una banda aguda en 3429 cm^{-1} y otra en 1084 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H y C-O de alcohol en C-21 y no se observó la banda característica de la cetona, lo que indicó que el grupo carbonilo en C-20 si se protegió por un acetal. La absorbancia máxima de UV de 240 nm siguió presente, implicando que la cetona α - β insaturada en C-3 no se alteró. Para RMN ^1H , se observaron en 3.67 ppm (dd $J= 5.9, 9\text{ Hz}$, 2H) los protones Ha y Hb del metileno en C-21, así como señales en 3.30 (s, H) y 3.26 (s, H) de los protones de metoxilos en C-20. En RMN ^{13}C el carbono de C-20 se desplazó a campo bajo en 103 ppm mientras el carbonilo de C-3 permaneció en 199.8 ppm .

Para la desprotección del cetal se realizó en una reacción en condiciones ácidas (gotas de HCl en acetona) para así tener al precursor con el alcohol libre **5** (Esquema 9).

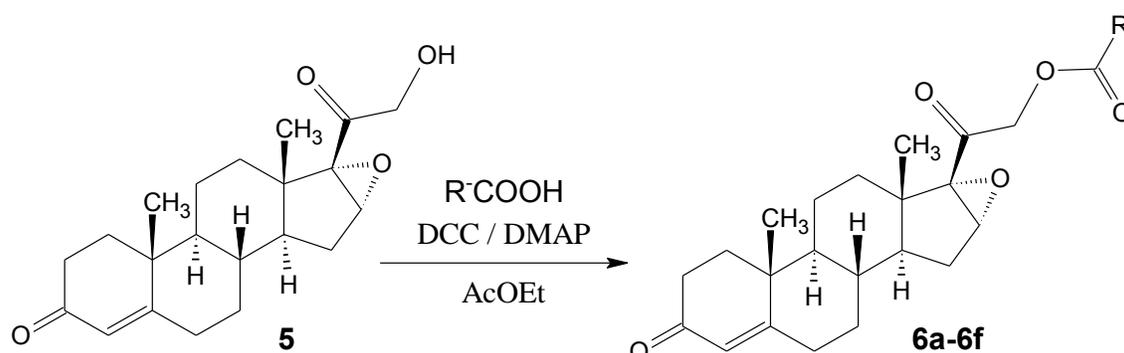


Esquema 9. Cuarto paso de la ruta sintética. Desprotección de cetal en C-20.

Para el compuesto **5** en IR se observó la banda aguda correspondiente al estiramiento O-H del alcohol libre en C-21 en 3457 cm^{-1} . La absorbancia máxima de UV a 240 nm siguió presente, implicando que la cetona α,β -insaturada en C-3 no se alteró. En RMN ^1H se observaron señales en 4.34 ppm (dd $J= 19.7, 4\text{ Hz}$, 1H) y 4.04 ppm (dd $J= 19.7, 5.3\text{ Hz}$, 1H) correspondientes a los protones Ha y Hb del metileno en C-21, lo que sugirió un acoplamiento geminal de protones que se encuentran en ambientes distintos (protones diastereotópicos), también se comprobó la presencia del protón correspondiente alcohol en C-21, que se observó en 2.94 ppm (t, 1H); para corroborar esto, se realizó un espectro con intercambio de agua deuterada y los protones en C-21 se mantuvieron como dos doble de dobles mientras que el protón del alcohol ya no se detectó; sin embargo, se observó la señal que correspondía al agua en 4.7 ppm lo que implicó que si se llevó a cabo el intercambio con agua deuterada con el alcohol en C-21 (Espectro 4.6). En RMN ^{13}C se mantuvieron las dos señales de carbonilos de C-20 y C-3 en 206.9 y 199.4 ppm respectivamente.

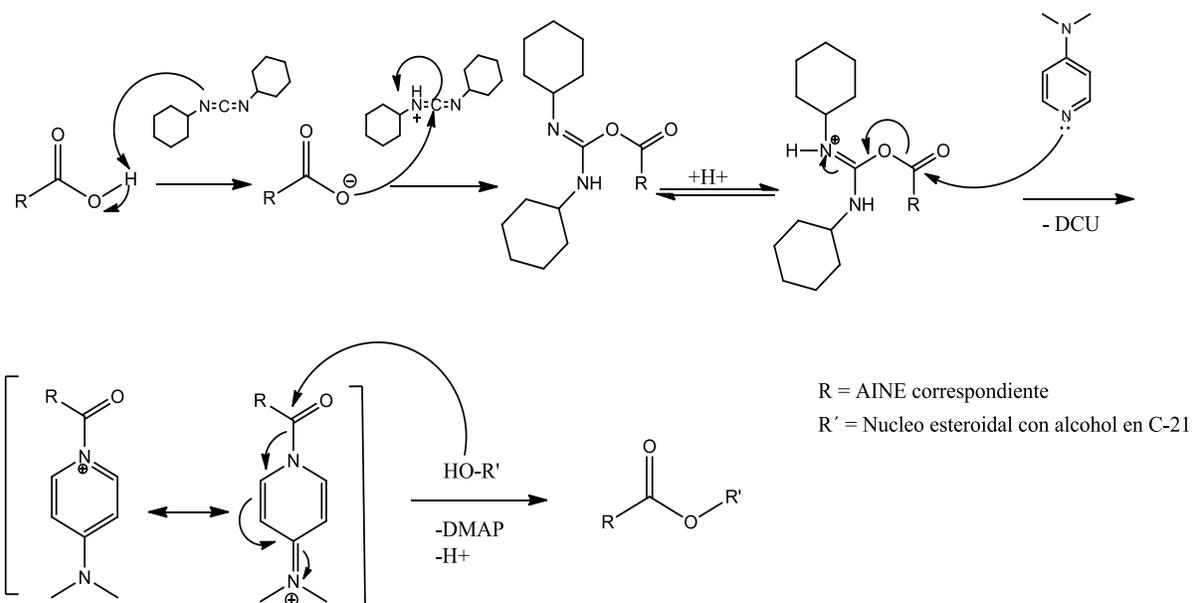
Los rendimientos fueron bajos sobre todo en las reacciones que implicaron oxidaciones, esto fue debido al tratamiento y la purificación, ya que por un lado, la reacción de Oppenauer necesitó un tratamiento ácido por el hidróxido de aluminio producido, así como para retirar la piperidona que no reaccionó y después una recristalización. En tanto la oxidación e C-21 se trató por medio de una extracción, para retirar el exceso de NaOH y después se purificó en una columna de silica gel, ambos métodos implicaron pérdidas significativas.

La siguiente reacción, consistió en una esterificación de Steglich³⁴ entre el alcohol libre del esteroide en C-21 y el grupo ácido de los AINES seleccionados, así como la reacción con ácido benzoico (**Esquema 10**).



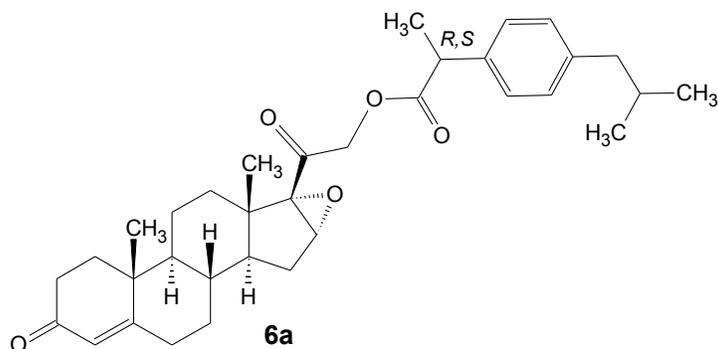
Esquema 10. Quinto paso de la ruta sintética. Esterificación de Steglich.
Donde R corresponde a los ácidos señalados anteriormente

Como se observa en el **Esquema 11** para que esta reacción proceda, es necesaria la acción catalítica de la DMAP. Primeramente el ácido carboxílico de cada AINE correspondiente se desprotona por la acción de la DCC, lo que permite que se produzca un ataque nucleofílico por parte del carboxilato a la DCC protonada; entonces se forma un intermediario O- acilourea que se protona y permite que la porción del ácido unido presente una reactividad similar al anhídrido del ácido. La DMAP que es un nucleófilo fuerte ataca a la O- acilourea en la porción electrofílica correspondiente al ácido y deja como grupo saliente a la diciclohexilurea (DCU), lo que da lugar a la formación una amida reactiva (que presenta estructura resonante) y que permite el ataque del alcohol en el carbonilo unido a la DMAP para la formar el éster correspondiente.

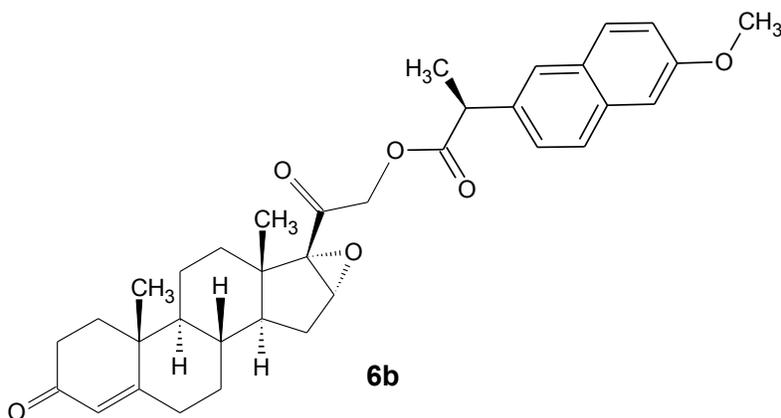


Esquema 11. Mecanismo de la esterificación de Steglich, entre el alcohol en C-21 del esteroide y el ácido adecuado

Los primeros tres híbridos esteroidales con ibuprofeno **6a**, naproxeno **6b** y ketoprofeno **6c**, que son derivados del ácido propiónico sustituido en C-2, tienen la característica de poseer un centro quiral que como sustituyentes tiene un metilo, el grupo ácido, un protón y el sustituyente aromático que caracteriza a cada uno, por ello en esta sección se analizarán esas características de forma general.

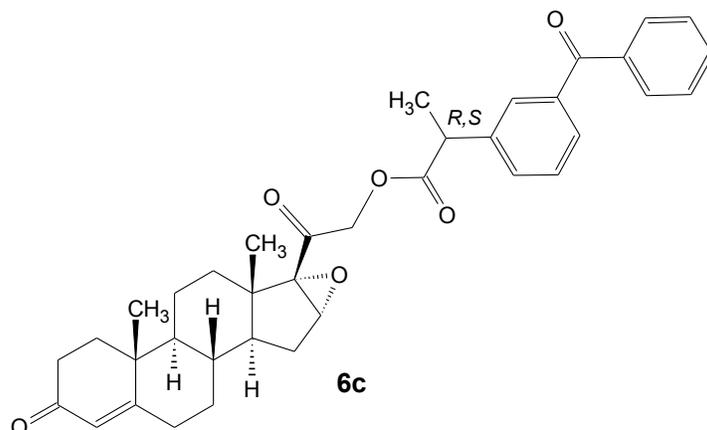


Para el primer híbrido 21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6a**). En el espectro de IR se observó una banda del carbonilo de éster en 1744 cm^{-1} así como las bandas de estiramiento C-O también del éster en 1159 y 1065 cm^{-1} . En RMN ^1H se observaron los protones correspondientes al AINE ibuprofeno, lo aromáticos en 7.21 ppm (d, $J= 8$ Hz, 2H) y 7.10 ppm, una señal en 3.81 ppm (q, $J= 7.2$ Hz, 1H) del protón del carbono quiral, la señal a 1.54 ppm (d, $J= 9.3$ Hz, 3H) correspondiente a los protones del metilo unido al carbono quiral así como una señal a 0.89 ppm (d, $J= 6.6$ Hz, 6H) de los metilos libres. Para RMN ^{13}C se observaron los carbonilos C-20 y C-3 en 199.9 y 199.2 ppm, respectivamente del esteroide; así como las señales de los carbonos aromáticos entre 142 -126 ppm y el carbono del carbonilo del éster en 174.7 ppm, esto último correspondiente al ibuprofeno.

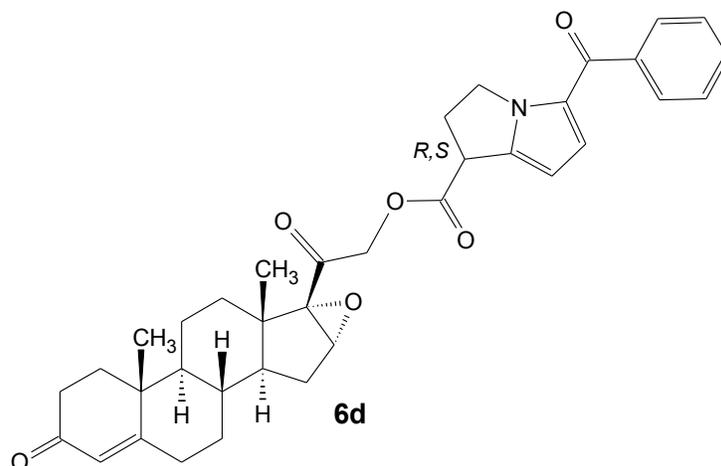


Para el híbrido 21-((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6b**) en el espectro de IR se observaron la banda del éster en 1747 cm^{-1} y el estiramiento de C-O del éster en 1163 y 1070 cm^{-1} . En RMN ^1H , las señales de los protones aromáticos correspondientes al AINE(naproxeno), se observaron en 7.72 ppm (s, 1H), 7.69 ppm (s, 1H), 7.41 ppm (d, $J= 1.9$ Hz, 1H), 7.26 ppm (d, $J= 1.8$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J= 2.5$ Hz, 1H) y 7.11 ppm (s, 1H); el protón del carbono quiral en 3.98 ppm (q, $J= 7.2$ Hz, 1H), 1.63 ppm (d, $J= 7.2$ Hz, 3H) del metilo unido al carbono quiral y la señal del un grupo metilo del grupo metoxilo del anillo naftaleno en 3.91 ppm (s, 3H). En RMN ^{13}C se observaron las señales del esteroide de C-20 y C-3 en 197.1 y 196.4 ppm respectivamente, y entre 155 – 131 ppm las señales correspondientes a las carbonos aromáticos; así como una señal en 171.1

ppm del carbono del carbonilo del éster del naproxeno. Ya que el ácido que se hizo reaccionar es enantioméricamente puro, el compuesto tiene configuración S por parte del ácido.



Para el híbrido 21-(2-(3-benzoilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6c**), en IR se observó la banda del carbonilo de éster en 1743 cm^{-1} ; así como las bandas de estiramiento de C-O en 1282 y 1161 cm^{-1} . En RMN ^1H las señales correspondientes a los protones aromáticos del AINE (ketoprofeno) se encontraron en 7.82 ppm (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.81-7.75 ppm (m, 3H), 7.72-7.66 ppm (m, 1H), 7.61 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.57 ppm (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.51-7.42 ppm (m, 3H), el protón del carbono quiral en 3.92 ppm (q, $J = 7.2$ Hz, 1H); en 1.59 ppm (d, $J = 7.2$ Hz, 3H) los protones del metilo unido al carbono quiral. En RMN ^{13}C , se observaron las señales del esteroide de C-20 y C-3 en 199.4 y 198.6 ppm, así como una señal de carbono a campo bajo en 196.5 ppm del carbonilo presente en el ketoprofeno y también los carbonos aromáticos entre 132 y 128 ppm.



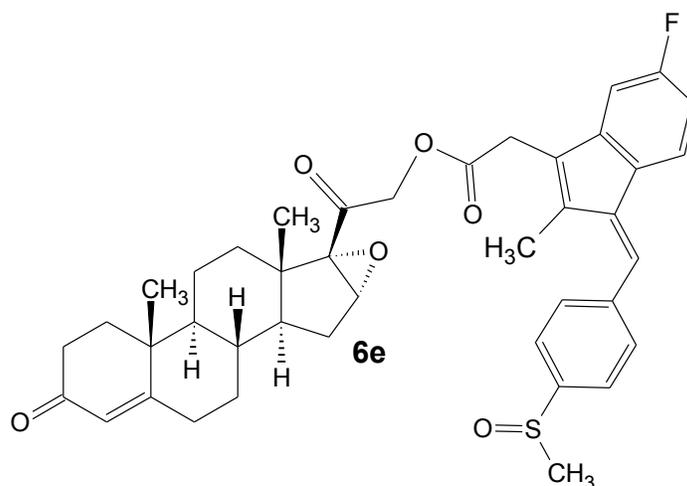
El híbrido con ketorolaco presenta un núcleo de pirrolizina con un centro quiral, así como una insaturación y un benzoilo.

Para el híbrido 21-(1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina)carboxiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6d**) en IR se observó la banda del carbonilo de éster en 1748 cm^{-1} y el estiramiento C-O del éster en 1268 y 1175 cm^{-1} . En RMN ^1H se los protones aromáticos del benzoilo se encontraron entre 7.81 ppm (d, $J = 10.4$ Hz, 2H), 7.52 ppm (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.44 ppm (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), y los protones del pirrol de la pirrolizina se observaron en 6.83 ppm (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), y 6.16 ppm (dd, $J = 10.4, 4$ Hz, 1H), mientras que los protones correspondientes a los carbonos con las insaturaciones de

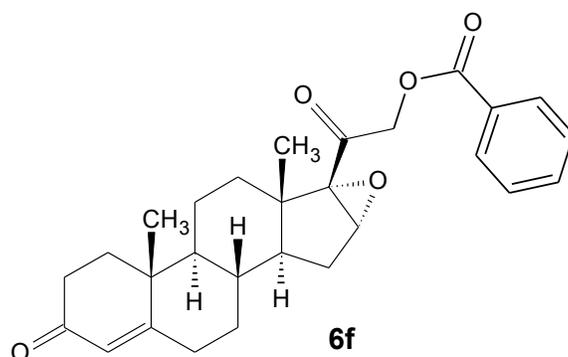
ese mismo núcleo se encontraron en 4.60 -4.54 ppm (m, 2H) y 3 -2.86 ppm (m, 2H), el protón del carbono quiral se encontró en 4.45 ppm (d, $J=d$ 11.2, 7.3, Hz, 2H). Para RMN ^{13}C los carbonos correspondientes a los carbonilos del esteroide en C-20 y C-3 se encontraron en 199.4 y 198.5 ppm respectivamente; mientras que el carbonilo del núcleo del ketorolaco se encontró en 196.5 ppm y carbonilo del éster en 171 ppm.

Para los compuestos finales **6a**, **6c** y **6d**, los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C no se observaron las señales duplicadas, por lo que se determinó que no existe la mezcla de diastereoisómeros correspondiente a la porción de los AINES: ibuprofeno, ketoprofeno y ketorolaco que se comercializan como mezclas racémicas en las formulaciones farmacéuticas. Debido a esto, se evidenció que se separó uno de los diastereoisómeros, sin embargo no es posible predecir cuál de ellos con los análisis espectroscópicos realizados en este trabajo.

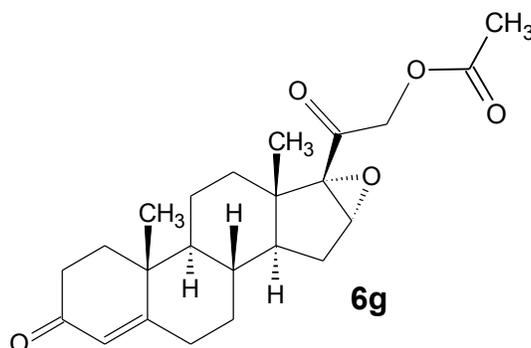
El híbrido del sulindaco es una molécula muy grande, es un derivado del ácido acético sustituido en C-2 que presenta un indeno con un fluor, así como un anillo aromático que tiene un metilsulfóxido como sustituyente.



El híbrido 21-(2-((1Z)-5-fluoro-2-metil-1-(4-(metilsulfinil)benziliden))-1H-inden-3-il)acetoxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6e**), en IR presentó una banda característica de éster en 1723 cm^{-1} correspondiente al carbonilo y el estiramiento C-O en 1151 y 1045 cm^{-1} ; en 1087 cm^{-1} de un estiramiento S=O de sulfóxido. Para RMN ^1H , los protones aromáticos del indeno se observaron en 7.13 ppm (d, $J= 5.3$ Hz, 1H), 6.91 ppm (dd, $J= 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 6.55 ppm (td, $J= 8.7, 2.4, 4$ Hz, 1H), en este análisis se puede observar el efecto de acoplamiento de los protones vecinos a un fluor por ser un átomo con spin nuclear 1/2. Mientras que para el anillo aromático había señales entre 7.69 ppm (d, $J= 9.5$ Hz, 2H) y 7.65 ppm (d, $J= 6$ Hz, 2H); los protones del C-2 del ácido acético se encontraron en 3.77 ppm (s, 2H), los protones del metilo correspondientes al metilsulfóxido se presentaron en 2.81 ppm (s, 3H). Para RMN ^{13}C , los carbonos de carbonilos del esteroide en C-20 y C-3 se observaron en 199.1 y 198.3 ppm respectivamente; mientras que para el núcleo del sulindaco el carbono del carbonilo del éster estaba en 169.5 ppm así como los carbonos aromáticos entre 160-105 ppm. Por otro lado se observó un doblete en 163.2 ppm (d, $J= 246$ Hz), correspondiente al acoplamiento C-F.



Para el compuesto 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6f**) se observó en IR la presencia de las bandas de estiramiento C=O en 1730 cm^{-1} y del estiramiento C-O en 1269 y 1104 cm^{-1} del éster. Para RMN ^1H se observaron los protones aromáticos entre 8.08 ppm (dd, $J= 8.2, 1.2$ Hz, 2H), 7.45 ppm (dd, $J= 10.6, 4.3$ Hz, 2H) y en 7.45 ppm (t, $J= 7.7$, 1H). En el caso de RMN ^{13}C los carbonos del esteroide en C-20 y C-3 se encontraron en 199.1 y 198.3 ppm, respectivamente; mientras que para los carbonos aromáticos del benzoilo las señales se observaron entre 133-128 ppm.

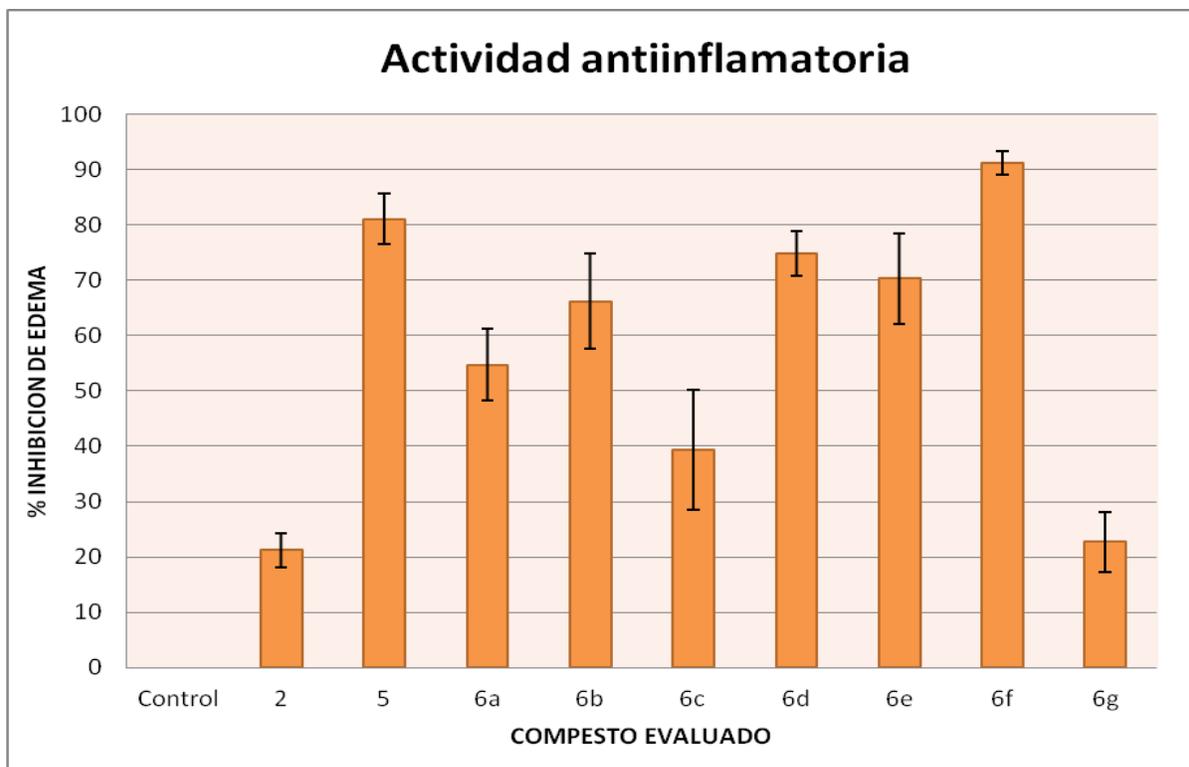


Para el compuesto 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6g**) se observó en IR la banda en 1754 cm^{-1} correspondiente al carbonilo y el estiramiento C-O en 1225 y 1045 cm^{-1} característica de éster. En RMN ^1H se encontró una señal en 2.17 ppm (s, 3H) del metilo en el acetilo de C-21. En RMN ^{13}C , los carbonos del esteroide en C-20 y C-3 se observaron en 199.1 y 198.3 ppm, respectivamente; mientras que el carbono del éster se encuentra en 171.3 ppm.

Las esterificaciones conllevaron a tratamientos que implicaron bastante manipulación, primero una filtración para eliminar la DCU (dicilohexilurea) formada; posteriormente, un tratamiento ácido y básico, el primero para eliminar a la DMAP y el segundo para eliminar el exceso de ácido que no reaccionó durante la esterificación; todo esto se realizó en AcOEt debido a que la solubilidad del éster es alta en este disolvente y la DCU es poco soluble; sin embargo, es difícil retirarla del medio, por lo que una columna suele ser la alternativa siempre que se manejen fases móviles poco polares; es por ello que los rendimientos de esterificación fueron bajos. El promedio del rendimiento global de la ruta fue de 11%.

7.2 Parte biológica

Como se puede observar, en la síntesis se añadieron dos compuestos más, uno que tienen un grupo pequeño y uno voluminoso en C-21, el grupo acetilo y el grupo benzoilo respectivamente; esto esperando observar algún efecto que no involucre la actividad directa de una molécula activa como los AINES y que dependa mayormente del esteroide y del tipo de interacciones que ejerza el grupo con el cual se bloquee el alcohol en C-21.



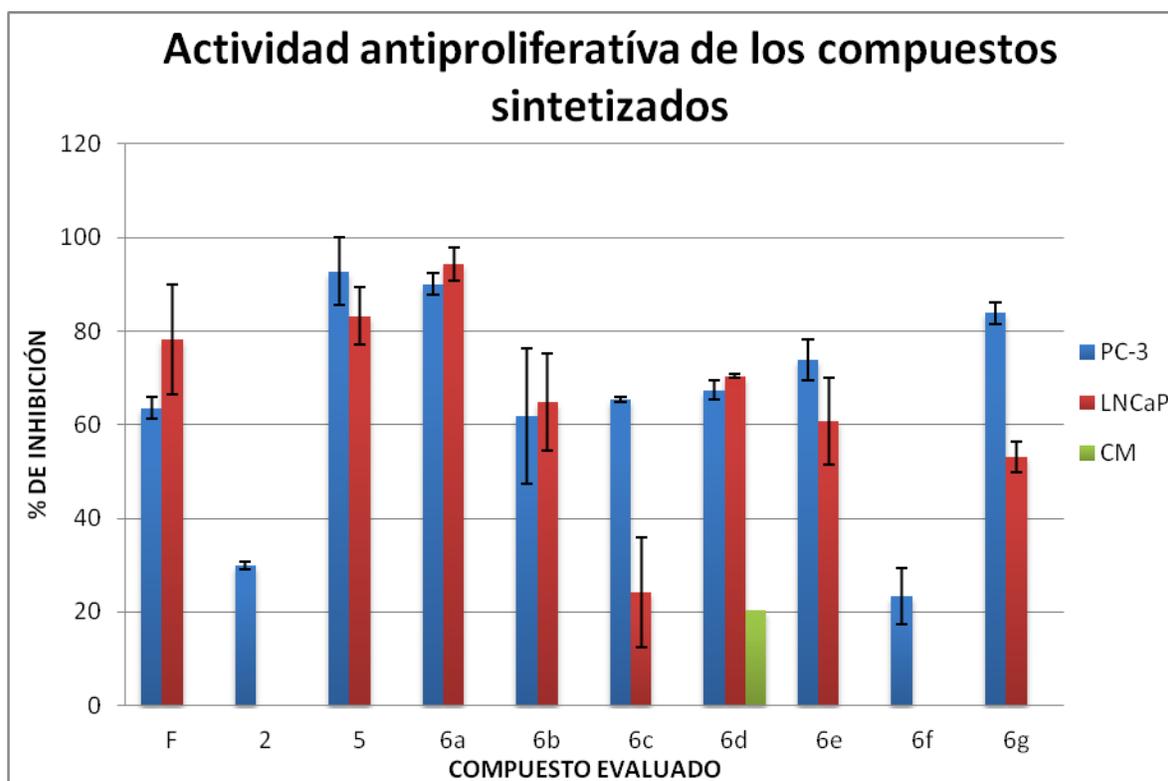
Grafica 1. Porcentaje de inhibición del edema en oreja inducido por ATF de los compuestos finales y dos intermedarios.

En la primera parte que corresponde a la actividad antiinflamatoria aguda, se observó el efecto como corticoide del compuesto con el alcohol libre en C-21 (**5**), que generó una inhibición del edema arriba del 80%. Al bloquear el efecto del alcohol con el grupo benzoilo (**6f**) y acetilo (**6e**) no parece existir la hidrólisis del éster, ya que la actividad del compuesto benzoilado es mucho mayor que el compuesto de alcohol libre y pudo deberse a ciertas interacciones de tipo hidrofóbicas; además de la planaridad conferida por el anillo aromático; por el contrario el compuesto acetilado presentó un decremento importante en su actividad, esto se debió por el bloqueo del alcohol en C-21 con una molécula pequeña, como el acetilo y no alcanza a generar interacciones importantes que le permitieran reestablecer la actividad del compuesto.

Los compuestos híbridos **6b**, **6d** y **6e** presentaron inhibición del edema mayor al 50%, y estadísticamente muy similares, siendo posible que su actividad se deba tanto a la porción del

esteroide como a sus características de AINE; sin embargo el volumen de las moléculas pudo haber interferido en el efecto, ya que no se muestra que existiera una hidrólisis.

Como dato importante, se tuvo la evaluación extra del AINE (**a**) ibuprofeno, y el porcentaje de inhibición de edema fue de 23.5%, mostrando que el híbrido **6a** tiene más actividad que el AINE solo.



Grafica 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las células de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP y de células mononucleares (CM) de los compuestos sintetizados.

Las células de PC-3 de cáncer de próstata son hormonalmente independientes en su crecimiento, ya que existe una alta tasa mutación celular, estas células son una representación de un cáncer "tardío" de próstata, que no responde a tratamientos normales, por ello los ensayos sobre esta línea celular son relevantes. En la actividad antiproliferativa correspondiente a las células PC-3, el compuesto **5** mostró una actividad mucho mayor que la flutamida, esto pudo deberse al aumento en el receptor de glucocorticoide, que se mencionó en los antecedentes al tratarse de células cancerígenas resistentes a antiandrógenos.

Al comparar con los compuestos: sin alcohol en **21 (2)**, acetilado (**6g**) y benzoilado (**6f**) se observó que el factor determinante es el Log P y a medida de que aumenta es evidente la pérdida de actividad biológica, ya sea por falta de solubilidad o porque las interacciones de tipo lipofílico y estérico a esa distancia atómica no son favorables para sistemas esteroidales en C-21, esto es en caso de tratarse de moléculas no activas en esta posición.

Ahora bien, para el caso de los híbridos el Log P pareció no ser un factor importante, ya que por el contrario el compuesto híbrido del ibuprofeno (**6a**), fue el que más actividad presentó y esta molécula tiene un Log P mayor que todos los compuestos híbridos, debido a la cadena de carbonos que posee en el núcleo del ibuprofeno; por otro lado el compuesto **6b** y **6c** que son los híbridos de naproxeno y ketoprofeno, respectivamente y que pertenecen junto con el ibuprofeno a AINES derivados del ácido propiónico sustituido en 2, se pudo observar una tendencia en el decremento de su actividad biológica en cuanto mayor sea su volumen molecular.

Entre el híbrido del ketorolaco (**6d**) y el híbrido del ketoprofeno (**6c**) existe una relación estructural que los hace muy semejantes en cuanto a sus propiedades estéricas y electrónicas, debido a que el metilo libre que existe en el ketoprofeno se puede comparar con el metileno del anillo de pirrolisina y pese a que contiene un heterociclo (pirrol), su heteroátomo se encuentra muy impedido y es poco básico por ello pudiera presenciarse un efecto de similitud entre el anillo de pirrolisina y el benceno del ketoprofeno y se observa el efecto antiproliferativo muy parecido entre ellas.

Para el compuesto híbrido de sulindaco (**6e**) se observó una actividad un poco mayor en comparación de la flutamida; para este caso el híbrido de sulindaco posee un volumen molecular mayor; sin embargo, una respuesta antiproliferativa mayor al 50% tiene relevancia farmacológica

Las células LNCaP, corresponden a líneas celulares de cáncer dependientes de andrógenos y representan a la etapa primaria de cáncer de próstata, el proceso antiproliferativo en estas células muchas veces dependen del efecto antiandrogénico de las vías mencionadas antes como son 5 α -reductasa y receptor androgénico.

Para la línea celular LNCaP se tiene que nuevamente el compuesto **5** presentó alta actividad a diferencia de la molécula sin alcohol en C-21 (**2**), el compuesto benzoilado (**6f**) y acetilado (**6g**); siendo nuevamente evidente que la pérdida de actividad se encuentra relacionada con el aumento de Log P o efectos estéricos que se refieran al bloqueo del alcohol en C-21.

Para el caso de los híbridos, nuevamente se observó que el compuesto híbrido del ibuprofeno (**6a**) es el que presenta mayor actividad de la serie y que sus similares propanoicos (**6b**) y (**6c**) tienen un decremento en la actividad que está relacionado con el aumento en su volumen molecular. Para los compuestos **6c** y **6d** que son similares en su volumen y estructura, se presentó el restablecimiento de la actividad, que podría deberse a la disminución de los grados de libertad, ya que el híbrido del ketorolaco (**6d**) tuvo mayor actividad que el híbrido del ketoprofeno. Para el caso del híbrido del sulindaco (**6e**), se observó que mantuvo una actividad similar a la flutamida implicando está que su volumen molecular no interfiere completamente con su actividad.

Como dato adicional se realizó un ensayo en líneas LNCaP con sulindaco y no presentó inhibición alguna en la proliferación de las células, mostrando nuevamente la efectividad de los híbridos.

De acuerdo a los ensayos biológicos en células mononucleares (células sanas), los compuestos no presentaron toxicidad y se sabe que la flutamida es tóxica en células sanas, lo que implicó que los compuestos son buenos candidatos para pruebas que diluciden su mecanismo de acción.

Se había mencionado, que los blancos a los que posiblemente se dirigirán estas moléculas híbridas, podrían ser la enzima COX, debido a la sobreexpresión e importancia biológica en procesos tumorales; para el receptor androgénico o a la 5 α -reductasa por el tipo de estructura base de los

compuestos. Debido a que el blanco y mecanismo de acción no puede ser dilucidado con estos ensayos biológicos, la mayor actividad se le confirió al híbrido del ibuprofeno (**6a**); esto se puede atribuir a los parámetros fisicoquímicos y a la naturaleza de las interacciones que genera el compuesto.

El híbrido contiene un anillo aromático con un iso-butilo en posición *para*, por ello, esta molécula tiene un Log P alto por lo que fácilmente puede atravesar las membranas celulares. Adicionalmente, se ha observado que la introducción de grupos metilo podría favorecer la solubilidad debido a la disminución energética de la red cristalina del compuesto. También la cadena alifática puede favorecer interacciones mediante efectos electrónicos, como donadores por inducción, estas serían características que favorecieron la actividad biológica de esta molécula.³⁴

En comparación con el anillo benzoico (**6f**), donde se observa que se pierde actividad al bloquear el alcohol en C-21, la porción aromática del compuesto híbrido **6a** se encuentra a una distancia atómica mayor y existe un grupo metilo antes del anillo aromático, implicando esto que las interacciones hidrofóbicas a larga distancia de la molécula generan un restablecimiento en la actividad del compuesto.

8. CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron y caracterizaron los compuestos híbridos del pregnano:

21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16 α , 17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

21-((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoiloxi)-16 α , 17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

21-(2-(3-benzoilfenil)propanoiloxi)-16 α , 17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

21-(1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina)carboxiloxi)-16 α , 17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

21-(2-((1Z)-5-fluoro-2-metil-1-[4-(metilsulfinil)benziliden])-1H-inden-3-il}acetoxi)-16 α , 17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

Y dos compuestos más que tienen grupos benzoilo y acetilo:

21-benzoiloxi-16 α , 17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

21-acetoxi-16 α , 17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

2. Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los compuestos híbridos, los resultados permiten concluir que el efecto sobre COX y el efecto de los corticoides como moduladores del efecto inflamatorio no se pierde pese al tamaño moléculas.

3. Se evaluó la actividad antiproliferativa de los compuestos en líneas celulares PC-3 y LNCaP donde el compuesto con el alcohol libre **5** y el híbrido del ibuprofeno **6a** presentaron la mayor actividad. Esta respuesta puede estar mediada tanto por efectos sobre COX como independientes de esta.

4. En la evaluación de citotoxicidad ninguno de los compuestos resultaron tóxicos, por lo que sería importante proceder con pruebas biológicas *in vivo* que permitan conocer su farmacodinamia.

5. El núcleo del pregnano 16 α , 17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona, (**5**) es un buen candidato para ejercer modificaciones estructurales, ya que presentó una alta actividad antiinflamatoria y antiproliferativa; por lo observado, se puede concluir que su actividad depende del OH en C-21, pero que ésta puede ser restablecida al colocar moléculas bioactivas voluminosas que ejerzan interacciones de tipo hidrofóbico.

6. Al presentar actividad sobre PC-3 y LNCaP, así como nula citotoxicidad, los compuestos híbridos podrían ser una alternativa para el tratamiento de cáncer de próstata inicial o tardío.

9. DESARROLLO EXPERIMENTAL

9.1 Parte química

9.1.1 Equipo utilizado

Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher –Johns y no fueron corregidos.

La pureza de los compuestos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (ccf) utilizando cromatoplasas recubiertas de gel de sílice (ALUGRAM XTRA® SIL G UV254) en diferentes sistemas de elución, adecuados para cada compuesto. Para visualizar las placas se utilizó una lámpara de luz UV marca Spectroline modelo CM-10 ($\lambda = 254\text{nm}$) y una solución de CoCl_2 2N en H_2SO_4 al 2%.

Para la purificación de compuestos se empleó cromatografía en columna (cc) utilizando como fase estacionaria gel de sílice (TECROM® 60 0,063-0,2 MM) o Florisil (ALDRICH®).

Los equipos utilizados para la caracterización de los compuestos fueron los siguientes:

Para la espectroscopía de absorción en el infrarrojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Elmer modelo 1605 utilizando la técnica de FTIR reflectancia ATR

Para la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- ^1H) y de carbono (RMN- ^{13}C) se utilizaron los equipos Inova Variant de 400 MHz y 100 MHz respectivamente; utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) están reportados en partes por millón (ppm) referidos al TMS para RMN ^1H y para RMN ^{13}C ; las constantes de acoplamiento están dadas en Hertz (Hz).

La multiplicidad de señales se representa de la siguiente manera:

singulete (**s**), doblete (**d**), triplete (**t**), cuarteto (**q**), doble de dobles (**dd**), multiplete (**m**).

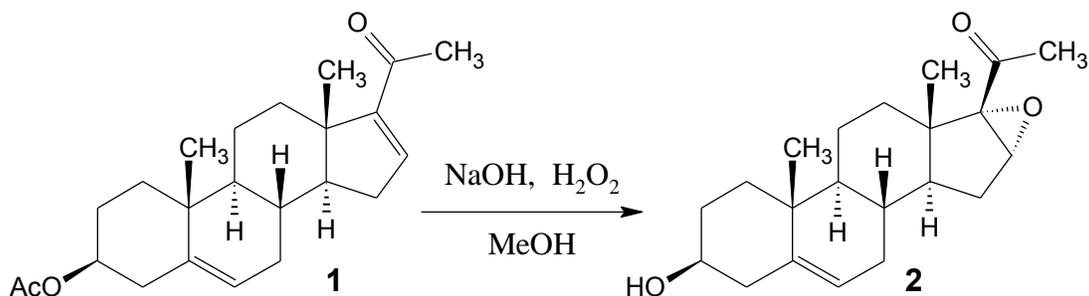
Para la espectrometría de masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas MStation con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa), mediante la técnica de Bombardeo rápido de átomos (FAB) utilizando una matriz de alcohol *m*-nitrobencilo y átomos de cesio a una temperatura menor de $50\text{ }^\circ\text{C}$, mediante la detección de iones positivos. El ion molecular se expresa como $[\text{M}+1]^+$.

Por otro lado, los espectros de masas de los compuestos **6a-6d** se determinaron mediante la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) en un espectrómetro de masas Accu TOF JMS-T100LC con un analizador Ion Sense DART modelo SVP100. El ion molecular, para ambas técnicas, se expresa como $[\text{M}+1]^+$ y se informa mediante las unidades *m/z*.

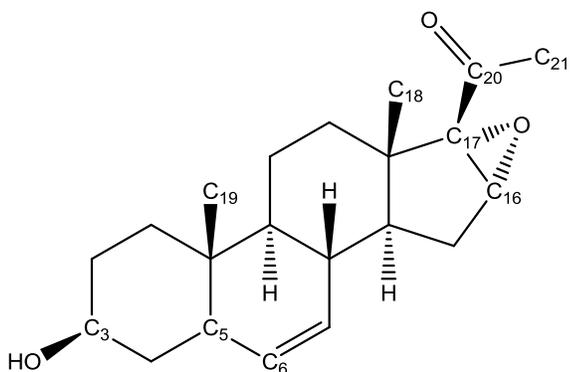
9.2 Síntesis química de intermediarios (2 - 5)

La materia prima grado reactivo *16-deshidropregnenolona* (**1**) se adquirió en Aldrich, con un punto de fusión de 170 - 178°C. Debido a que su apariencia era de sólido amarillo se recrystalizó de MeOH obteniendo un sólido cristalino con un punto de fusión 170 – 172°C.

9.2.1 Síntesis y caracterización de *16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona* (**2**)



En matraz de fondo redondo de 100 mL, se colocó 1 g (3 mmol) de **1** en 66 mL de MeOH caliente, hasta su disolución total. Posteriormente se adicionaron 2 mL de una solución 4N (8 mmol) de NaOH y 4 mL de una solución al 30% (v/v) de H₂O₂. La solución se agitó a temperatura ambiente por 4 h. Finalizado este tiempo, el disolvente se evaporó a presión reducida, el sólido resultante se lavó con agua fría destilada y se filtró al vacío, obteniendo un sólido blanco y cristalino.

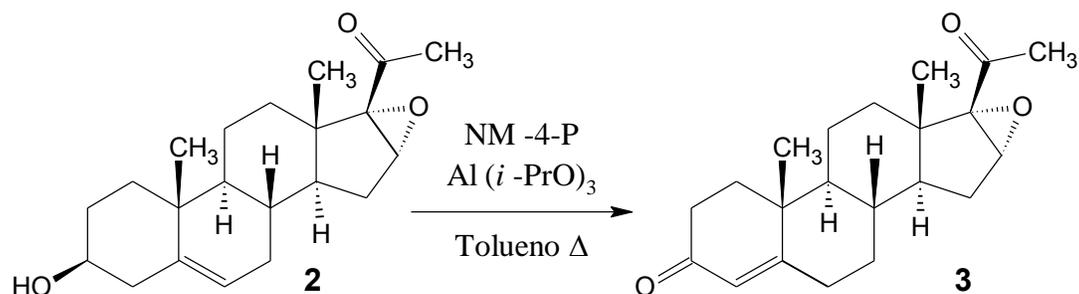


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
Peso molecular	330.4 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	183-185 °C
Rendimiento	93 %

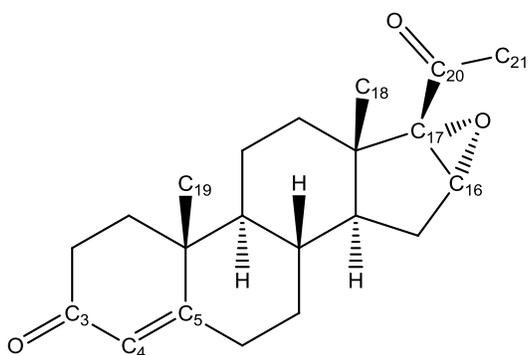
IR (cm ⁻¹) (Espectro 1.1)		
Valor N° de onda (ν)	Asignación de grupo funcional	
3343	H-O de alcohol en C-3	
1045	C-O de alcohol en C-3	
2969-2863	C-H de metilos y metilenos	
1690	C=O de cetona en C-20	
1368	C-CO de cetona	
1243	C-O de epóxido en C-16 y C-17	
1634	C=C del doble enlace entre C-5 y C-6	
RMN ¹ H (Espectro 1.2)		
Protón	δ(ppm)	Multiplicidad
H -6	5.32	d, J = 5.1 Hz, 1H
H-16	3.66	s, 1H
H-3	3.49	m, J = 11.5 Hz, 1H
CH ₃ -21	2.02	s, 3H
CH ₃ -18	1.01	s, 3H
CH ₃ -19	1.03	s, 3H
H-1, H-2, H-5, H-7, H-8, H-9, H-12, H-14, H-15	2.32-2.16 1.98-1.79 1.63-1.36 1.35-1.28 1.20-1.09 1.00-0.93	m, 2H m, 4H m, 9H m, 1H m, 1H m, 1H
RMN ¹³ C (Espectro 1.3)		
Carbono	δ(ppm)	
C-20	204.9	
C-5	141.1	
C-6	120.9	
C-16	60.4	
C-3	71.0	
C-17	71.5	
C-18	15.1	
C-19	19.3	
C-21	25.9	
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-5, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	50.44, 45.68, 42.34, 37.26, 31.70, 31.57, 31.50, 29.88, 27.70, 20.58	
C (C-10, C-13)	41.65, 36.81	
EM-FAB ⁺ (m/z) (Espectro 1.4)		
M ⁺ + 1	331	

Tabla 2. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxipregn-5-en-20-ona

9.2.2 Síntesis y caracterización de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**3**)



En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se suspendió 1 g (3 mmol) de **2** en 100 mL de tolueno, luego se añadieron 12 mL (97.5 mmol) de *N*-metil-4-piperidona (NM-4P) y la mezcla se calentó a reflujo, utilizando una trampa DeanStark para eliminar la humedad proveniente del tolueno y de NM-4P, hasta que se colectaron 40 mL de destilado. Posteriormente se agregaron 3.1 g (15 mmol) de Al (*i*-PrO)₃ manteniendo la temperatura. Se destilaron otros 10 mL de tolueno para asegurar que el sistema quede anhidro. La reacción se dejó agitando a temperatura de reflujo por 24 horas. Posteriormente, se evaporó al vacío el disolvente y el residuo se disolvió con 100 mL de AcOEt. El extracto orgánico se lavó dos veces con 50 mL de una solución al 15 % de HCl, después se lavó con 50 mL de una solución saturada de NaHCO₃ y finalmente se lavó con 50 mL de agua destilada. La fase orgánica resultante se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El producto crudo obtenido (un sólido amarillo) se recrystalizó en MeOH lo que permitió obtener un sólido cristalino.

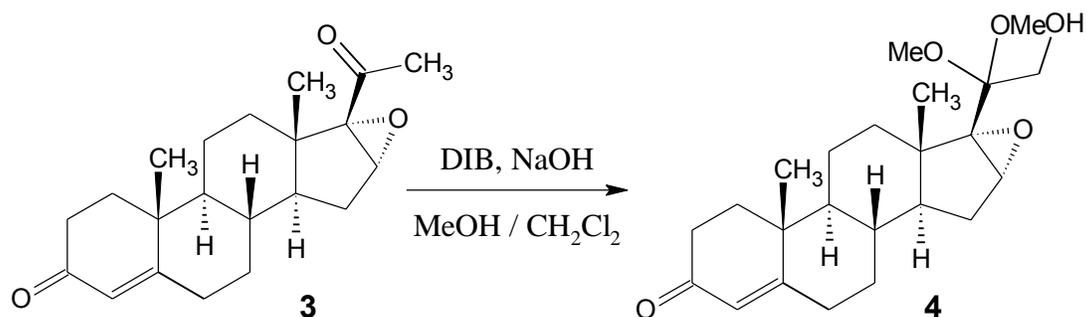


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₈ O ₃
Peso molecular	328.4 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	205-207 °C
Rendimiento	60%

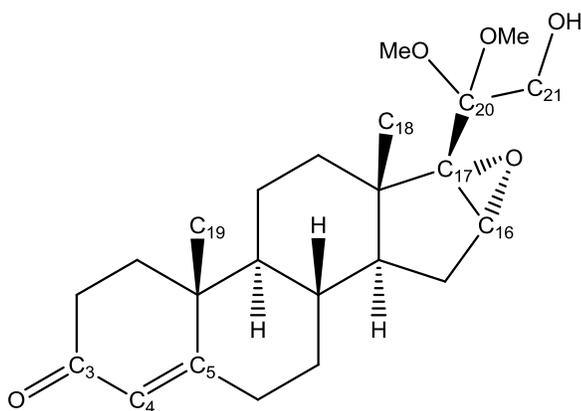
IR (cm ⁻¹) (Espectro 2.1)		
Valor N° de onda (ν)	Asignación de grupo funcional	
2976-2853	C-H de metilos y metilenos	
1697	C=O de cetona en C-20	
1658	C=O α,β-insaturado C-3 y C-4	
1378	C-CO de cetona	
1266	C-O de epóxido en C-16 y C-17	
1634	C=C del doble enlace entre C-4 y C-5	
UV (MeOH)λ _{max} (Espectro 2.2)	239.76, de C=O α,β-insaturado C-3 y C-4	
RMN ¹ H (Espectro 2.3)		
Protón	δ(ppm)	Multiplicidad
H-4	5.70	s, 1H
H-16	3.68	s, 1H
CH ₂ -21	2.01	s, 3H
CH ₃ -18	1.03	s, 3H
CH ₃ -19	1.07	s, 3H
H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15	2.46-2.23 1.81-1.57 1.53-1.28 1.16-1.09 1.05-0.90	m, 5H m, 5H m, 4H m, 1H m, 2H
RMN ¹³ C (Espectro 2.4)		
Carbono	δ(ppm)	
C-20	205.2	
C-3	199.8	
C-5	171	
C-4	124.5	
C-16	60.9	
C-17	71.2	
C-18	15.7	
C-19	17.7	
C-21	25.9	
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	54.01, 44.99, 35.73, 34.03, 33.43, 32.78, 31.68, 31.30, 27.50, 20.52.	
C (C-10, C-13)	41.72, 38.78	
EM-FAB ⁺ (m/z) (Espectro 2.5)		
M ⁺ + 1	329	

Tabla 3. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

9.2.3 Síntesis y caracterización de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (**4**)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó 1 g (3 mmol) de **3** y 15 mL de una mezcla (2:1) de MeOH-CH₂Cl₂, se añadió 1 g (25 mmol) de lentejas de NaOH y se agitó a temperatura ambiente hasta la disolución del sólido. Posteriormente, se añadieron 1.8 g (5.8 mmol) de DIB y se dejó agitar por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y la mezcla resultante se extrajo con 30 mL de AcOEt y se lavó dos veces con 30 mL de agua, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se llevó a sequedad para empacarse en una columna de gel de sílice donde se eluyó con una mezcla de hexano:AcOEt (7:3) y se obtuvo un sólido blanco cristalino.

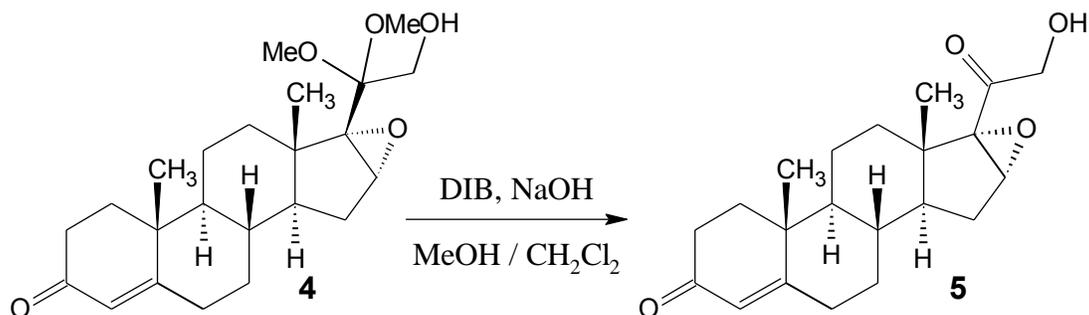


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₄ O ₄
Peso molecular	374.5 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	150-152 °C
Rendimiento	50%

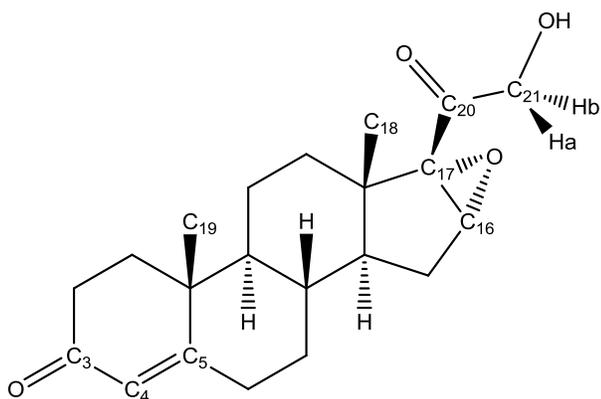
IR (cm ⁻¹) (Espectro 3.1)		
Valor N° de onda (ν)	Asignación de grupo funcional	
3429	H-O de alcohol en C-21	
1084	C-O de alcohol en C3	
2976-2853	C-H de metilos y metilenos	
1651	C=O α,β-insaturado C-3 y C-4	
1235	C-O de epóxido en C-16	
UV (MeOH)λ _{max} (Espectro3.2)	240.34, de C=O α,β-insaturado C-3 y C-4	
RMN ¹ H (Espectro 3.3)		
Protón	δ(ppm)	Multiplicidad
H -4	5.72	s, 1H
CH ₂ -21	3.67	dd, J = 5.9, 9Hz 2H
H -16	3.46	s, 1H
OCH ₃ -20	3.30 3.26	s, 3H s, 3H
CH ₃ -18	1.06	s, 3H
CH ₃ -19	1.19	s, 3H
H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15	2.46-2.23 2.07-1.95 1.90-1.84 1.80-1.44 1.32-1.21 1.12-0.89	m, 4H m, 3H m, 1H m, 6H m, 2H m, 2H
RMN ¹³ C (Espectro 3.4)		
CARBONO	δ(ppm)	
C-3	199.8	
C-5	171	
C-4	124.5	
C-16	65.4	
C-17	69.2	
C-18	15.7	
C-19	17.7	
C-20	103.7	
C-21	62.3	
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	53.99, 45.61, 35.72, 34.04, 33.57, 32.88, 32.54, 31.75, 27.00, 20.63	
C (C-10, C-13)	42.52, 38.76	
EM-FAB ⁺ (m/z) (Espectro 3.5)		
M ⁺ + 1	375	

Tabla 4. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona.

9.2.4 Síntesis y caracterización de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (5)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se disolvieron 500 mg (1.3 mmol) de **4** en 10 mL de Me₂CO, se colocaron 6 gotas de HCl concentrado y se agitó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se evaporó el disolvente y el sólido residual se disolvió en 20 mL de AcOEt y se lavó dos veces con 20 mL de agua destilada. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad, obteniendo un sólido blanco cristalino.



Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₈ O ₄
Peso molecular	344.4 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	146 – 148 °C
Rendimiento	83%

IR (cm ⁻¹) (Espectro 4.1)		
Valor N° de onda (v)	Asignación de grupo funcional	
3457	H-O de alcohol en C-21	
1068	C-O de alcohol en C-21	
2985-2849	C-H de metilos y metilenos	
1711	C=O de cetona en C-21	
1660	C=O α,β -insaturado en C-3 y C-4	
1235	C-O de epóxido en C-16	
UV (CHCl ₃) λ_{max} (Espectro4.2)	244,58, de C=O α,β -insaturado C-3 y C-4	
RMN ¹ H(Espectro 4.3)		
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad
H -4	5.72	s, 1H
Ha-21	4.34	dd, J = 19.7, 4 Hz, 1H
Hb-21	4.04	dd, J =19.7, 5.3 Hz, 1H
H -16	3.69	s, 1H
H -21	2.94	t, 1H
CH ₃ -18	1.06	s, 3H
CH ₃ -19	1.19	s, 3H
H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15	2.47-2.24 2.05-1.96 1.81-1.60 1.55-1.33 1.14-0.91	m, 4H m, 3H m, 5H m, 3H m, 2H
RMN ¹³ C(Espectro 4.4)		
CARBONO	δ (ppm)	
C-20	206.9	
C-3	199.4	
C-5	124.2	
C-4	170.3	
C-16	62	
C-17	69.9	
C-18	15.3	
C-19	17.3	
C-21	65.8	
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	53.94, 44.47, 35.75, 34.02, 33.29, 32.73, 31.66, 31.19, 27.85, 20.48	
C (C-10, C-13)	42.67, 38.77	
DART (m/z) (Espectro 4.5)		
M ⁺ + 1	345	
RMN ¹ H D ₂ O(Espectro 4.5)		
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad
H -4	5.72	s, 1h
CH ₂ -21	4.32 4.03	dd, J = 19.9 Hz, 1H dd, J = 19.7 Hz, 1H
H -16	3.64	s, 1H
CH ₃ -18	1.19	s, 1H
CH ₃ -19	1.17	s, 1H

Tabla 5. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona

9.3 Síntesis química de híbridos (6a – 6e) y derivados: Benzoico y acético (6f y 6g)

9.3.1 Método general de extracción de los AINES: Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y sulindaco

Dependiendo de la presentación en cada tableta se utilizaban las necesarias para obtener entre 200 - 400 mg de principio activo.

En un mortero de mano, se trituraron las tabletas y el polvo obtenido se agitó en 20 mL de CH_2Cl_2 por 30 minutos, la suspensión se filtró descartándose el sólido, la fase orgánica se concentró por medio de rotaevaporador, el sólido obtenido se cristalizó por par de disolvente MeOH : H_2O destilada y se filtró; obteniendo sólidos cristalinos.

Ibuprofeno: Presentación de tabletas de 800 mg. El sólido final obtenido cristalizado fue de 610 mg.

Naproxeno: Presentación de tabletas de 500 mg. El sólido final obtenido cristalizado fue de 330 mg.

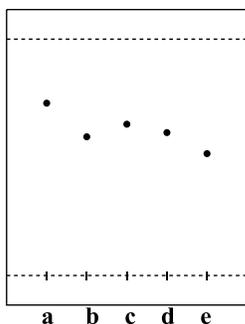
Ketoprofeno: Presentación de tabletas de 100 mg por lo que se molieron 6 tabletas. El sólido final obtenido cristalizado fue de 400 mg.

Sulindaco: Presentación de tabletas de 200 mg se molieron 2 tabletas. El sólido final obtenido cristalizado fue de 325 mg.

9.3.2 Método de extracción del AINE Ketorolaco-trometamina

En un mortero, se trituraron 10 tabletas de 30 mg, el sólido obtenido se agitó en 20 mL de CH_2Cl_2 por 30 minutos, la suspensión se filtró y se desechó el sólido, la fase orgánica se lavó con 10 mL de una solución al 15% v/v de HCl, posteriormente se lavó con 10 mL de agua destilada para quitar exceso de ácido. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad obteniéndose un sólido blanco que se cristalizó por par de disolvente MeOH : H_2O destilada y se filtró obteniendo 230 mg de un sólido cristalino.

A todos los ácidos obtenidos se les determinó punto de fusión y se comparó con el reportado (**Tabla 6**); también se obtuvieron los espectros de IR que de manera general presentaron bandas características de H-O del ácido carboxílico ($2500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$), C-H de metilos y metilenos ($2880 - 2975 \text{ cm}^{-1}$), C-O de carbonilo (1710 cm^{-1}) y C-O de cetona para el caso de etorolaco y etoprofeno (1715 cm^{-1}). Espectros de IR 12-16 en Anexos.



Cromatoplaca realizada a los AINES aislados de su forma farmacéutica. El medio de elución consistió en un medio 9:1 CH_2Cl_2 : MeOH con unas gotas de ácido acético.

- a) Ibuprofeno $R_f = 0.73$, b) Naproxeno $R_f = 0.6$,
c) Ketoprofeno $R_f = 0.64$, d) Ketorolaco $R_f = 0.59$
y e) Sulindaco $R_f = 0.52$.

Nombre común	Nombre sistemático	Punto de fusión teórico	Punto de fusión medido
IBUPROFENO (a)	Ácido (<i>R,S</i>)-2-(4-isobutilfenil)propanoico	75 -76 °C	74 -76 °C
NAPROXENO (b)	Ácido (<i>S</i>)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoico	152 – 155 °C	152 – 154 °C
KETOPROFENO (c)	Ácido (<i>R,S</i>)-2-(3-benzofenil)propanoico	94 – 97 °C	95 -98 °C
KETOROLACO (d)	Ácido (\pm)-1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolisina)carboxílico	165 – 167 °C	165 -168 °C
SULINDACO (e)	Ácido-2-((<i>1Z</i>)-5-fluoro-2-metil-(4-metilsulfinil)benzilideno)-1H-inden-3-il)acético	182 – 185 °C	181 – 184 °C

Tabla 6. Características de los ácidos extraídos (Figura 16).

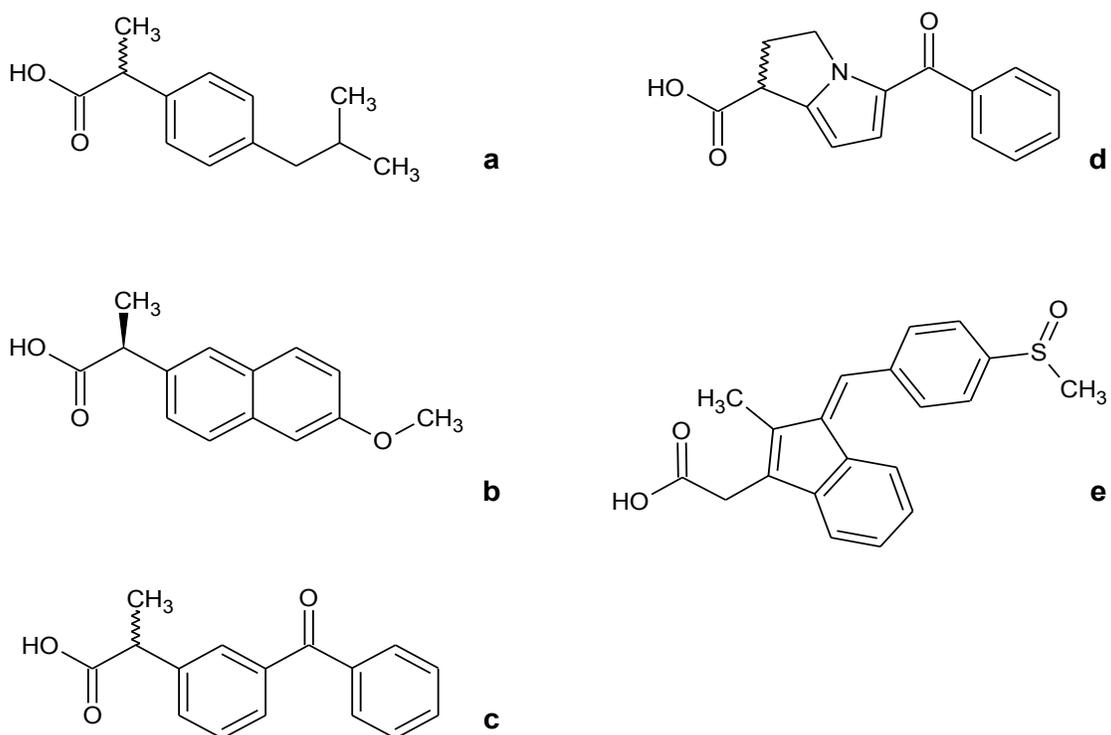
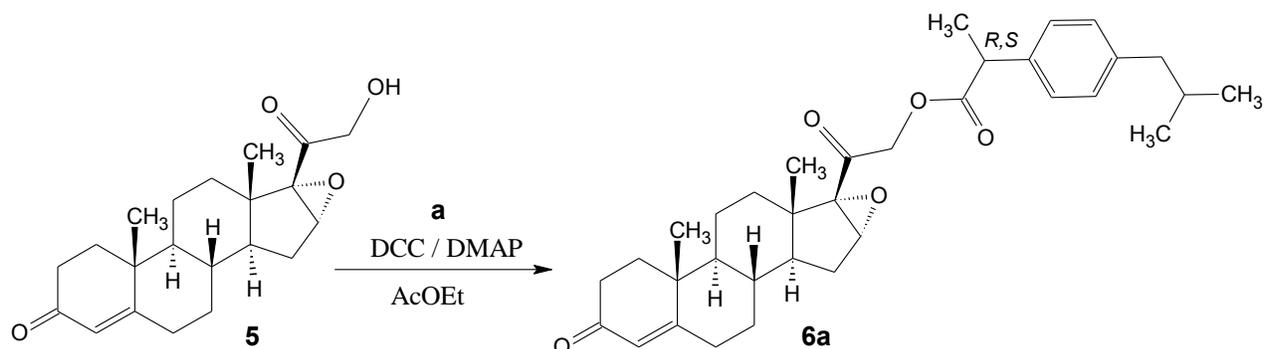
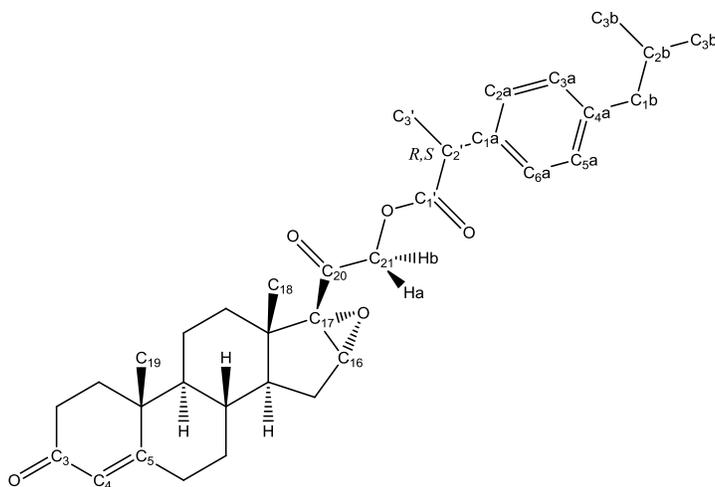


Figura 16. Ácidos extraídos de tabletas comerciales (AINES).

9.3.3 Síntesis y caracterización del híbrido 21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6a**)



En un matraz bola de fondo redondo de 20 mL se disolvieron 0.089 g (0.435 mmol) de DCC, 0.053 g (0.435 mmol) de DMAP y 0.435 mmol de ácido (*R,S*)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (**a**) en 10 mL de AcOEt y la solución se agitó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.1 g (0.29 mmol) de **5** y la mezcla se agitó por dos horas a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, hasta el consumo total de la materia prima. Una vez terminada la reacción, se filtró al vacío y la fase orgánica se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 15%; posteriormente, con una solución saturada de NaHCO₃, (3 x 15 mL), finalmente se lavó con 20 mL de agua destilada. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se empacó en una columna de Florisil para la purificación del compuesto con una mezcla hexano:AcOEt (95:5). Se obtuvo un sólido blanco y cristalino.

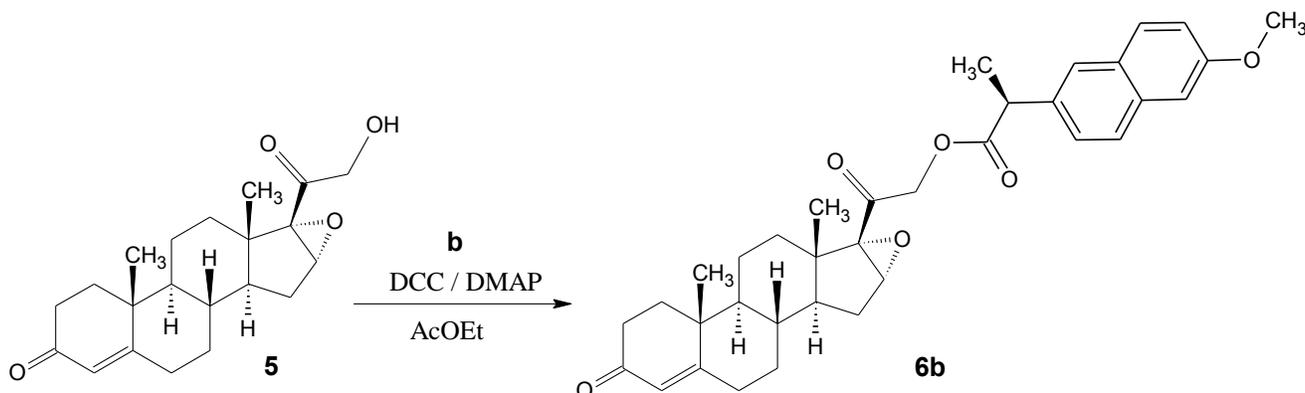


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₄₄ O ₅
Peso molecular	532.3 g / mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	123 – 125 °C
Rendimiento	60%

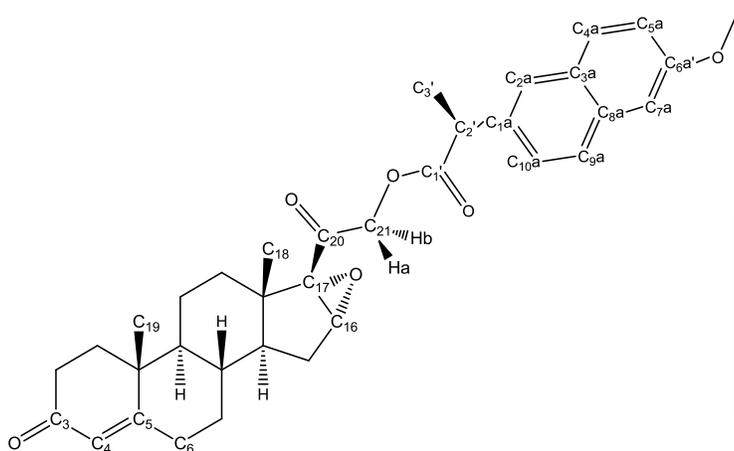
IR (cm ⁻¹) (Espectro 5.1)		
Valor N° de onda (v)	Asignación de grupo funcional	
3056	C-H aromático	
2976-2853	C-H de metilos y metilenos	
1744	C=O de éster	
1721	C=O de cetona C-20	
1660	C=O α,β -insaturado C-3 y C-4	
1453	C-H de metilenos	
1376	C-C-O de cetona	
1231	C-O de epóxido en C-16	
1159 y 1065	C-O de éster	
-800	p-sustitución	
RMN ¹ H (Espectro 5.2)		
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad
H -2a y H-6a	7.21	d, J = 8.0 Hz, 2H
H-3a y H-5a	7.10	d, J = 6.1 Hz, 2H
H -4	5.72	s, 1H
Ha -21	4.68	dd, J = 22.7, 17.3 Hz, 1H
Hb -21	4.53	dd, J = 17.2, 7.8 Hz, 1H
H -2'	3.81	q, J = 7.2 Hz, 1H
H -16	3.77	s, 1H
H -1b	2.44	d, J = 7.1 Hz, 2H
CH ₃ -3'	1.54	d, J = 9.3 Hz, 3H
CH ₃ -19	1.18	s, 3H
CH ₃ -18	1.13	s, 3H
CH ₃ -3b	0.89	d, J = 6.6 Hz, 6H
RMN ¹³ C(Espectro 5.3)		
Carbono	δ (ppm)	
C-20	199.9	
C-3	199.2	
C-1'	174.7	
C-5	170.9	
C (C-na) de aromáticos	142-126	
C-4	124.6	
C-17	70.8	
C-21	66.6	
C-3'	20.8	
C-2' (quiral)	45.2	
C-1b	45.7	
C-2b	28.2	
C-3b y C-4b	22.9	
C-18	15.7	
C-19	17.5	
DART (m/z) (Espectro 5.4)		
M ⁺ + 1	533	

Tabla 7. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

9.3.4 Síntesis y caracterización del híbrido 21-((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6b**)



En un matraz bola de fondo redondo de 20 mL se disolvieron 0.119 g (0.58 mmol) de DCC, 0.078 g (0.58 mmol) de DMAP y 0.58 mmol de ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoico (**b**) en 10 mL de AcOEt y la solución se agitó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.1g (0.29 mmol) de **5** y la mezcla se agitó por tres horas a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, hasta el consumo total de la materia prima. Una vez terminada la reacción, se filtró al vacío y la fase orgánica se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 15%; posteriormente, con una solución saturada de NaHCO₃, (3 x 15 mL), finalmente se lavó con 20 mL de agua destilada. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se empacó en una columna de Florisil para la purificación del compuesto con una mezcla hexanó:AcOEt (95:5). Se obtuvo un sólido blanco y cristalino.

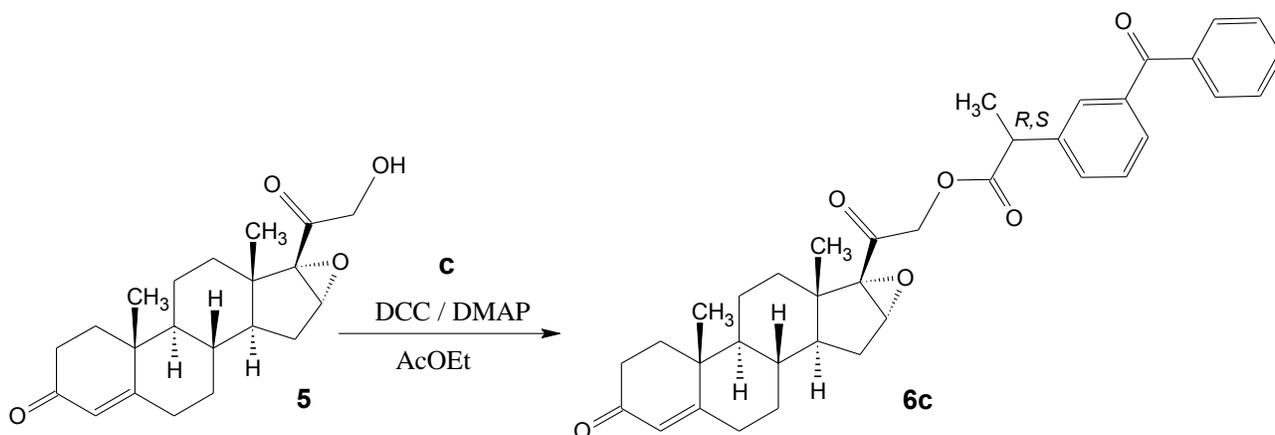


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₃₅ H ₄₄ O ₆
Peso molecular	556.6 g/ mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	180 – 181°C
Rendimiento	50%

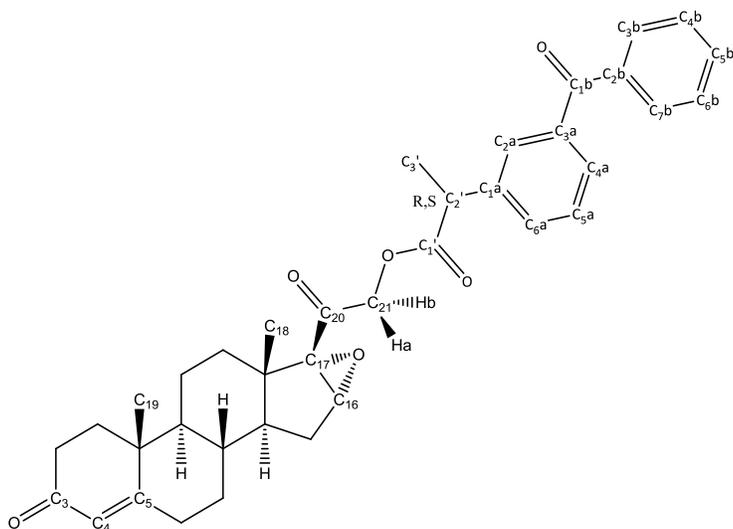
IR cm ⁻¹ (Espectro 6.1)		
Valor N° de onda (v)	Asignación de grupo funcional	
3056	C-H de aromático	
2931-2852	C-H de metilos y metilenos	
1747	C=O de éster	
1719	C=O de cetona C-20	
1662	C=O α,β -insaturado C-3 y C-4	
1607	C-C-O de aromáticos	
1453	C-H de metilenos	
1388	C-C de cetona	
1229	C-O de epóxido en C-16	
1163 y 1025	C-O de éster	
RMN ¹ H (Espectro 6.2)		
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad
H-2a en naftaleno	7.72	s, 1H
H-9a en naftaleno	7.69	s, 1H
H-4a	7.41	d, J = 1.9 Hz, 1H
H-5a	7.26	d, J = 1.8 Hz, 1H
H-10a	7.15	d, J = 2.5 Hz, 1H
H-7a	7.11	s, 1H
H -4	5.72	s, 1H
Ha -21	4.65	d, J = 17.2 Hz, 1H
Hb-21	4.56	d, J = 17.2 Hz, 1H
H -2' de	3.98	q, J = 7.2 Hz, 1H
OCH ₃ de C-6a de naftaleno	3.91	s, 3H
H -16	3.77	s, 1H
CH ₃ -3' de naproxeno	1.63	d, J = 7.2 Hz, 3H
CH ₃ -19	1.18	s, 3H
CH ₃ -18	1.14	s, 3H
RMN ¹³ C (Espectro 6.3)		
Carbono	δ (ppm)	
C-20	197.1	
C-3	196.4	
C-1' de naproxeno	171.7	
C-5	168.5	
C-6a de naftaleno	155.8	
C-1a de naftaleno	133.7	
C-3a de naftaleno	127.5	
C-8a de naftaleno	131.8	
C-4	124.5	
C-7a de naftaleno	103	
C-17	68	
C-21	64.3	
C-16	59.3	
C de metoxilo en C-6a de naftaleno	53.5	
C-3' de naproxeno	38.3	
C-2' de naproxeno	53.5	
C-18	12.5	
C-19	19.2	
DART (m/z) (Espectro 6.4)		
M ⁺ + 1	557	

Tabla 8. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 21-((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

9.3.5 Síntesis y caracterización del híbrido 21-(2-(3-benzoilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6c**)



En un matraz bola de fondo redondo de 20 mL se disolvieron 0.119 g (0.58 mmol) de DCC, 0.078 g (0.58 mmol) de DMAP y 0.58 mmol de ácido (*R,S*)-2-(3-benzoilfenil)propanoico (**c**) en 10 mL de AcOEt y la solución se agitó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.1 g (0.29 mmol) de **5** y la mezcla se agitó por tres horas a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, hasta el consumo total de la materia prima. Una vez terminada la reacción, se filtró al vacío. La fase orgánica se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 15%; posteriormente, con una solución saturada de NaHCO₃, (3 x 15 mL), finalmente se lavó con 20 mL de agua destilada. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se empacó en una columna de Florisil para la purificación del compuesto con una mezcla Hex :AcOEt (95:5). Se obtuvo un sólido blanco y cristalino.

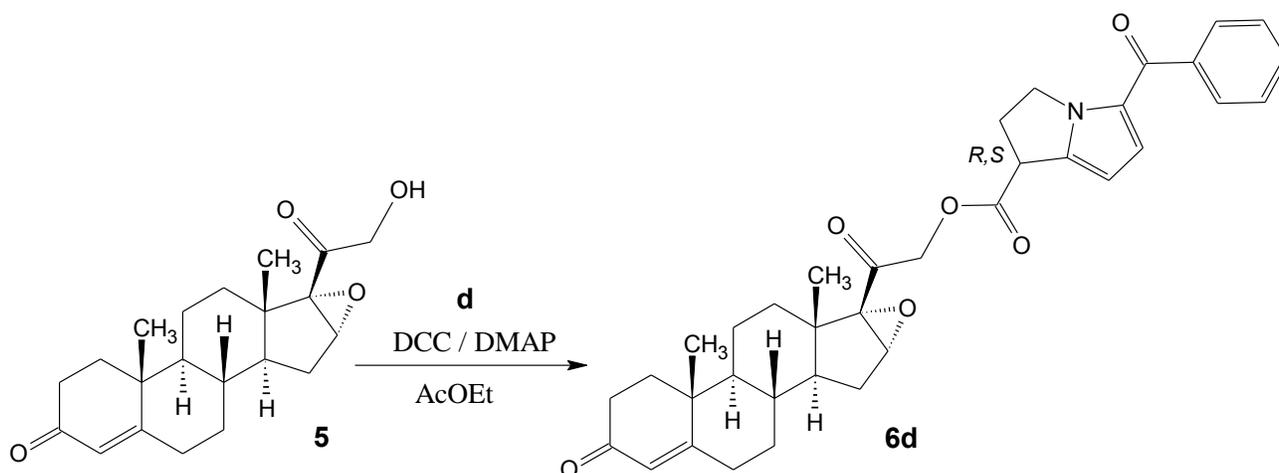


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₃₇ H ₄₀ O ₆
Peso molecular	580.2 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	69-71 °C
Rendimiento	55%

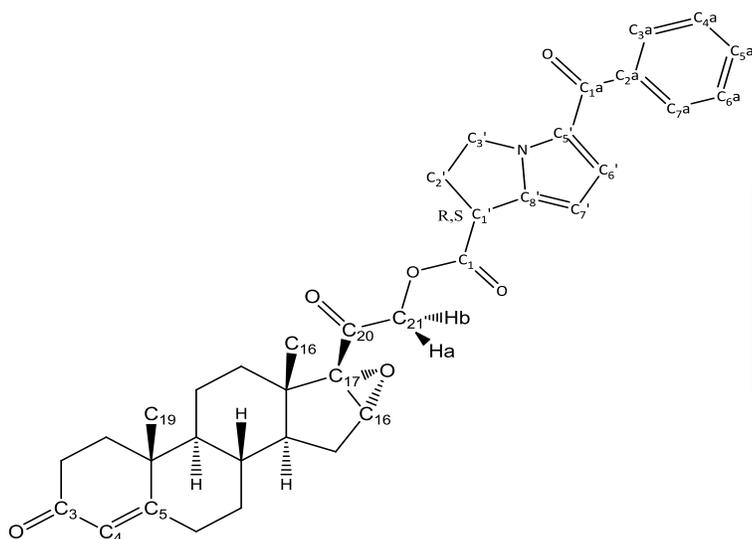
IR (cm ⁻¹) (Espectro 7.1)		
Valor N° de onda (v)	Asignación de grupo funcional	
3059	C-H de aromático	
2935-2856	C-H de metilos y metilenos	
1743	C=O de éster	
1722	C=O de cetona C-20	
1657	C=O α,β -insaturado C-3 y C-4	
1616	C-C de aromáticos	
1447	C-H de metilenos	
1379	C-C-O de cetona	
1234	C-O de epóxido en C-16	
1282 y 1161	C-O de éster	
RMN ¹ H (Espectro 7.2)		
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad
H -2a	7.82	d, J = 1.5 Hz, 1H
H -3b y 7b	7.81 – 7.75	m, 2H
H -4a	7.72 -7.66	m, 1H
H-6a	7.61	d, J = 7.3 Hz, 1H
H-5b	7.57	d, J = 1.4 Hz, 1H
H -5a, 4b y 6b	7.51- 7.42	m, 3H
H -4	5.74	s, 1H
Ha -21	4.72	d, J = 17.1 Hz, 1H
Hb -21	4.55	d, J = 17.2 Hz, 1H
H -2'	3.92	q, J = 7.2 Hz, 1H
H -16	3.77	s, 1H
CH ₃ -3'	1.59	d, J = 7.2 Hz, 3H
CH ₃ -19	1.19	s, 3H
CH ₃ -18	1.14	s, 3H
RMN ¹³ C (Espectro 7.3)		
Carbomo	δ (ppm)	
C-20	199.4	
C-3	198.6	
C-1b	196.5	
C-1'	173.6	
C-5	170.4	
C-3a	140.4	
C-1a	138	
C-2b	137.1	
C (C-na y C-nb)	132-128	
C-4	124.2	
C-17 C-O	70.4	
C-21	66.3	
C-16 C-O	61.3	
C-3'	18.7	
C-2'	44.4	
C-18	15.3	
C-19	17.3	
DART (m/z) (Espectro 7.4)		
M ⁺ + 1	581	

Tabla 9. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 21-(2-(3-benzoilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

9.3.6 Síntesis y caracterización del híbrido de 21-(1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina)carboxiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6d**)



En un matraz bola de fondo redondo de 20 mL se disolvieron 0.119 g (0.58 mmol) de DCC, 0.078 g (0.58 mmol) de DMAP y 0.58 mmol de ácido-1-(\pm)-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina)carboxílico (**d**) en 10 mL de AcOEt y la solución se agitó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.1 mg (0.29 mmol) de **5** y la mezcla se agitó por tres horas a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, hasta el consumo total de la materia prima. Una vez terminada la reacción, se filtró al vacío y la fase orgánica se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 15%; posteriormente, con una solución saturada de NaHCO₃, (3 x 15 mL), finalmente se lavó con 20 mL de agua destilada; la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se empacó en una columna de Florisil para la purificación del compuesto con una mezcla Hex :AcOEt (9:1). Se obtuvo un sólido blanco.

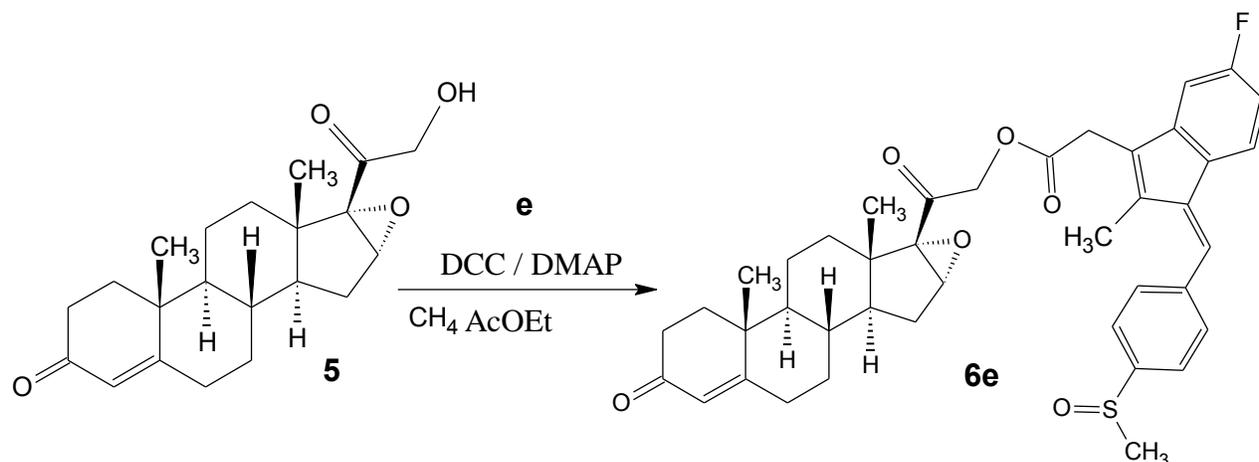


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₃₆ H ₃₉ NO ₆
Peso molecular	581.7 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	118-121 °C
Rendimiento	45%

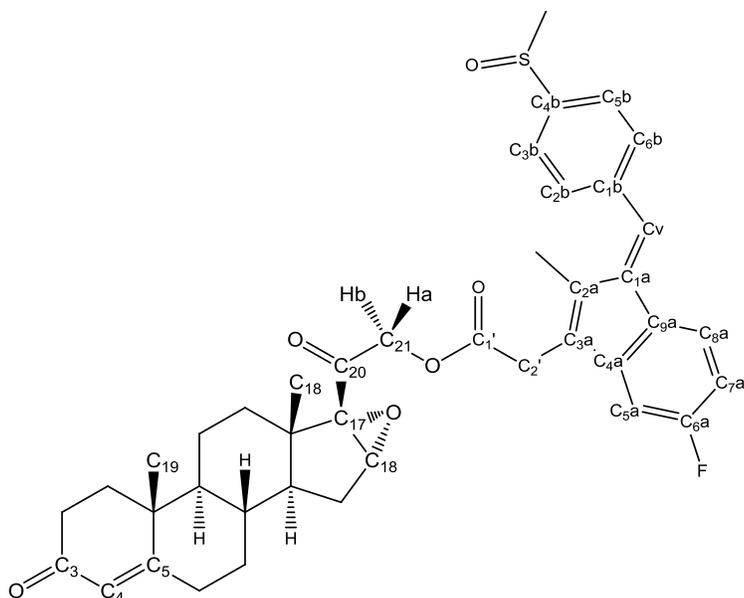
IR (cm ⁻¹) (Espectro 8.1)		
Valor N° de onda (ν)	Asignación de grupo funcional	
3056	C-H de aromático	
2934-2855	C-H de metilos y metilenos	
1748	C=O de éster	
1723	C=O de cetona C-20	
1665	C=O α,β-insaturado C-3 y C-4	
1621	C-C de aromáticos	
1431	C-H de metilenos	
1335	C-C-O de cetona	
1233	C-O de epóxido en C-16	
1268 y 1175	C-O de éster	
RMN ¹ H (Espectro 8.2)		
Protón	δ(ppm)	Multiplicidad
H -3a y 7a	7.81	d, J = 10.4 Hz, 2H
H -5a	7.52	t, J = 7.2 Hz, 1H
H -4a y 6a	7.44	t, J = 7.4 Hz, 2H
H -6'	6.83	d, J = 9.8, 1H
H -7'	6.16	dd, J = 10.4, 4 Hz, 1H
H -4	5.72	s, 1H
Ha-21	4.75	d, J = 6.1 Hz, 1H
Hb -21	4.66	d, J = 6.2 Hz, 1H
CH ₂ -3'	4.60 - 4.54	m, 2H
H de C-1'	4.45	dd, J = 11.2, 7.3 Hz, 1H
H -16	3.79	s, 1H
CH ₂ -2'	3.00 - 2.86	m, 2H
CH ₃ -19	1.19	s, 3H
CH ₃ -18	1.14	s, 3H
RMN ¹³ C (Espectro 8.3)		
Carbono	δ(ppm)	
C-20	199.4	
C-3	198.5	
C-1a	196.5	
C-1 éster	171.2	
C-5	170	
C-8'	142.1	
C-2a	139.2	
C-5'	131.5	
C-5a	129.8	
C-3a	128.2	
C-6a	127.8	
C-6'	124.2	
C-4	125.1	
C-7'	103.5	
C-17	70.4	
C-21	66.7	
C-16	61.6	
C-3'	18.7	
C-2'	44.4	
C-18	15.3	
C-19	17.3	
DART (m/z) (Espectro 8.4)		
M ⁺ + 1	582	

Tabla 10. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 21-(1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolisina)carboxiloxi-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

9.3.7 Síntesis y caracterización del híbrido 21-(2-((1Z)-5-fluoro-2-metil-1-(4-(metilsulfinil)benziliden))-1H-inden-3-il)acetoxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6e**)



En un matraz bola de fondo redondo de 20 mL se disolvieron 0.179 g (0.87 mmol) de DCC, 0.106 g (0.87 mmol) de DMAP y 0.87 mmol de ácido (1Z)-5-fluoro-2-metil-1-[4-(metilsulfinil)benzilideno]-1H-indeno-3-il)acético (**e**) en 15 mL de AcOEt y la solución se agitó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.1g (0.29 mmol) de **5** y la mezcla se agitó por cinco horas a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, hasta el consumo total de la materia prima. Una vez terminada la reacción, se filtró al vacío y la fase orgánica se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 15%; posteriormente, con una solución saturada de NaHCO₃, (3 x 15 mL), finalmente se lavó con 20 mL de agua destilada; la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se empacó en una columna de Florisil para la purificación del compuesto con una mezcla hexano:AcOEt (75:25). Se obtuvo un sólido amarillo y cristalino.



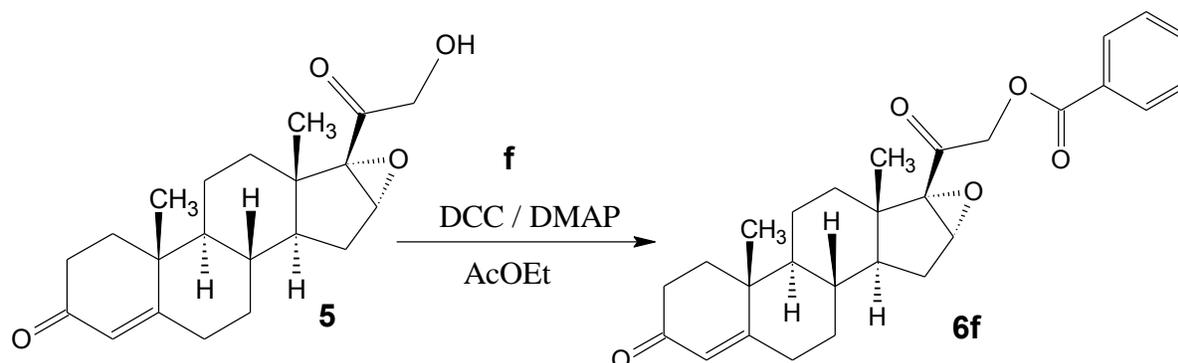
Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₄₂ H ₄₆ O ₆ S
Peso molecular	678.5 g /mol
Aspecto	Polvo amarillo cristalino
Punto de fusión	121-124°C
Rendimiento	50%

IR (cm ⁻¹) (Espectro 9.1)		
Valor N° de onda (ν)	Asignación de grupo funcional	
3056	C-H de aromático	
2932-2856	C-H de metilos y metilenos	
1723	C=O de éster	
1698	C=O de cetona C-20	
1662	C=O α,β-insaturado C-3 y C-4	
1602	C-C de aromáticos	
1466	C-H de metilenos	
1374	C-C-O de cetona	
1230	C-O de epóxido en C-16	
1087	S=O sulfóxido	
1151 y 1045	C-O de éster	
-800	p-sustitución	
RMN ¹ H (Espectro 9.2)		
Protón	δ(ppm)	Multiplicidad
H-v (vinílico sulindaco)	7.73	s, 1H
H-2b y H- 6b	7.69	d, J = 9.5 Hz, 2H
H-3b y H-5b	7.65	d, J = 6 Hz, 2H
H-8a	7.13	d, J = 5.3 Hz, 1H
H-5a	6.91	dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H
C-7a	6.55	td, J = 8.7, 2.4, 4 Hz, 1H
H -4	5.72	s, 1H
Ha-21	4.75	d, J = 17.1 Hz, 1H
Hb -21	4.66	d, J = 17.2 Hz, 1H
H -16	3.68	s, 1H
CH ₂ -2'	3.00 – 2.86	m, 2H
CH ₃ -4b (del sulfoxido)	2.81	s, 3H
CH ₃ -2a (metilo)	2.21	s, 3H
CH ₃ -19	1.19	s, 3H
CH ₃ -18	1.14	s, 3H
RMN ¹³ C (Espectro 9.3)		
Carbono	δ(ppm)	
C-20 C=O	199.1	
C-3 C=O	198.3	
C-5 C=C	171.1	
C-éster	169.5	
C-6a (de fluor)	163.2 (d, J= 246 Hz)	
C-1a	141.4	
C-2b y C-6b	130	
C-3b y C-5b	123.9	
C-8a	123.3	
C-7a	110.7	
C-5a	105..8	
C-4 C=C	123.6	
C-17 C-O	70.1	
C-21	66.2	
C-16 C-O	61.2	
CH ₃ -SO	43.7	
CH ₃ en C-2a	17.1	
C-18	10.3	
C-19	15.2	
DART (m/z) (Espectro 9.4)		
M ⁺ + 1	679	

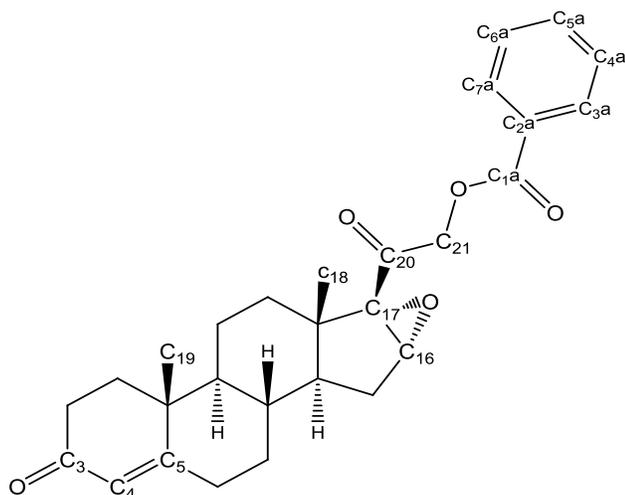
Tabla 11. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 21-(2-((1Z)-5-fluoro-2-metil-1-(4-(metilsulfinil) benziliden))-1H-inden-3-il)acetoxi)-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona

Se sintetizarán dos compuestos más con el fin de observar el efecto estérico en C-21 de un grupo voluminoso sencillo sin actividad biológica como el ácido benzoico (**f**) y un grupo pequeño sin actividad biológica como el grupo acetilo (**g**)

9.3.8 Síntesis y caracterización de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6f**)



En un matraz bola de fondo redondo de 20 mL se disolvieron disolvieron 0.089 g (0.435 mmol) de DCC, 0.053 g (0.435 mmol) de DMAP y 0.435 mmol de ácido benzoico (**f**) en 10 mL AcOEt y la solución se agitó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.1 g (0.29 mmol) de **5** y la mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, hasta el consumo total de la materia prima. Una vez terminada la reacción, se filtró al vacío y la fase orgánica se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 15%; posteriormente, con una solución saturada de NaHCO₃, (3 x 15 mL), finalmente se lavó con 20 mL de agua destilada. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó en rotaevaporador y el sólido se recrystalizó de MeOH. Se obtuvo un sólido blanco cristalino.

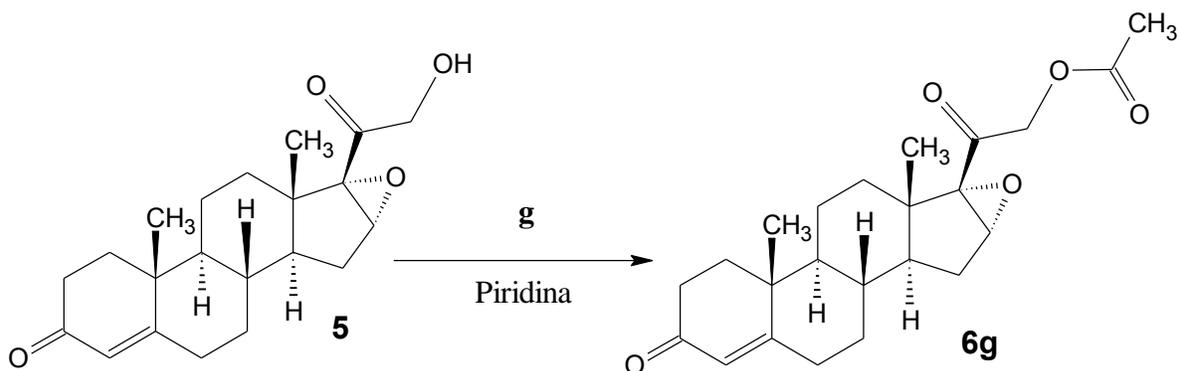


Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₂ O ₅
Peso molecular	448.5 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	203-205°C
Rendimiento	46%

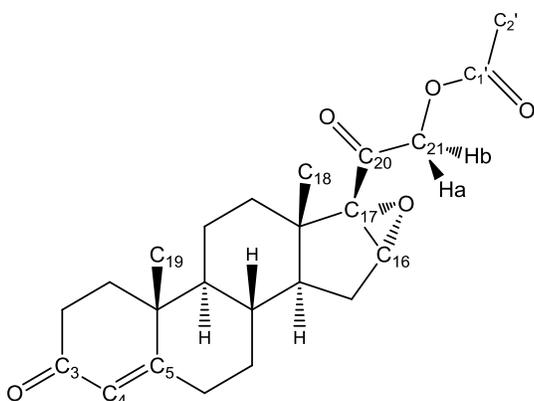
IR (cm ⁻¹) (Espectro 10.1)		
Valor N° de onda (v)	Asignación de grupo funcional	
3027	C-H aromático	
2979-2853	C-H de metilos y metilenos	
1730	C=O de éster	
1711	C=O de cetona C-20	
1670	C=O α,β -insaturado C-3 y C-4	
1104	C-C de aromáticos	
1450	C-H de metilenos	
1383	C-C-O de cetona	
1248	C-O de epóxido en C-16	
1269 y 1104	C-O de éster	
RMN ¹ H (Espectro 10.2)		
Protón	δ (ppm)	Multipliciad
H-3a y H-7a	8.08	dd, J = 8.2, 1.2 Hz, 2H
H-4a y H-6a	7.58	dd, J = 10.6, 4.3 Hz, 1H
H-5 ^a	7.45	t, J = 7.7 Hz, 2H
H -4	5.74	s, 1H
Ha-21	4.92	d, J = 17.3 Hz, 1H
Hb -21	4.85	d, J = 17.3 Hz, 1H
H -16	3.89	s, 1H
CH ₃ -19	1.19	s, 3H
CH ₃ -18	1.18	s, 3H
RMN ¹³ C (Espectro 10.3)		
Carbono	δ (ppm)	
C-20	199.1	
C-3	198.3	
C-5	170.8	
C-1a	166.4	
C-4	124.7	
C-3a a C-7a	133-128	
C-17	70.8	
C-21	66.7	
C-16	61.9	
C-18	17.9	
C-19	15.9	
DART (m/z) (Espectro 10.4)		
M ⁺ + 1	449	

Tabla 12. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 21-benzoilato-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

9.3.9 Síntesis de 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**6g**)



En un matraz bola de fondo redondo de 20 mL se disolvieron 0.41 mL (0.435 mmol) de anhídrido acético (**g**) y 2 mL de piridina, la solución se agitó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.1 g (0.29 mmol) de **5** y la mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, hasta el consumo total de la materia prima. Una vez terminada la reacción, se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 15%; posteriormente, con una solución saturada de NaHCO₃, (3 x 15 mL), finalmente se lavó con 20 mL de agua destilada. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó en rotaevaporador y el sólido se recrystalizó de metanol. Se obtuvo un sólido blanco y cristalino



Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₀ O ₆
Peso molecular	386.4 g/mol
Aspecto	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	159 - 161°C
Rendimiento	70%

(IR cm⁻¹) (Espectro 11.1)		
Valor N° de onda (v)	Asignación de grupo funcional	
3027	C-H vinílico	
2927-2853	C-H de metilos y metilenos	
1754	C=O de éster	
1725	C=O de cetona C-20	
1666	C=O α,β -insaturado C-3 y C-4	
1067	C-C de aromáticos	
1423	C-H de metilenos	
1381	C-C-O de cetona	
1269	C-O de epóxido en C-16	
1225 y 1059	C-O de éster	
RMN ¹H (Espectro 11.2)		
Protón	δ(ppm)	Multiplicidad
H-4	5.74	s, 1H
Ha-21	4.70	d, J = 17.3 Hz, 1H
Hb-21	4.62	d, J = 17.3 Hz, 1H
H -16	3.82	s, 1H
CH ₃ -2'	2.17	s, 3H
CH ₃ -19	1.21	s, 3H
CH ₃ -18	1.16	s, 3H
RMN ¹³C (Espectro 11.3)		
Carbono	δ(ppm)	
C-20	199.3	
C-3	198.3	
C-5	170.1	
C-1a	171.3	
C-4	123.9	
C-17	70.9	
C-21	65.6	
C-16	61.2	
C-2 ^a	20.17	
C-18	17.9	
C-19	15.9	
EM-FAB⁺ (m/z) (Espectro 11.4)		
M⁺+ 1	387	

Tabla 13. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona.

9.4 Ensayos biológicos

9.4.1 Ensayo de actividad antiproliferativa en líneas celulares PC-3 y LNCaP

El bioensayo se realizó por medio del método colorimétrico con sulforrodamina B (SRB), donde se determinó la viabilidad de la célula después de su tratamiento con los compuestos sintetizados, las líneas celulares cancerígenas utilizadas fueron PC-3 (cáncer de próstata independiente de andrógenos) y LNCaP (cáncer de próstata dependiente de andrógenos).

En una placa tituladora de 96 pozos, se inocularon 100 μ L de medio celular con una densidad ajustada de 1×10^6 cel/mL para PC-3 y 3×10^4 para LNCaP, la placa fue preincubada por 24 hrs a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de las células antes de adicionar las sustancias a probarse.

Posteriormente se añadieron por triplicado 100 μ L de una solución 20 mM del compuesto a evaluar disuelto en DMSO, teniendo así, una concentración final de 50 μ M y se colocaron pozos testigo que solo contenían los compuestos, esta placa se dejó incubar por 48 hrs. Del mismo modo se realizó una placa tituladora control con 100 μ L de inóculo y 100 μ L de medio DMSO y se incubó por 1 hora.

Una vez finalizado el periodo de incubación de los compuestos con las células, a cada pozo se le añadió *in situ* 50 μ L de una solución de ácido tricloroacético frío al 50 %, posteriormente la placa se incubó a 4 °C por 60 minutos y se desechó el sobrenadante, finalmente se lavó 5 veces con agua desionizada.

Se añadieron en los pozos 100 μ L de una solución al 0.4% de sulforrodamida B (SRB) y se dejó la placa en reposo por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados con ácido acético al 1 % y se dejó secar a temperatura ambiente. A los pozos teñidos se les agregaron 100 μ L de un buffer de tris salino y se agitaron por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; a continuación se midió la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm.

Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la densidad óptica de los 3 pozos de cada línea, tratados con el compuesto, los 3 pozos tratados con DMSO y los pozos testigos. El porcentaje de inhibición del crecimiento se obtuvo con la siguiente ecuación:

$\% \text{ IC} = 100 - (\text{densidad óptica del compuesto prueba} - \text{densidad óptica de los pozos testigos} / \text{densidad óptica de pozos con DMSO} - \text{densidad óptica de los pozos testigo})$

9.4.2 Evaluación de citotoxicidad en células mononucleares (sanas)

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), son aquellas que se caracterizan por tener sólo un núcleo redondo como los linfocitos o los monocitos. Estas células sanguíneas se obtienen de la sangre, usando un medio de separación (ficoll hypaque de densidad 1.078 g / mL) y por gradientes de centrifugación, se separa la sangre en varios extractos celulares, donde los monocitos y linfocitos forman un anillo translucido por encima de los eritrocitos y por debajo de la capa del plasma. Para conseguir la separación, la muestra de sangre se deposita sobre el medio de separación y se centrifuga para acelerar la separación, el medio aglutina a los eritrocitos.

Para la obtención de las células mononucleares, se emplearon ratas Wistar macho de 250-300g que fueron anestesiadas con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal. Una vez que el animal estuvo completamente anestesiado, en condiciones de asepsia, se procedió a limpiar con etanol la parte torácica y se introdujo una aguja con su respectiva jeringa de 10 mL cargada con 1 ml de heparina. Se extrajeron 9 mL de sangre por punción cardiaca y se mezcló suavemente, para impedir la formación de coágulos.

En tubos cónicos de vidrio, a los cuáles previamente se les añadió 3 mL del medio de separación, se depositaron lentamente 3 mL de sangre sin diluir, evitando que se mezclara la sangre y el medio de separación; posteriormente, los tubos se centrifugaron en un rotor oscilante a temperatura ambiente, iniciando con una velocidad de centrifugación de 500 g y se incrementó hasta alcanzar 2000 g durante 20 min. Una vez que terminó la centrifugación, se recolectó la fracción mononuclear con una pipeta Pasteur, se depositó en los tubos cónicos, se adicionó buffer de fosfato (PBS) pH 7.2, y se procedió a centrifugar a 2500 g por 5 minutos. Una vez que terminó la centrifugación, el sobrenadante se decantó, se agregó PBS para resuspender el pellet y se centrifugó nuevamente, para eliminar los restos del medio de separación. El pellet celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI y se determinó la viabilidad de las células usando azul de tripano, ajustando la densidad de las CMSP a 1×10^6 cel/mL.

En placas de 96 pozos, se depositaron 100 μ L de las CMSP y se incubaron durante 1 h. Después del tiempo de incubación, se adicionó el compuesto de prueba a la concentración de 50 μ M en un volumen de 100 μ L y se incubó de nueva cuenta, en una atmósfera de CO₂ a 37°C durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron con una solución de ácido tricloroacético frío al 50% por 1 h a 4°C, se lavaron tres veces con agua de la llave y se dejaron secar a temperatura ambiente. Enseguida, se tiñeron con sulforrodamina B (SRB) y se lavaron con una solución de ácido acético al 1 %. Una vez secas las placas, se añadió 100 μ L de un buffer de Tris, para favorecer la solubilidad de la SRB, y se determinaron en un lector de Elisa a una longitud de onda de 515 nm. La toxicidad celular se determinó mediante la ecuación descrita en el apartado 9.4.1.

9.4.1 Ensayo de actividad antiinflamatoria con ATF

Se evaluó la actividad antiinflamatoria tisular de los compuestos híbridos, utilizando el método de edema auricular en ratón inducido por acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (ATF). Se utilizaron ratones hembras CD1 de entre 25 y 30 gramos de peso y se dividieron en grupos de 4 ratones. A la oreja izquierda de cada ratón se le aplicaron tópicamente 10 μ L, procedentes de una solución etanólica de TPA a una concentración de 0.125 μ g/ μ L; posteriormente, a esa misma oreja se le aplicaron 20 μ L de una solución 1 μ M/20 μ L del compuesto a evaluar disuelto en CH₂Cl₂. La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 10 μ L de etanol y 20 μ L CH₂Cl₂, esto para evaluar la diferencia de peso entre cada oreja considerando la tasa de variabilidad del disolvente.

En el grupo control se siguió el mismo procedimiento solo que no se le aplicó la solución con el compuesto a evaluar, únicamente se agregaron 20 μ L de CH₂Cl₂.

Después de 4 horas de la administración tópica de ATF y los compuestos híbridos, los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂ y con un sacabocados se extrajeron discos de 7 mm de diámetro de oreja para determinar su peso. La diferencia promedio de peso entre la oreja derecha e

izquierda de cada grupo se tomó como expresión del edema y se calculó el porcentaje de inhibición en los animales tratados.

9.5 Parámetros fisicoquímicos calculados

Compuesto	Ovalidad	Log P	Volumen molecular A ^{o3}	Polarizabilidad
2	1.437	3.53	347.4	67.191
5	1.454	2.83	359.8	67.794
6a	1.71	7.12	570.92	85.481
6b	1.669	6.34	576.2	86.176
6c	1.72	6.68	601.56	87.979
6d	1.676	3.64	592.3	87.375
6e	1.76	4.39	682	39.546
6f	1.591	4.96	461.95	76.584
6g	1.54	3.06	396.33	71.162

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos de las moléculas que fueron obtenidos con el software Spartan 8 por el método semiempírico a través de la optimización molecular.

10. REFERENCIAS

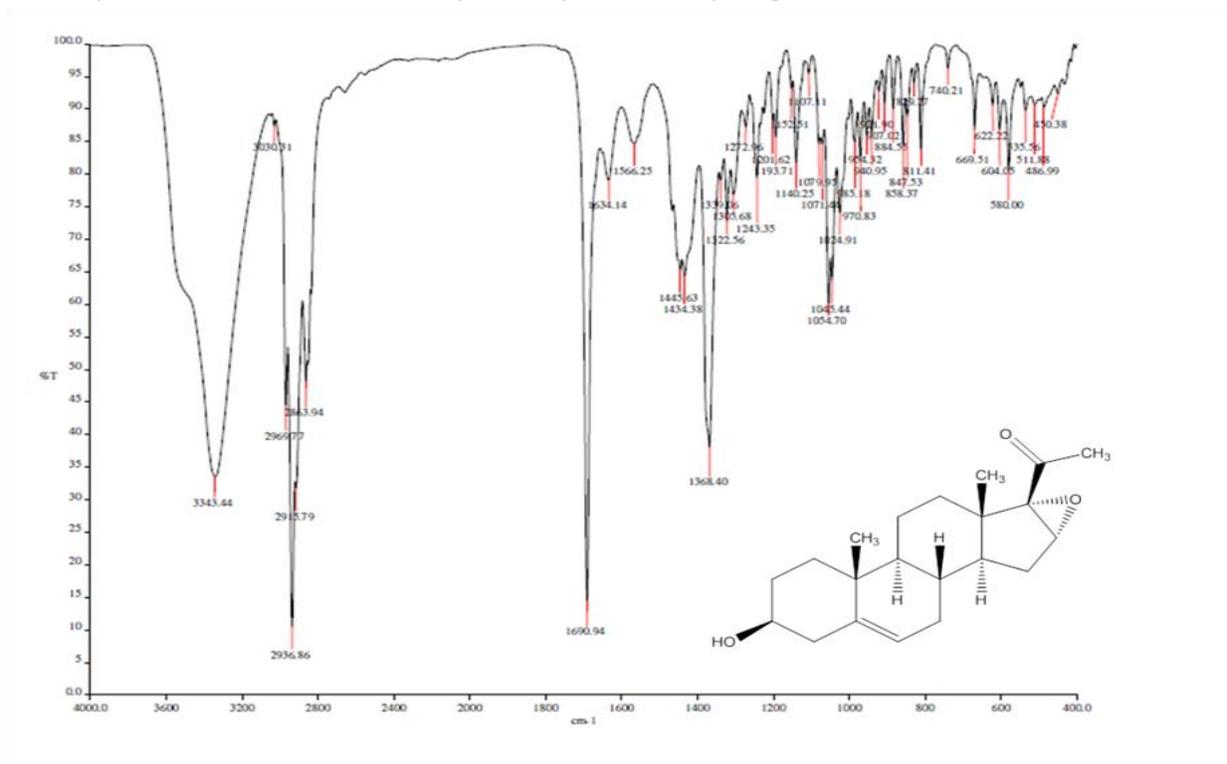
1. Wade, L.G. Química Orgánica, 5ª edición, Ed. Pearson Prentice Hall: España, 2006; 1172-1173.
2. Cabeza, M.; Brattoeff, E.; Ramírez, E.; Flores, E. Mecanismos de acción de antiandrógenos esteroidales, Serie Académicos CBS UAM, México D.F, 2004; p.12-16.
3. Calderon, D.; Brattoef, E.; Ramírez, E.; Dorado,V.; Hernández, E.; Trujillo, F. Ensayo de actividad antimutagénica de un nuevo esteroide sintético. *Arch. Neurocién.* **2010**, *15*, 156-159.
4. Rittmaster, R.S. 5 α -reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer risk reduction. *Best Pract Res Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *2*, 389-402.
5. Instituto Nacional de Cáncer. Cáncer de Próstata. Recuperado el 25 de febrero de 2015 de: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/prostata/Patient/page1>.
6. Welen, K.; Damber, J. Prostate diseases-role of sex steroids and their inhibitors. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *25*, 355-367.
7. Subsecretaria de prevención y promoción de la salud (SPPS), Los 5 tipos de cáncer que más afectan a los mexicanos Recuperado el 3 de febrero de 2015 de: <http://www.spps.gob.mx/>
8. Pennti, K.; Jean, D. Dihidrotestosterone in prostatic hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **2003**, *49*, 1737-1745.
9. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cancer". Recuperado el 5 de febrero de 2015 de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom>.
10. Simeng, W.; Yuanjie, N.; Lee, S. O.; Chawnshang, C. Androgen receptor (AR) positive vs. negative roles in prostate cancer cell deaths including, apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 31-40.
11. Kyprianou, N.; Kenya, S. Exploitation of the androgen receptor to overcome taxane resistance in advance prostate. *Adv. Cancer Res.* **2015**, *30*. 135-149.
12. Nacusi, L. P.; Tindall, D. Targeting 5 α -reductase for prostate cancer prevention and treatment. *Nat. Rev. Urol.* **2011**, *8*, 378-384.
13. Perez, V.; Cabeza, M.; Brattoef, E.; Ramírez, E.; New 5alpha-reductase inhibitors: in vitro and in vivo effects. *Steroids*, **2007**, *70*, 217-224.
14. Mendoza Jasso Ma. Eugenia, Síntesis y evaluación biológica de derivados de deshidroepiandrosterona con un grupo azol en C-17 y ésteres de cinamoilo en C-3. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, 2015.
15. Aggarwal, S.; Thareja, S.; Verma, A.; Bhardwaj, R. T.; Kumar, M. An Overview on 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*, **2010**, *136*, 109-153.

-
16. Durán, F.; Manzo, J.; Soto-Cid, A.; Aranda, G.E.; Juárez, E.; Coria-Ávila, G.A.; Toledo, R.; Locia, J.; Hernández, M.A. El receptor de andrógenos en la fisiopatología prostática. *Rev. Neurobiol.* **2011**, *2*, 1-15.
 17. Lázaro, M.; Hautot, C.; Mehio, M.; Jeandel, L.; Courei, M.; Voisin, T.; Couvineau, A.; Goblet, F.; Leprince, J.; Pfiter, C.; Anouar, Y.; Charte, N. Enzalutamide: A new prostate cancer targeted therapy against the androgen receptor. *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *50*, 2126-233.
 18. Tian, H.Y.; Yuan, X.; Jin, L.; Li, J.; Luo, Ch.; Ye, W.C.; Jiang, R. A bufadienolide derived androgen receptor antagonist in inhibitory activities against prostate cell cancer. *Chem. Bio. Interact.* **2014**, *207*, 16-22.
 19. Kindt, T.; Goldsby, R.; Osbore, B. *Inmunología de Kubly*, 6^a ed. Editorial Mc Graw Hill: México, 2007, p. 57-59.
 20. Farivar, H.; Kandzari, S.; Zaslau, S. Synergistic effects of Cox-1 and -2 inhibition on bladder and prostate cancer in vitro. *Am. J. Surg.* **2004**, *188*, 505-510.
 21. Thapa, D.; Gosh, R. Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *94*, 53-62.
 22. Liggett, J. L.; Zhang, X.; Eling, T. E.; Baek, S.J. Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase-independent targets. *Cancer Lett.* **2014**, *346*, 217-224.
 23. Sabichi, A.; Lippman, S.M. COX-2 Inhibitors and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in genitourinary cancer. *Sem. Oncol.* **2006**, *31*, 36-44.
 24. Andrews, J.; Djakiew, D.; Krygier, S.; Andrews, P. Superior effectiveness of ibuprofen compared with other NSAIDs for reducing the survival of human prostate cancer cell. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *50*, 277-284.
 25. Minnery, C.; Getzeberg, R. Benign prostatic hyperplasia cell line viability and modulation of JM-27 by doxazosin and ibuprofen. *J. Urol.* **2005**, *174*, 375-379.
 26. Longhin, P.; Ferreira, T.; Oliveira, E.; Dos Santos, J.; Chin, M. Anti-inflammatory drug design a molecular hybridation approach. *Pharm. Chem. J.* 2011, *4*, 1450-1474.
 27. Arellano, Y.; Brattoef, E.; Cabeza, M.; Soriano, J. New derivatives of dehydroepiandrosterone as 5 α -reductase inhibitors, *Steroids*, **2011**, *76*, 1241-1246.
 28. Aggarwal, S.; Thareja, S.; Verma, A.; Bhardwaj, R.T.; Kumar, M. Self organizing molecular field analysis on pregnane derivatives as human steroidal 5 α -reductase inhibitors, *Steroids*, **2011**, *75*, 411-418.

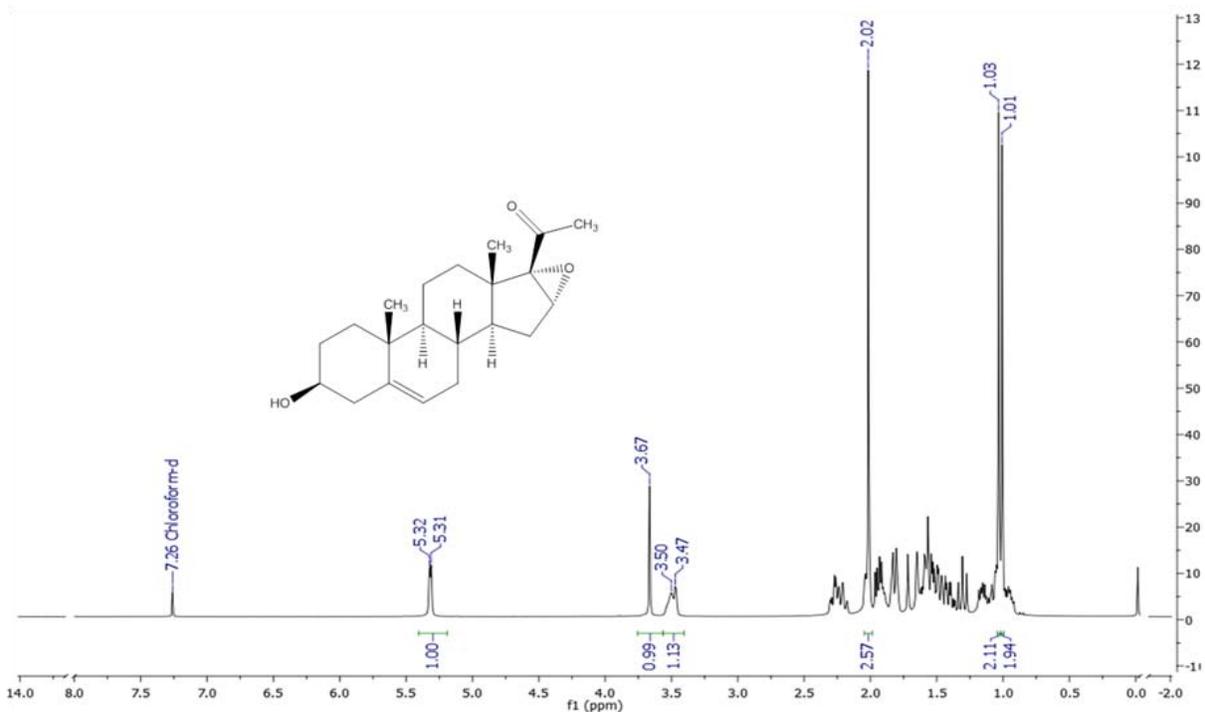
-
29. Lim, J.T.; Piazza, G.A.; Kyo-Ho, E.; Delohery, T.M.; Li, H.; Finn, T.S.; Buttyan, R.; Yammamoto, H.; Sperl, G.; Brendel, K.; Gross, P.H.; Pamukcu, R.; Weinstein, B. Sulindac derivatives Inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1097-1107.
 30. Chávez, A.; Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Soriano, M. Crystal Structure and Synthesis of 3 β -(*p*-Iodobenzoyloxy)-16 α ,17 α -epoxy pregn-4-en-6,20-dione. *CSTA*. **2014**, *3*, 39-47.
 31. Kürti, L.; Czakó, B. Strategic applications of named reactions in organic synthesis, 3^a ed. Editorial Elsevier Academic Press: USA, 2005; p. 320-321.
 32. Parkash, O.; Singh, S.P. Iodobenzene diacetate and related hypervalent iodine reagents in the synthesis of heterocyclic compounds. *Aldrichim. Acta*. **1994**, *27*, 15-23.
 33. Organic Chemistry Portal. Steglich esterification mechanism. Recuperado el 7 de abril de 2015 de: <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm>.
 34. Avedaño, C. Introducción a la química terapéutica, 2^a ed. Editorial Mc Graw Hill: España, 2001; p. 64-68.

ANEXOS

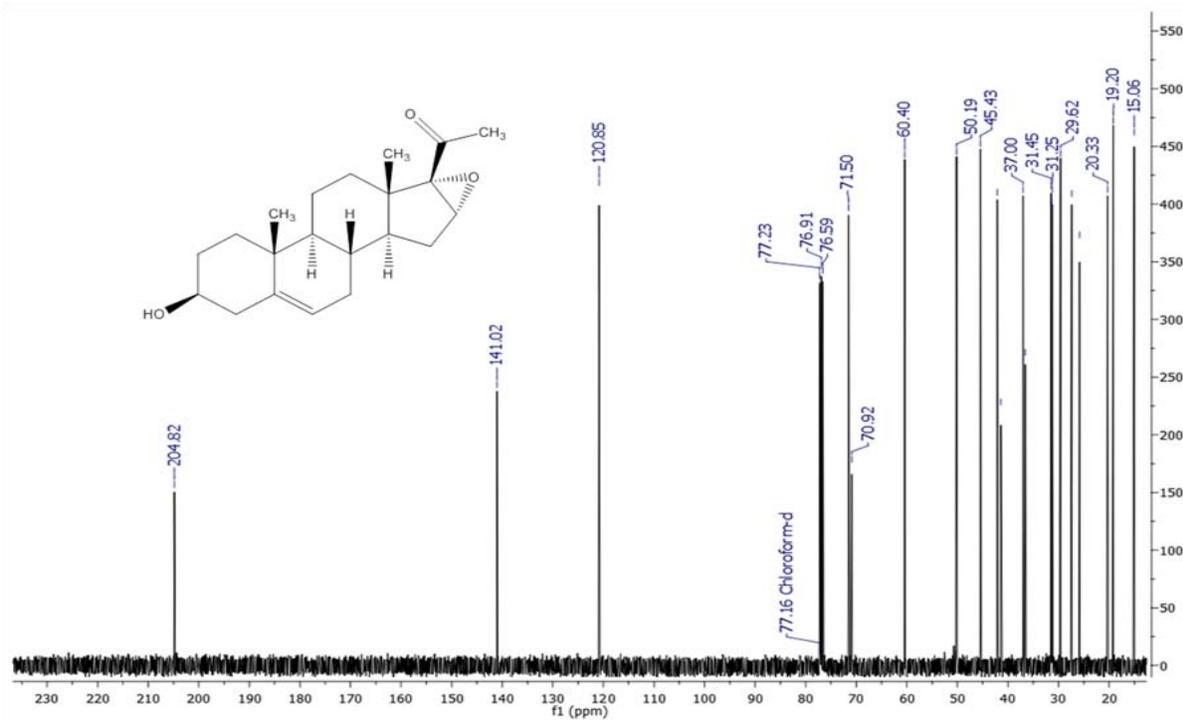
Espectros de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (1.1-1.4)



Espectro 1.1 IR



Espectro 1.2 RMN ¹H



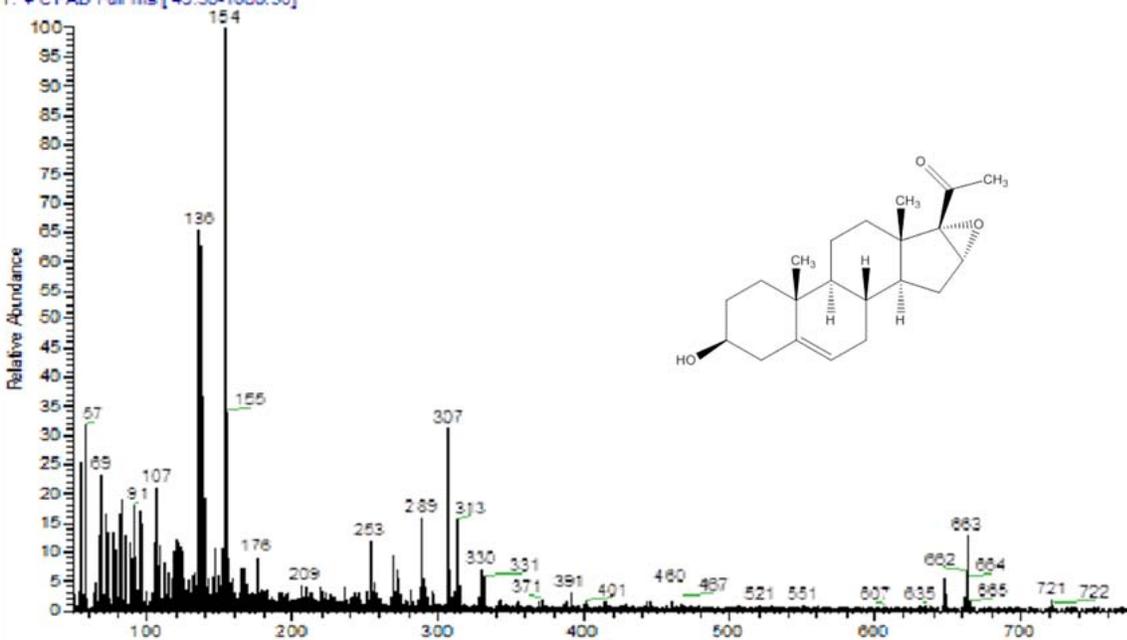
Espectro 1.3 RMN ^{13}C

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\ACR-2E_1_1
szComment

5/2/2014 10:41:55 AM

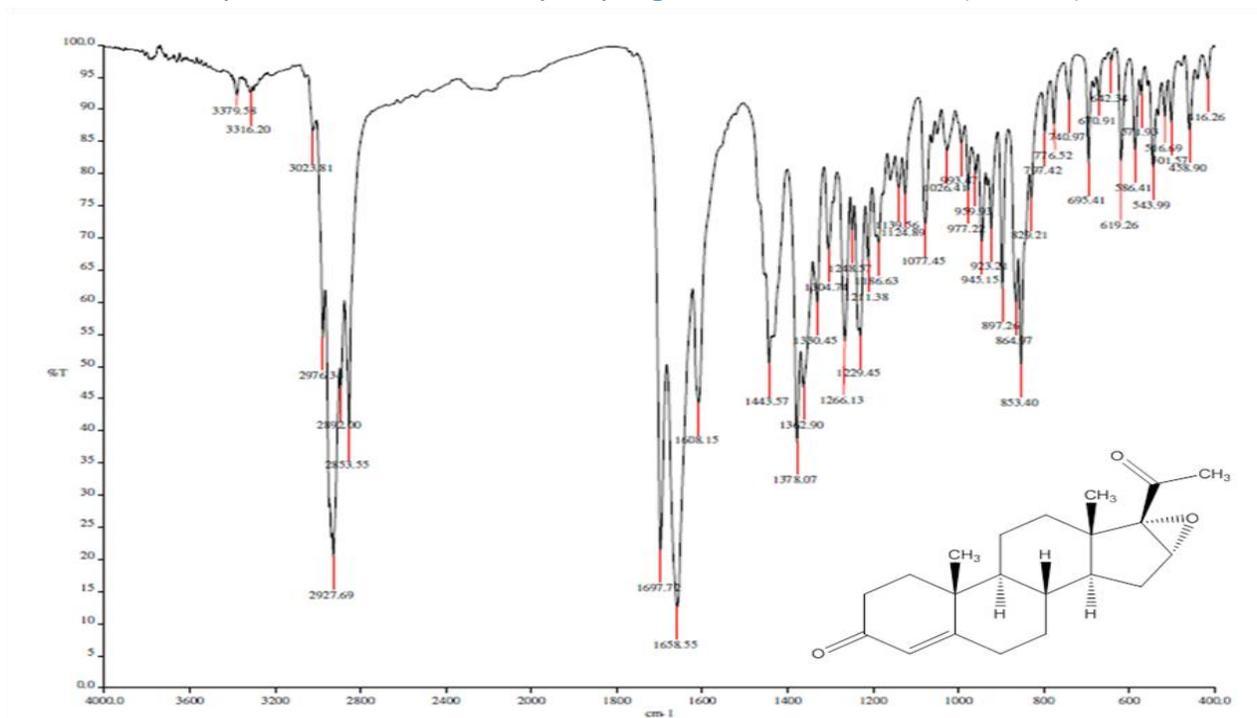
ACR-2E_1_1 #4-7 RT: 0.34-0.68 AV: 4 NL: 6.08E5

T: +c FAB Full ms [49.50-1000.50]

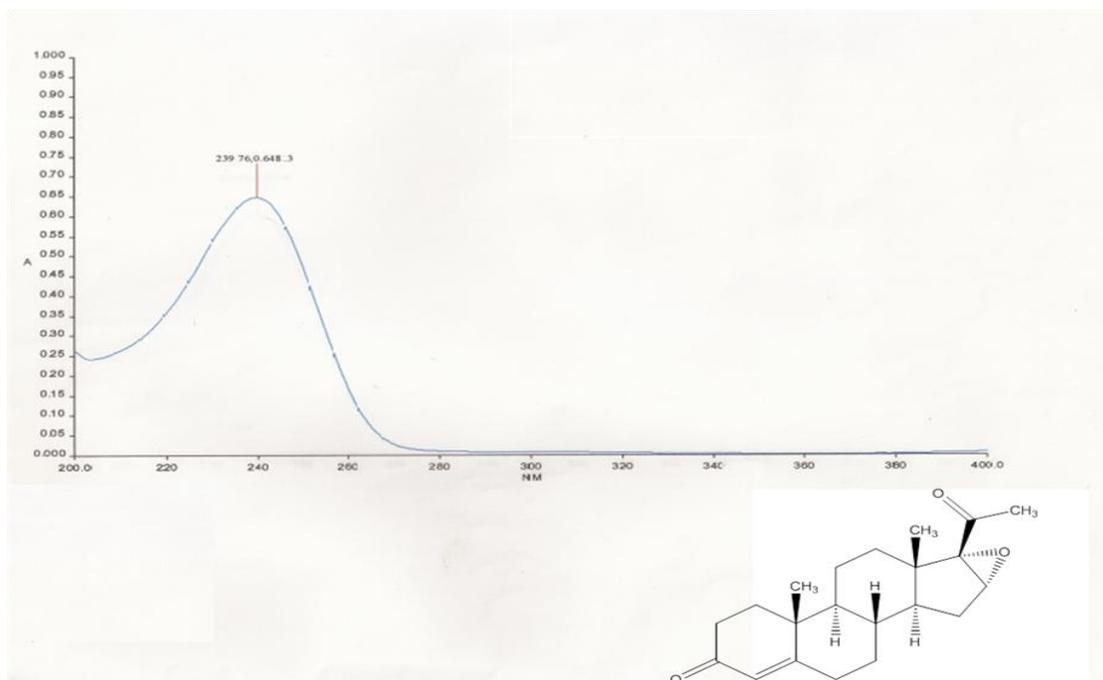


Espectro 1.4 EM

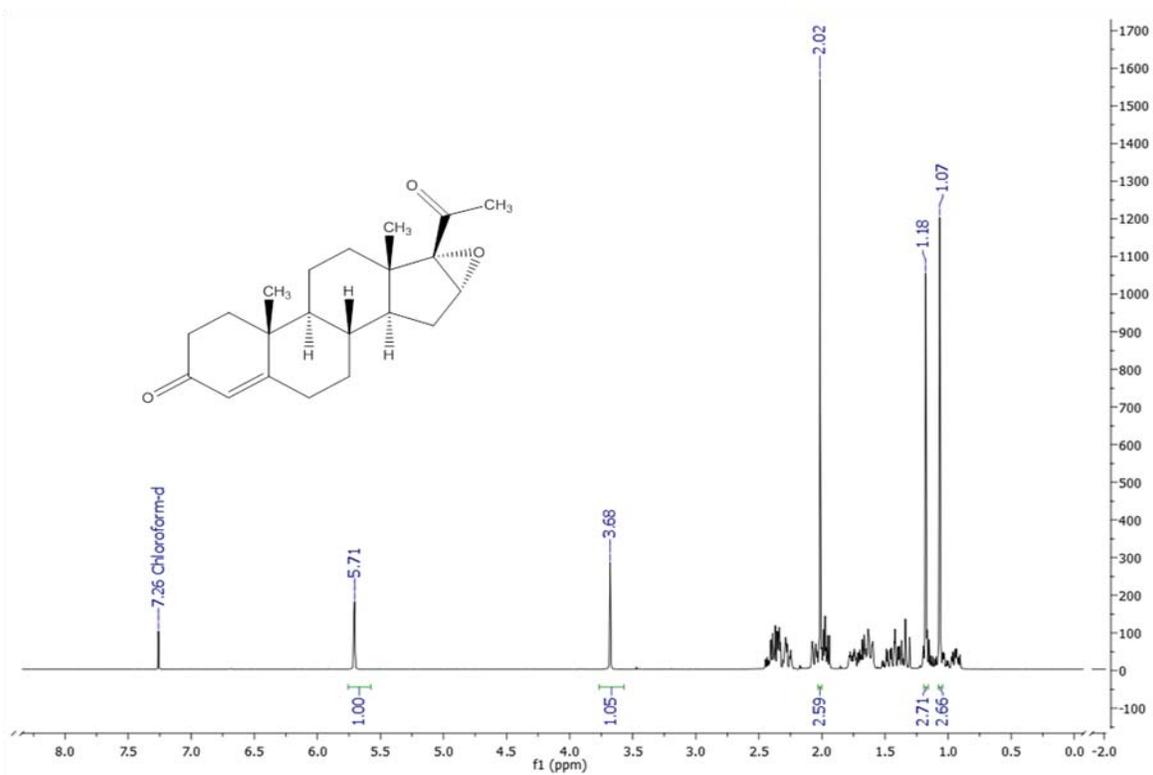
Espectros de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (2.1-2.5)



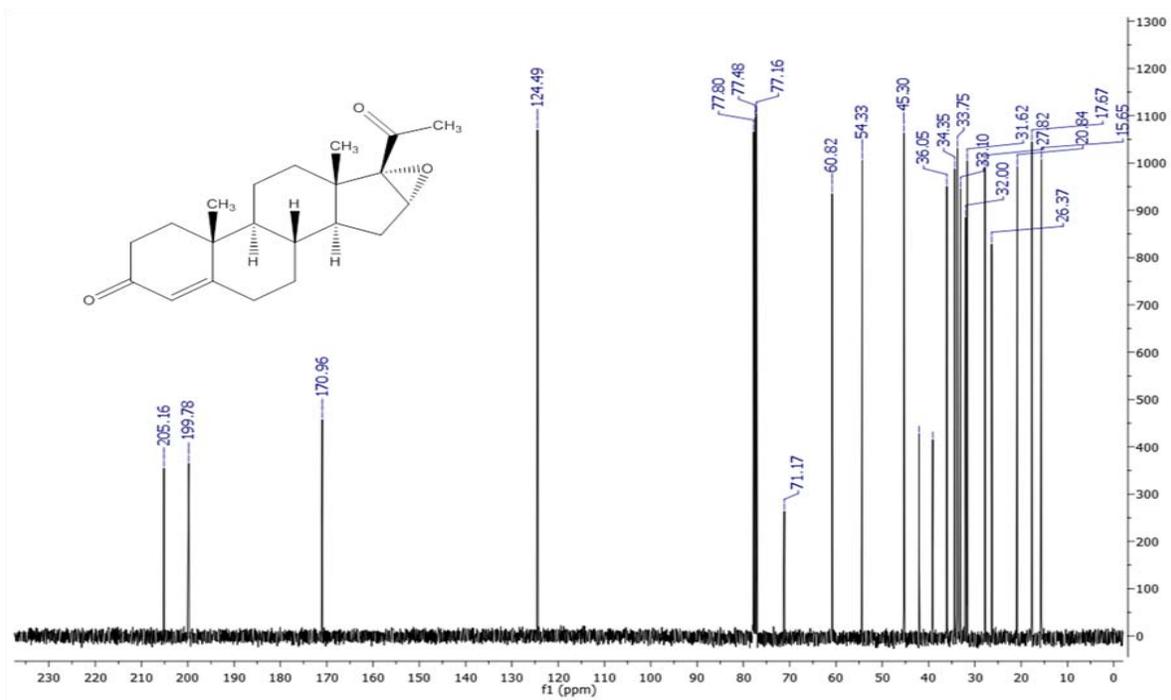
Espectro 2.1 IR



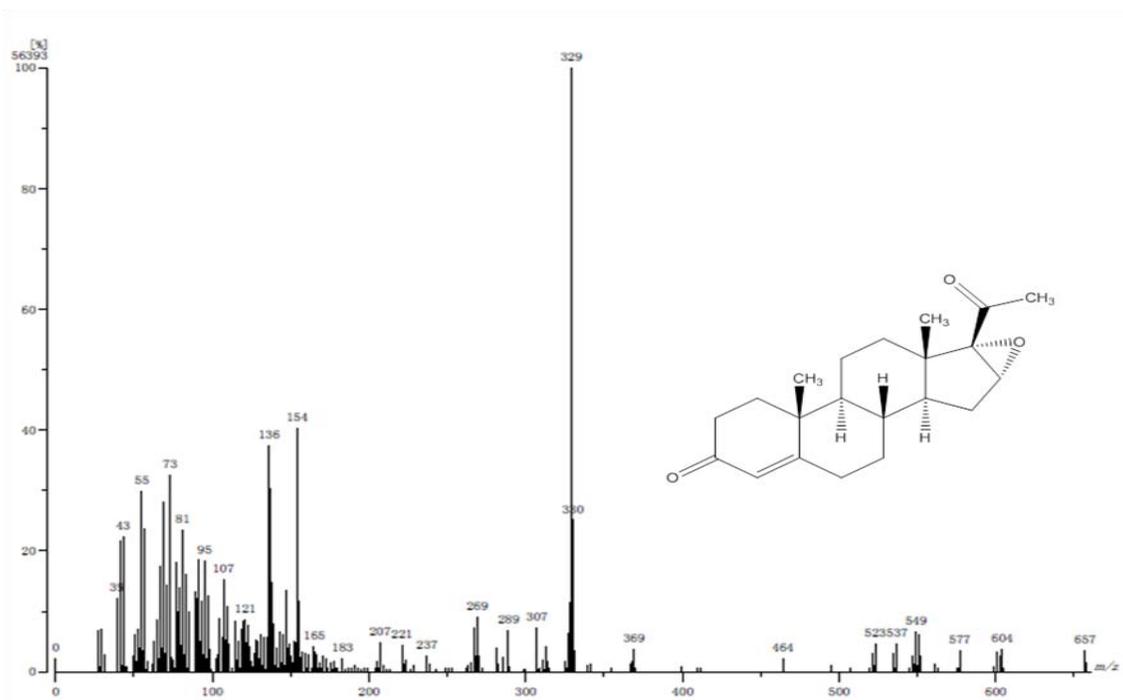
Espectro 2.2 UV



Espectro 2.3 RMN ^1H

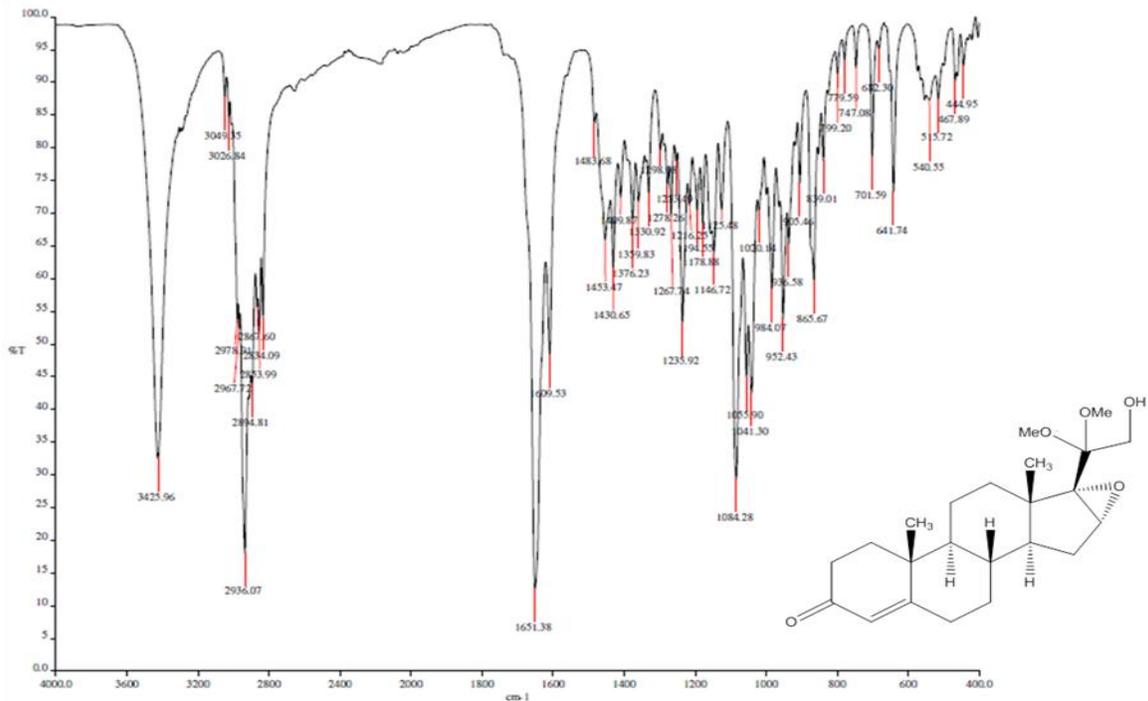


Espectro 2.4 RMN ^{13}C

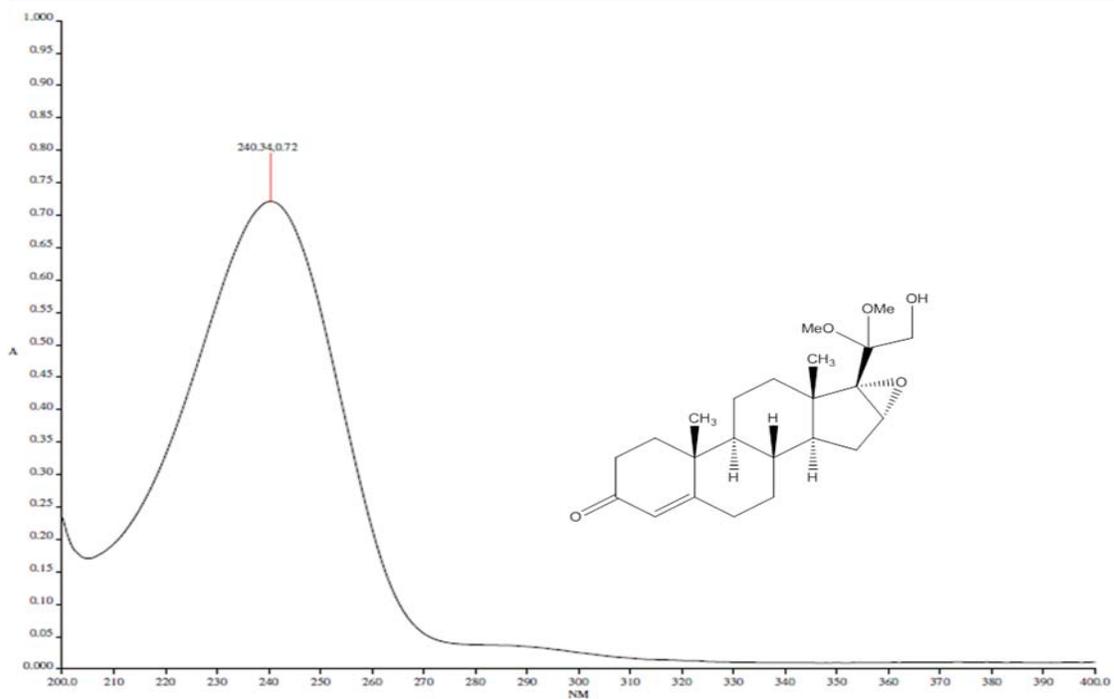


Espectro 2.5 EM

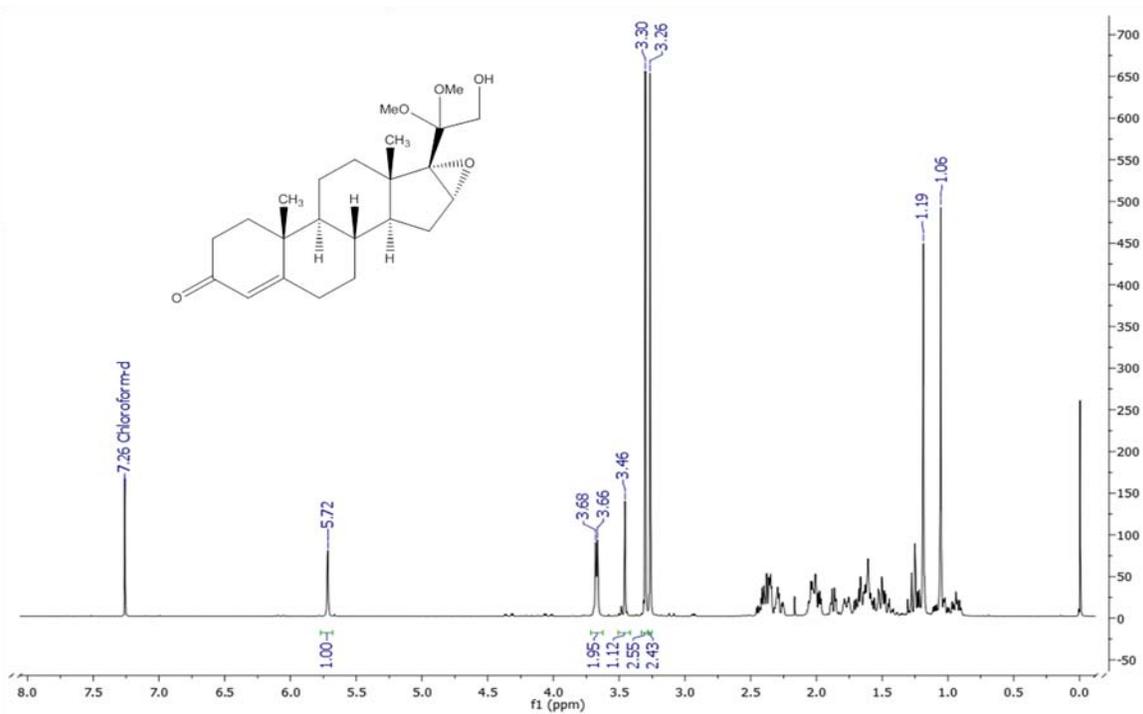
Espectros de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-eno-3-ona (3.1-3.5)



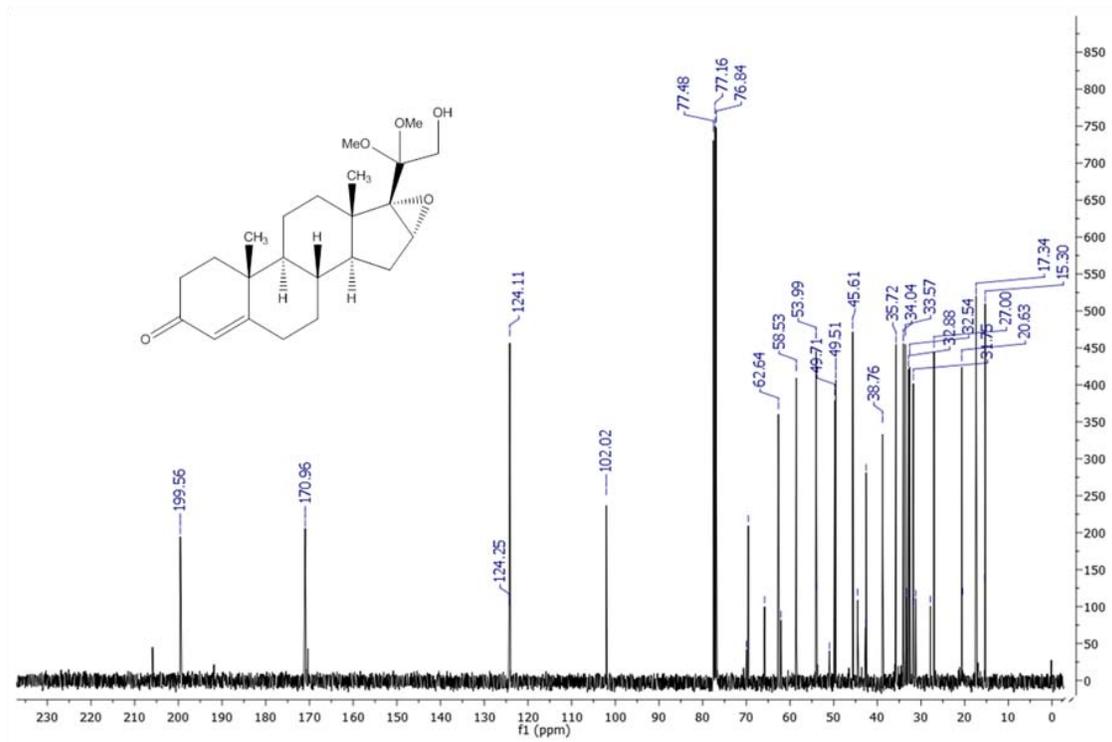
Espectro 3.1 IR



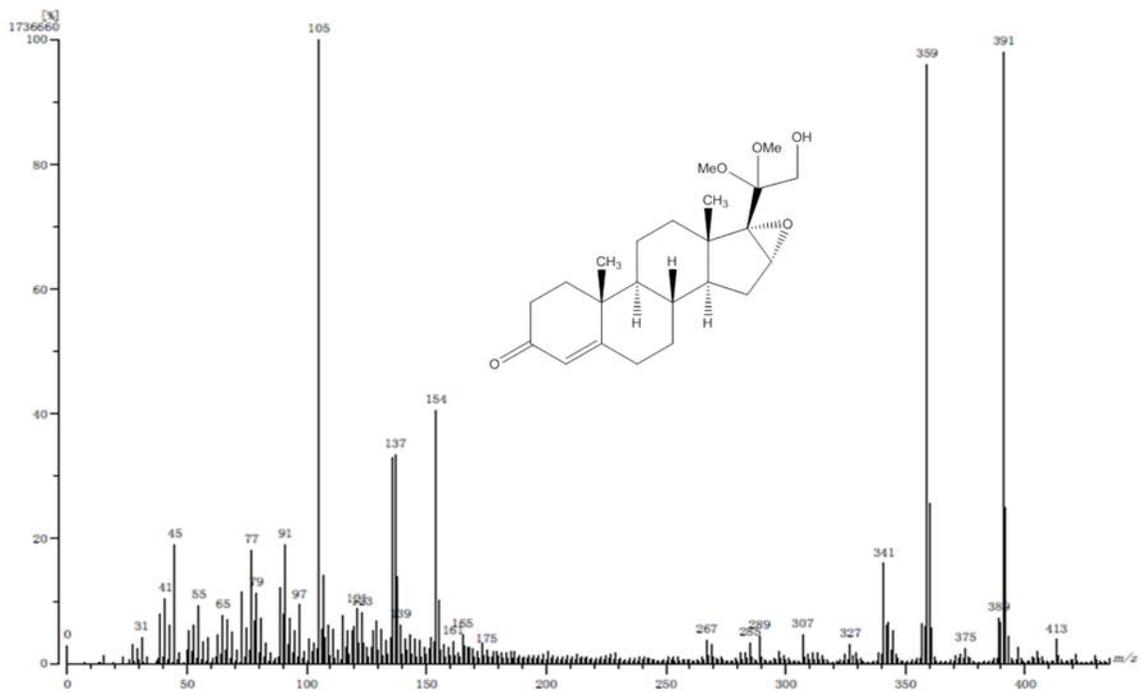
Espectro 3.2 UV



Espectro 3.3 RMN ¹H

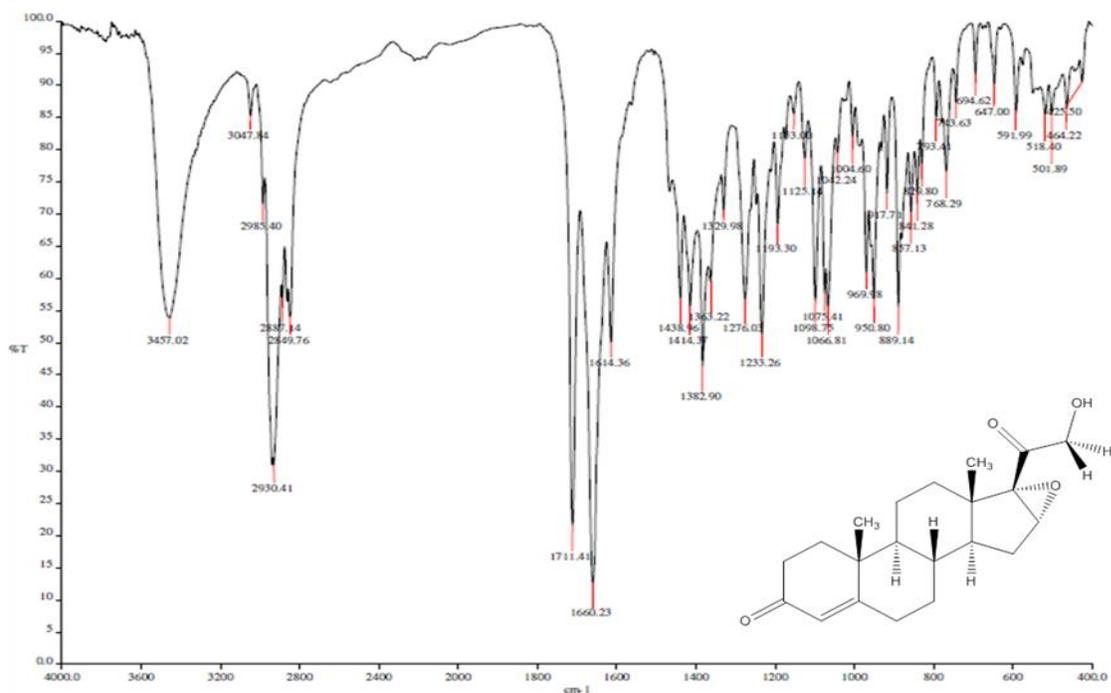


Espectro 3.4 RMN ^{13}C

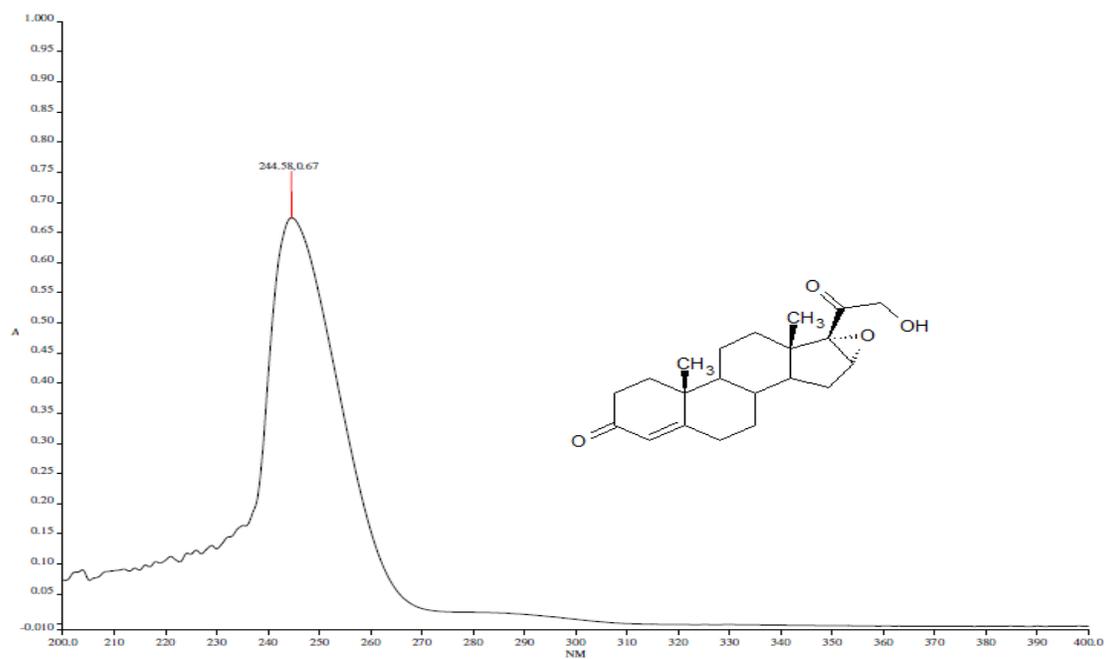


Espectro 3.5 EM

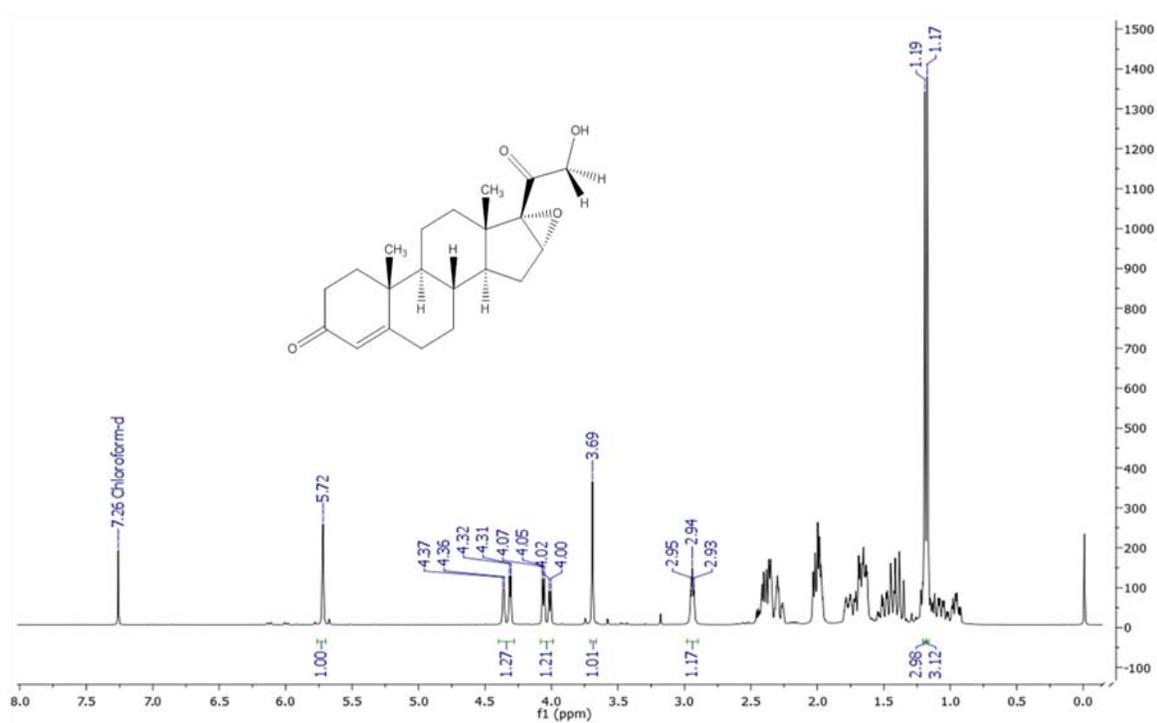
Espectros de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (4.1-4.6)



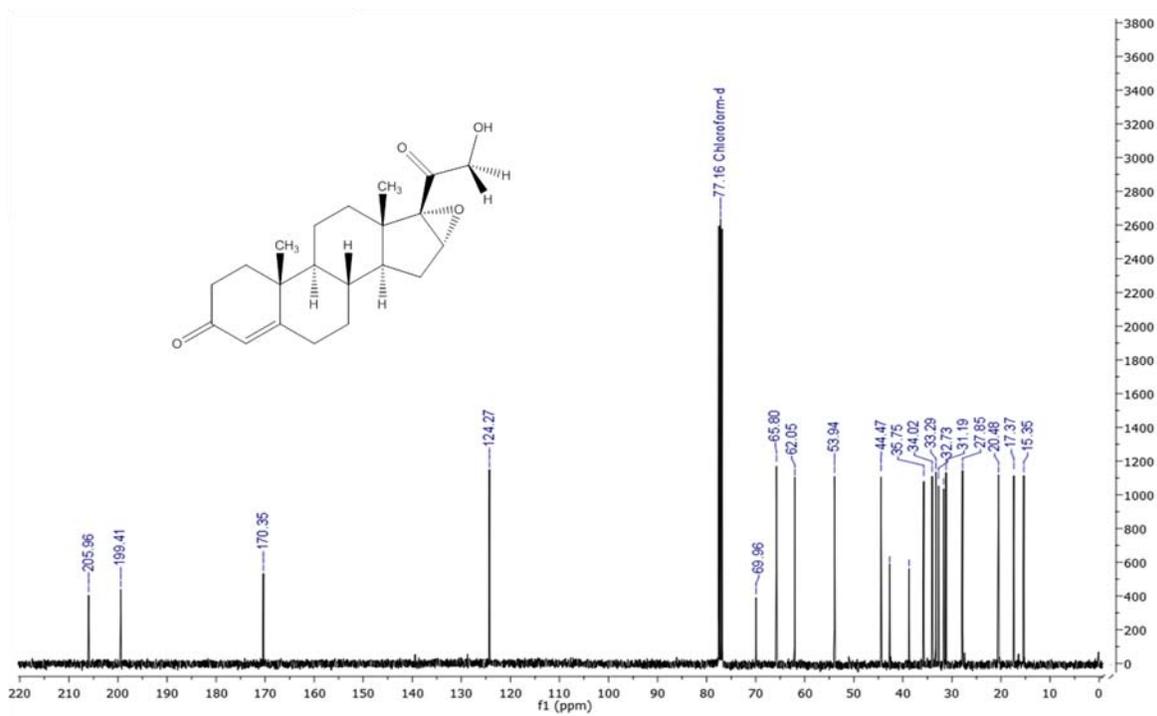
Espectro 4.1 IR



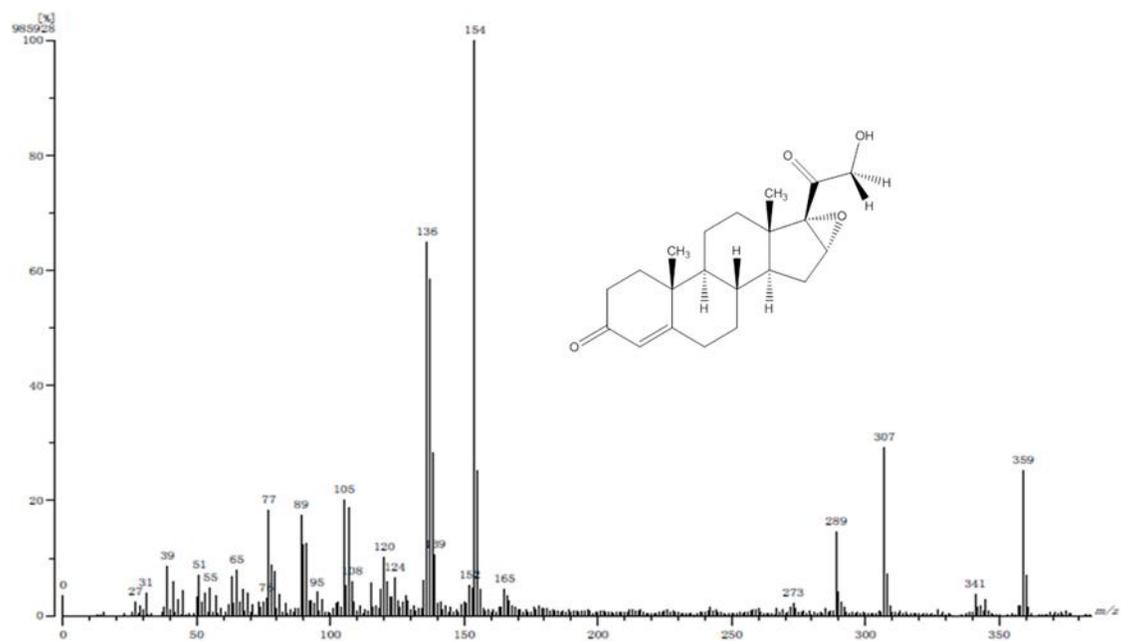
Espectro 4.2 UV



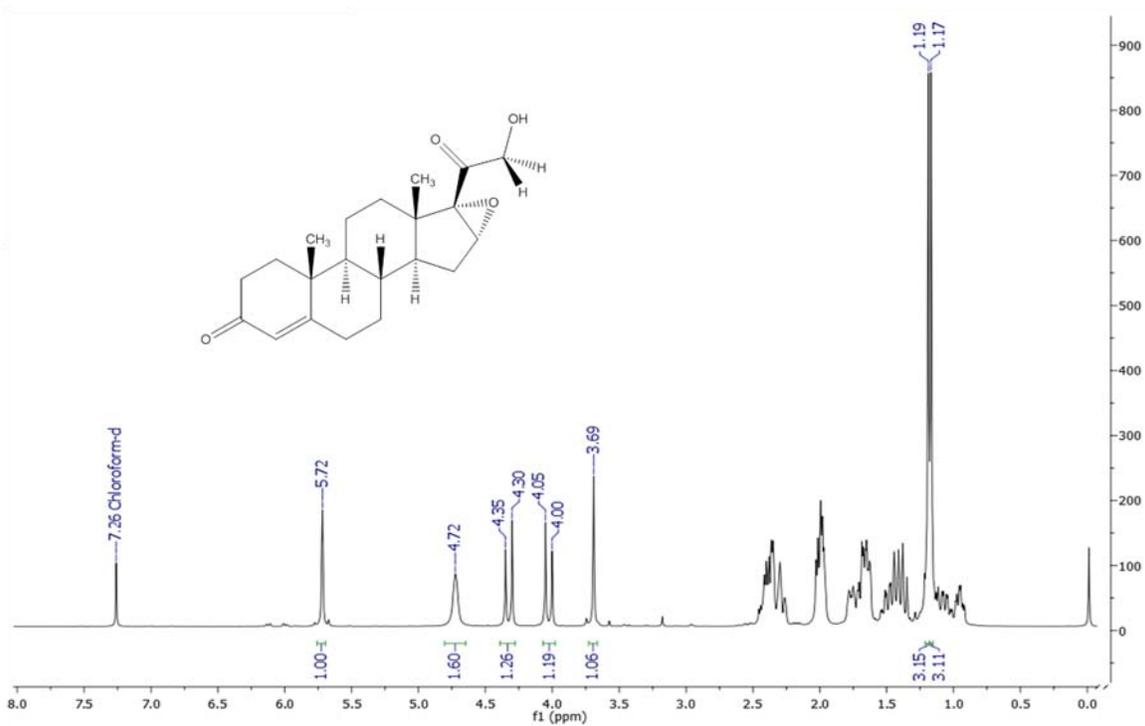
Espectro 4.3 RMN ^1H



Espectro 4.4 RMN ^{13}C

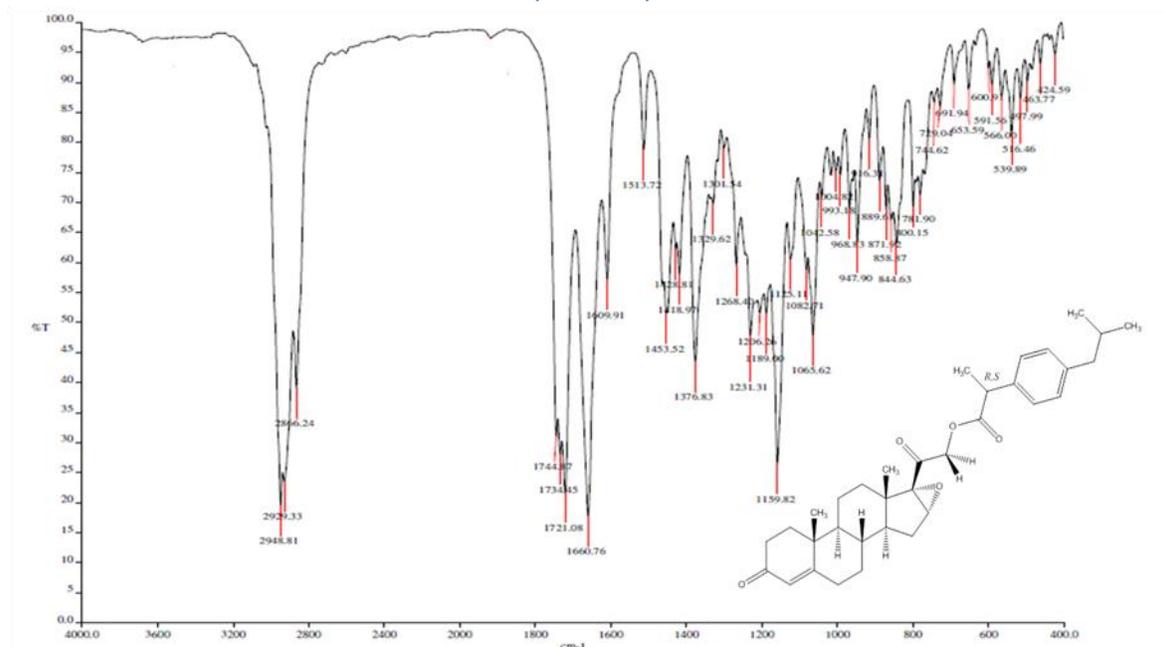


Espectro 4.5 EM

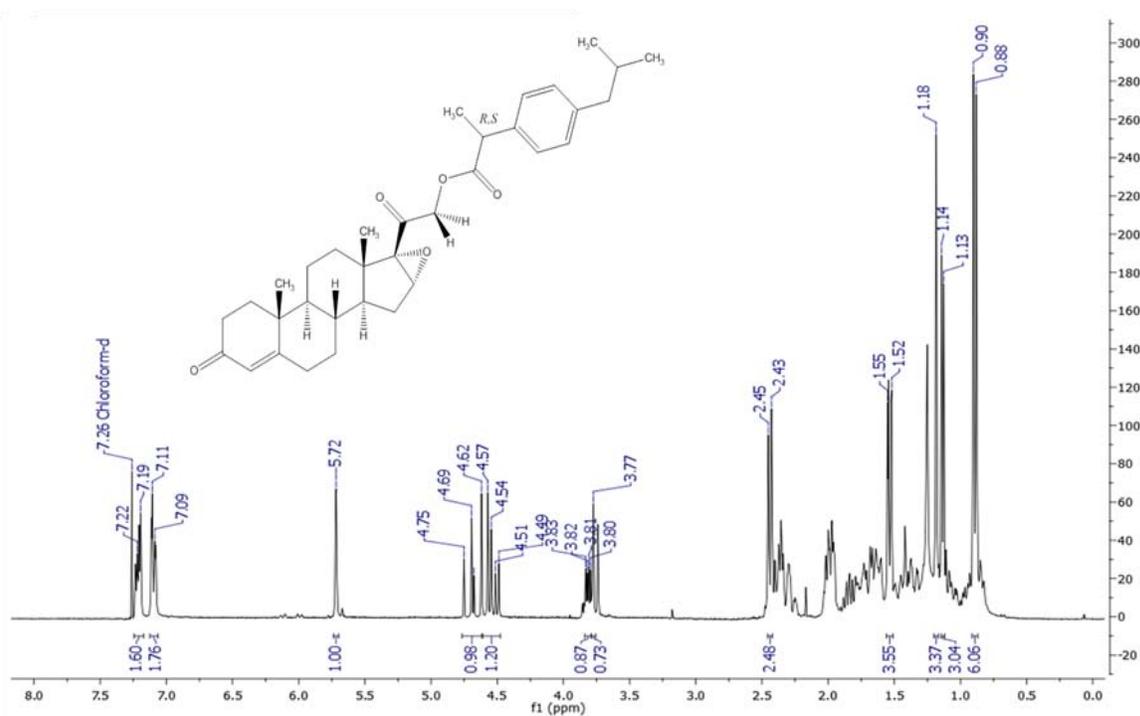


Espectro 4.6 RMN intercambio con D₂O

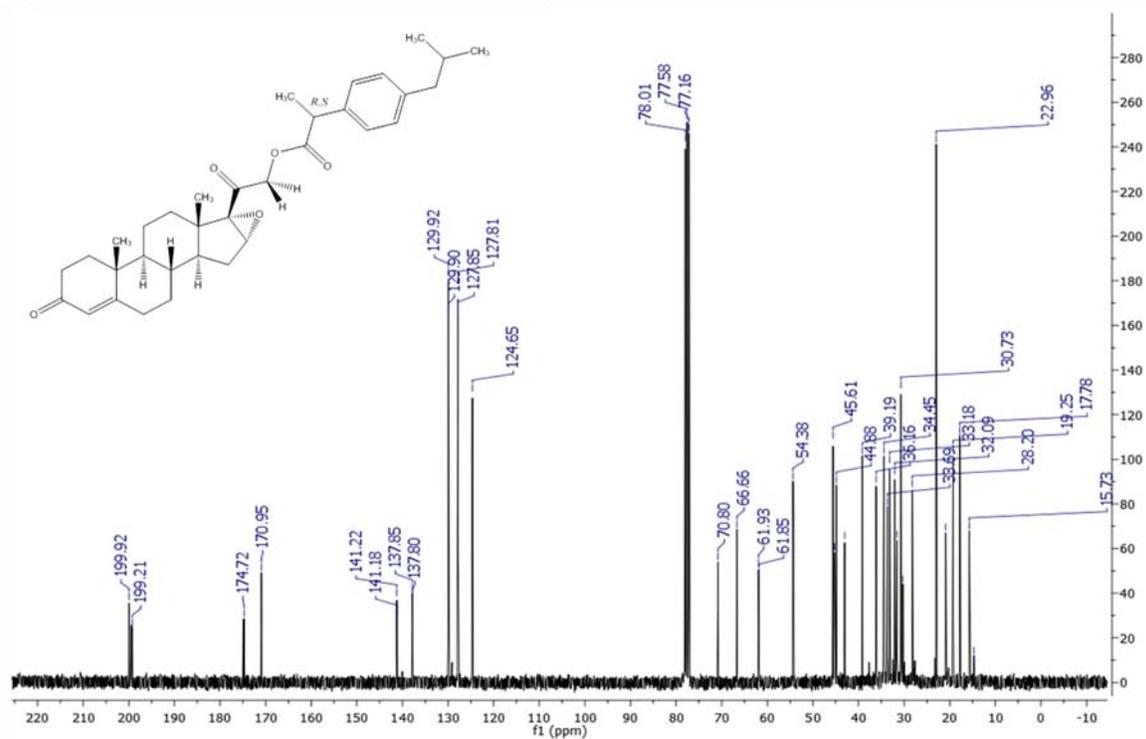
Espectros de 21-(2-(4-isobutilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona
(5.1-5.4)



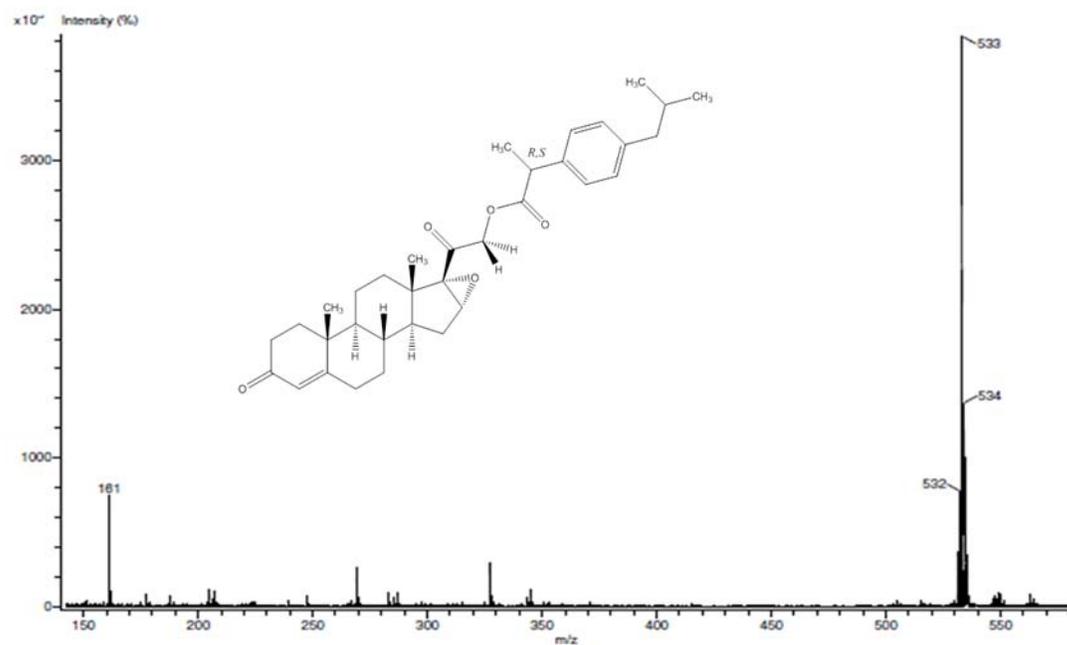
Espectro 5.1 IR



Espectro 5.2 RMN 1H

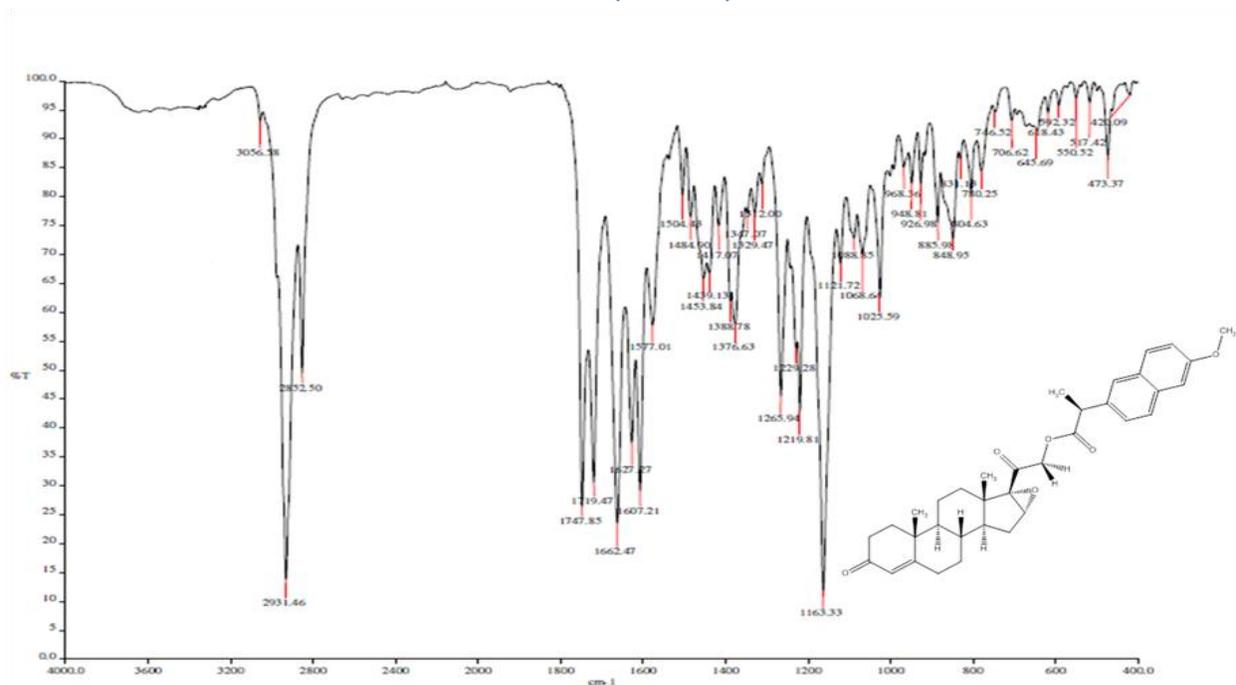


Espectro 5.3 RMN ^{13}C

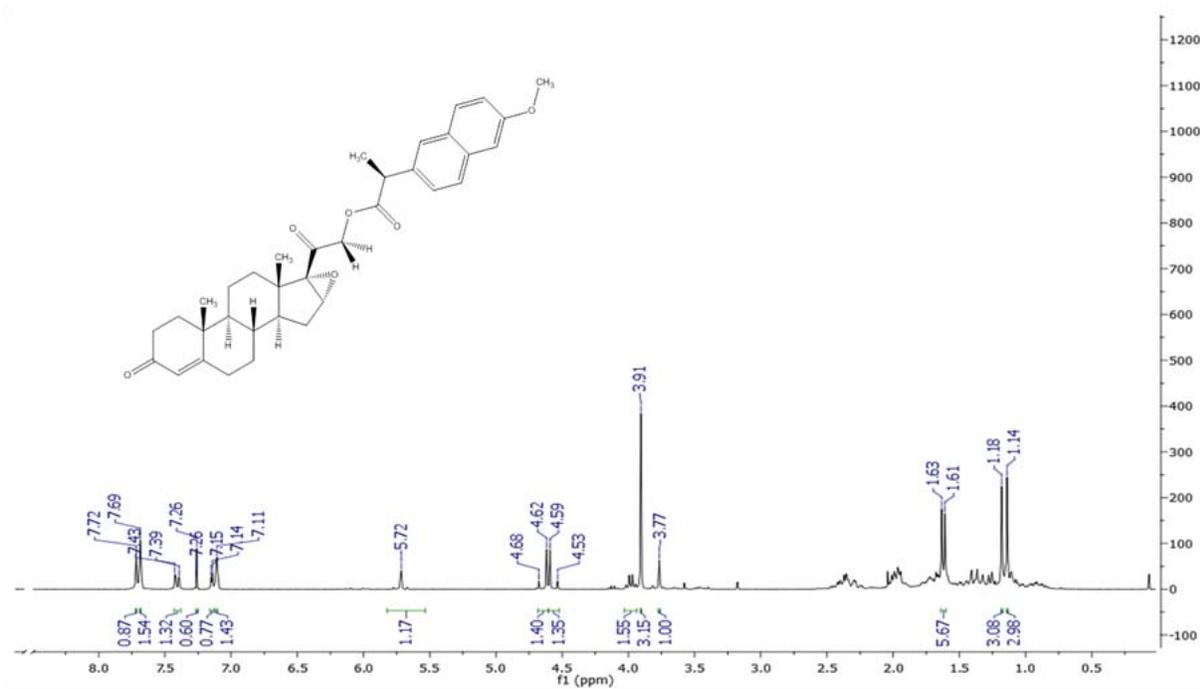


Espectro 5.4 EM (DART)

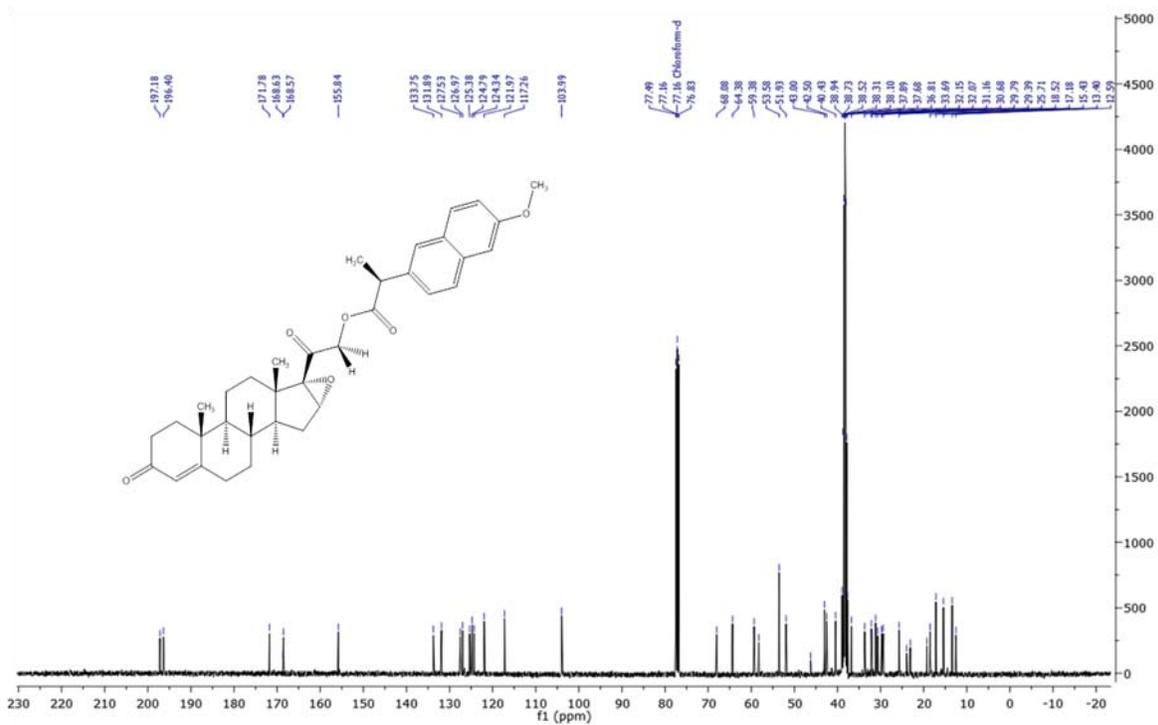
Espectros de 21-((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (6.1-6.4)



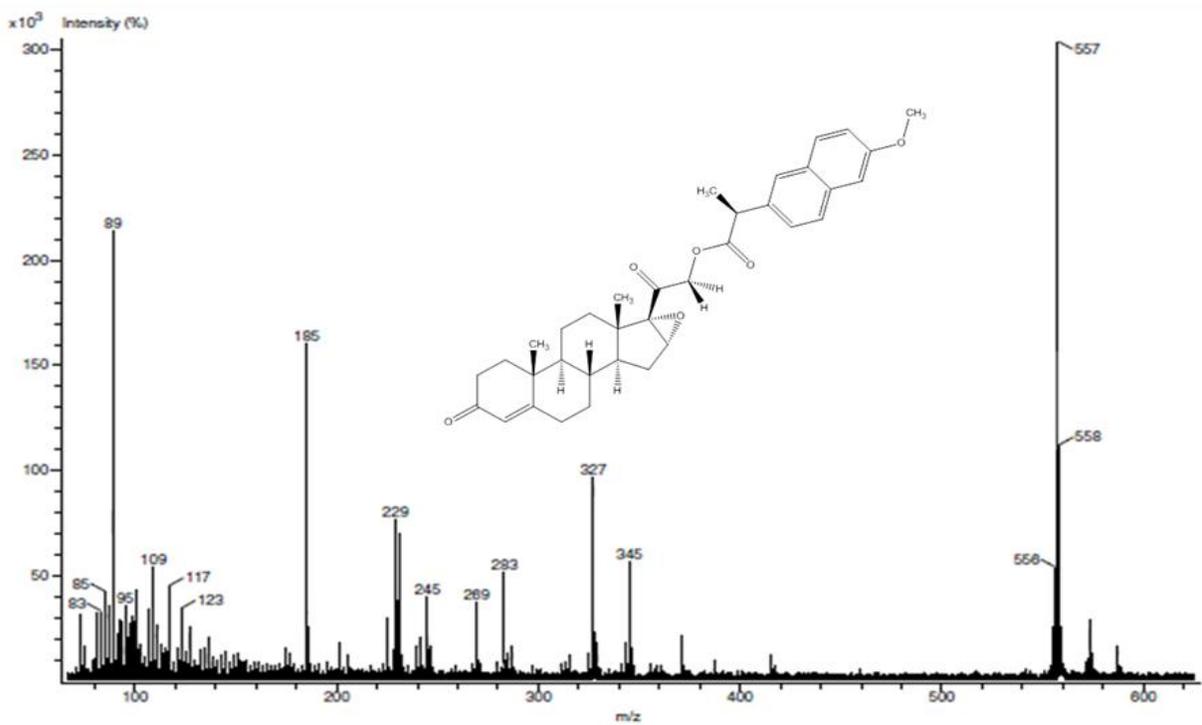
Espectro 6.1 IR



Espectro 6.2 RMN ¹H

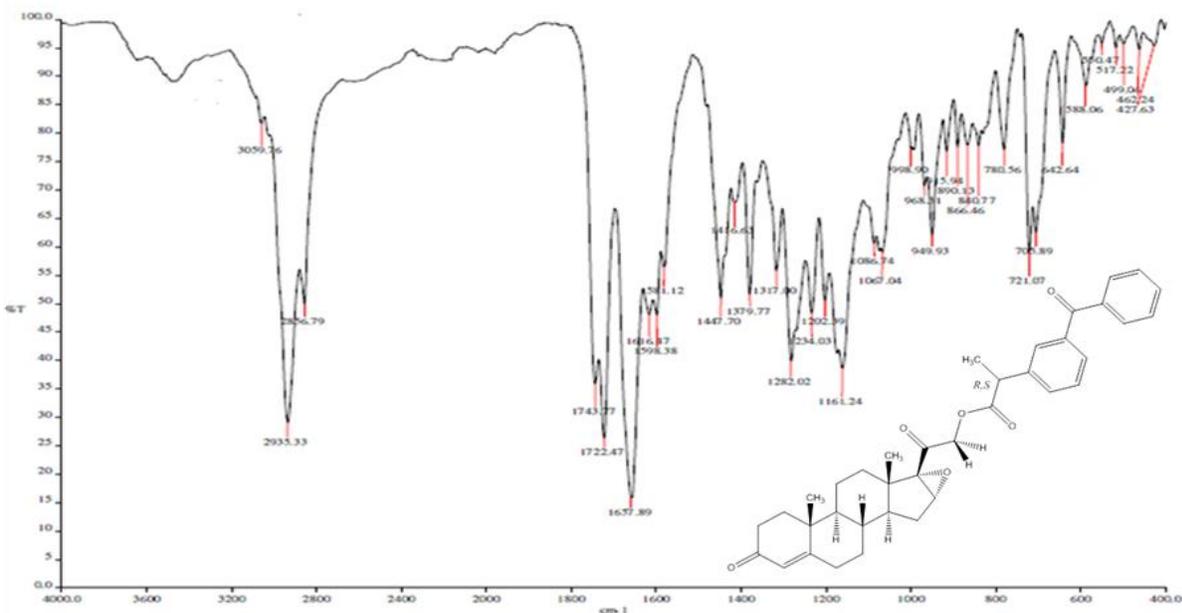


Espectro 6.3 RMN ^{13}C

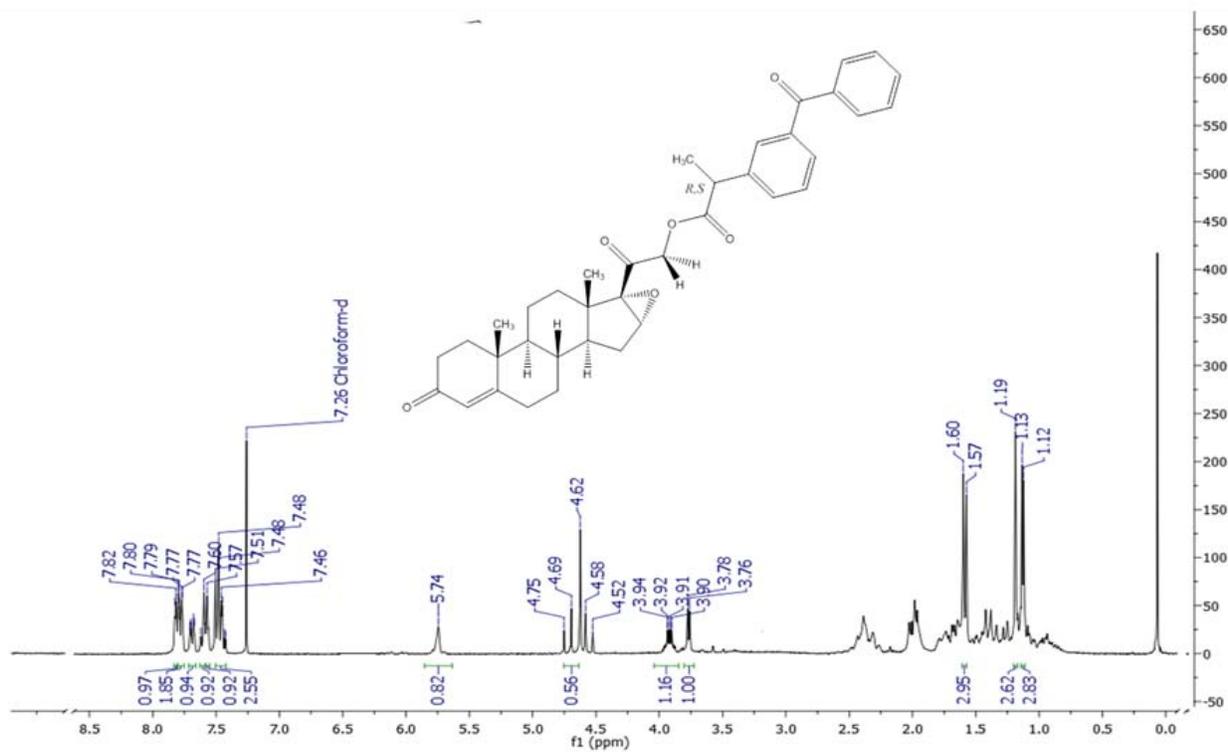


Espectro 6.4 EM (DART)

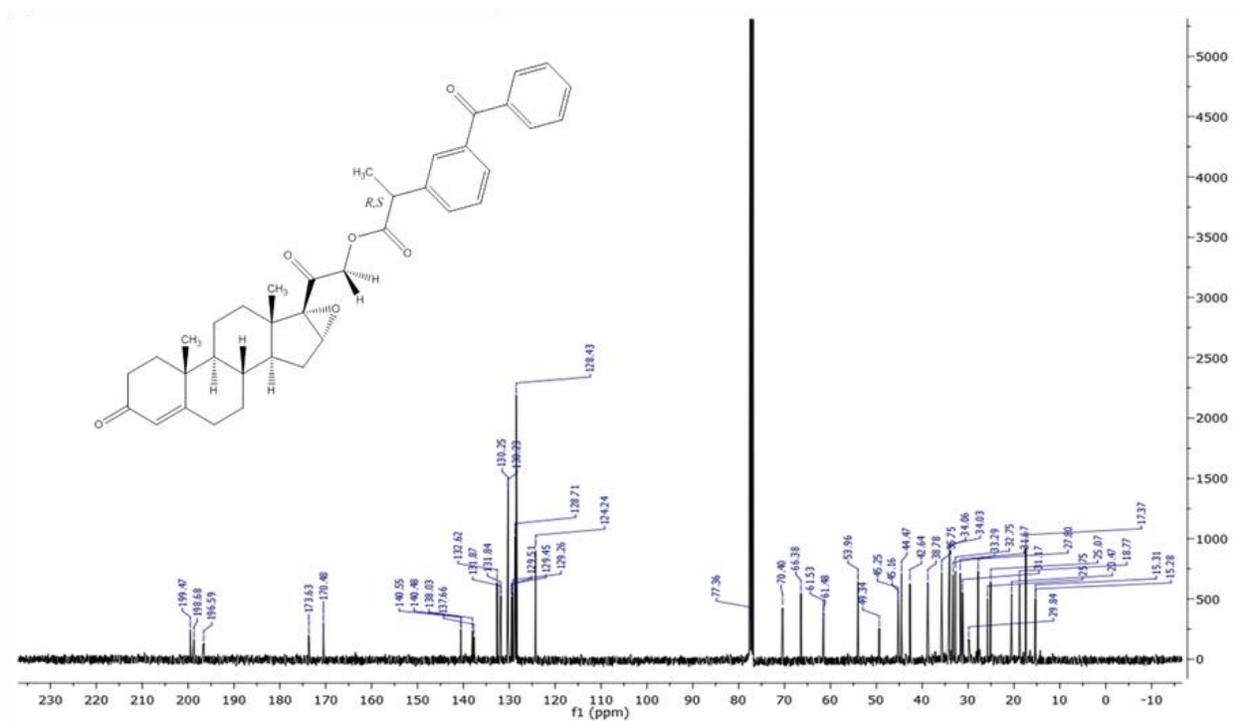
Espectros de 21-(2-(3-benzoilfenil)propanoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona
(7.1-7.2)



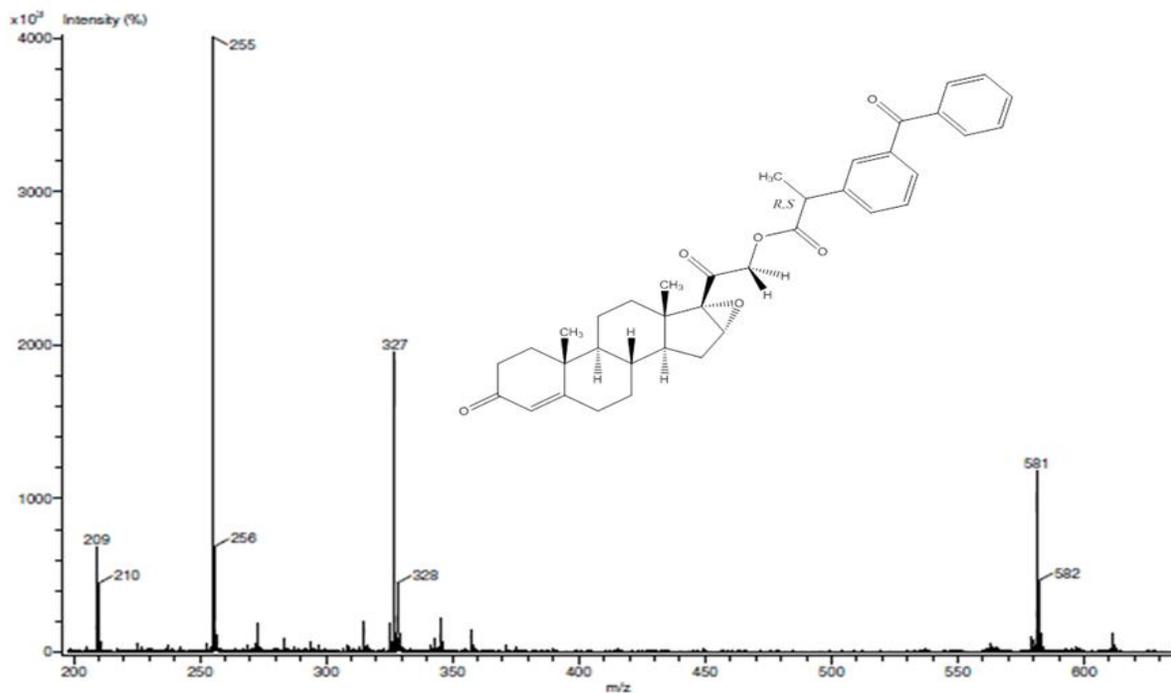
Espectro 7.1 IR



Especto 7.2 RMN ^1H

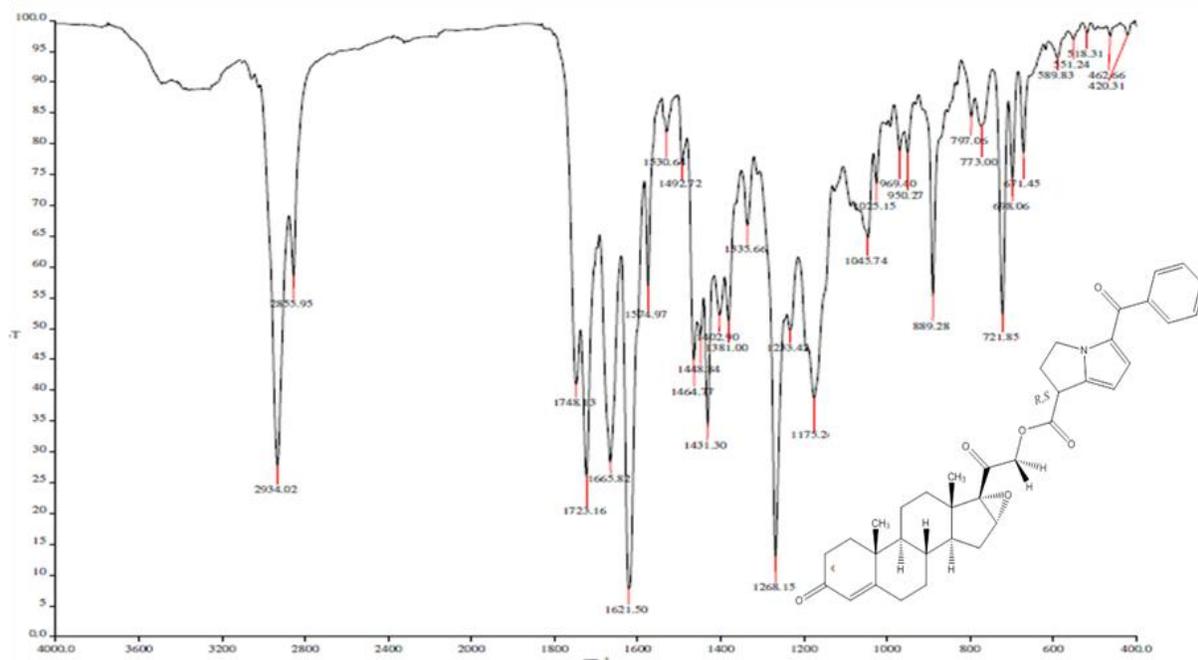


Espectro 7.3 RMN ^{13}C

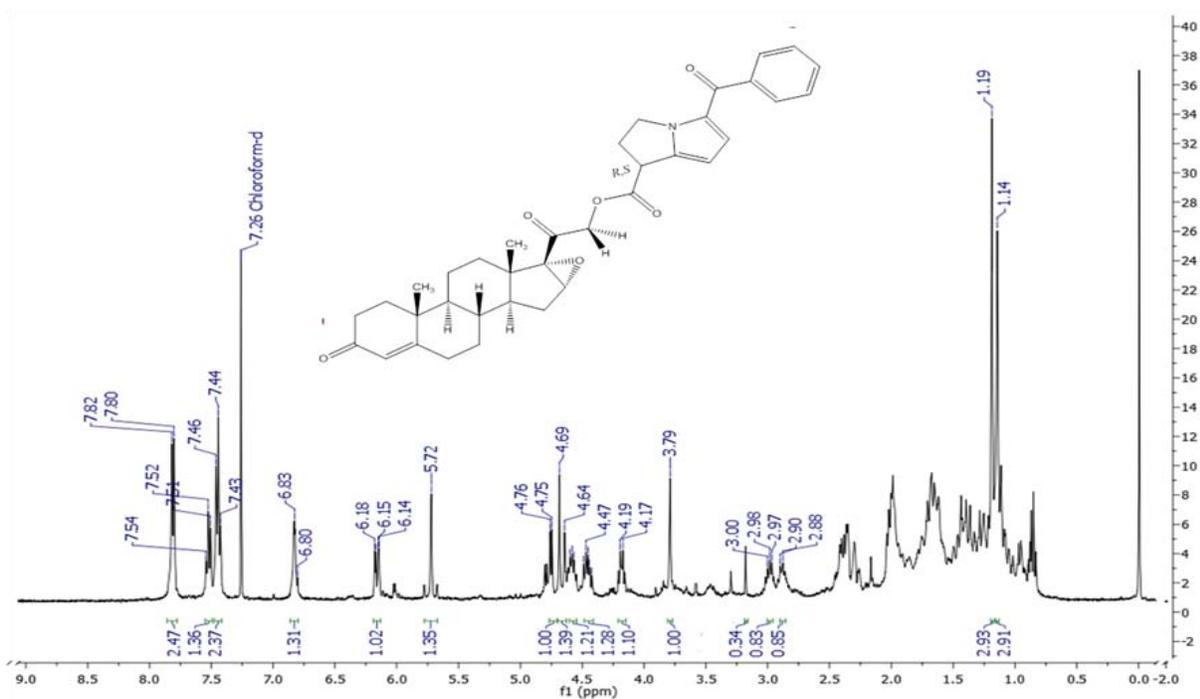


Espectro 7.4 EM (DART)

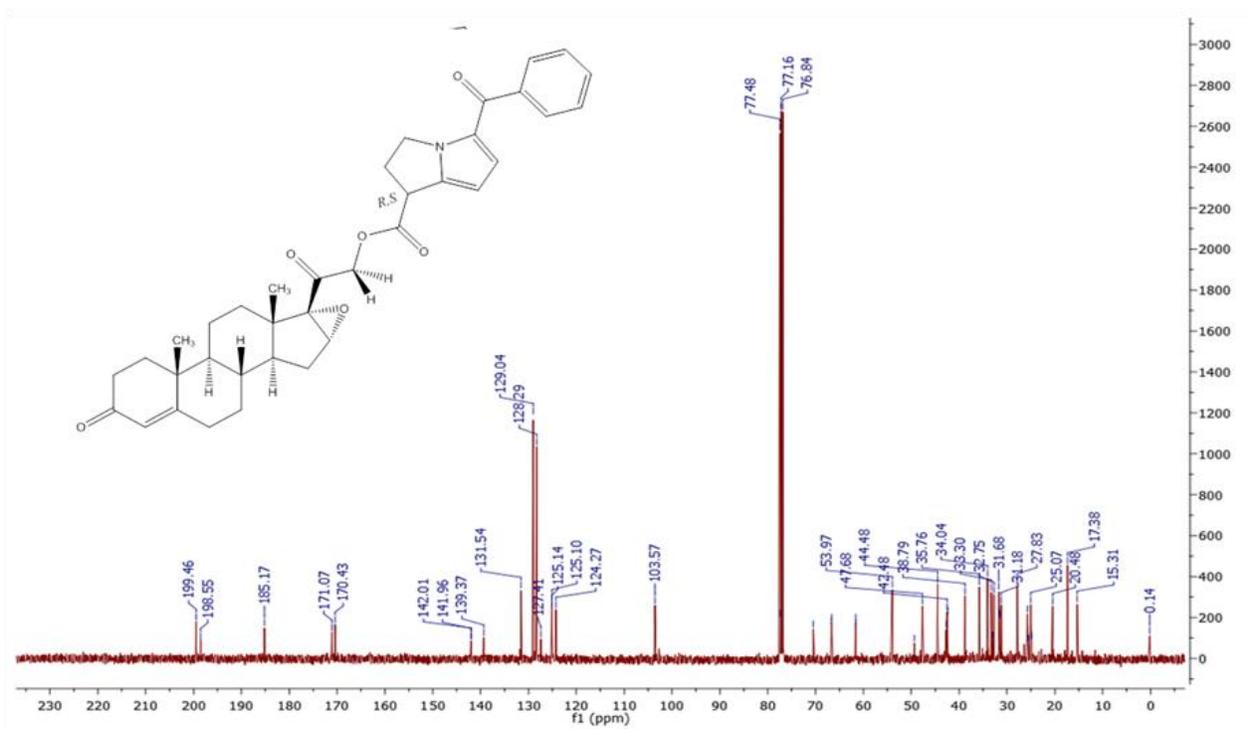
Espectros de 21-(1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina)carboxiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (8.1-8.4)



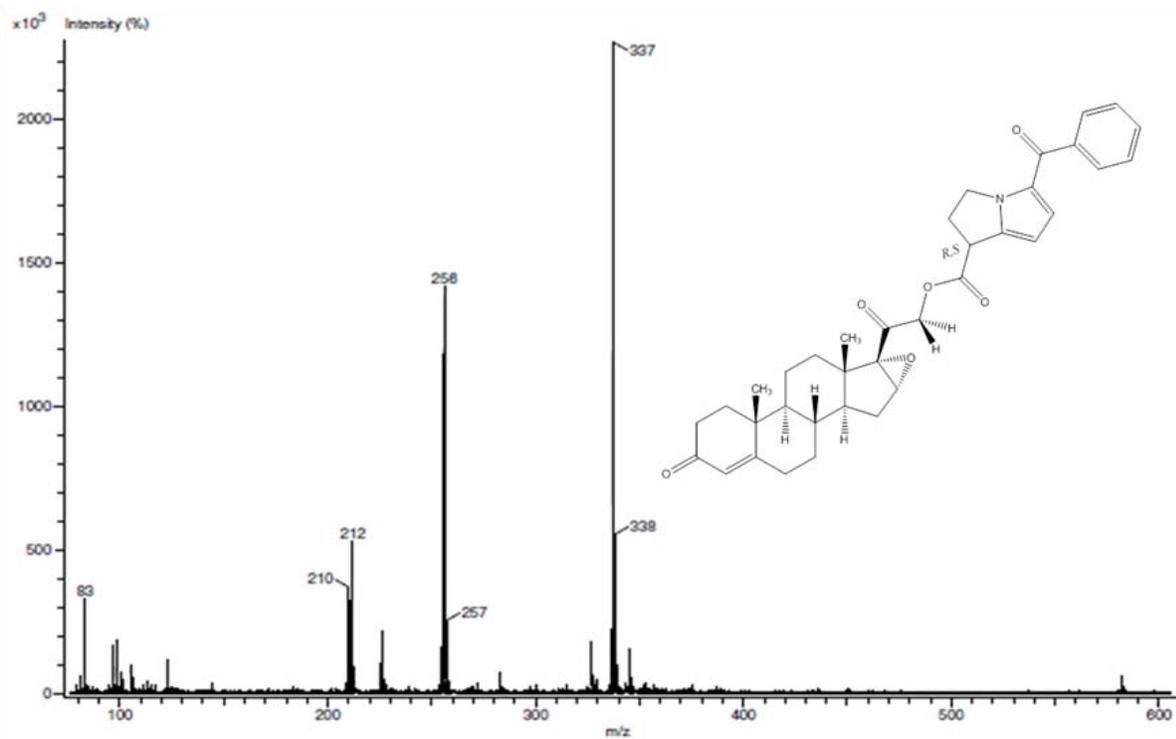
Espectro 8.1 IR



Espectro 8.2 RMN ¹H

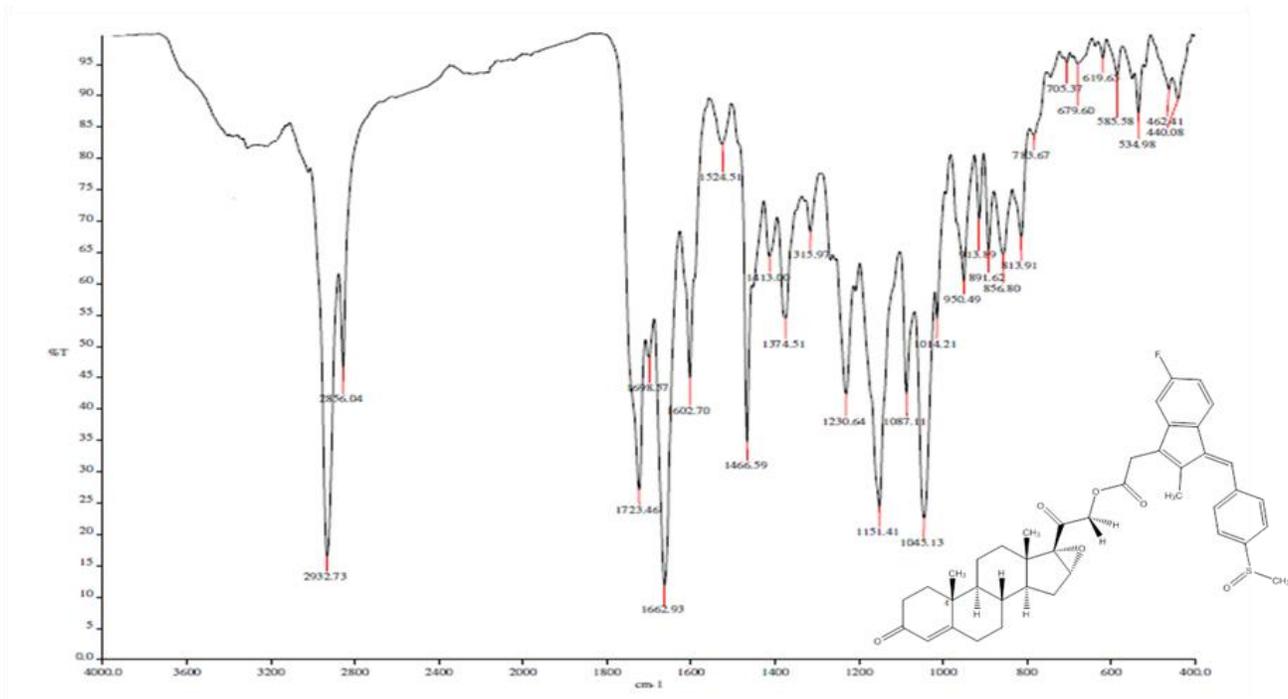


Espectro 8.3 RMN ^{13}C

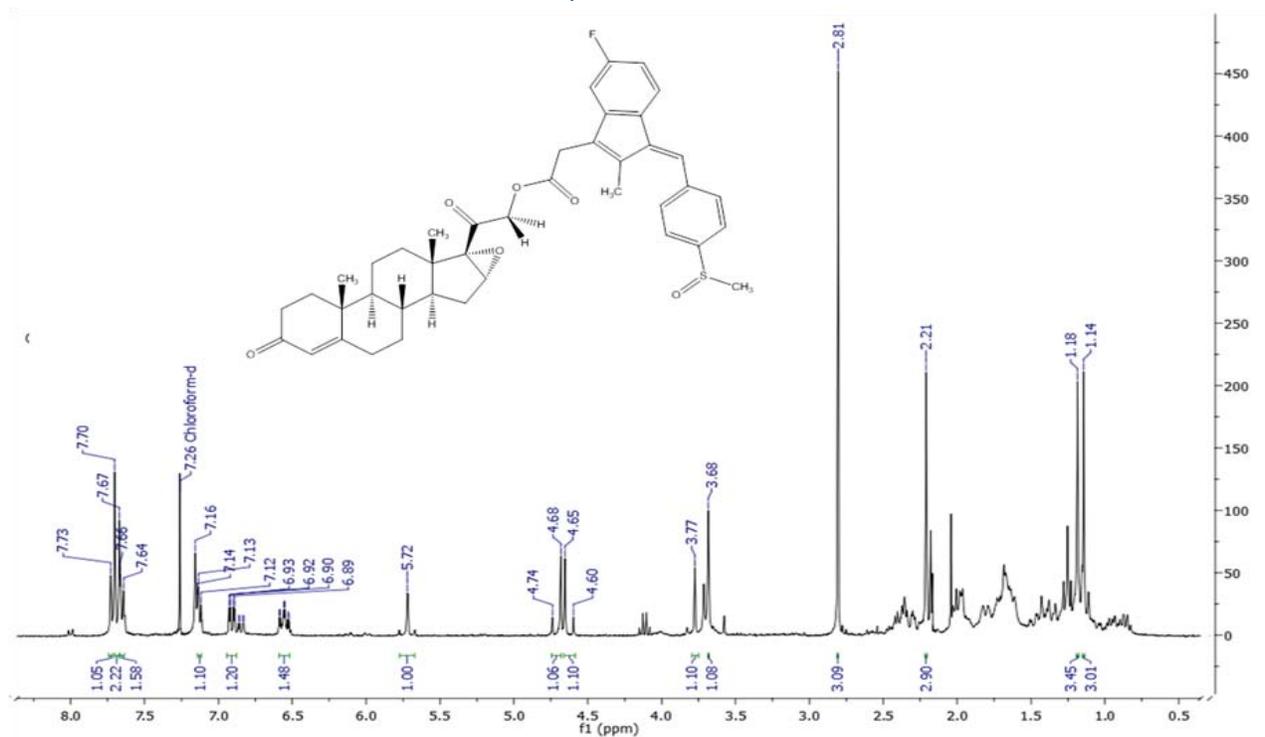


Espectro 8.4EM (DART)

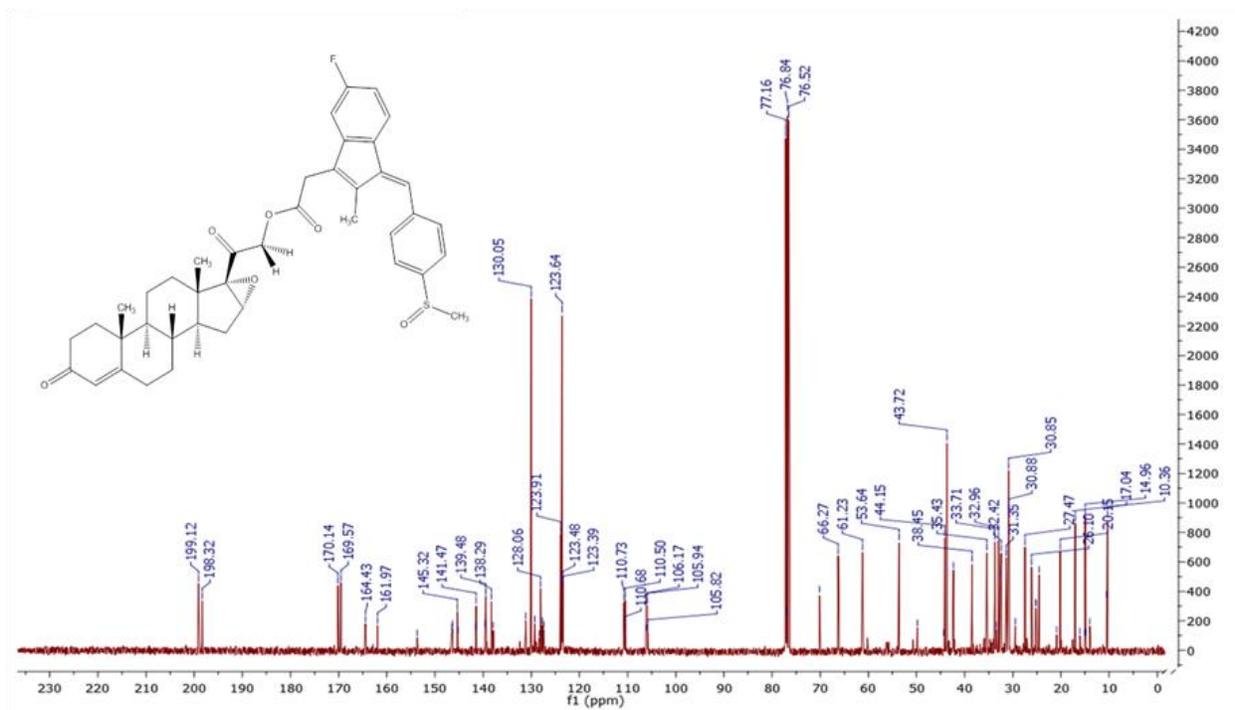
Espectros de 21-(2-((1Z)-5-fluoro-2-metil-1-(4-(metilsulfonil)benziliden))-1H-inden-3-il)acetoxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (9.1-9.4)



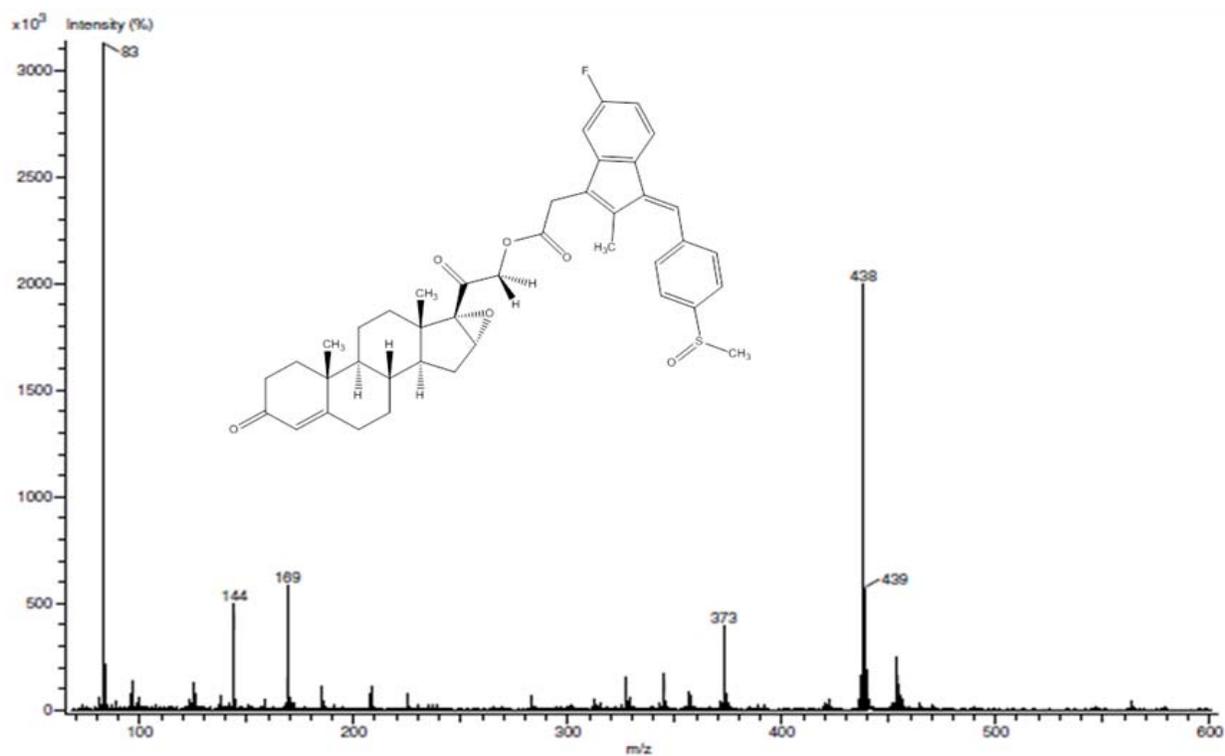
Espectro 9.1 IR



Espectro 9.2 RMN ¹H

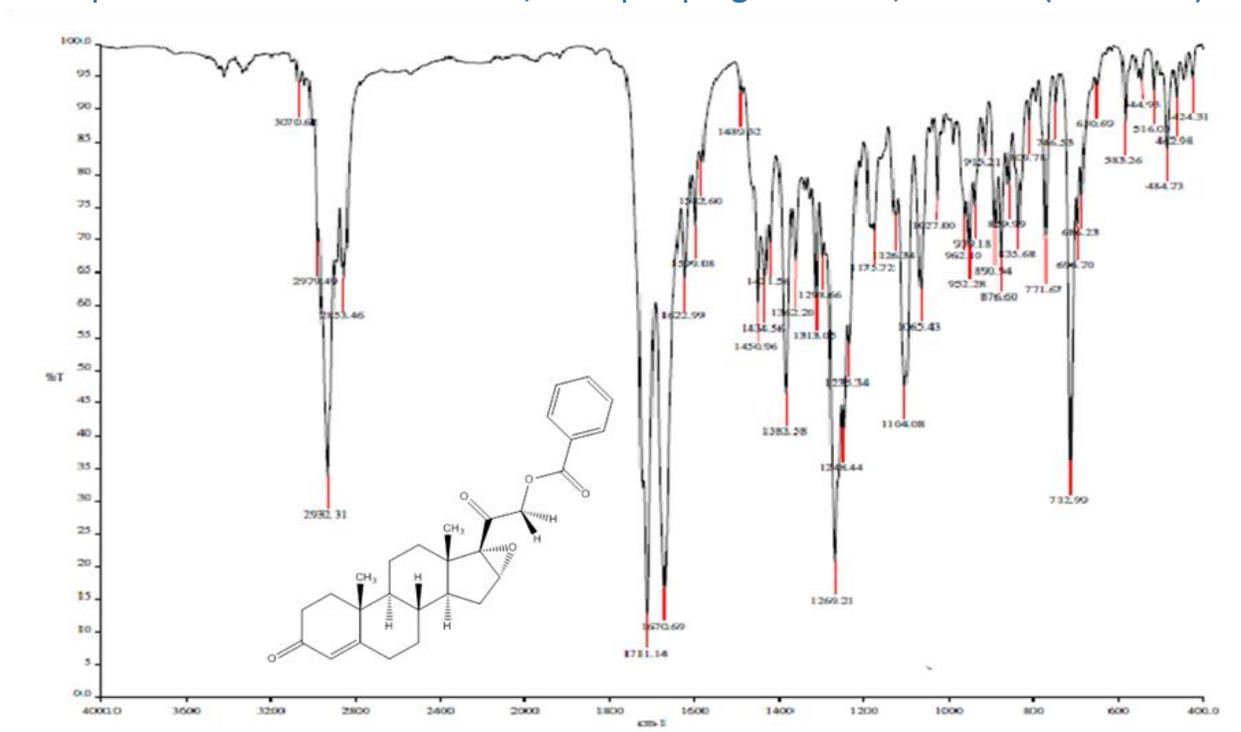


Espectro 9.3 RMN ^{13}C

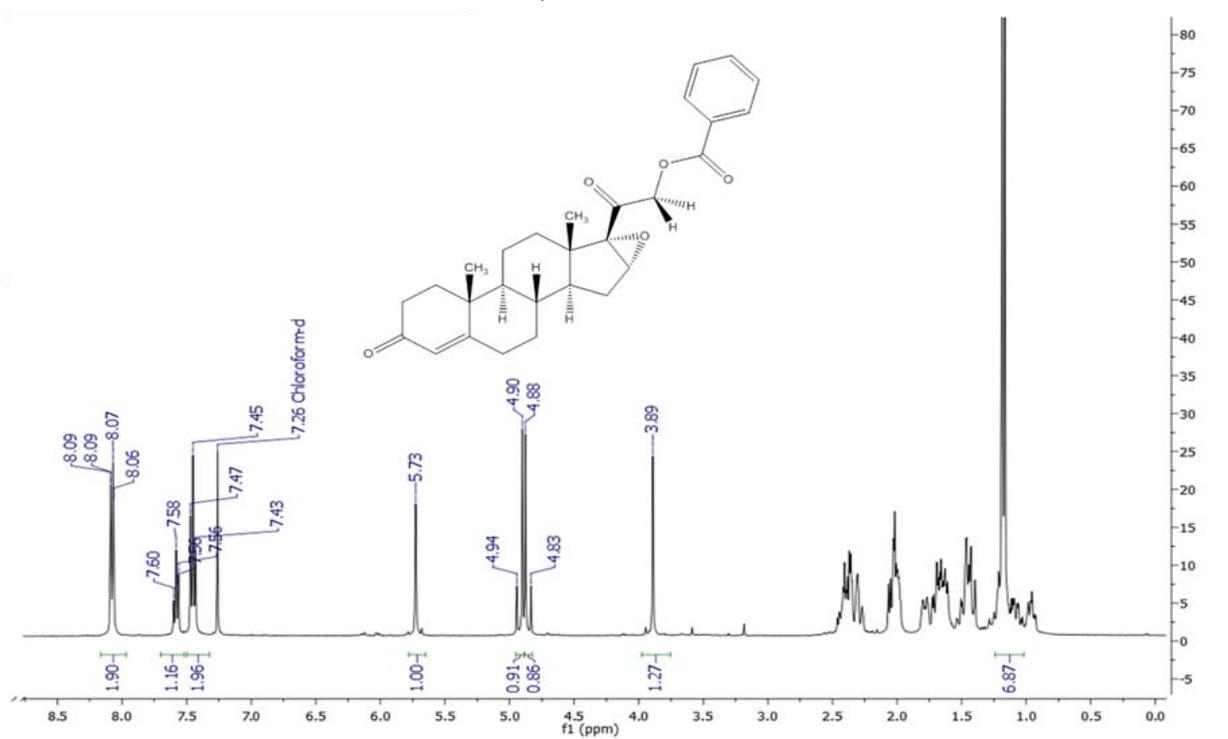


Espectro 9.4 EM (DART)

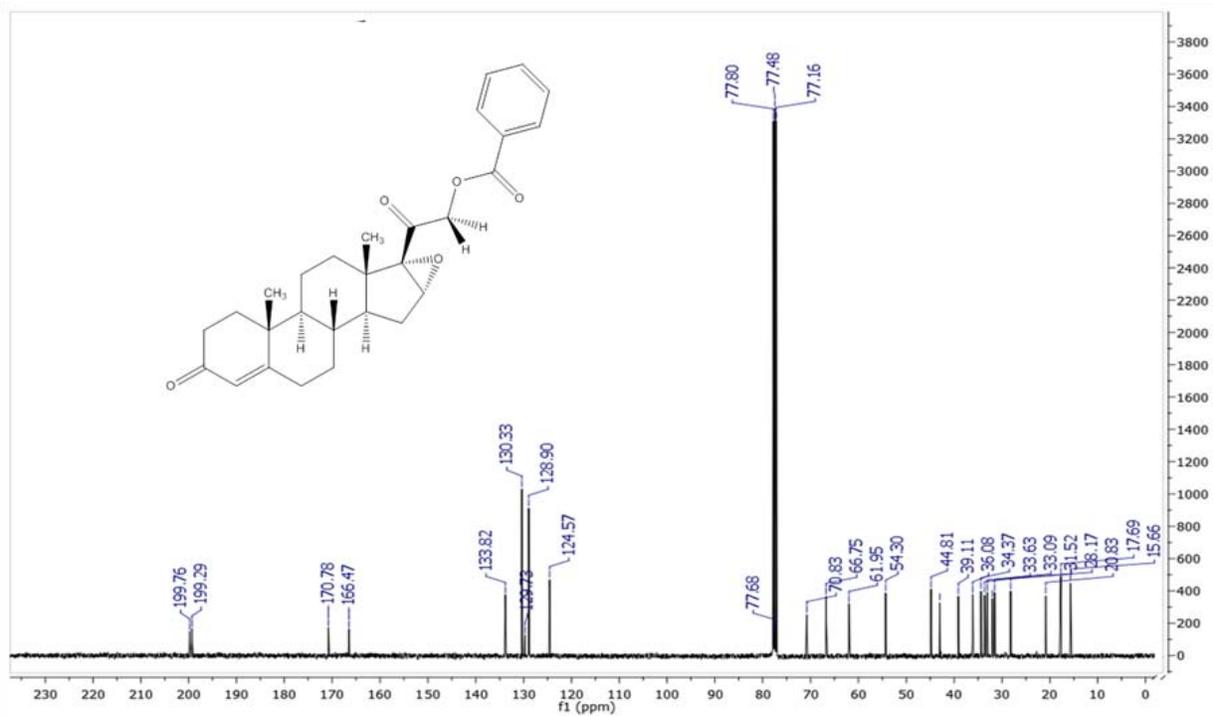
Espectros de 21-benzoilato-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (10.1-10-4)



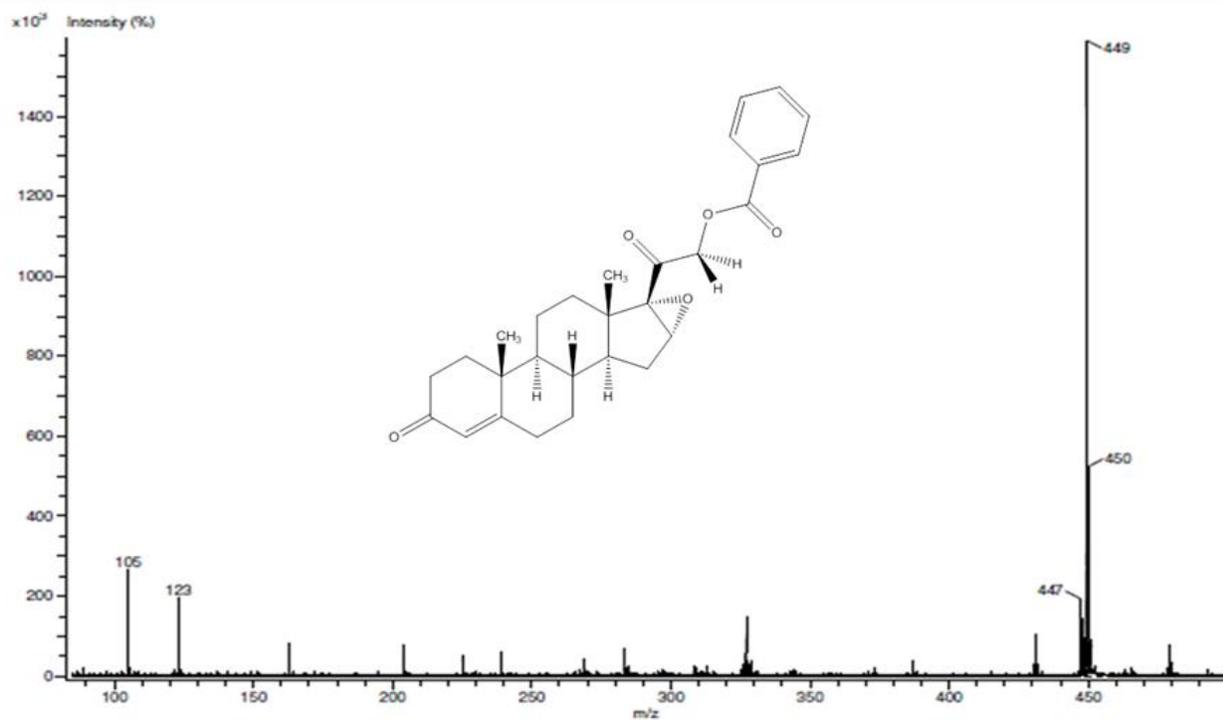
Espectro 10.1 IR



Espectro 10.2 RMN ¹H

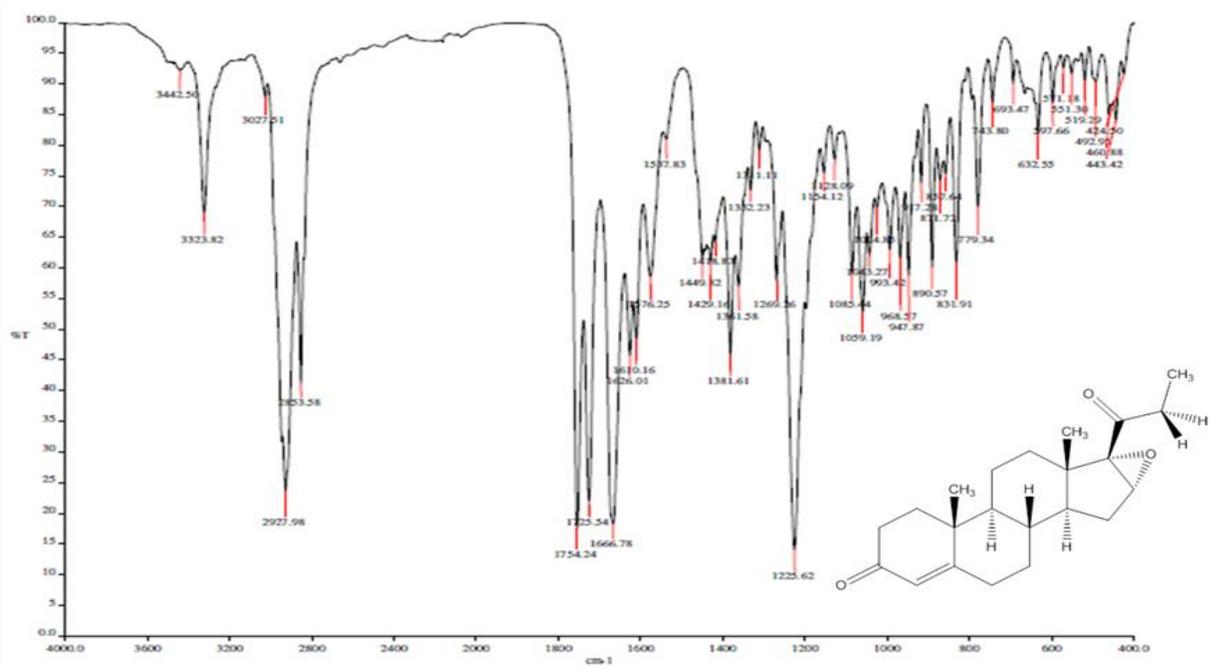


Espectro 10.3 RMN ^{13}C

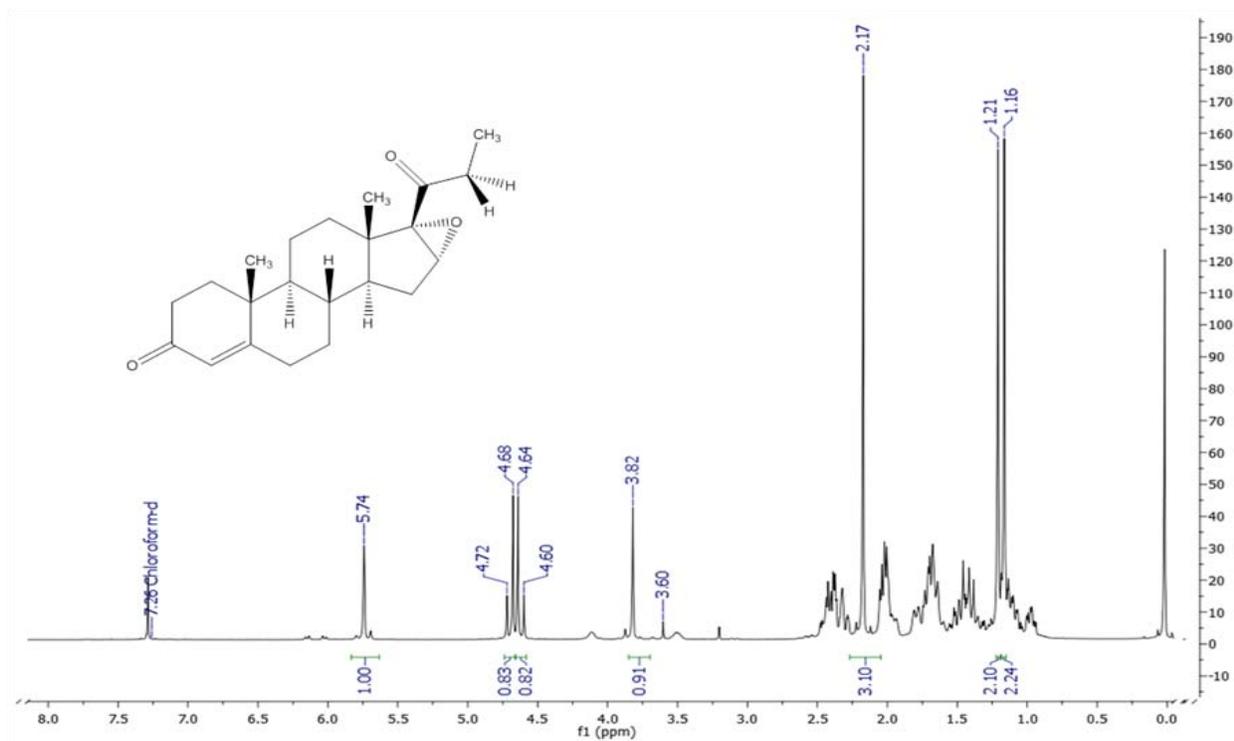


Espectro 10.4 EM (DART)

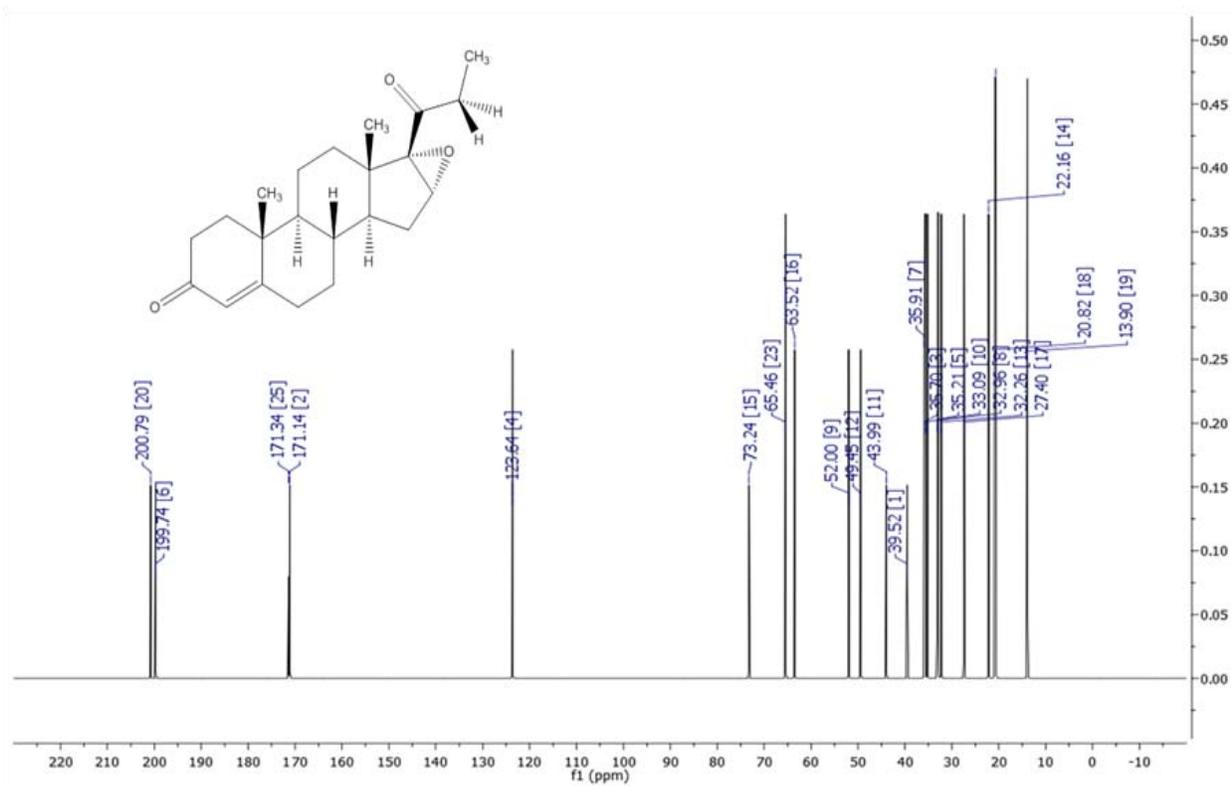
Espectros de 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (11.1-11.4)



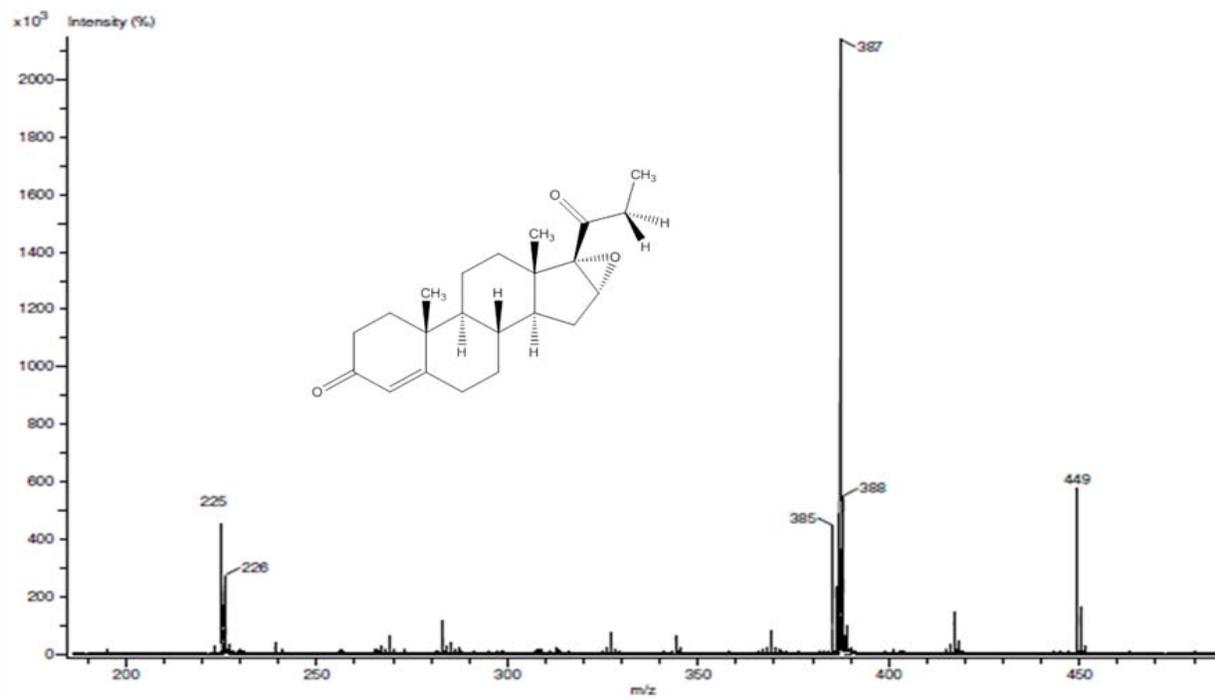
Espectro 11.1 IR



Espectro 11.2 RMN ^1H

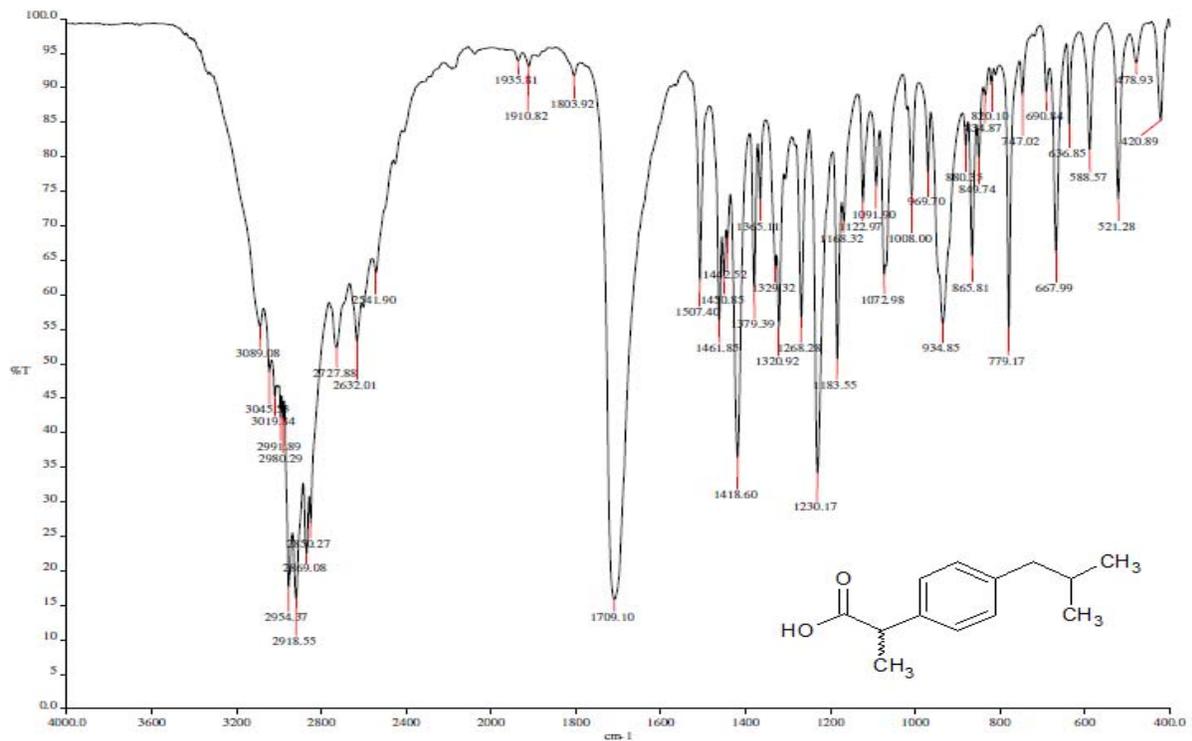


Espectro 11.3 RMN ^{13}C

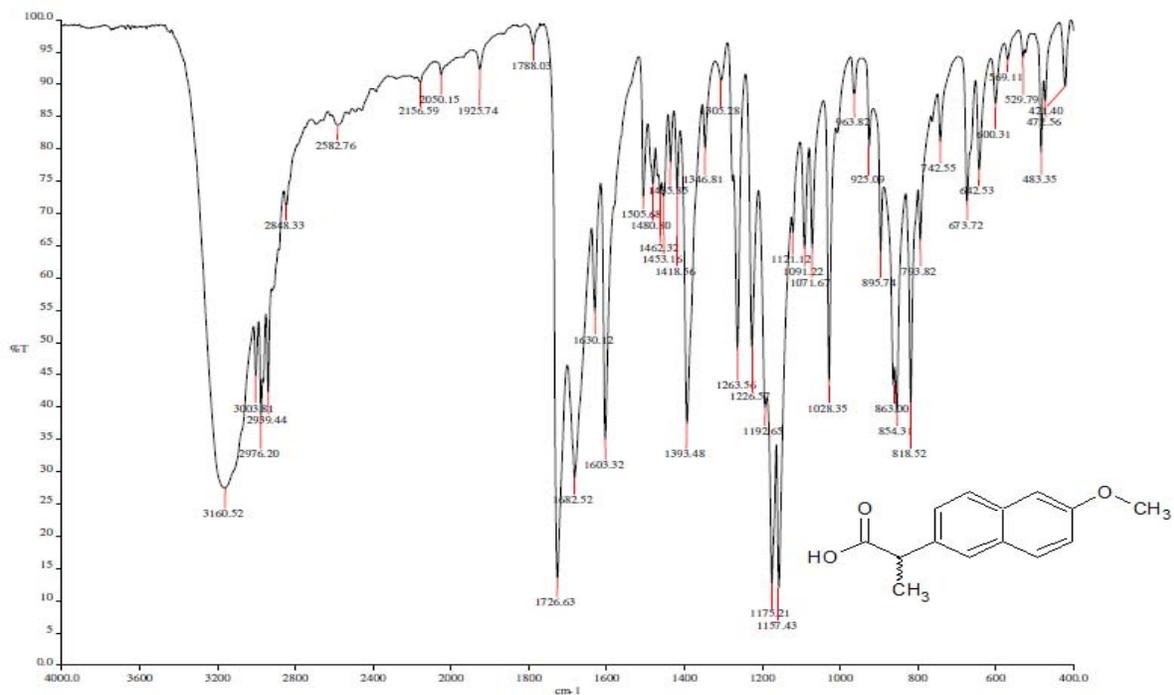


Espectro 11.4 EM (DART)

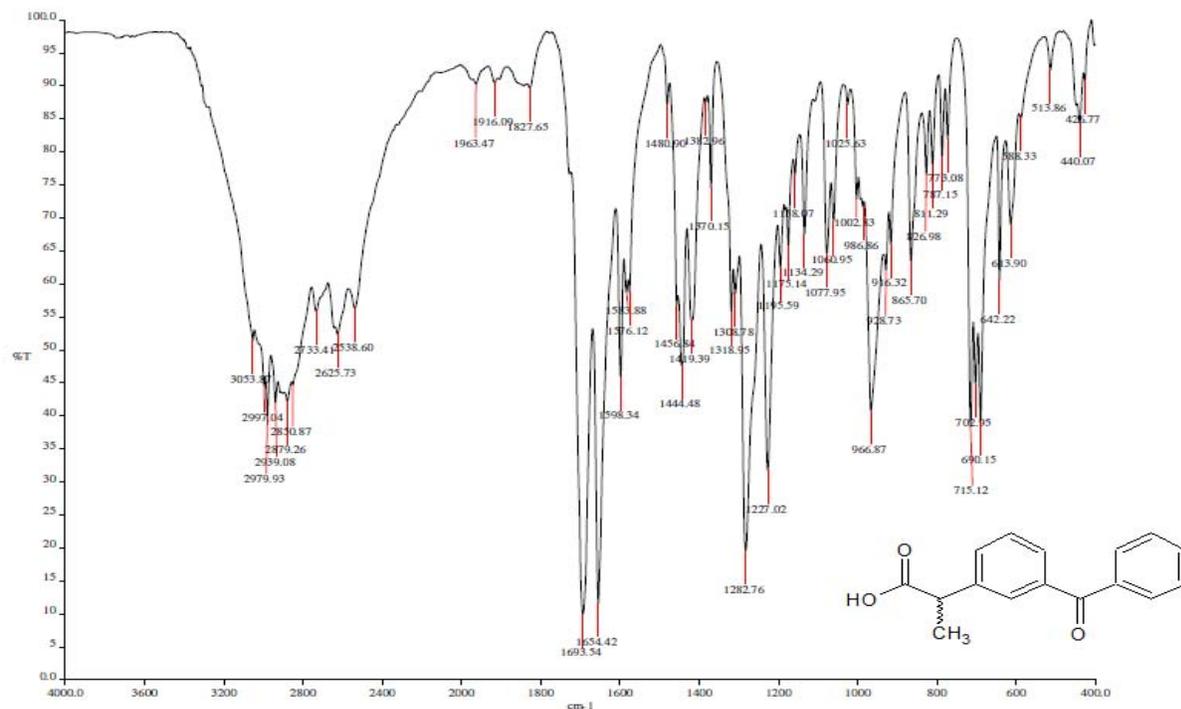
Espectro 12. IR de Ácido (*R,S*)-2-(4-isobutilfenil) propionico (IBUPROFENO)



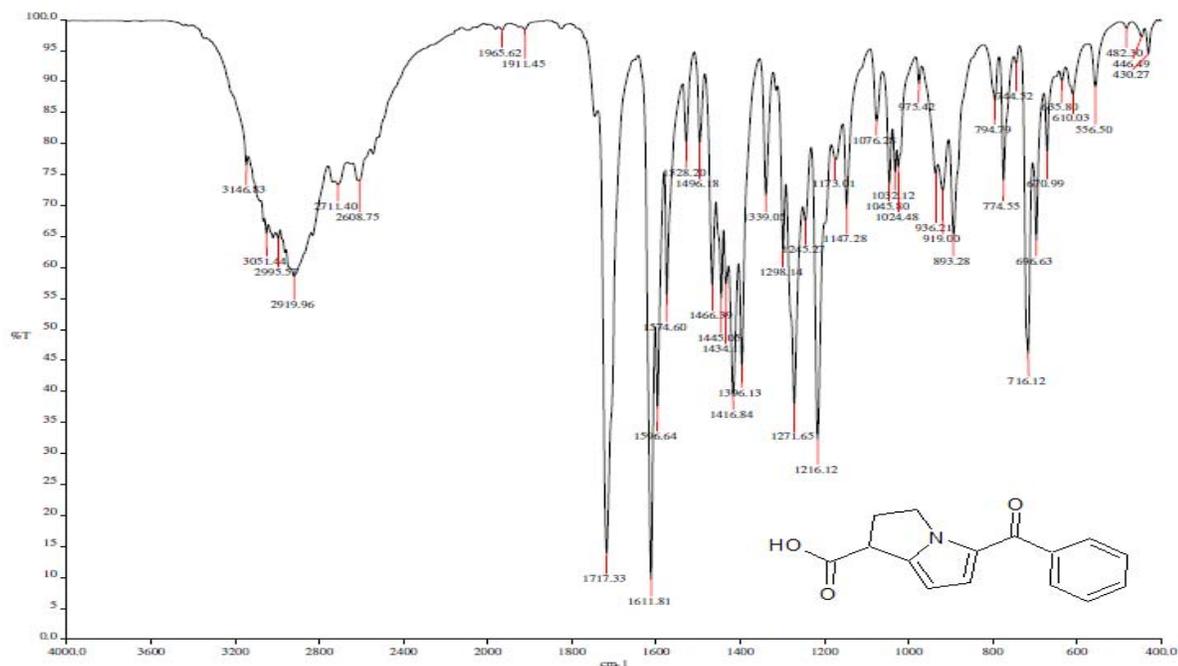
Espectro 13. IR de Ácido (*S*)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico (NAPROXENO)



Espectro 14.IR de Ácido (R,S)-2-(3-benzofenil) propanoico (KETOPROFENO)



Espectro 15.IR de Ácido (±)-1-(5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina) carboxílico (KETOROLACO)



Espectro 16.IR de Ácido 2-((1Z)-5-fluoro-2metil-(4-metilsulfinil-benziliden)-1H-inde-3-il) acético (SULINDACO)

