



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y estudio de la reactividad de productos de la condensación aldólica de sapogeninas esteroidales y benzaldehidos mono- y polihidroxilados.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MANUEL ANTONIO RAMOS ENRÍQUEZ

Dr. Martín Andrés Iglesias Aretaga
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, Septiembre 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y estudio de la reactividad de productos de la condensación aldólica de sapogeninas esteroidales y benzaldehidos mono- y polihidroxilados.

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Manuel Antonio Ramos Enríquez

Tutor Principal
Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga
Facultad de Química, UNAM



Ciudad de México, Septiembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por la oportunidad y facilidades brindadas durante la realización de este proyecto de Investigación.

A la Facultad de Química de la UNAM por el soporte económico brindado a través del proyecto PAPIIT 5000-9063 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el proyecto IN211714

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado (No. CVU/No. De Becario: 547423/294652).

Al Dr. Martín A. Iglesias Arteaga por ser un excelente tutor pero sobre todo un amigo incondicional. Le agradezco su amistad, preocupación, apoyo, empeño e interés; no sólo en mi formación académica sino también en mi crecimiento personal.

A los Doctores José Guadalupe López Cortés y Braulio Rodríguez Molina, que son los miembros del Comité Tutor y a quienes siempre les estaré agradecido por todas sus enseñanzas y atenciones. En especial agradezco al Dr. José Guadalupe por creer en mí, por darme su confianza y apoyo para comenzar la siguiente etapa en mi formación como investigador.

A los Sinodales miembros del Jurado: Dr. José Norberto Farfán García, Dr. Eduardo González Zamora, Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez y Dr. Alejandro Cordero Vargas, por sus atenciones y aportaciones a este trabajo.

A mi madre, a mis padres, a Rocío Sánchez y a mi familia que son lo más importante para mí, que son mi refugio y mi vida, que transitaron conmigo este camino, que siempre estuvieron para apoyarme y en quienes siempre puedo confiar.

Agradezco enormemente a Rodrigo Kiesslich, Adrián Carrillo, Oscar Aburto, Emmanuel Cruz, Javier López, Martha Isabel, Luis Pérez, Humberto Adam, Andrea Franco, Brenda Munguía y Gloria García por ser parte de mi vida y de esta etapa. Gracias por su apoyo incondicional.

A mis compañeros del laboratorio 202F con quienes disfruté los buenos momentos y me ayudaron a superar los malos. Especialmente agradezco a Martha Mayorquín por ser una hermana de química, de viajes y cómplice, pues siempre pudimos apoyarnos el uno con el otro para superar cualquier eventualidad.

*A mi madre, mi familia y a quienes
llevo siempre conmigo*

Este trabajo se realizó en el laboratorio 202 del Edificio F de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga y la colaboración de los miembros del Comité Tutor: Dr. José Guadalupe López Cortés y Dr. Braulio Rodríguez Molina.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo fue publicada en los artículos:

- ✓ Synthesis of novel steroids bearing a spirochromene side chain by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ catalyzed aldol condensation of spirostane sapogenins and salicylaldehyde; de los autores: Ramos-Enríquez M.A.; Iglesias-Arteaga M.A.; *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 3325–3327.
- ✓ Synthesis and radical scavenger properties of novel spirochromenes derived from steroid sapogeninas; de los autores: Ramos-Enríquez, M.A.; Medina-Campos, O.N.; Pedraza-Chaverri, J.; Iglesias-Arteaga, M.A. *Steroids* **2015**, 98, 132-137.
- ✓ An unexpected $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed rearrangement of 23E-benzylidenespirostanes to spiro[furan-indenes]; de los autores: Ramos-Enríquez M.A.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga M.A. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 2249–2252.
- ✓ Synthesis of novel hybrid steroid dimers by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of 2-formyl-estradiol diacetate and steroid sapogenins; de los autores: Ramos-Enríquez, M.A.; Iglesias-Arteaga, M.A.; *Steroids* **2017**, 128, 46-49.
- ✓ Synthesis and in vitro anticancer activity of 23(23')E-benzylidenespirostanols derived from steroid sapogenins; de los autores: Ramos-Enríquez, M.A.; Vargas-Romero, K.; Rárová, L.; Strnad, M.; Iglesias-Arteaga, M.A.; *Steroids* **2017**, 128, 85-88.
- ✓ Synthesis of dimeric spirostanols linked through a 1,4-dimethylidenebenzene moiety by double $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of steroid sapogenins and terephthalaldehyde; de los autores: Ramos-Enríquez, M.A.; Rárová, L.; Iglesias-Arteaga, M.A.; *Steroids* **2018**, 140, 58-61.
- ✓ Studies on the reactivity of 23E-benzylidene spirostanes; de los autores: Ramos-Enríquez, M.A.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M.A.; *Steroids* **2019**, 151, 108462.

Una parte de los resultados obtenidos en este trabajo fue presentada en los siguientes congresos:

- ✓ 15va Conferencia anual de Heterociclos y Síntesis patrocinada por la IUPAC llevada a cabo en Gainesville, Florida, E.U.; del 2 al 5 de marzo del 2014; con el póster: Ramos-Enríquez, M.A.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis of novel steroids bearing a spirochromene side chain by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ catalyzed aldol condensation of spirostane sapogenins and salicylaldehyde.
- ✓ 22va Conferencia de Isoprenoides, llevada a cabo en Praga, República Checa, del 7 al 10 de septiembre de 2014; con el póster: Ramos-Enríquez, M.A.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M.A. Exploring the reactivity of *E*-23(23')-Benzylidenespirostanes. Con este Póster se obtuvo el premio "The Teva Award" otorgado por Teva Czech Industries a la mejor Comunicación Estudiantil en la categoría de póster.
- ✓ 16va Conferencia anual de Heterociclos y Síntesis patrocinada por la IUPAC llevada a cabo en Gainesville, Florida, E.U.; del 1 al 4 de marzo del 2015; con el póster: Ramos-Enríquez, M.A.; Medina-Campos, O.N.; Pedraza-Chaverri, J.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis and radical scavenger properties of novel spirochromenes derived from steroid sapogenins.
- ✓ QUIMIUNAM 2015, llevado a cabo en el Auditorio "Alfonso Caso" de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.; del 22 al 24 de abril del 2015; con la presentación oral: Exploring the reactivity of *E*-23(23')-Benzylidenespirostanes.
- ✓ 17va Conferencia anual de Heterociclos y Síntesis patrocinada por la IUPAC llevada a cabo en Gainesville, Florida, E.U.; del 28 de febrero al 2 de marzo del 2016; con el póster: Ramos-Enríquez, M.A.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M.A. A serendipitous $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed rearrangement of 23*E*-benzylidenespirostanes.
- ✓ 18va Conferencia anual de Heterociclos y Síntesis patrocinada por la IUPAC llevada a cabo en Gainesville, Florida, E.U.; del 4 al 7 de marzo del 2018; con el póster: Ramos-Enríquez, M.A.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis of steroid dimers with spirostane and/or furostane cores.
- ✓ QuimiUNAM 2018, llevado a cabo en la Facultad de Química de Ciudad Universitaria, CDMX, México.; el 7 de Agosto del 2018; con el póster: Ramos-Enríquez, M.A.; Colin-Molina, A.; Flores-Alamo, M.; Rodríguez-Molina, B.; Iglesias-Arteaga, M.A. Solvatomorfismo Conformacional del diacetato de 23*E*-(3'-hidroxibenciliden)-tigogenina.
- ✓ 24va. Conferencia en Isoprenoides, llevado a cabo en Białystok, Polonia.; del 9 al 12 de septiembre del 2018; con el póster: Ramos-Enríquez, M.A.; Colin-Molina, A.; Flores-Alamo, M.; Rodríguez-Molina, B.; Iglesias-Arteaga, M.A. Conformational solvatomorphism of 23*E*-(3'-hydroxy-benzylidene)-tigogenin diacetate.

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
Capítulo 1. Antecedentes.	3
1.1. Esteroides.	3
1.1.2. Características estructurales.	3
1.2. Sapogeninas esteroidales.	6
1.2.1. Características estructurales.	7
1.3. Cadena lateral espirocetálica.	8
1.3.1. Reactividad de la cadena lateral espirocetálica.	9
1.3.2. Degradación de la cadena lateral espirocetálica.	12
1.3.3. Reacciones de sustitución en C-23 de las sapogeninas esteroidales.	15
1.3.4. Apertura de la cadena lateral espirocetálica.	18
1.4. Actividad antitumoral de sapogeninas esteroidales.	20
1.5. Esteroides con actividad antioxidante.	20
1.6. Dímeros esteroidales.	22
1.7. Solvatomorfismo.	26
Capítulo 2. Hipótesis y objetivos	30
Capítulo 3. Síntesis y estudio de la reactividad de los 23 <i>E</i> -bencilidenespirostanos y de los dímeros 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos.	32
3.1. Síntesis y estudio de la reactividad de los 23 <i>E</i> -bencilidenespirostanos	32
3.1.1. Obtención de los 23 <i>E</i> -bencilidenespirostanos.	32
3.1.2. Hidrogenación catalítica.	32
3.1.3. Epoxidación.	35
3.1.4. Reordenamientos de la cadena lateral catalizados por ácidos.	37
3.1.4.1. Síntesis de los espiro[furan-indenos] derivados de sapogeninas esteroidales.	37
3.1.4.2. Apertura oxidativa de los 23 <i>E</i> -bencilidenespirostanos.	43
3.1.5. Saponificación de los 23 <i>E</i> -bencilidenespirostanos	45
3.2. Síntesis y estudio de la reactividad de los dímeros 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos.	47
3.2.1. Síntesis de los dímeros simétricos 1,4-dimetiliden-diespirostanos.	47
3.2.2. Saponificación de los dímeros simétricos 1,4-dimetiliden-diespirostanos.	48
3.2.3. Estudio de las reducciones de los dímeros 1,4-dimetiliden-diespirostanos.	50
3.2.3.1. Reducción con NaBH ₃ CN en ácido acético.	50
3.2.3.2. Hidrogenación catalítica.	55
Parte experimental	56
Capítulo 4. Síntesis de los espirocromenos derivados de sapogeninas esteroidales.	83
4.1. Productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2-hidroxibenzaldehído.	83
4.2. Productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2,5-hidroxibenzaldehído	86
Parte experimental.	87
Capítulo 5. Síntesis y estudios de la reactividad de los productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y benzaldehídos monohidroxilados.	92
5.1. Síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la tigogenina.	92

5.1.1. Primera síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos.	92
5.1.4. Optimización en la síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos.	93
5.1.3. Saponificación de los derivados monoacetoxi-bencilidenespirostanos.	95
5.2. Estudio de las reducciones de los bencilidenespirostanos monoacetoxilados derivados de la tigogenina.	96
5.2.1. Reducción con NaBH ₃ CN en ácido acético.	96
5.2.2. Hidrogenación catalítica.	100
5.2.3. Saponificación de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos.	101
5.4. Extensión de la síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos a otras sapogeninas esteroidales.	102
5.4.1. Obtención de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la sarsasapogenina.	102
5.4.2. Obtención de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la hecogenina.	103
5.5. Síntesis de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol.	104
5.5.1. Obtención de los productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2-formilestradiol.	105
5.5.2. Saponificación de los dímeros híbridos tipo-benciliden-espiroetano.	110
Parte experimental	111
Capítulo 6. Síntesis de los bencilidenespirostanos dihidroxilados derivados de la tigogenina.	141
6.1. Síntesis de los bencilidenespirostanos diacetoxilados.	141
6.2. Desprotección y reordenamientos catalizados por HCl de los diacetoxi-bencilidenespirostanos.	144
Parte experimental	148
Capítulo 7. Propiedades de algunos de los compuestos obtenidos. Actividad biológica y aplicaciones de los derivados de sapogeninas esteroidales obtenidos.	158
7.1. Actividad antitumoral de los 23 <i>E</i> -bencilidenespirostanos.	158
7.2. Actividad antioxidante de los hidroxí-espírocromenos y dihidroxí-espíroindenos derivados de sapogeninas esteroidales.	160
7.3. Actividad antitumoral y antioxidante de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol.	165
7.4. Solvatomorfismo conformacional del acetato de 3'-acetoxi-benciliden--tigogenina.	168
Conclusiones	179
Referencias bibliográficas	182
Anexo 1 – Artículos publicados	A-1
Anexo 2 – CD-ROM con la colección de espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de los productos obtenidos	

Resumen

Las sapogeninas esteroidales son metabolitos distribuidos ampliamente en la naturaleza, que han sido estudiadas desde hace más de 70 años pues además de su actividad biológica intrínseca, muchos miembros de esta familia de compuestos han servido como materias primas en la síntesis de una amplia variedad de esteroides bioactivos. Nuestro grupo de investigación ha descrito modificaciones importantes a la cadena lateral espirocetálica de las sapogeninas esteroidales y recientemente informó sobre la síntesis de una nueva familia de compuestos denominada como 23*E*-bencilidenespirostanos, que demostró tener modos de reacción no descritos hasta el presente.

Debido a la reactividad particular conferida a estos compuestos por la presencia del fragmento bencilideno en la cadena lateral, nos dimos a la tarea de explorar la reactividad y propiedades de derivados con sustituyentes hidroxilo en dicho fragmento.

En el presente trabajo se describe la síntesis y caracterización de nuevos derivados esteroidales monoméricos y diméricos, obtenidos a través de la condensación aldólica catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ con una amplia variedad de benzaldehídos hidroxilados que permitieron obtener compuestos con perfiles de reactividad que difieren del de las sapogeninas esteroidales no funcionalizadas y que además algunos de estos demostraron ser bioactivos y con propiedades interesantes en estado sólido.

Abstract

Steroid sapogenins are metabolites widely distributed in nature, which have been studied for more than 70 years because of their intrinsic biological activity and, many members of this family of compounds have served as starting materials in the synthesis of a wide variety of bioactive steroids. Our research group has described important modifications to the spiroketal side chain of steroidal sapogenins and recently reported the synthesis of a new family of compounds called 23*E*-benzylidene spirostanes, which were shown to have reaction modes not described so far.

Due to the particular reactivity conferred on these compounds by the presence of the benzylidene fragment in the side chain, we set out to explore the reactivity and properties of derivatives with hydroxyl substituents in the said fragment.

This document describes the synthesis and characterization of new monomeric and dimeric steroidal derivatives, obtained through $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation with a wide variety of hydroxylated benzaldehydes that allowed to obtain compounds with reactivity profiles that differ drastically from the non-functionalized steroid sapogenins and some of these derivatives proved to be bioactive and with interesting solid-state properties.

Introducción.

Los esteroides son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza que tienen un papel fundamental en una gran variedad de procesos en los organismos vivos. Dentro de este gran grupo de compuestos se encuentran las sapogeninas esteroidales, que son metabolitos secundarios de las plantas que han recibido considerable atención desde principios del siglo XX por parte de diversos grupos de investigación. Estas moléculas han servido como materias primas de fácil acceso y de bajo costo para la obtención de una amplia variedad de esteroides bioactivos como antitumorales, hormonas, promotores del crecimiento vegetal, entre otros. Además, en los últimos años, se ha demostrado que estas sapogeninas tienen actividades biológicas importantes *per se*.

En México, la historia de la industria y la química de los esteroides guardan una especial relación con las sapogeninas esteroidales. Alrededor del año 1940, Russell E. Marker encontró que la *cabeza de negro* y el *barbasco* (plantas mexicanas del género *Dioscorea*) eran una excelente fuente de sapogeninas esteroidales. Posteriormente, la "Degradación de Marker" permitió generar precursores de hormonas sexuales de manera semisintética, lo que cambió dramáticamente el control natal; pues a partir de estos precursores sintéticos fue posible llegar, unos años después, a la síntesis del primer anticonceptivo oral: la noretindrona.

Las sapogeninas esteroidales se diferencian de todos los demás esteroides porque tienen una cadena lateral espirocetálica, que les brinda una reactividad particular y la modificación o escisión de este fragmento siempre está involucrada en la síntesis de productos naturales o en la obtención de nuevos derivados esteroidales con propiedades interesantes. Por estas razones, la modificación de la cadena lateral sigue, y seguramente, seguirá siendo un tema de interés para los químicos orgánicos.

Por lo anterior, en este trabajo nos centramos en la síntesis, caracterización y estudio de la reactividad de nuevos derivados de sapogeninas esteroidales que tienen perfiles de reactividad que difieren drásticamente del de las sapogeninas no sustituidas y que además presentan actividades biológicas interesantes.

Capítulo 1. Antecedentes.

1.1. Esteroides.

Los esteroides son metabolitos secundarios derivados de los triterpenos^{1,2} que están presentes en organismos animales y vegetales, y que tienen una importancia biológica significativa pues presentan funciones vitales para las células. Las diferencias estructurales en los esteroides, así como la diversidad estructural generada por la presencia de cadenas laterales, dan como resultado un amplio grupo de productos naturales biológicamente importantes que han sido estudiados ampliamente (**Figura 1**).²

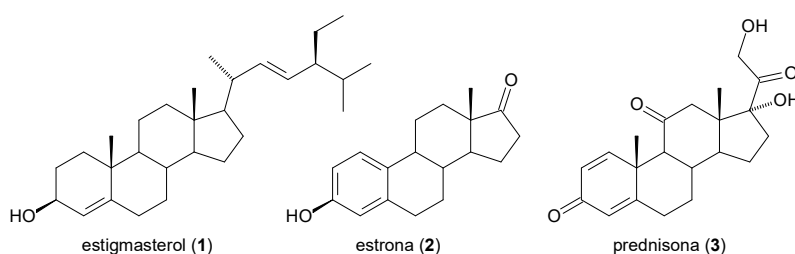


Figura 1. Algunos esteroides con importancia biológica

1.1.2. Características estructurales.

Los esteroides presentan un esqueleto hidrocarbonado tetracíclico que se denomina ciclopentanoperhidrofenantreno (**4**) o un esqueleto derivado del mismo por rupturas de enlace, expansiones o contracciones de anillo. Este núcleo es común en todos los esteroides y los anillos se designan por las letras mayúsculas A, B, C y D de izquierda a derecha (**Figura 2**).^{1,3-5}

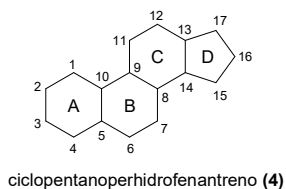


Figura 2. Núcleo esteroide y su numeración.

Es común encontrar grupos metilo en las posiciones C-10 y C-13 y la presencia de un grupo funcional o una cadena lateral en la posición C-17. En la naturaleza, se encuentran esteroides que presentan un grupo hidroxilo en la posición C-3 y se denominan esteroides.³⁻⁵

La nomenclatura sistemática de los esteroides establecida por la IUPAC,⁵ está basada en esqueletos precursores o carbociclos fundamentales de acuerdo al número de carbonos que

componen al esteroide. El primer grupo es el de los *gonanos* (C_{17}), que son los esteroides más simples pues mantienen únicamente el esqueleto del núcleo esteroidal y prácticamente no están presentes en la naturaleza.³ El segundo grupo es el de los *estrano*s, que son compuestos C_{18} que incluyen al metilo C-18. Generalmente estos compuestos presentan al anillo A aromático y a este grupo pertenecen sustancias que controlan la actividad estrogénica en los mamíferos (**5**). Los *androstanos* son compuestos C_{19} que incluyen los grupos metilo en las posiciones C-10 y C-13. A este grupo pertenecen las hormonas que regulan el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos (**6**). El siguiente grupo es el de los *pregnanos* (C_{21}), sustancias que retienen el núcleo intacto de 19 átomos de carbono y además tienen una cadena lateral de dos carbonos en la posición C-17. Pertenecen a este grupo los compuestos responsables de la regulación hormonal reproductiva femenina (**7**), las progestinas usadas como anticonceptivos (**8**) y los glucocorticoides, conocidos por su actividad antiinflamatoria, que son también llamados derivados del pregnano (**9**). El grupo de los *colanos* se conforma de esteroides C_{24} e incluye a los ácidos biliares, que son compuestos que se secretan en el intestino para emulsionar las grasas y facilitar la digestión de éstas (**10**). Los *colestano*s son esteroides C_{27} que tienen el núcleo esteroidal y presentan una cadena lateral alifática en C-17, como el colesterol (**11**), que es un constituyente de las membranas celulares de los mamíferos (**Figura 3**).^{1,3-5}

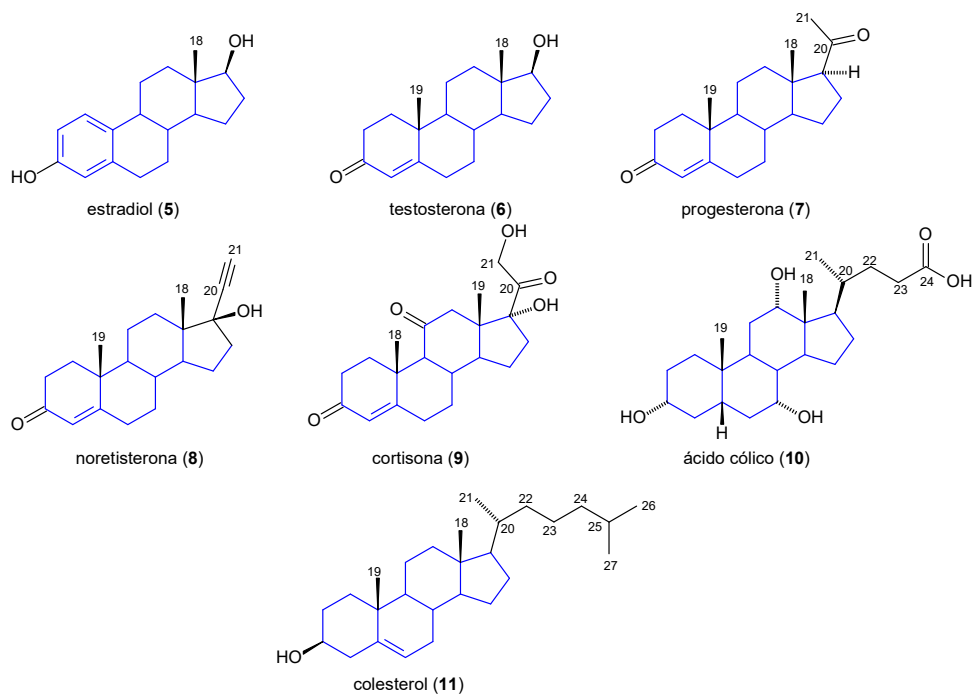


Figura 3. Ejemplos de los principales carbociclos fundamentales esteroidales.

Las características de reactividad y actividad biológica tan marcadamente diferenciadas entre compuestos que comparten un núcleo en común, se atribuyen a los grupos funcionales presentes y en parte también a la estereoquímica en las fusiones de los anillos. Los sistemas de anillos fusionados de seis o de cinco miembros se pueden unir de manera *trans* o *cis*. La fusión *trans* produce una molécula plana en la que los grupos cabezas de puente son axiales para ambos anillos. Por otro lado, cuando la fusión es de tipo *cis* lo que se observa es una molécula no-plana en la cual solo uno de los sustituyentes es axial y uno ecuatorial para cada anillo (**Figura 4**).^{1,6}

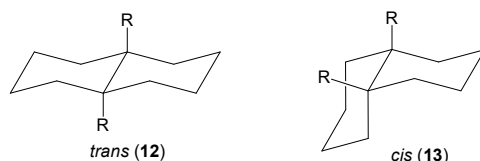


Figura 4. Fusiones de anillo en la *trans*-decalina y en la *cis*-decalina.

El núcleo esteroidal es prácticamente plano cuando todas las fusiones de los anillos son *trans* o contienen un carbono sp^2 en alguna de las uniones. No obstante, la forma del núcleo cambia a una “L” cuando los anillos A y B están fusionados de manera *cis*.⁷ En esteroides de origen natural se ha observado que la fusión de los anillos A/B puede ser *trans* o *cis* y también pueden presentarse insaturaciones en las posiciones C-4 (Δ^4) y C-5 (Δ^5) o que el anillo A sea aromático, como es el caso de los estrógenos.

Por convenio,⁵ cuando los anillos del núcleo esteroidal se denotan como proyecciones en el plano del papel (hexágonos) y con la orientación que se muestra en las **Figuras 1 y 2**, la estereoquímica de los sustituyentes en el núcleo esteroidal está indicada como “ α ” para la cara inferior de la molécula, o “ β ” para la cara superior. Las fusiones de los anillos se pueden designar utilizando α o β para el hidrógeno puente apropiado. De acuerdo al H-5, los esteroides pueden agruparse en dos series; los 5α -esteroides, donde todos los anillos están orientados de manera similar y la serie 5β en la que la unión A/B es *cis*. La diferencia entre 5α y 5β -esteroides tiene un efecto significativo en las propiedades espectroscópicas y químicas (**Figura 5**).⁴

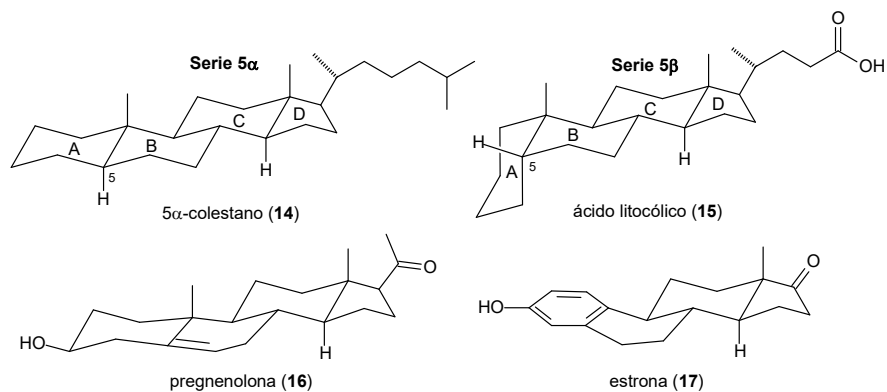


Figura 5. Estereoquímica de fusiones de anillos en esteroides naturales.

1.2. Saponinas esteroidales.

Las saponinas esteroidales son metabolitos distribuidos ampliamente en la naturaleza, principalmente en plantas y en organismos marinos y comúnmente se encuentran formando glicósidos de alto peso molecular denominados *saponinas*. El aglicón o porción no glicosídica de la molécula de saponina es llamada genina o saponina y dependiendo del tipo de saponina presente, las saponinas se clasifican en tres clases o familias: glicósidos triterpénicos (18), glicósidos esteroidales (19) y glicósidos de alcaloides esteroidales (20) (Figura 6).⁸⁻¹²

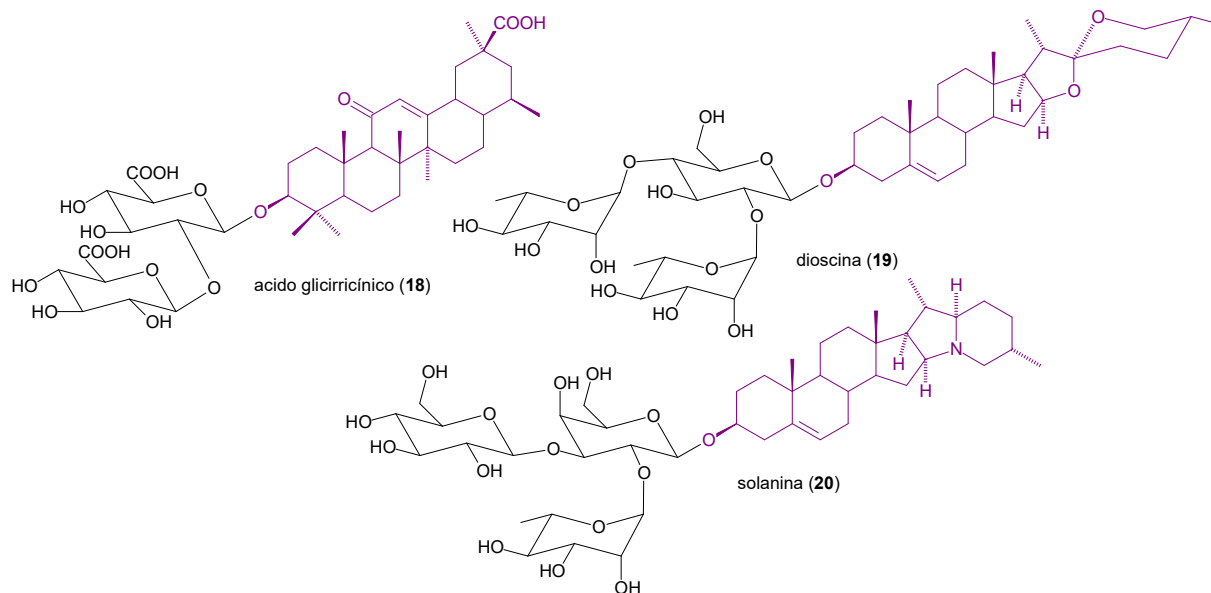


Figura 6. Estructura de las saponinas.

La gran mayoría de saponinas forman espumas estables en soluciones acuosas, lo que permite que la savia de algunas plantas que contienen saponinas se emplee como jabón, de ahí el nombre de saponina (del latín sapon = jabón).

Las sapogeninas esteroidales han sido estudiadas desde hace más de 70 años, pues además de su actividad biológica intrínseca, muchos miembros de esta familia de compuestos han servido como materias primas en la síntesis de una amplia variedad de esteroides bioactivos^{13,14} que incluyen hormonas sexuales,¹⁵ antitumorales análogos de cefalostatinas y ritterazinas,¹⁶ y promotores del crecimiento vegetal,¹⁷ entre otros (**Figura 7**).

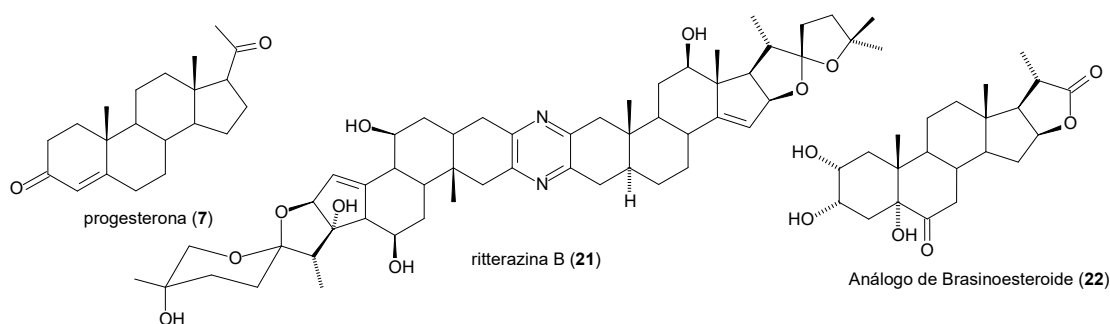


Figura 7. Algunos esteroides bioactivos obtenidos a partir de sapogeninas esteroidales.

1.2.1. Características estructurales.

Las sapogeninas esteroidales son esteroides que poseen un esqueleto de 27 átomos de carbono que se compone del núcleo de **ciclopentanoperhidrofenantreno** y de una **cadena lateral espirocetálica** que está formada por dos fragmentos heterocíclicos unidos a través del carbono C-22. Los heterociclos E y F son consecuencia de una cetalización intramolecular que tiene lugar después de la introducción de un grupo carbonilo en C-22 y grupos hidroxilos en C-16 y C-26 en el núcleo de colestano.^{10,13} En general, estos compuestos se dividen en **16,22:22,26-diepoxicolestanos o espirostanos (23-26)** y **16,22:22,25-diepoxicolestanos o furoespirostanos (27)**. Aunque es posible encontrar otros tipos de cadenas laterales espirocetálicas en sapogeninas esteroidales naturales, las que se encuentran con mayor frecuencia son las de tipo espirostanos (**Figura 8**).^{1,5,18-21}

Aunque el esqueleto hexacíclico de los espirostanos puede ser portador de diferentes grupos funcionales en distintas posiciones, las principales variaciones estereoquímicas pueden

encontrarse en las posiciones C-5 y C-25. Las sapogeninas esteroidales, al igual que los esteroides, pueden agruparse en las series 5α (**23,26**), 5β (**24**) o Δ^5 (**25**) de acuerdo a la configuración de C-5 y adicionalmente pueden clasificarse, según la orientación ecuatorial o axial del metilo enlazado a C-25 en las series $25R$ (**23,25,26**) y $25S$ (**24**) respectivamente.^{1,10,18,19}

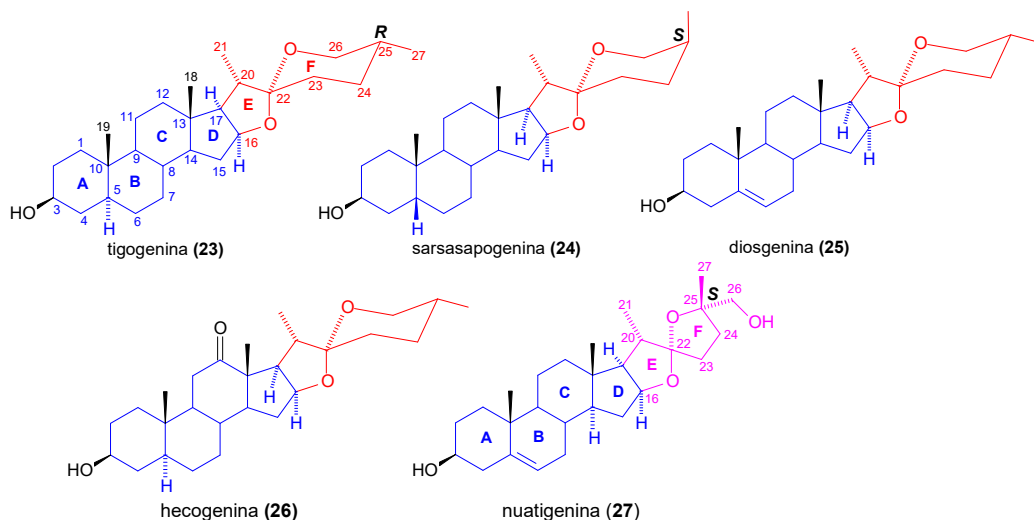


Figura 8. Estructura y numeración de sapogeninas con cadenas laterales espiroestánicas y furoespiroestánicas.

1.3. Cadena lateral espirocetálica.

Los espirocetales son subestructuras encontradas en una enorme variedad de productos naturales de complejidad diversa aislados de microorganismos, hongos, plantas, insectos y organismos marinos, que en los últimos 50 años se han convertido en objetivos sintéticos importantes para los grupos de investigación, no sólo por el desafío que presenta la síntesis de estos compuestos, sino también por su importancia farmacológica debido a que la mayoría de espirocetales naturales son compuestos biológicamente activos.^{22,23}

Los espirocetales son cetales cíclicos que se componen de dos anillos unidos a través de un solo átomo de carbono, denominado *carbono espiro*.²² La gran mayoría de la química de los espirocetales se centra en los sistemas de anillos generales de tipo 1,7-dioxaspiro[5.5]undecano (**28**), 1,6-dioxaspiro[4.5]decano (**29**) y 1,6-dioxaspiro[4.4]nonano (**30**), porque los espirocetales presentes en productos naturales se encuentran en alguna de estas categorías (**Figura 9**).²⁴

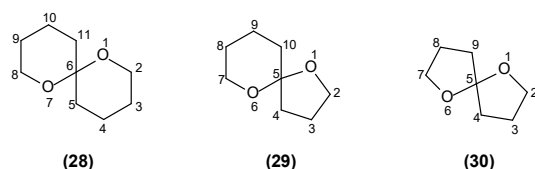


Figura 9. Sistemas de anillos espirocetálicos generales.

Los primeros ejemplos de compuestos de origen natural con un fragmento espirocetálico fueron las sapogeninas esteroidales. Sin embargo, establecer la estructura de la cadena lateral como la conocemos actualmente no fue una tarea fácil, debido a la carencia de técnicas analíticas estructurales que había a principios del siglo XX. Fue así que diversos investigadores, como Fieser y Jacobsen,²⁵ y Tschesche y Hagedorn,²⁶ propusieron estructuras que cumplieran con los perfiles de reactividad observados en sapogeninas esteroidales, es decir, grupos funcionales inertes en medios básicos y neutros, pero reactivos en medios ácidos (**Figura 10**).²⁷

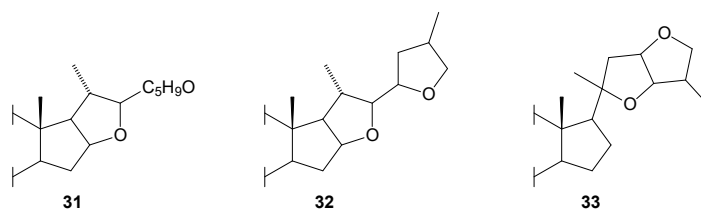


Figura 10. Primeras estructuras propuestas para la cadena lateral espirocetálica de las sapogeninas esteroidales.

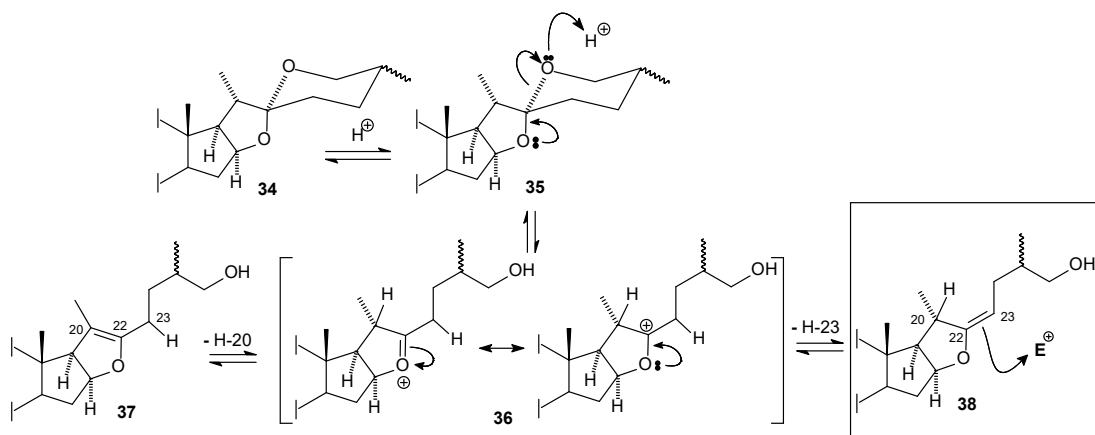
Finalmente, con ayuda de estos antecedentes y con experimentos propios, la estructura de la cadena lateral espirocetálica de las sapogeninas fue establecida por Marker y Rohrmann en 1939.²⁸

1.3.1. Reactividad de la cadena lateral espirocetálica.

El núcleo esteroidal de las sapogeninas mantiene un perfil de reactividad similar al de los esteroides en general. Sin embargo, la reactividad particular de esta familia de compuestos está determinada por la presencia de la cadena lateral espirostánica.

Actualmente se sabe que en disolución ácida, la cadena lateral espirocetálica experimenta la apertura reversible del anillo F a través de un equilibrio que incluye dos formas enólicas posibles (**37**, **38**).²⁸⁻³⁰ El éter enólico **38** ha sido señalado como intermediario en una gran variedad de

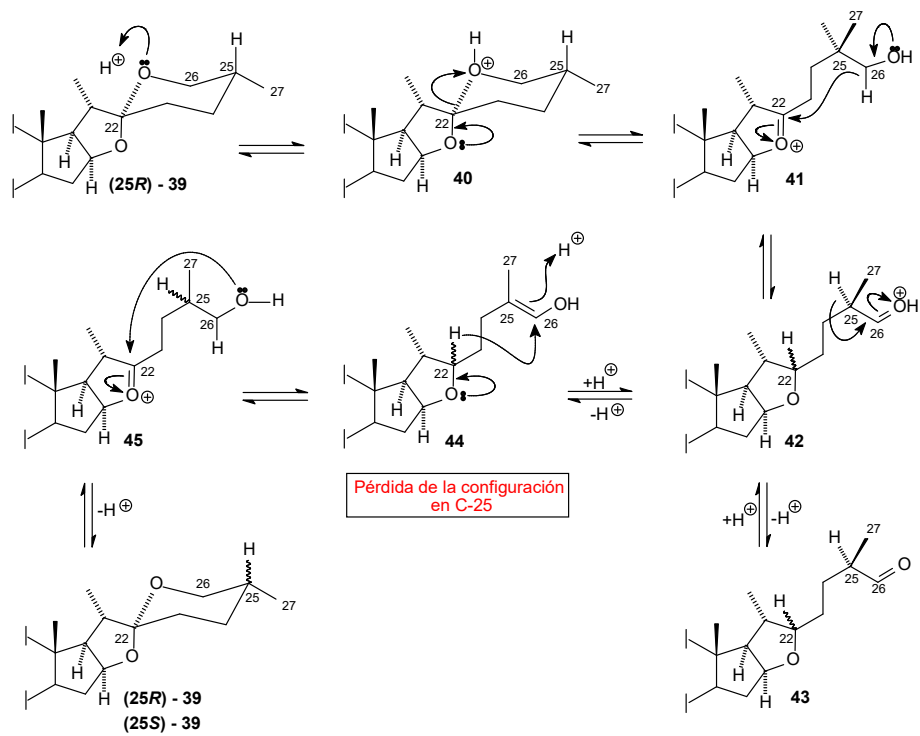
métodos para la introducción de sustituyentes en la posición C-23, que permiten la transformación de la cadena lateral (**Esquema 1**).



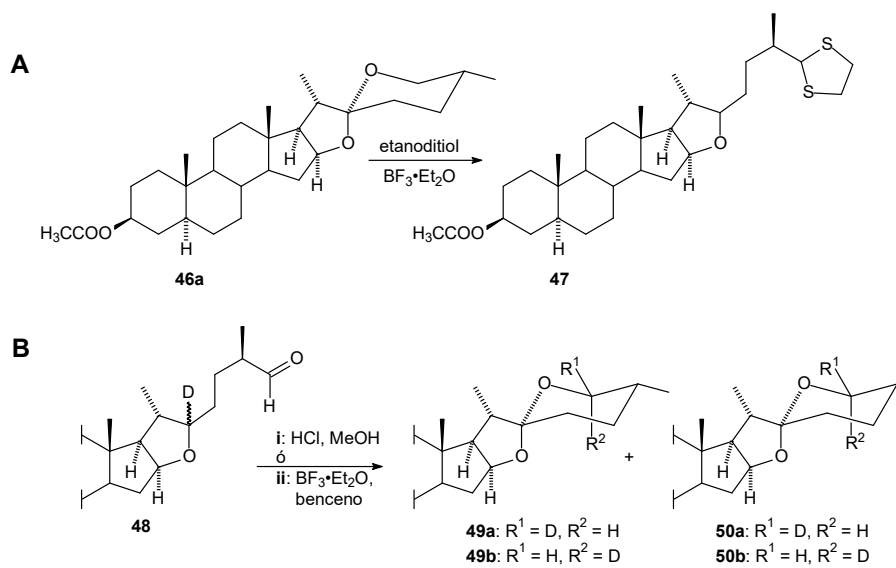
Esquema 1. Equilibrio ceto-enólico de la cadena lateral espirocetálica.

Durante las primeras investigaciones de la cadena lateral de las sapogeninas, se observó que el tratamiento en medio ácido de estas sustancias daba lugar a una isomerización del sistema espirocetálico, que inicialmente se pensó tenía lugar en el carbono espiro. No obstante, se demostró que la epimerización, que se denominó *reacción Iso*,^{26,28} ocurría en C-25 y fueron Woodward y colaboradores quienes demostraron que este proceso se llevaba a cabo por un mecanismo de óxido-reducción cuyo paso clave es la transferencia reversible de un ion hidruro entre C-22 y C-26 (**Esquema 2**).³¹

La migración de hidruro [1,5] propuesta por Woodward, fue demostrada por el grupo de investigación de Djerassi, que al estudiar la reactividad de la cadena lateral espirostánica a través del tratamiento de acetato de tigogenina (**46a**) con un ácido de Lewis en presencia de etanoditiol, lograron capturar al intermediario **43** generando el tiocetal **47** (**Esquema 3A**).³² Posteriormente Seo y colaboradores realizaron una demostración directa de la migración de hidruro a través del aldehído **48**, que tras el tratamiento en medio ácido generó una mezcla de sapogeninas epiméricas en C-25, cada una de ellas con un deuterio en la posición C-26 (**Esquema 3B**).³³



Esquema 2. Mecanismo de epimerización de C-25.



Esquema 3. Evidencias experimentales de la migración de hidruro entre C-22 y C-26.

Por otra parte, se conoce que la orientación axial o ecuatorial de C-27 influye en los modos de reacción de algunas de las transformaciones de la cadena lateral, pues la distribución en los productos puede variar dependiendo de la configuración de dicho centro quiral. Así mismo, se ha demostrado que las sapogeninas esteroidales que tienen un sustituyente en la posición C-23 muestran diferentes perfiles de reactividad, modificando el espectro de reacciones en los que el fragmento espiroacetálico puede participar.³⁴⁻³⁶

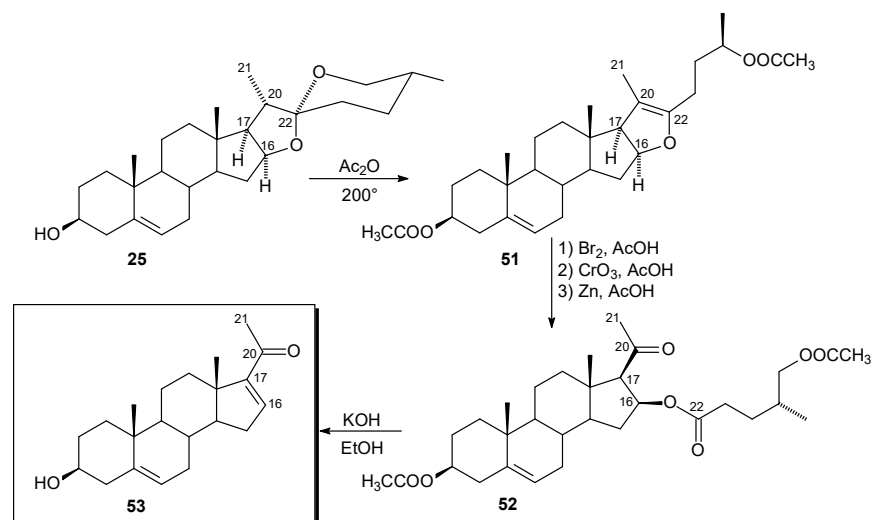
Es importante señalar que la síntesis de esteroides bioactivos a partir de sapogeninas esteroidales implica la degradación y/o modificación de la cadena lateral espirocetálica, por lo que a continuación se señalarán algunas de las transformaciones más importantes que involucran al fragmento espirocetálico.

1.3.2. Degradación de la cadena lateral espirocetálica.

El uso de hormonas sexuales como fármacos en la década de 1930, dio como resultado que se dedicara considerable atención a la obtención de progesterona, útil por su valor en el tratamiento de diversos trastornos menstruales y en la prevención de abortos involuntarios. Sin embargo, su alto costo y difícil obtención restringió su uso significativamente.^{27,37} Fue en 1940 que gracias a los trabajos de Marker, se logró la obtención de esta hormona utilizando como materias primas a las sapogeninas esteroidales.

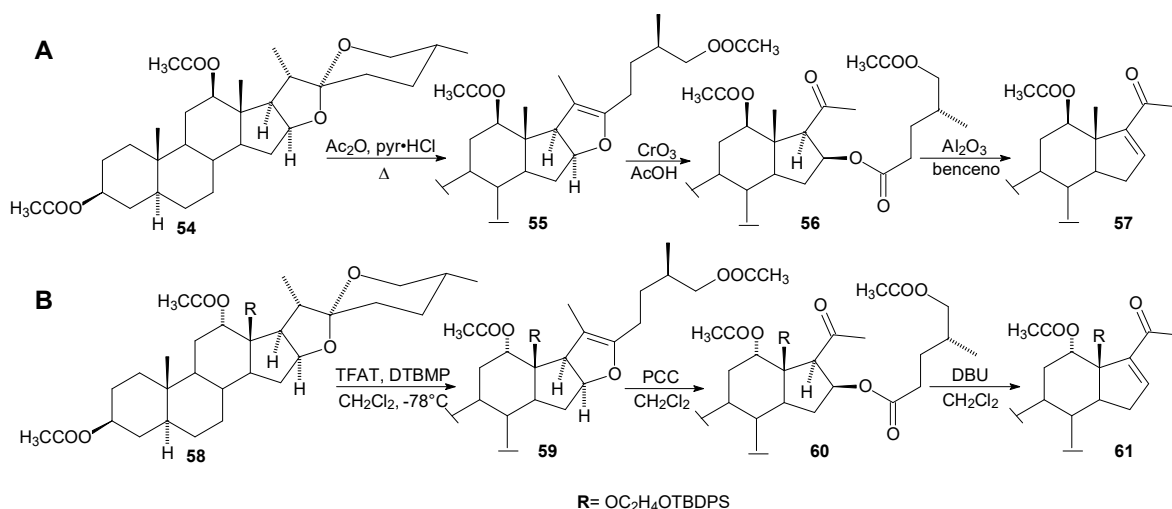
Sin lugar a dudas, una de las más grandes aportaciones, sino es que la más importante en la química de esteroides es la Degradación de Marker de la cadena lateral espirocetálica, pues fue un proceso que permitió la obtención de derivados pregnánicos con un buen rendimiento, a partir de sapogeninas esteroidales que son materias primas baratas y de fácil obtención.

El proceso de degradación consta de tres pasos: primero, la apertura de la cadena lateral para la obtención de la pseudosapogenina (**51**), después la ruptura del doble enlace 20-22 con CrO₃ y finalmente la hidrólisis del éster **52**, para generar la deshidropregnenolona (**53**), que es el intermediario clave en la síntesis de hormonas sexuales, como la progesterona y testosterona; y de corticosteroides, como la desoxicorticosterona (**Esquema 4**).^{1,27,38,39}



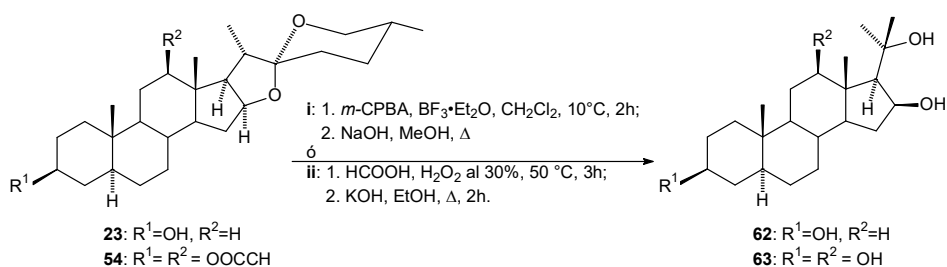
Esquema 4. Degradación de Marker de la cadena lateral espirocetálica.

Aunque la serie de reacciones propuesta por Marker sigue siendo el método más conocido y empleado para la obtención de derivados pregnánicos, existen actualmente alternativas al procedimiento original que generan el esqueleto de C_{21} con excelentes rendimientos y en condiciones más suaves. Fuchs y colaboradores describieron que el tratamiento de acetato de rockogenina (**54**) con hidrocloreuro de piridinio y anhídrido acético generó la pseudosapogenina **55** que fue transformada en el ceto éster **56** con la oxidación con CrO_3 en ácido acético, el cual fue hidrolizado con alúmina básica en benceno para sintetizar la cetona α,β -insaturada **57** con un rendimiento global del 56% (**Esquema 5A**).⁴⁰ Por otra parte, el grupo de Shair informó que el tratamiento de **58** con trifluoroacetyl trifluorometanosulfonato (TFAT) y 2,6-di-*tert*-butil-4-metil-piridina (DTBMP), generó la pseudosapogenina correspondiente, la cual se hizo reaccionar con clorocromato de piridinio (PCC) para obtener el ceto éster **60** que se hidrolizó con una base no nucleofílica para dar lugar al pregnano **61** con un rendimiento del 43% (**Esquema 5B**).⁴¹



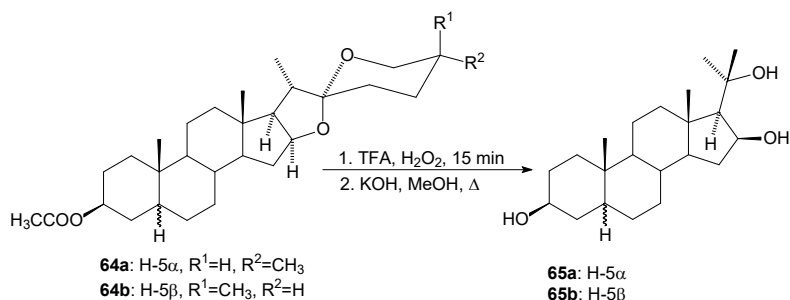
Esquema 5. Modificaciones recientes a la Degradación de Marker.

Otro tipo de reacciones que degradan la cadena lateral de sapogeninas esteroidales en un solo paso, son las oxidaciones de Baeyer-Villiger. Se ha informado que el tratamiento de sapogeninas esteroidales con distintos perácidos producen 20(S)-pregnan-3 β -16 β ,20-trioles. Por ejemplo, el tratamiento de sapogeninas esteroidales con ácido *m*-cloro-peroxibenzoico (*m*-CPBA) en presencia de BF₃•Et₂O genera el pregnantriol **62** con un muy buen rendimiento (82%).⁴² Del mismo modo, el procedimiento descrito para la sapogenina **62** con ácido fórmico y peróxido de hidrógeno producía el correspondiente triol **63** con un rendimiento del 93% (**Esquema 6**).⁴³



Esquema 6. Eliminación de la cadena lateral de sapogeninas esteroidales con perácidos.

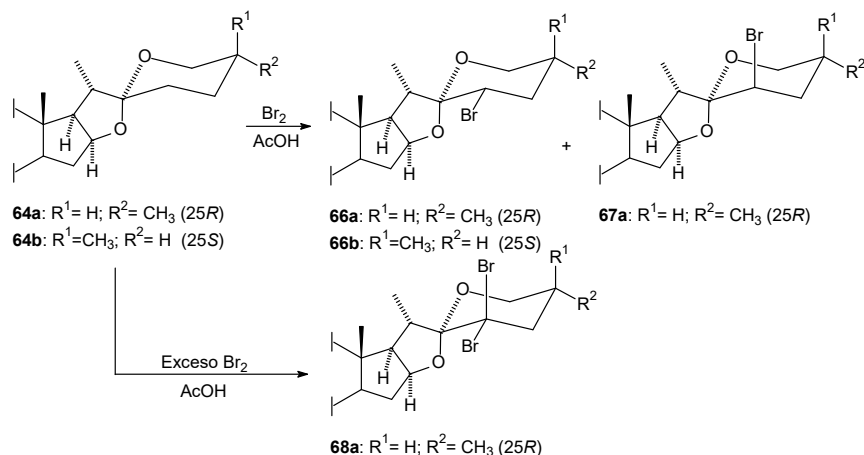
Muy recientemente, nuestro grupo de trabajo realizó una importante aportación a la síntesis de pregnantrioles a partir de sapogeninas esteroidales con una nueva metodología que utilizó al ácido trifluoroperoxiacético generado *in situ* como agente oxidante, con la cual los productos de la oxidación de Baeyer-Villiger se obtuvieron en 15 minutos y con rendimientos superiores a los reportados anteriormente (97%) (**Esquema 7**).⁴⁴



Esquema 7. Escisión de la cadena lateral con ácido trifluoroperoxiacético.

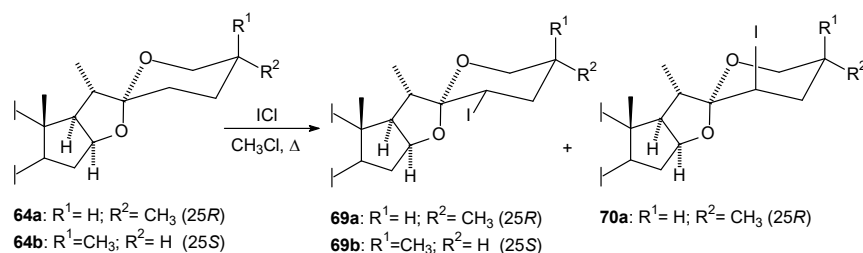
1.3.3. Reacciones de sustitución en C-23 de las sapogeninas esteroidales.

La síntesis de esteroides bioactivos a partir de sapogeninas esteroidales, generalmente involucra la introducción de sustituyentes en la posición C-23 y debido a esto se han descrito una gran variedad de métodos con este fin. Dentro de las primeras investigaciones sobre la introducción de sustituyentes en la cadena lateral, Marker y Rohrmann describieron la monobromación de algunas sapogeninas esteroidales al tratar a los acetatos de sapogeninas de las series 25R y 25S con Br₂ y ácido acético para obtener una mezcla epimérica en C-23 de los compuestos bromados.⁴⁵ En trabajos posteriores de otros grupos de investigación, se encontró que al utilizar un exceso del halógeno en la reacción ocurría la dibromación en C-23.⁴⁶⁻⁴⁸ Trabajos más recientes, demostraron que la bromación de los acetatos de sapogeninas de la serie 25R genera los epímeros ecuatorial y axial en C-23, con una relación 3:1 y que con un exceso de halógeno se produce el derivado dibromado. Sin embargo, el tratamiento de espirostanos de la serie 25S únicamente produce el derivado ecuatorial (**Esquema 8**).^{49,50}



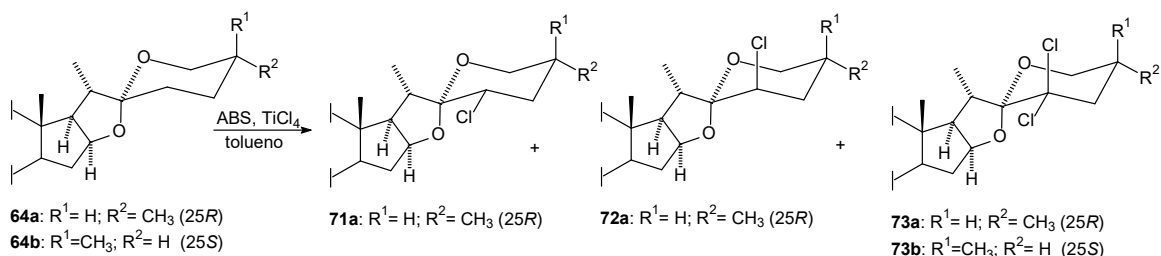
Esquema 8. Bromación de sapogeninas esteroidales de las series 25R y 25S.

En 1966, se describió que el tratamiento de acetato de sapogeninas de las series 25R y 25S con cloruro de yodo a reflujo de cloroformo, conducía a la introducción estereoselectiva de un yodo ecuatorial (*R*) en la posición C-23.⁴⁹ No obstante, nuestro grupo de investigación demostró que el acetato de tigogenina (25R), bajo estas condiciones de reacción, generaba la mezcla epimérica de yodotigogenina 23R (69a) y 23S (70a), mientras que en el caso del acetato de sarsapogenina (25S) únicamente se obtenía el isómero 23S (69b) (Esquema 9).³⁵



Esquema 9. Productos de la yodación de sapogeninas esteroidales de las series 25R y 25S.

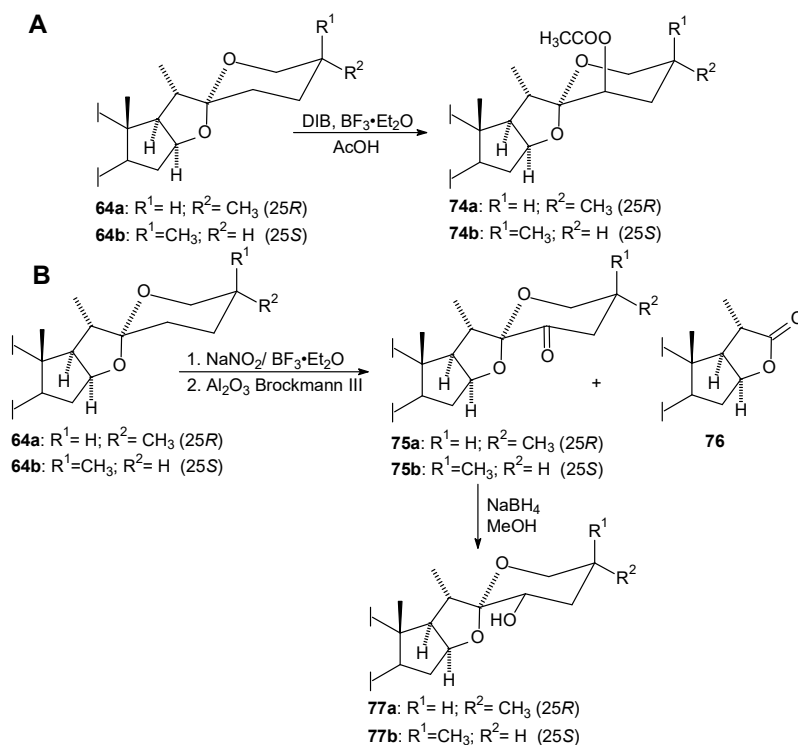
Recientemente se reportó que el tratamiento de sapogeninas esteroidales con anhídrido bencenselenénico (ABS) en presencia de tetracloruro de titanio produce la cloración en C-23. Para la serie 25R se obtuvo una mezcla epimérica de los derivados monohalogenados (71a y 72a) y el derivado dihalogenado (73a), pero en el caso de la serie 25S se obtiene únicamente el producto dihalogenado de la serie 25S (71b) (Esquema 10).⁵¹



Esquema 10. Reacción de cloración de la cadena lateral espirocetálica.

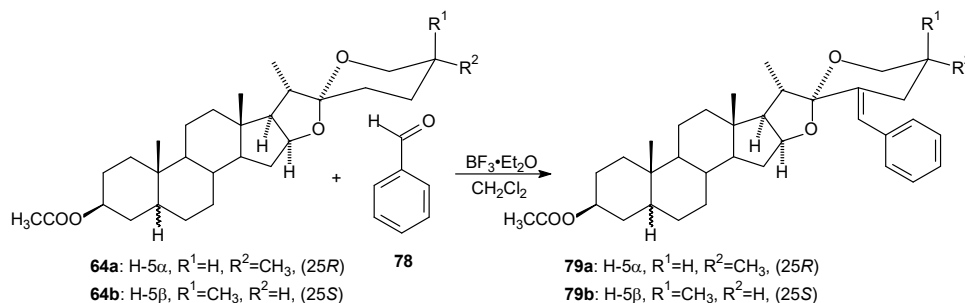
Muchos esteroides bioactivos con cadenas laterales espirocetálicas, presentan funciones oxigenadas en el fragmento espiroestánico y esto hace de gran importancia el diseño de métodos para la introducción de grupos oxigenados en la cadena lateral. Nuestro grupo de trabajo describió que el tratamiento de sapogeninas esteroidales con diacetoxiyodosobenceno (DIB) en presencia de un ácido de Lewis, en ácido acético, genera la acetoxilación axial en C-23 en un solo paso (Esquema 11A).⁵² Por otra parte, la reacción de acetatos de sapogeninas con nitrito de sodio y iterato de trifluoruro de boro, seguido de una cromatografía en columna de alúmina neutra,

produce las 23-oxosapogeninas correspondientes y en menor proporción la lactona dinorcolónica. La reducción de **75** con borohidruro de sodio en metanol, genera mayoritariamente (89%) el hidroxilo ecuatorial en C-23 (**Esquema 11B**).^{53,54}

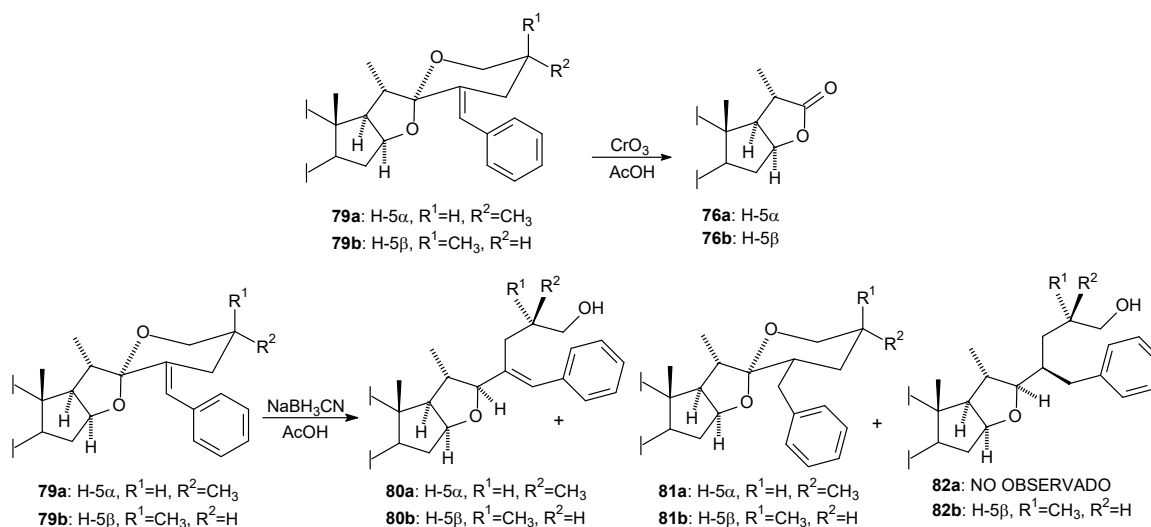


Esquema 11. Reacciones de oxidación de la cadena lateral espirocetálica.

Nuestro grupo de investigación ha descrito modificaciones importantes a la cadena lateral espirocetálica^{35,53,54} y recientemente informó que el tratamiento de sapogeninas esteroidales acetiladas con benzaldehído (**78**) en presencia de BF₃•Et₂O generó una nueva familia de compuestos llamada 23*E*-bencilidenespirostanos (**79a/b**) (**Esquema 12**) y en estudios posteriores se demostró que estos compuestos presentan modos de reacción que se diferencian drásticamente de los descritos actualmente para las sapogeninas esteroidales (**Esquema 13**).^{55,56}



Esquema 12. Síntesis de los 23*E*-bencilidenespirostanos.

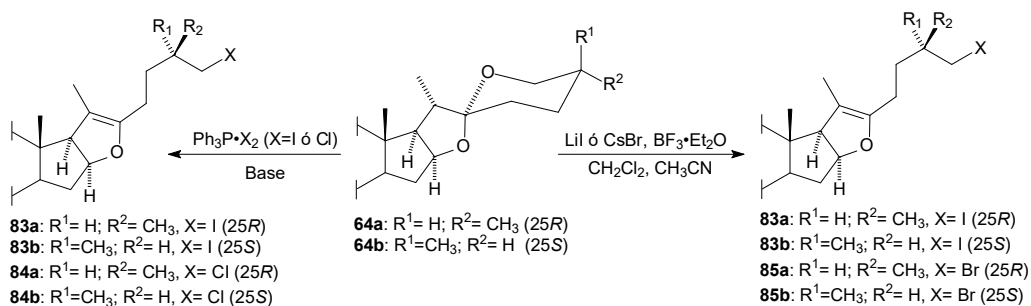


Esquema 13. Nuevos modos de reacción de la cadena lateral esteroestánica inducidos por la presencia de la agrupación 23E-bencilideno.

1.3.4. Apertura de la cadena lateral espirocetálica.

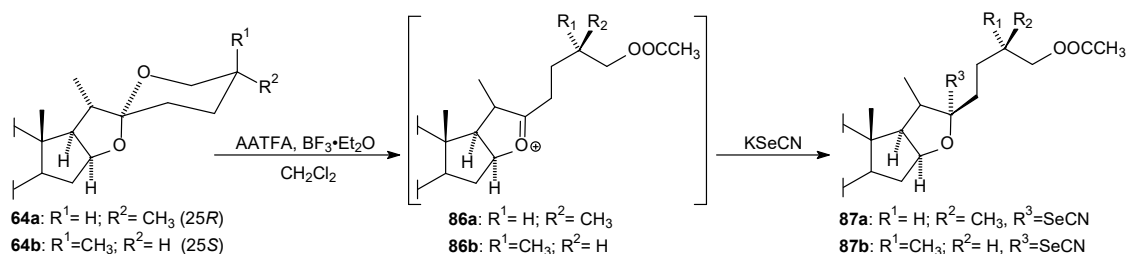
La apertura del anillo F de la cadena lateral espirocetálica está involucrada en la síntesis de esteroides bioactivos, como las hormonas sexuales y derivados análogos a cefalostatinas y ritterazinas. Debido a esto se han desarrollado métodos para la obtención de derivados furostánicos a partir de sapogeninas esteroidales.

El tratamiento de sapogeninas esteroidales con haluros de trifenilfosfina ($\text{Ph}_3\text{P}\cdot\text{X}_2$) en presencia de una base débil (2,6-lutidina o imidazol) da lugar a la apertura oxidativa del anillo F, produciendo la 26-halo-pseudosapogenina con buenos rendimientos.⁵⁷ Recientemente, se describió que los esteroestanos esteroidales en presencia de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ y bromuro de cesio o yoduro de litio, generan también las pseudosapogeninas halogenadas en C-26 (**Esquema 14**).⁵⁸



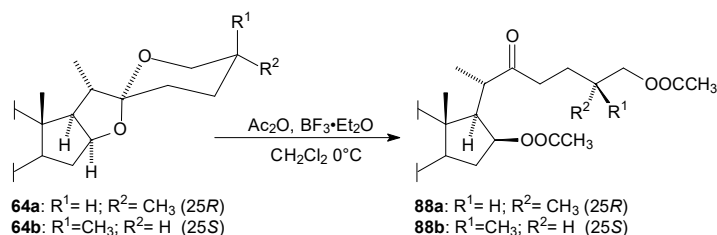
Esquema 14. Síntesis de 26-halo-pseudosapogeninas

También, la obtención de derivados furostánicos sustituidos en C-22 se llevó a cabo con el anhídrido mixto acético-trifluoroacético (AATFA) en medio ácido de Lewis, formando el oxocarbenio intermediario **86** que al estar en presencia de un nucleófilo permite una adición estereoselectiva en C-22 (**Esquema 15**).⁵⁹



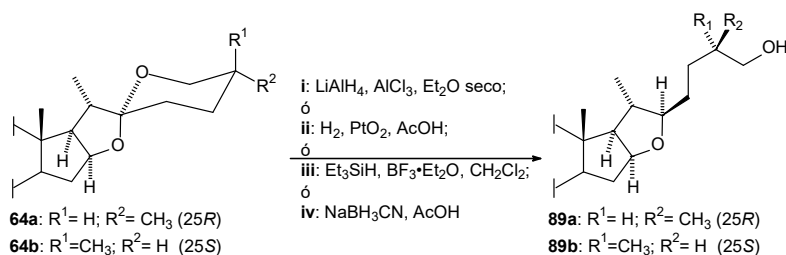
Esquema 15. Obtención de pseudosapogeninas sustituidas en C-22.

Por otra parte, se ha descrito que la reacción de espirostanos de las series 25R y 25S con anhídrido acético y BF₃•Et₂O a baja temperatura, provoca la completa apertura de la cadena lateral formando los derivados 22-oxocolestanos (**Esquema 16**).^{36,60}



Esquema 16. Obtención de derivados 22-oxocolestanos.

Se han descrito también, distintos métodos para la obtención de dihidrosapogeninas esteroidales a partir de la apertura reductiva del fragmento espirocetálico. Se conoce que la reducción en medios ácidos de Brønsted o de Lewis con agentes reductores como: hidruro de litio aluminio,⁶¹ hidrógeno,⁶² trietilsilano⁶³ y cianoborohidruro de sodio,⁶⁴ generan la adición de un hidruro en C-22 de manera estereoselectiva (**Esquema 17**).



Esquema 17. Apertura reductiva de la cadena lateral espiroestánica.

1.4 Actividad antitumoral de sapogeninas esteroidales.

Además de su uso como materias primas, en trabajos realizados en los últimos años, se ha demostrado que las sapogeninas esteroidales son compuestos bioactivos con posibles aplicaciones en el tratamiento de múltiples trastornos, entre los que se incluyen varios tipos de cáncer. La diosgenina (**25**) ha sido la más estudiada y se ha demostrado que tiene efectos protectores y terapéuticos.^{65,66}

Se ha informado que la diosgenina afecta diversas fases de la formación de tumores, incluida la proliferación de células tumorales, la apoptosis, la transición epitelio-mesenquimal, la migración celular y la angiogénesis. Las investigaciones sobre los mecanismos anticancerígenos de la diosgenina se centran principalmente en la inhibición de crecimiento e inducción de la apoptosis.⁶⁵ El efecto anticancerígeno de la diosgenina se ha estudiado en diversas líneas celulares tumorales y se ha demostrado que esta bioactividad depende tanto del tipo de célula como de la concentración de la sapogenina. Hasta el momento se sabe que la diosgenina tiene actividad antiproliferativa en el cáncer de próstata (líneas celulares PC-3 y DU-145 células), carcinoma de colon (células HCT-116 y HT-29), eritroleucemia (células HEL), carcinoma escamoso (A431, Hep2, y células RPMI 2650), carcinoma hepatocelular (células HepG2 y HCC), cáncer gástrico (células BGC-823), cáncer de pulmón (células A549), cáncer de mama (MCF-7) y leucemia mieloide crónica humana (CML) (células K562).⁶⁷

Dentro de las diversas fases de la tumorigénesis, se ha observado que la diosgenina parece tener una gran capacidad para inducir la muerte celular apoptótica y evitar la transformación a maligna. Se ha demostrado que los efectos antitumorales de este compuesto, están mediados a través de la activación de la proteína p53 (activadora de la apoptosis), detención del ciclo celular, modulación de la actividad de caspasa-3 (inductora de la muerte celular) y activación de la vía de señalización de transcripción STAT3 (factor supresor de tumores).^{65,67}

1.5. Esteroides con actividad antioxidante.

Aun cuando se conoce una amplia variedad de esteroides bioactivos, hasta el momento se ha descrito un número limitado de esteroides con actividad antioxidante.^{68,69}

El estrés oxidativo en células y tejidos se refiere a un desequilibrio en el organismo en el cual la generación de Especies Reactivas de oxígeno ($O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 principalmente) se encuentra aumentada y existe evidencia de que este desbalance esté involucrado en muchos desordenes de la salud como el cáncer, la aterosclerosis y la neurodegeneración.⁷⁰⁻⁷²

Debido a lo anterior, el estudio experimental y teórico de compuestos naturales y sintéticos con actividad antioxidante ha recibido considerable atención en los últimos años. El efecto protector contra el estrés oxidativo, ejercido por los antioxidantes de origen natural como el α -tocoferol (**90**) (también conocido como vitamina E) y el carotenoide fenólico 3,3'-dihidroxi-isorenieratano (**91**), así como el efecto del Trolox (**92**), un análogo sintético soluble en agua de la vitamina E, han sido bien documentados y el papel que tienen los grupos hidroxilo fenólicos presentes en estos compuestos y en otros antioxidantes fenólicos, tales como el ácido nordihidroguayarático (**93**) y el resveratrol (**94**), son bien conocidos (**Figura 11**).⁷³⁻⁷⁸

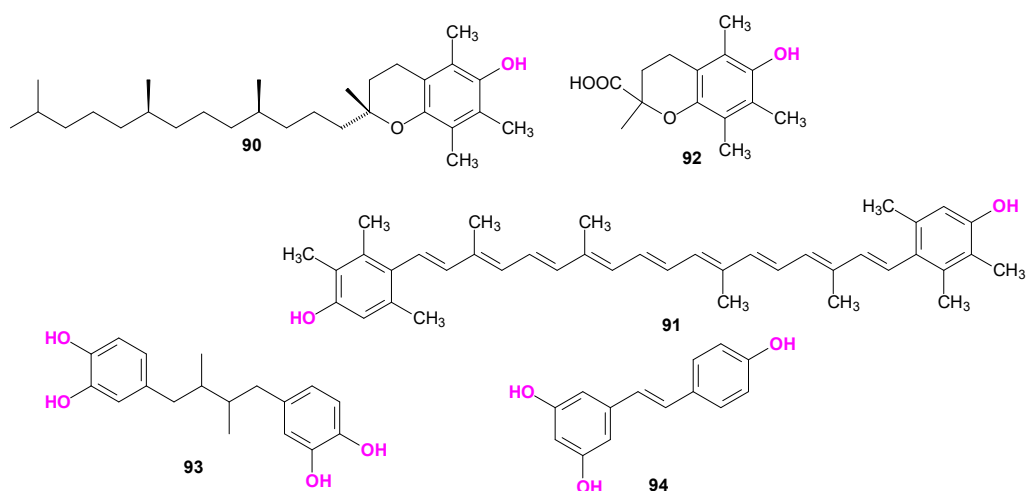


Figura 11. Algunos compuestos con actividad antioxidante.

La capacidad de ciertos esteroides, particularmente los estrógenos, para funcionar como antioxidantes y capturadores de radicales libres ha sido bien documentada. Se ha descrito que moléculas tales como el 17β -estradiol (**5**), y los catecolestrógenos 2-hidroxiestradiol (**95**) y 4-hidroxiestradiol (**96**) demuestran una significativa actividad antioxidante en diferentes condiciones experimentales y se ha señalado que la característica del anillo A fenólico en estas sustancias, que distingue a estas hormonas de otros esteroides, es un componente crucial en la potencia de su actividad biológica (**Figura 12**).^{68,69,78-80}

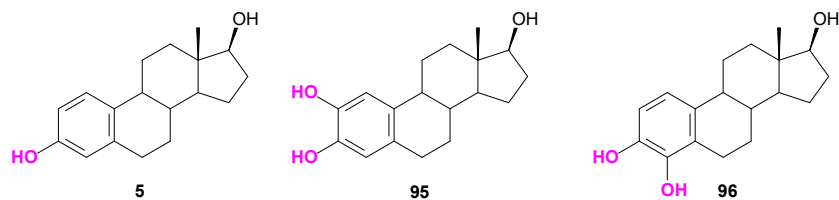


Figura 12. Esteroides con actividad antioxidante.

Para determinar la actividad antioxidante de una sustancia se ha desarrollado una amplia gama de métodos *in vitro* que esencialmente consisten en medir la resistencia de una sustancia a la oxidación cuando está en presencia de antioxidantes potenciales. La mayoría de las pruebas se llevan a cabo por el acortamiento del periodo de inducción de la reacción en cadena, ya sea mediante el uso de alta temperatura o un suministro aumentado de oxígeno.

A partir de estas pruebas, las actividades antioxidantes de una serie de compuestos puros y extractos de plantas se han determinado a través de la medición del consumo de oxígeno o la producción de hidroperóxidos u otros productos de degradación.⁸¹ Actualmente, un método muy utilizado y que tiene un enfoque diferente para la medición de dicha actividad, es el del radical estable 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH[•]), en el cual, para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos o extractos específicos, estos últimos se hacen reaccionar con este radical. La reducción del DPPH[•] genera una disminución de su absorbancia a una longitud de onda característica que es medible por métodos espectroscópicos. En su forma radical, el DPPH[•] presenta una máxima absorbancia a 515 nm, que desaparece después de la reducción por parte de otra molécula.⁸²⁻⁸³

1.6. Dímeros esteroidales.

Los dímeros esteroidales se consideraron inicialmente como meras curiosidades que se obtenían como subproductos en algunas reacciones y posteriormente fueron encontrados en la naturaleza. Actualmente han recibido considerable atención por parte de los químicos orgánicos debido a las particulares propiedades físicas y químicas que presentan estos compuestos, además de que son bien conocidos por su arquitectura rígida, predecible y asimétrica.⁸⁴⁻⁸⁶

Los dímeros esteroidales se pueden clasificar de acuerdo a su estructura, en dímeros acíclicos o lineales y en dímeros cíclicos. Los dímeros lineales implican conexiones directas entre los anillos del núcleo esteroidal (**97**, **98**), a través del metilo C-19 o por medio de grupos espaciadores (**99**) y forman el grupo principal de dímeros esteroidales. Por otro lado, en los dímeros cíclicos, la dimerización directa o a través de espaciadores genera nuevas estructuras macrocíclicas como los ciclocolatos o colafanos (**100**) (**Figura 13**).⁸⁴⁻⁸⁶

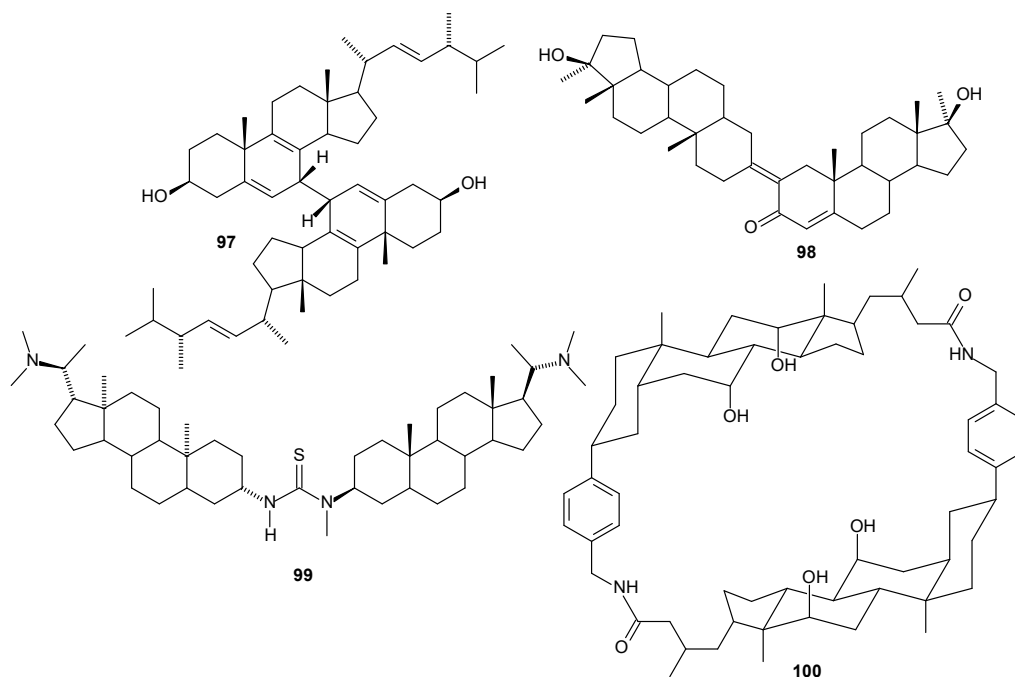


Figura 13. Diferentes estructuras presentes en los dímeros esteroidales de origen natural y sintético

Estas sustancias pueden clasificarse también en dímeros simétricos (**97**, **99**, **100**); cuando está formado por dos unidades monoméricas idénticas, o en no-simétricos (**98**) cuando las unidades monoméricas que lo conforman son distintas o cuando dos unidades idénticas están unidas de manera que no hay simetría en el dímero resultante. Otra forma de clasificar a los dímeros esteroidales es de acuerdo a su origen en dímeros naturales o sintéticos.⁸⁴

Como consecuencia al desarrollo actual en el campo de los dímeros esteroidales, se ha hecho necesaria una nueva definición para los dímeros esteroidales simétricos y no-simétricos, que permita incluir con mayor precisión a muchos de los nuevos derivados. Nuestro grupo de trabajo propone las siguientes definiciones: Dímero simétrico, cuando se compone de unidades idénticas

(97); Dímero no-simétrico, cuando las unidades que lo componen pertenecen a la misma familia esteroidal, pero se diferencian en algún sustituyente, centro estereogénico o no están unidas de forma simétrica (98, 99). Se sugiere también la inclusión del término Dímero híbrido, que se define como un dímero en el que las unidades que lo componen pertenecen a familias esteroidales distintas.

Los productos de la dimerización del núcleo esteroidal han mostrado tener características especiales que los hacen compuestos con aplicaciones en diferentes áreas. Las cefalostatinas y ritterazinas son dímeros esteroidales no-simétricos de origen natural que demostraron ser de los más potentes antitumorales descritos hasta la fecha. En especial, la cefalostatina 1 (101) mostró tener una DE_{50} de 0.1 – 0.001 μ M sobre líneas celulares de leucemia linfocítica P-388 (Figura 14).^{16,87}

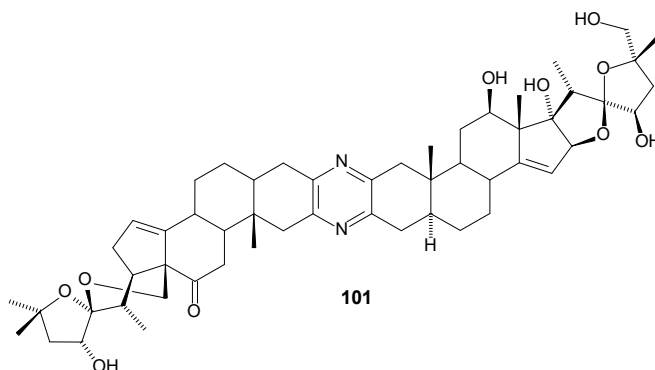


Figura 14. Estructura de la cefalostatina 1.

En el área de liberación de fármacos, Janout y colaboradores diseñaron las llamadas *sombrillas moleculares*, que son dímeros esteroidales derivados del ácido cólico, que ayudan a una molécula huésped de carácter polar a atravesar la membrana celular por difusión, gracias a las propiedades anfifílicas de los esteroides que la conforman (Figura 15).^{88,89}

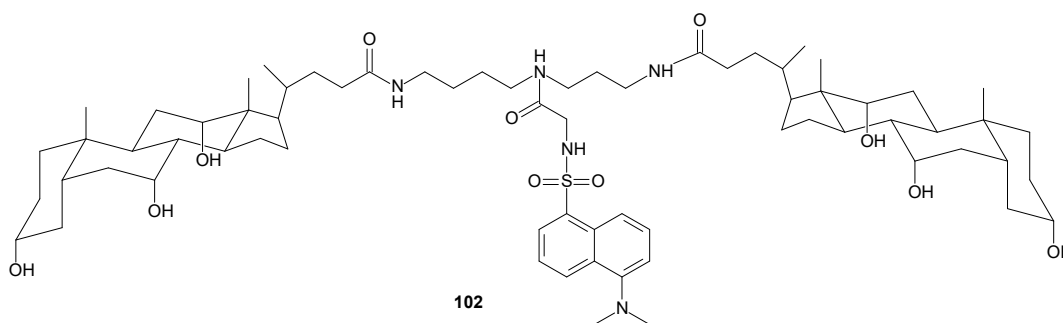


Figura 15. Estructura de una sombrilla molecular.

Algunos otros dímeros esteroidales demostraron tener potencial aplicación en el área del diseño de materiales y en la química supramolecular, pues algunas de estas sustancias tienen propiedades como cristales líquidos (**103**), formadores de micelas (**104**) o como organocatalizadores (**105**) (Figura 16).⁹⁰⁻⁹³

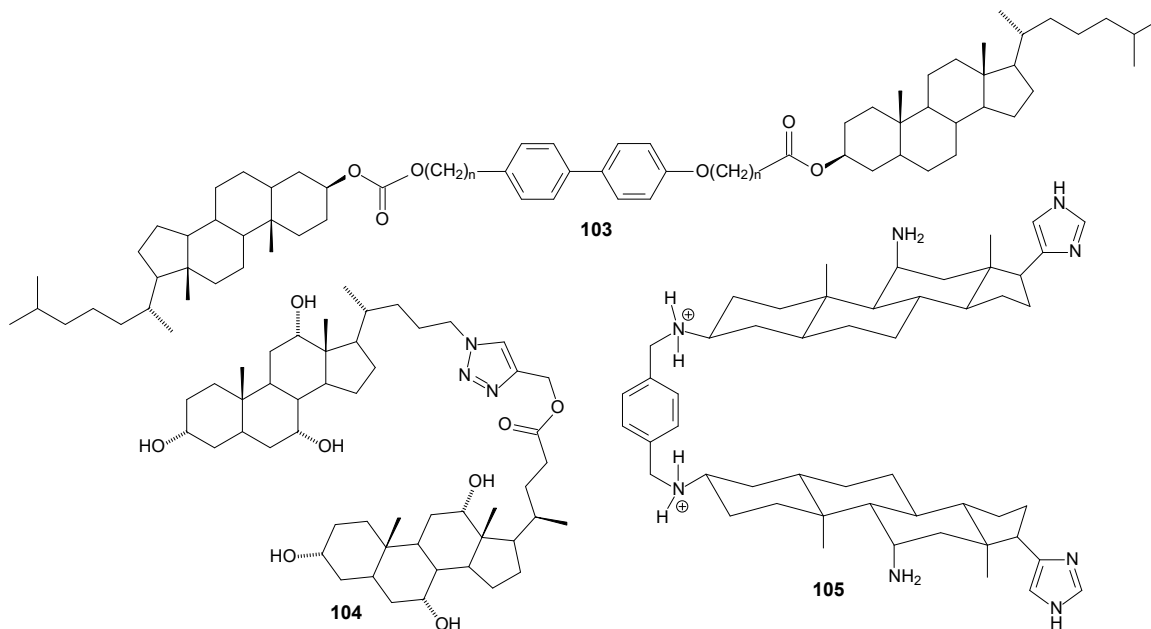
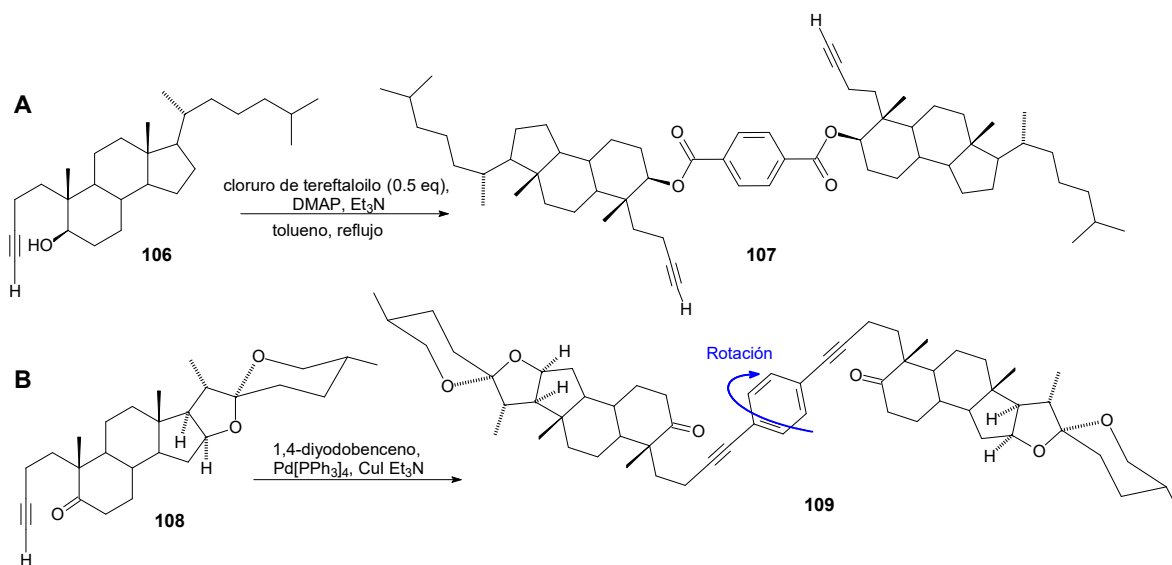


Figura 16. Dímeros esteroidales con aplicaciones en la síntesis y en diseño de materiales.

Nuestro grupo de trabajo ha hecho recientemente aportaciones importantes al campo de los dímeros esteroidales. Se informó la síntesis de novedosos dímeros esteroidales unidos a través de un fragmento de tereftaloilo que mostraron arreglos cristalinos interesantes (**Esquema 18A**).⁹⁴ También se reportó el diseño, síntesis y caracterización de un nuevo dímero esterooidal simétrico unido por un puente dietinil-bencénico (**109**) obtenido a través de una doble reacción de acomplamiento de Sonogashira. Este nuevo derivado mostró ser un rotor molecular con ejes flexibles y se probó que posee propiedades muy importantes como máquina molecular (**Esquema 18B**).⁹⁵



Esquema 18. Aportaciones de nuestro grupo de investigación a los dímeros esteroidales.

1.7. Solvatomorfismo.

La propiedad que tienen algunas moléculas de presentar diferentes formas cristalinas ha llamado la atención de la comunidad química y farmacéutica en los últimos años, pues se ha observado que muchas sustancias de interés biológico se pueden obtener en más de una forma cristalina y las propiedades de estos sólidos a menudo pueden ser bastante diferentes.^{96,97}

El *polimorfismo* es la propiedad de una sustancia para presentar diferentes estructuras cristalinas y que cada una de ellas tiene la misma composición elemental. Por otro lado, el término *solvatomorfismo* ayuda a definir los sistemas cristalinos de una sustancia que puede existir con distintos arreglos, pero donde las celdas unitarias son distintas en su composición debido a que presentan la inclusión de una o más moléculas de disolvente en la red cristalina.^{96,98}

Las propiedades como: capacidad calorífica, densidad, difusividad, dureza, color del cristal, solubilidad, higroscopicidad, entre otras; de un material dado, se ven afectadas por la naturaleza cristalina de la sustancia y esto puede tener un efecto directo en las aplicaciones del material.⁹⁶ Un ejemplo de esto es lo que ocurre con el conocido fármaco antiparasitario mebendazol (**110**). La forma metaestable C (**Figura 17A**) se prefiere clínicamente debido a su biodisponibilidad y menor toxicidad, pero se ha informado que este polimorfo puede convertirse en la forma A (**Figura 17B**),

en condiciones de mayor temperatura y humedad relativa, que es termodinámicamente más estable pero menos soluble y con una menor efectividad farmacológica.⁹⁸⁻¹⁰⁰

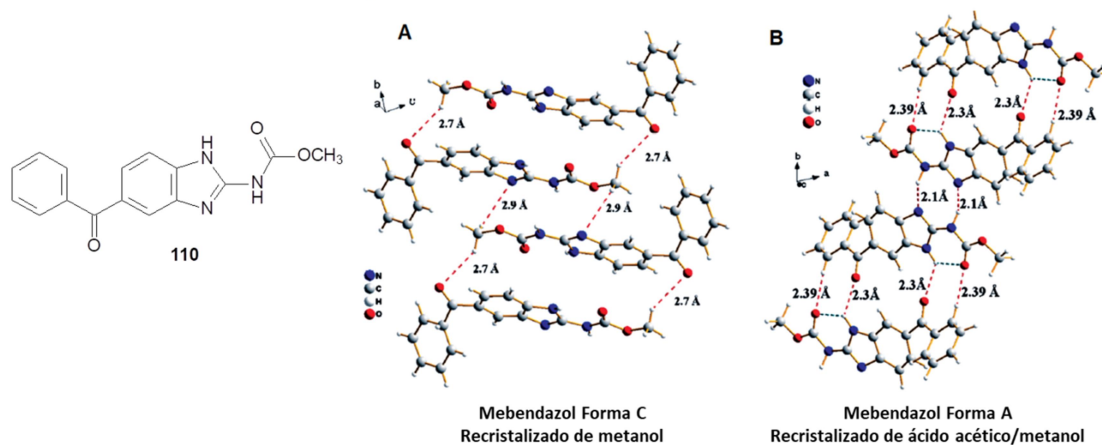


Figura 17. Formas cristalinas A y C del mebendazol.

Los solvatomorfos pueden clasificarse en cuanto a la relación del compuesto huésped respecto al disolvente en: estequiométricos, en los que existe una relación definida de disolvente a molécula huésped definida; y en no estequiométricos, donde la relación de disolvente a molécula puede variar continuamente.⁹⁸ Griesser identificó además a los solvatomorfos no estequiométricos como disoluciones sólidas en las que el disolvente puede estar presente en un modo intersticial, también llamados co-cristales intersticiales.¹⁰¹

Para las disoluciones acuosas, la formación y estabilidad de la red cristalina con el disolvente se debe a fuerzas intermoleculares fuertes en disoluciones de electrolitos, debido a las interacciones electrostáticas de iones con moléculas de disolventes polares. No obstante, cualquier agregado que consiste en un ión o molécula con una o más moléculas de disolvente se denomina *solvato*. Esto último, no es consistente con la situación en la mayoría de los solvatos cristalinos de compuestos orgánicos, donde las moléculas de disolventes interaccionan en los arreglos cristalinos a través de enlaces de hidrógeno o interacciones débiles (Fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas) entre el disolvente y las moléculas huésped.^{98,101}

Como se señaló, el papel de una molécula de disolvente es dar estabilidad a una red cristalina y esto puede lograrse de dos maneras principalmente: una donde las moléculas del disolvente

ocupan posiciones aisladas en la estructura cristalina y otra donde las posiciones reticulares agrupan las moléculas de disolvente a lo largo de canales en el arreglo cristalino.⁹⁸

El fármaco sulfatiazol (**111**) ha demostrado tener una gran capacidad de formación de solvatos donde las moléculas de disolvente están en las cavidades del arreglo tetragonal, donde la relación entre moléculas de fármaco y moléculas de disolvente es 1:1 (**Figura 18**).^{102,103}



Figura 18. Formas cristalinas de **111**. A: Estructura cristalina del complejo de inclusión con N-formil-piperidina, B: Estructura cristalina del solvatomorfo que incluye piridina en la cavidad tetragonal.

Los solvatomorfos en los cuales las moléculas de disolvente están ubicadas adyacentes a otras formando una cadena a lo largo de la red cristalina se dominan solvatos de tipo canal. Esta característica estructural se puede concebir como un canal de disolvente que existe a través del cristal.⁹⁸ Un ejemplo de este tipo de solvatomorfos son los que se obtienen con la N,N'-ditiodiftalimida (**112**) con nitrometano, etilbenceno, *p*-xileno y tolueno, en los que las moléculas de disolvente se encuentran desordenadas dentro de las cavidades formando canales continuos creados por secuencias de interacciones de apilamiento π - π y enlaces de hidrógeno (**Figura 19**).¹⁰⁴

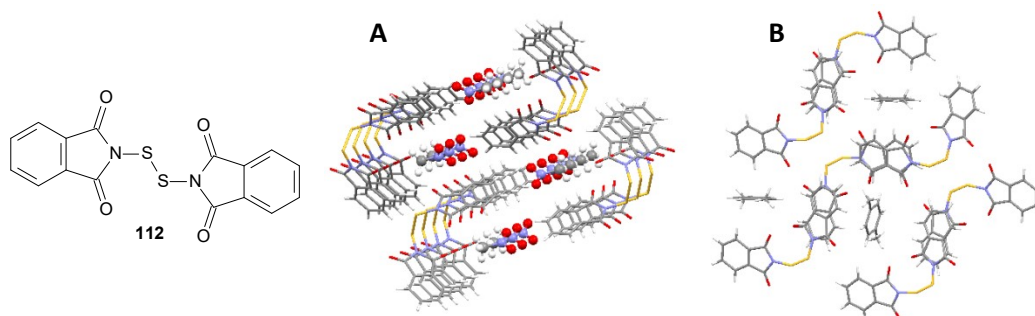


Figura 19. Solvatomorfos del compuesto **112** con nitrometano (A) y con *p*-xileno (B).

También se informó que el diacetato de triamcinolona (**113**), un fármaco corticosteroide, al cristalizar presentó un arreglo cristalino ortorrómbico que contenía canales a lo largo del eje cristalográfico, en el que se podían incluir varias moléculas de disolvente, en una relación molécula-disolvente 1:1 (**Figura 20**).¹⁰⁵

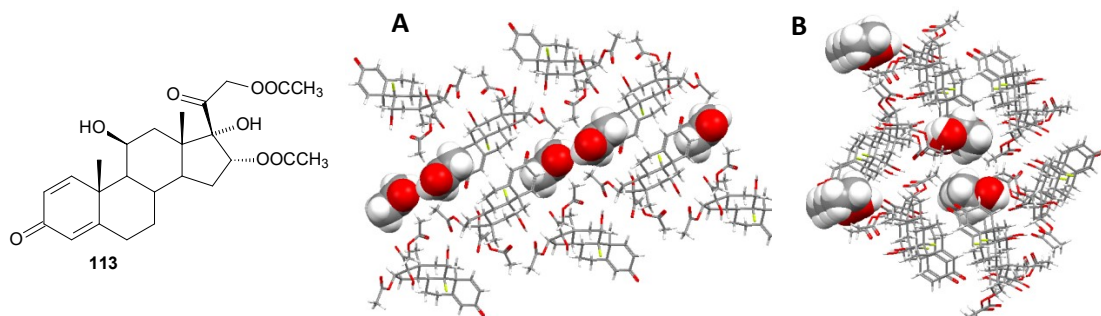


Figura 20. Solvatomorfos del esteroide **113** con acetona (A) y con etanol (B).

Por otro lado, se describió que el dímero esteroide 2,5-Bis(17 α -etinil-5 α -androst-2-en-17 β -ol)-4-nitroanilina generó un arreglo cristalino que presentaba cavidades que podrían reconocer o atrapar moléculas pequeñas dentro de la red cristalina. A través de estudios *in silico* se encontró que presentaba afinidad por distintas moléculas, entre las que se incluía al benceno (**Figura 21**).¹⁰⁶

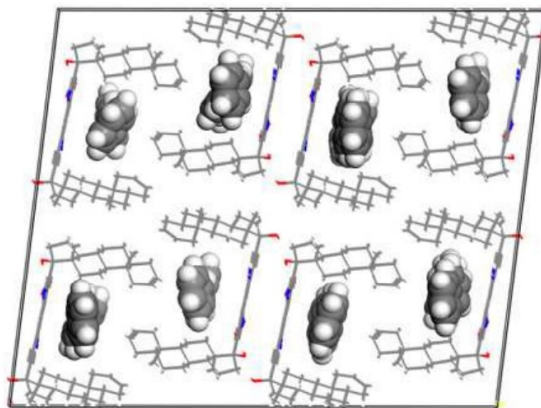
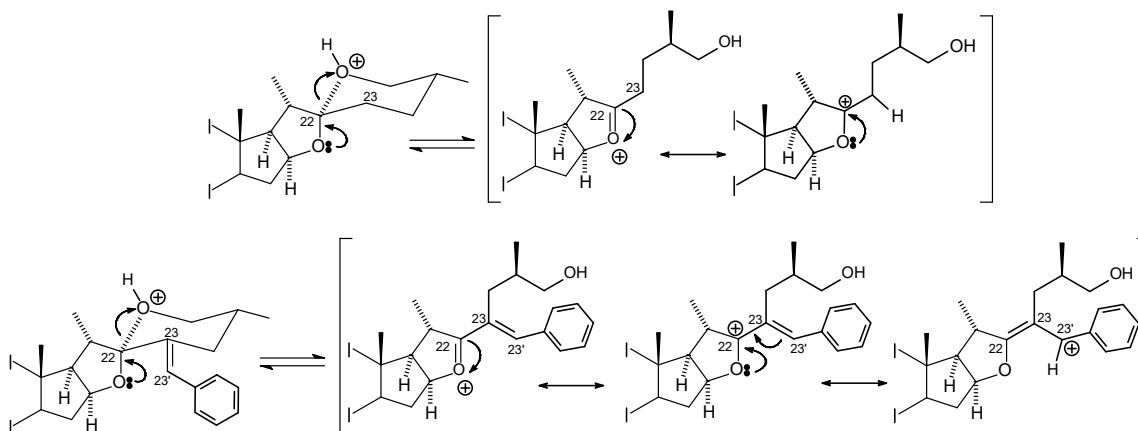


Figura 21. Canales en la red cristalina del dímero 2,5-Bis(17 α -etinil-5 α -androst-2-en-17 β -ol)-4-nitroanilina con benceno en modelado *in silico* con fugacidad de 10 kPa a 298 K.

Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

Como se sabe, las modificaciones a la cadena lateral de las sapogeninas esteroidales, generan compuestos que presentan propiedades que difieren drásticamente de los materiales de partida ya sea en la reactividad, propiedades biológicas y/o en sus propiedades en estado sólido y existen muchos ejemplos, entre los que se puede mencionar a los 23E-bencilidenespirostanos.



Por lo tanto, podemos asumir que los productos de las reacciones de condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y benzaldehídos mono- y polihidroxilados generarán nuevos derivados esteroidales que presenten desviaciones importantes en la actividad biológica y en el perfil de reactividad de la cadena lateral espirocetálica, en los compuestos obtenidos.

Por otro lado, a través de las reacciones de condensación aldólica será posible obtener dímeros esteroidales simétricos, utilizando al tereftalaldehído o dímeros híbridos, al utilizar benzaldehídos esteroidales. Se espera que los dímeros obtenidos también presenten propiedades biológicas y cristalinas interesantes.

2.2. Objetivos Generales

- Extender las reacciones de condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y derivados del benzaldehído a la síntesis de nuevos bencilidenespirostanos y espirocromenos esteroidales con potencial actividad como antitumorales y antioxidantes.

- Hacer un estudio del perfil de reactividad de los compuestos bencilidenespirostanos obtenidos.
- Hacer propuestas de mecanismos de reacción para explicar la formación de los derivados obtenidos.

2.3. Objetivos Particulares

- Realizar una exploración de la reactividad de la cadena lateral de los 23*E*-bencilidenespirostanos de las series 25*R* y 25*S*, a través de las reacciones de epoxidación, reducción catalítica y acetólisis.
- Realizar la desprotección de todas las funciones oxigenadas de los diferentes 23*E*-bencilidenespirostanos, para realizar posteriores pruebas de actividad biológica.
- Desarrollar una nueva metodología en condiciones más suaves para la síntesis de los 23*E*-bencilidenespirostanos y de los espirocromenos derivados sapogeninas esteroidales.
- Estudiar la reactividad de los 23*E*-bencilidenespirostanos en medio ácido.
- Llevar a cabo la síntesis de los bencilidenespirostanos y espirocromenos a partir de benzaldehídos mono- y polihidroxilados.
- Llevar cabo la obtención de dímeros 1,4-dimetiliden-benceno simétricos de sapogeninas esteroidales con la metodología desarrollada por nuestro grupo de trabajo, utilizando al aldehído terftálico como materia prima.
- Obtener los dímeros simétricos dibenciliden-furostano y dibencil-espirostano a través de las reacciones de reducción con cianoborohidruro de sodio en ácido acético e hidrogenación catalítica, a partir de los dímeros simétricos 1,4-dimetiliden-benceno derivados de sapogeninas esteroidales.
- Sintetizar los dímeros híbridos de tipo bencilidenespirostano y espirocromeno derivados de sapogeninas esteroidales, utilizando al 2-formilestradiol como materia prima, para obtener los correspondientes dímeros esteroidales unidos por la cadena lateral de la sapogenina.

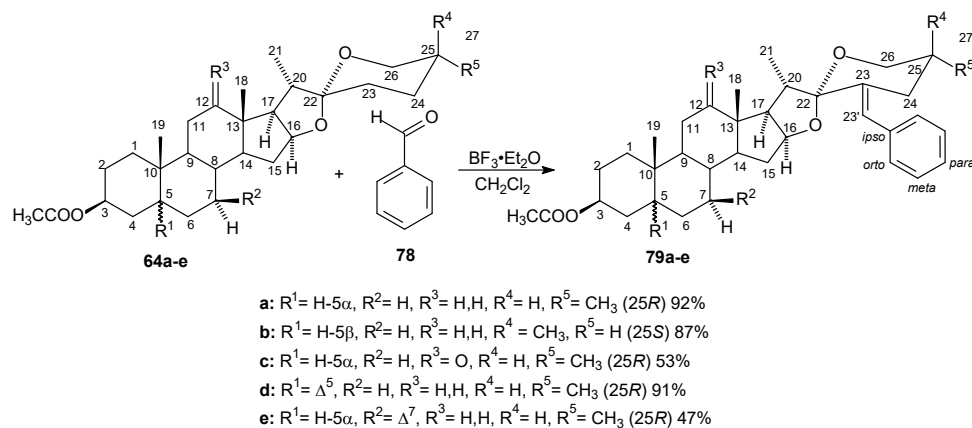
Capítulo 3. Síntesis y estudio de la reactividad de los 23E-bencilidenespirostanos y de los dímeros 1,4-dimetilidenebencen-diespirostanos.

3.1. Síntesis y estudio de la reactividad de los 23E-bencilidenespirostanos.

Considerando la reactividad particular que presentan los 23E-bencilidenespirostanos a causa de la presencia del fragmento bencilideno en la cadena lateral, se decidió explorar más a fondo el perfil de reactividad de esta familia de compuestos en busca de nuevos derivados que puedan mostrar actividad biológica o ser útiles como materias primas para la síntesis de esteroides bioactivos más complejos. Debido a esto se analizó el comportamiento de estas sustancias en reacciones como hidrogenación catalítica, epoxidación, reordenamiento en medio ácido y acetólisis.

3.1.1. Obtención de los 23E-bencilidenespirostanos.

La síntesis de los bencilidenespirostanos **79a-e** se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por nuestro grupo de investigación en trabajos anteriores⁵⁵ y los productos deseados se obtuvieron en rendimientos similares a los reportados (47 – 90%). La identidad de los compuestos obtenidos se corroboró comparándolos por cromatografía en capa delgada (CCD) con un patrones de referencia de cada derivado y por comparación de espectros de RMN (**Esquema 19**).

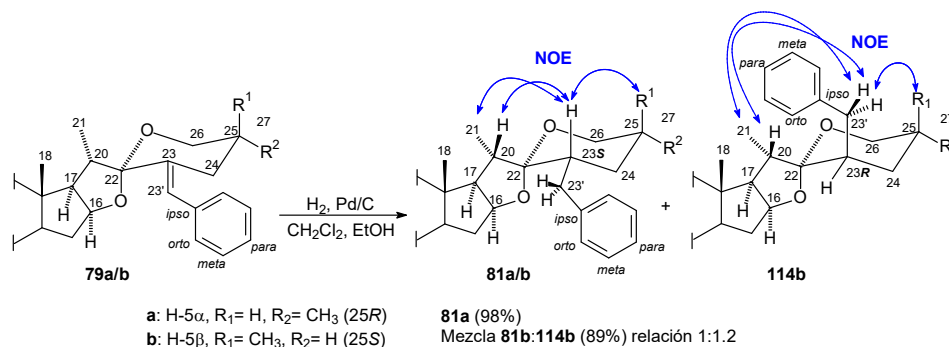


Esquema 19. Síntesis de los 23E-bencilidenespirostanos de las series 25R y 25S.

3.1.2. Hidrogenación catalítica.

La reducción catalítica del compuesto (5 α ,25R)-23E-bencilideno-tigogenina (**79a**) con paladio sobre carbono (Pd/C) en CH₂Cl₂ y etanol bajo atmósfera de H₂, generó únicamente el (23S,25R)-23-bencil-espirostanos (**81a**) con un 98% de rendimiento. Sin embargo, un tratamiento similar del compuesto (5 β ,25S)-23E-bencilideno-sarsasapogenina (**79b**) produjo en un 89% de rendimiento una

mezcla que al purificar por cromatografía en columna, se obtuvieron muestras analíticas de los compuestos identificados como el (23*S*,25*S*)-23-bencilspirostano (**81b**) con el grupo bencilo ecuatorial en C-23 y el epímero axial (23*R*,25*S*)-23-bencilspirostano (**114b**) en una relación 1:1.2, respectivamente, que fue determinada en el espectro de RMN de ^1H de la mezcla epimérica. (Esquema 20).



Esquema 20. Reducción catalítica de los bencilidenespirostanos **79a/b**.

La alta diastereoselectividad observada en la hidrogenación del derivado bencilidenespirostano de la serie 25*R* (**79a**), puede atribuirse a la presencia del oxígeno axial unido a C-22 que impide la hidrogenación por la cara α , dejando la hidrogenación por la cara β como la vía más favorecida. Por el contrario, en la serie 25*S*, el oxígeno axial unido a C-22 y el grupo metilo axial unido a C-25 impiden estéricamente los lados α y β respectivamente, justificando la falta de diastereoselectividad en este sustrato.

En el espectro de RMN de ^1H , la principal evidencia de la reducción del doble enlace C-23 – C-23', es la desaparición de la señal del protón olefínico C-23', que en los materiales de partida aparece en 6.57 (25*R*) y 6.72 (25*S*) ppm (**79b**).¹⁴ Adicionalmente, la presencia de nuevas señales correspondientes al par de protones diasterotópicos H-23'a y H-23'b, además de las señales de H-23, hacen evidente la reducción del doble enlace. Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{13}C , la desaparición de las señales de los carbonos olefínicos C-23 y C-23' y la aparición de dos señales alifáticas correspondientes a estas posiciones, constituyen la principal evidencia de la reducción. Los desplazamientos químicos que pertenecen a las señales de RMN de ^1H y de ^{13}C de las cadenas laterales de los derivados obtenidos se encuentran recopilados en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los bencil-espirostanos **81a**, **81b** y **114b**.Se incluyen las señales de las materias primas **79a/b** con fines comparativos.

H	79a	81a	$\Delta_{\delta_{81a}-\delta_{79a}}$	79b	81b	$\Delta_{\delta_{81b}-\delta_{79b}}$	114b	$\Delta_{\delta_{114b}-\delta_{79b}}$
16	4.44	4.41	-0.03	4.47	4.43	-0.04	4.42	-0.05
18	0.83	0.81	-0.02	0.85	0.80	-0.05	0.73	-0.12
20	2.59	2.39	-0.20	2.50	2.33	-0.17	2.22	-0.28
21	1.10	1.11	+0.01	1.11	1.03	-0.08	1.09	-0.02
23	-	1.89	-	-	2.12	-	2.02	-
26ax.	3.55	3.30	-0.25	4.05	3.88	-0.17	3.86	-0.19
26eq.	3.55	3.43	-0.12	3.32	3.26	-0.06	3.25	-0.07
27	0.80	0.71	-0.09	0.99	0.97	-0.02	0.92	-0.07
23'a		2.97	-3.60		2.97	-3.75	2.97	-3.75
23'b	6.57	2.31	-4.26	6.72	2.33	-4.39	2.41	-4.31
orto	7.23	7.28	+0.05	7.21	7.27	+0.06	7.12	-0.09
meta	7.34	7.24	-0.10	7.32	7.13	-0.19	7.23	-0.09
para	7.23	7.24	+0.01	7.21	7.18	-0.03	7.12	-0.09

Tabla 2. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los bencil-espirostanos **81a**, **81b** y**114b**. Se incluyen las señales de las materias primas **79a/b** con fines comparativos.

C	79a	81a	$\Delta_{\delta_{81a}-\delta_{79a}}$	79b	81b	$\Delta_{\delta_{81b}-\delta_{79b}}$	114b	$\Delta_{\delta_{114b}-\delta_{79b}}$
16	80.4	80.8	+0.4	81.0	81.0	0.0	80.4	-0.6
17	61.6	61.6	0.0	61.8	61.5	-0.3	63.3	+1.5
18	16.7	16.7	0.0	16.7	16.7	0.0	16.5	-0.2
20	37.3	36.9	-0.4	39.8	37.3	-2.5	38.3	-1.5
21	14.8	14.4	-0.4	14.7	14.2	-0.5	16.5	+1.8
22	110.5	111.2	+0.7	111.4	111.8	+0.4	112.3	+0.9
23	137.1	40.3	-96.8	136.8	34.6	-102.2	42.4	-94.4
24	32.9	34.3	+1.4	30.9	31.8	+0.9	30.0	-0.9
25	33.1	30.7	-2.4	30.3	28.0	-2.3	28.5	-1.8
26	66.1	66.0	-0.1	65.1	64.3	-0.8	65.8	+0.7
27	17.2	16.9	-0.3	18.3	16.6	-1.7	20.3	+2.0
23'	122.8	37.2	-85.6	122.8	37.1	-85.7	37.7	-85.1
ipso	137.2	140.9	+3.7	137.2	140.9	+3.7	140.9	+3.7
orto	129.1	129.1	0.0	129.1	129.0	-0.1	129.1	+0.0
meta	128.1	128.2	+0.1	128.0	128.2	+0.2	128.2	+0.2
para	126.5	125.8	-0.7	126.5	125.7	-0.8	125.8	-0.7

Las correlaciones **NOE** H-23 \leftrightarrow 20 y H-23 \leftrightarrow H-21 presentes en los compuestos **81a** y **81b** indican la cercanía espacial de estos núcleos, siendo posible solo cuando el protón H-23 se encuentra en posición axial, además una correlación **NOE** entre H-23 y H-27 en el compuesto **81b** que permite corroborar la asignación realizada. En el caso del compuesto **114b**, el efecto **NOE** observado entre H-23' – H-20 y H-23' – H-27, permite asignar con seguridad la orientación axial del fragmento

bencilo y de esta manera determinar la configuración 23*R*. (**Esquema 20**). Las estructuras propuestas de los compuestos bencil espirostanos **81a**, **81b** y **114b** fueron corroboradas por experimentos de Rayos X de Monocristal (**Figura 22**).

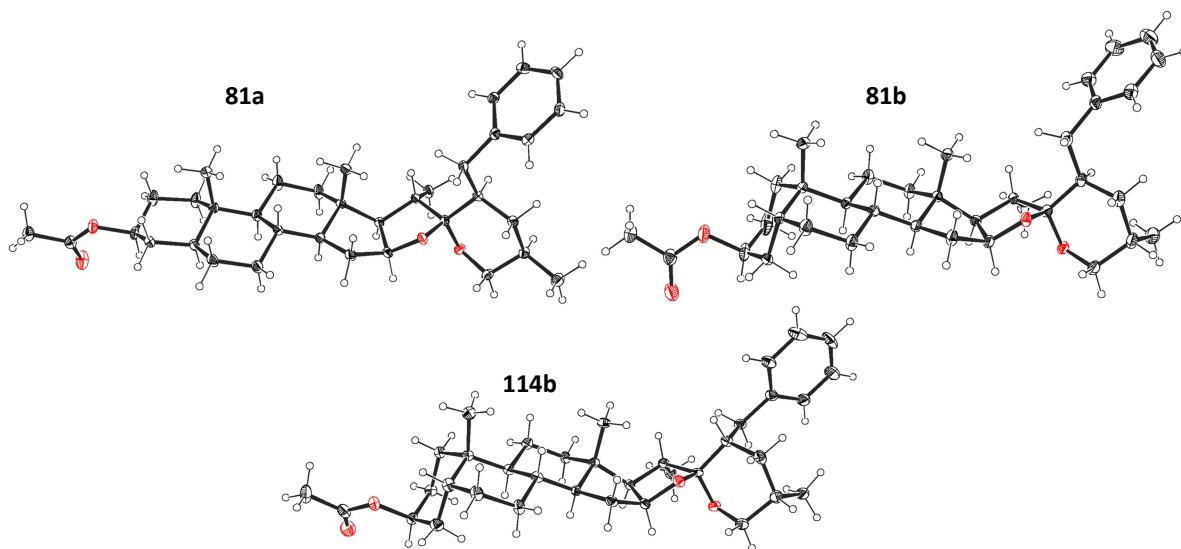
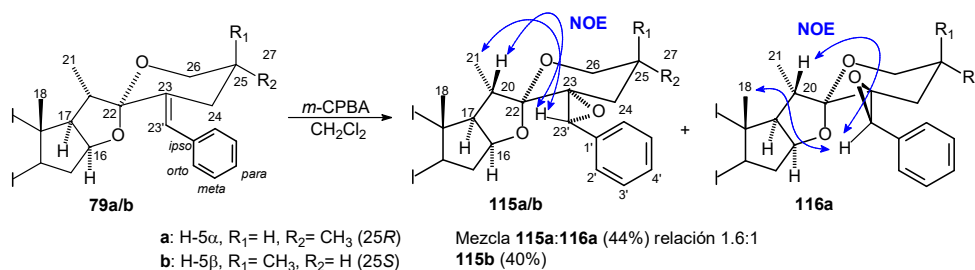


Figura 22. Estructuras cristalinas de los 23-bencil-espirostanos **81a**, **81b** y **114b** con los elipsoides térmicos trazados al 30% de probabilidad.

3.1.3. Epoxidación.

El tratamiento de la (5 α ,25*R*)-23*E*-benciliden-tigogenina (**79a**) con *m*-CPBA en CH₂Cl₂ durante 24 h, produjo en un 44% de rendimiento, una mezcla de dos compuestos que fueron parcialmente separados e identificados como el 23,23'- α -epoxi-23-bencil-espirostano **115a** y el 23,23'- β -epoxi-23-bencil-espirostano **116a** en una relación 1.6:1, respectivamente, que fue determinada en el espectro de RMN de ¹H de la mezcla epimérica. Por otra parte, cuando se aplicó el mismo tratamiento al bencilidenespirostano **79b**, solo se generó el epóxido **115b** con un 40%, pero en un proceso mucho más lento (96 h) (**Esquema 21**). En ambas reacciones se observó una extensa descomposición a mezclas de varios compuestos minoritarios no identificados.



Esquema 21. Epoxidación de los 23*E*-bencilidenespirostanos **79a/b**.

En el espectro de RMN de ^1H se puede notar principalmente la desaparición de la señal olefínica de H-23' y la presencia de una nueva señal a campo más alto que corresponde a H-23', que es ahora un hidrógeno carbinólico. Del mismo modo, en el espectro de RMN de ^{13}C se puede notar la desaparición del doble enlace C-23 – C-23' y la aparición de dos nuevas señales de carbonos carbinólicos. Los desplazamientos químicos correspondientes a las señales de RMN de ^1H y de ^{13}C de las cadenas laterales de los derivados obtenidos se encuentran agrupados en las **Tablas 3 y 4**.

Tabla 3. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los epoxi-bencil-espirostanos **115a**, **116a** y **115b**. Se incluyen las señales de las materias primas **79a/b** con fines comparativos.

H	79a	115a	$\Delta_{\delta_{115a}-\delta_{79a}}$	116a	$\Delta_{\delta_{116a}-\delta_{79a}}$	79b	115b	$\Delta_{\delta_{115b}-\delta_{79b}}$
16	4.44	4.48	+0.04	4.51	+0.07	4.47	4.49	+0.02
18	0.83	0.86	+0.03	0.89	+0.06	0.85	0.85	0.00
20	2.59	2.19	-0.40	2.11	-0.48	2.50	2.17	-0.33
21	1.10	1.12	+0.02	1.09	-0.01	1.11	1.17	+0.06
26ax.	3.55	3.48	-0.07	3.43	-0.12	4.05	4.03	-0.02
26eq.	3.55	3.46	-0.09	3.58	+0.03	3.32	3.26	-0.06
27	0.80	0.63	-0.17	0.72	-0.08	0.99	0.64	-0.35
23'	6.57	4.10	-2.47	4.27	-2.30	6.72	4.14	-2.58
<i>orto</i>	7.23	7.32	+0.09	7.31	+0.08	7.21	7.31	0.10
<i>meta</i>	7.34	7.32	-0.02	7.31	-0.03	7.32	7.31	-0.01
<i>para</i>	7.23	7.32	+0.09	7.31	+0.08	7.21	7.31	+0.10

Tabla 4. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los epoxi-bencil-espirostanos **10a**, **11a** y **10b**. Se incluyen las señales de las materias primas **79a/b** con fines comparativos.

C	79a	115a	$\Delta_{\delta_{115a}-\delta_{79a}}$	116a	$\Delta_{\delta_{116a}-\delta_{79a}}$	79b	115b	$\Delta_{\delta_{115b}-\delta_{79b}}$
16	80.4	81.2	+0.8	81.8	+1.4	81.0	81.2	+0.2
17	61.6	63.1	+1.5	62.3	+0.7	61.8	62.7	+0.9
18	16.7	16.4	-0.3	16.8	+0.1	16.7	16.4	-0.3
20	37.3	33.3	-4.0	35.8	-1.5	39.8	33.6	-6.2
21	14.8	16.7	+1.9	16.1	+1.3	14.7	16.2	+1.5
22	110.5	109.9	-0.6	109.6	-0.9	111.4	110.5	-0.9
23	137.1	62.5	-74.6	63.2	-73.9	136.8	61.0	-75.8
24	32.9	31.1	-1.8	33.1	+0.2	30.9	27.7	-3.2
25	33.1	30.9	-2.2	29.1	-4.0	30.3	30.1	-0.2
26	66.1	66.0	-0.1	66.0	-0.1	65.1	64.5	-0.6
27	17.2	16.7	-0.5	16.9	-0.3	18.3	17.1	-1.2
23'	122.8	61.2	-61.6	59.5	-63.3	122.8	62.1	-60.7
<i>ipso</i>	137.2	135.1	-2.1	135.4	-1.8	137.2	135.2	-2.0
<i>orto</i>	129.1	126.3	-2.8	126.3	-2.8	129.1	126.8	-2.3
<i>meta</i>	128.1	128.0	-0.1	128.0	-0.1	128.0	127.8	-0.2
<i>para</i>	126.5	127.5	+1.0	127.4	+0.9	126.5	127.5	+1.0

En los derivados obtenidos de la serie 25R, se observa en el compuesto **115a** un efecto **NOE** entre la señal del H-23' con los hidrógenos H-20 y H-21 que permitió establecer la orientación α del anillo de oxirano, mientras que en el derivado **116a** se observa la correlación **NOE** con los hidrógenos H-18 y H-20 lo que indica la orientación β del epóxido (**Esquema 21**). La orientación α del epóxido en el derivado de la serie 25S **115b**, se determinó con experimentos NOESY tal y como se describió para el derivado **115a**. Las estructuras de los derivados **115a** y **115b** fueron corroboradas a través de experimentos de difracción de rayos X de monocristal (**Figura 23**).

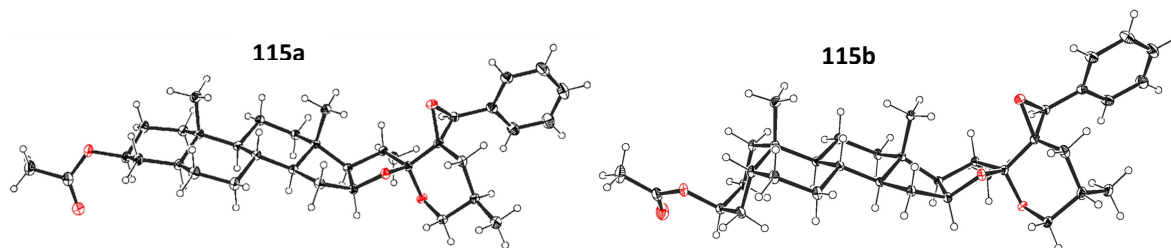


Figura 23. Estructuras cristalinas de los compuestos **115a** y **115b** con los elipsoides térmicos trazados al 50% de probabilidad

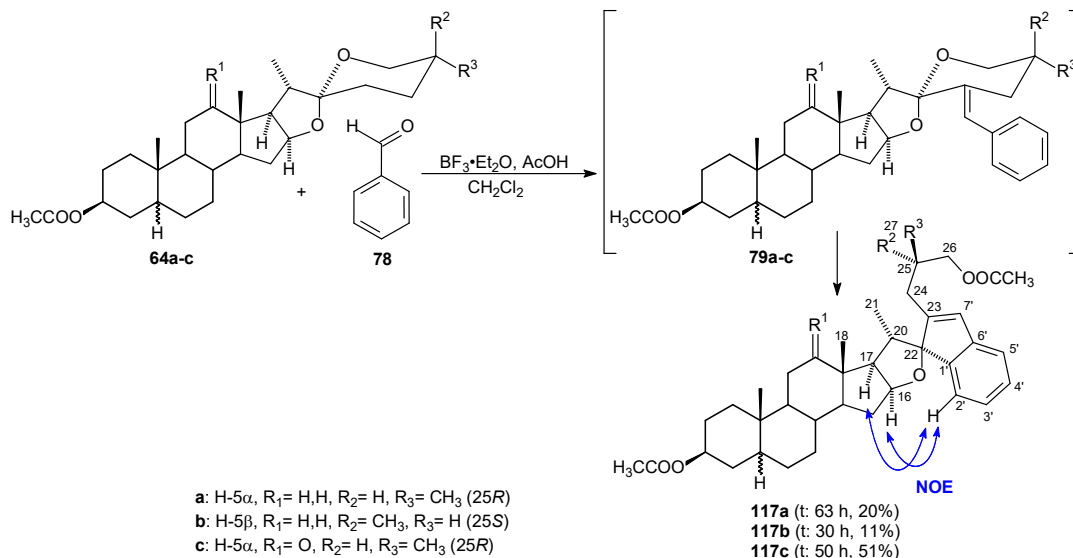
La distribución de los productos obtenidos se explica por la influencia que tiene la configuración C-25. En el bencilidenespirostanos **79a** de la serie 25R, el metilo C-27 se encuentra en posición ecuatorial, por lo que la coordinación entre el alqueno y el *m*-CPBA puede ocurrir por ambas caras del anillo F con poco impedimento estérico. Sin embargo, en el compuesto **79b** C-27 es axial e impide estéricamente la coordinación del perácido por la cara superior del anillo F y en consecuencia se obtiene únicamente el epóxido α .

3.1.4. Reordenamientos de la cadena lateral catalizados por ácidos.

3.1.4.1 Síntesis de los espiro[furan-indenos] derivados de sapogeninas esteroidales.

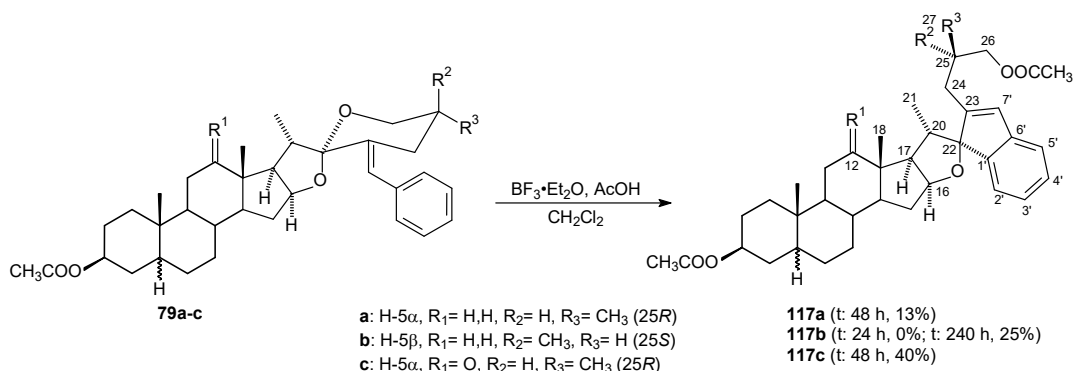
En búsqueda de un nuevo método para la obtención de los productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y benzaldehídos, en condiciones más suaves a las reportadas por nuestro grupo de trabajo (48 mmol de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$),⁵⁵ se llevó a cabo la síntesis del 23*E*-bencilidenespirostanos en CH_2Cl_2 y ácido acético utilizando una mínima cantidad $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (4.8 mmol) como catalizador. Sin embargo, aunque esta nueva metodología generó los esperados 23*E*-bencilidenespirostanos (**79a-c**) en un primer paso, al seguir la reacción su curso, generó una nueva

familia de derivados esteroidales con un fragmento de espiro[furan]indeno en la cadena lateral (**117a-c**) con rendimientos del 20%, 11% y 51% respectivamente (**Esquema 22**).



Esquema 22. Síntesis modificada de los 23E-bencilidenespirostanos.

Debido a lo observado, se hizo un estudio para generar los espiroindenos a partir de los bencilidenespirostanos **79a-c**, a través del tratamiento en CH₂Cl₂ y ácido acético, utilizando BF₃•Et₂O (4.8 mmol) como catalizador y de esta reacción se obtuvieron los derivados **117a-c** con rendimientos que van de moderados a bajos (13%, 25% y 40% respectivamente) (**Esquema 23**).



Esquema 23. Reordenamiento de la cadena lateral de los 23E-bencilidenespirostanos.

En ambas reacciones se observa que los mejores rendimientos se obtienen al utilizar como materia prima a los esteroides que presentan un grupo carbonilo en C-12 (**64c** y **79c**), que al parecer modula la catálisis ácida para favorecer la formación del espiroindeno en la cadena lateral. Cabe señalar que cuando se llevó a cabo la reacción con el derivado **79b** (serie 25S) la materia

prima se consumió después de 24 horas sin observarse la formación del compuesto deseado sino hasta después de las 48 horas. La reacción se continuó durante 10 días para estudiar si después de este período de tiempo había una mejora en el rendimiento del producto deseado, sin embargo no hubo gran diferencia con los resultados obtenidos anteriormente.

En los espectros de RMN de ^1H , los derivados espiroindenos de las series 25R (**117a** y **117c**) y 25S (**117b**) presentan variaciones similares, la más importante a notar es la pérdida de un H-orto y la diferenciación de las señales aromáticas, así mismo hay un corrimiento a campo más alto de H-23' (7' para el espiroindeno). En el espectro de RMN de ^{13}C se observa la desaparición de la señal espirocetálica y la presencia de una nueva señal a campo más alto correspondiente a C-22. Adicionalmente, cabe destacar el corrimiento a campo más alto de las señales correspondientes a C-7', que ahora pertenece al ciclo del indeno y de C-1' que es un nuevo carbono aromático cuaternario. El efecto **NOE** observado entre H-2' \leftrightarrow H-16 y H-2' \leftrightarrow H-17 permitió determinar que la configuración 22R de C-22 dónde el anillo aromático está orientado hacia la cara α de la molécula (**Esquema 22**). Los corrimientos químicos correspondientes a las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C de las cadenas laterales de los derivados espiro[furan]indenos se encuentran recopilados en las **tablas 5 y 6**.

Tabla 5. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los espiro[furan-indenos] **117a-c**. Se incluyen las señales de los 23E-bencilidenespirostanos **79a-c** con fines comparativos.

H	79a	117a	$\Delta_{\delta_{117a}-\delta_{79a}}$	79b	117b	$\Delta_{\delta_{117b}-\delta_{79b}}$	79c	117c	$\Delta_{\delta_{117c}-\delta_{79c}}$
16	4.44	4.99	+0.55	4.47	5.00	+0.53	4.37	4.92	+0.55
17	1.90	2.20	+0.30	1.88	2.21	+0.33	2.67	3.04	+0.37
18	0.83	0.99	+0.16	0.85	0.99	+0.14	1.11	1.26	+0.15
20	2.59	2.55	-0.04	2.50	2.53	+0.03	2.44	2.39	-0.05
21	1.10	0.55	-0.55	1.11	0.55	-0.56	1.20	0.64	-0.56
26a	3.55	4.00	+0.45	4.05	4.05	0.00	3.54	4.01	+0.47
26b	3.55	4.00	+0.45	3.32	3.96	+0.64	3.54	4.01	+0.47
27	0.80	0.98	+0.18	0.99	1.03	+0.04	0.80	0.98	+0.18
23' (7')	6.57	6.36	-0.21	6.72	6.36	-0.36	6.54	6.38	-0.16
orto (1')	7.23	-	-	7.21	-	-	7.23	-	-
orto (5')	7.23	7.11	-0.12	7.21	7.10	-0.11	7.23	7.11	-0.12
meta (2')	7.34	7.32	-0.02	7.32	7.32	0.00	7.33	7.33	0.00
meta (4')	7.34	7.05	-0.29	7.32	7.05	-0.27	7.33	7.07	-0.26
para (3')	7.23	7.16	-0.07	7.21	7.16	-0.05	7.23	7.18	-0.05

Tabla 6. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los espiro[furan-indenos] **117a-c**. Se incluyen las señales de los 23*E*-bencilidenespirostanos **9a-c** con fines comparativos.

C	79a	117a	$\Delta_{\delta_{117a}-\delta_{79a}}$	79b	117b	$\Delta_{\delta_{117b}-\delta_{79b}}$	79c	117c	$\Delta_{\delta_{117c}-\delta_{79c}}$
16	80.4	84.3	+3.9	81.0	84.3	+3.3	78.9	82.5	+3.6
17	61.6	63.2	+1.6	61.8	63.3	+1.5	52.9	53.9	+1.0
18	16.7	16.9	+0.2	16.7	17.0	+0.3	16.2	16.5	+0.3
20	37.3	36.2	-1.1	39.8	36.2	-3.6	37.8	36.7	-1.1
21	14.8	15.3	+0.5	14.7	15.3	+0.6	13.6	14.0	+0.4
22	110.5	101.2	-9.3	111.4	101.0	-10.4	110.6	101.2	-9.4
23	137.1	148.5	11.4	136.8	148.6	+11.8	137.0	147.9	+10.9
24	32.9	31.0	-1.9	30.9	30.4	-0.5	32.9	30.9	-2.0
25	33.1	31.4	-1.7	30.3	31.5	+1.2	33.1	31.3	-1.8
26	66.1	69.6	+3.5	65.1	69.0	+3.9	66.1	69.5	+3.4
27	17.2	17.1	-0.1	18.3	17.5	-0.8	17.2	17.0	-0.2
23' (7')	122.8	128.5	+5.7	122.8	128.1	+5.3	122.9	128.8	+5.9
ipso (6')	137.2	145.5	+8.3	137.2	145.3	+8.1	137.0	145.1	+8.1
orto (1')	129.1	142.8	+13.7	129.1	142.8	+13.7	129.1	142.6	+13.5
orto (5')	129.1	120.6	-8.5	129.1	120.6	-8.5	129.1	120.6	-8.5
meta (2')	128.1	124.0	-4.1	128.0	123.9	-4.1	128.1	124.0	-4.1
meta (4')	128.1	124.6	-3.5	128.8	124.5	-4.3	128.1	124.7	-3.4
para (3')	126.5	127.9	+1.4	126.5	127.9	+1.4	126.6	128.1	+1.5

La estructura propuesta del compuesto **117c** fue corroborada a con experimentos difracción de rayos X de monocristal (**Figura 24**).

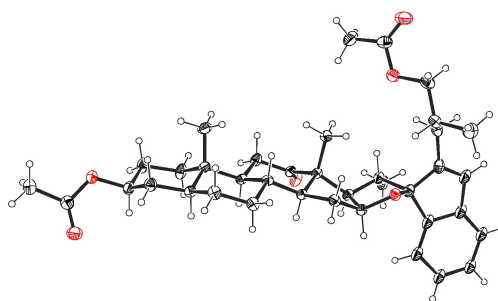
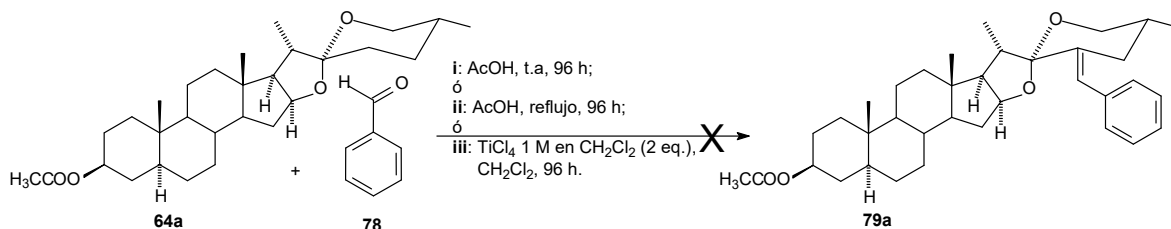


Figura 24. Estructura cristalina del compuesto **117c** con los elipsoides térmicos trazados al 50% de probabilidad.

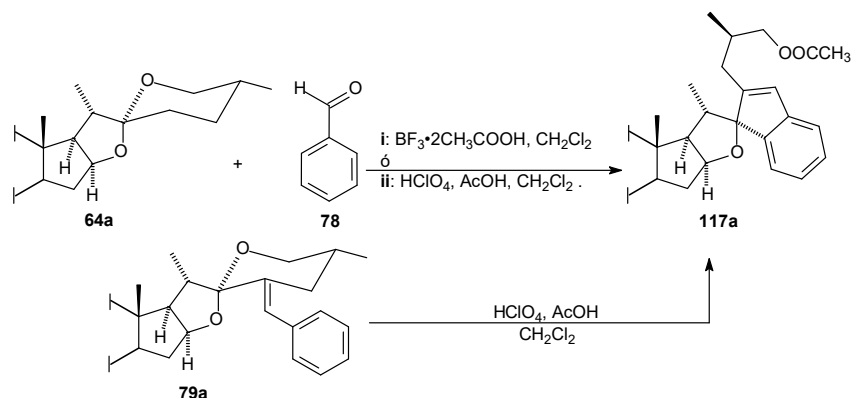
De acuerdo a los resultados obtenidos, se buscaron nuevas condiciones de reacción para llevar a cabo la síntesis de los bencilidenespirostanos y estudiar si estas modificaciones a la técnica eran adecuadas para favorecer también la formación de los derivados espiro[furan-indenos]. Para esto, se llevó a cabo la síntesis de la bencilidentigogenina (**79a**) en ácido acético a temperatura ambiente, sin que se observara cambio en la materia prima después de 96 horas de reacción.

Posteriormente, se llevó a cabo el procedimiento antes mencionado, pero manteniendo la reacción a reflujo durante 96 horas, pero tampoco se observó la formación de los productos deseados. Adicionalmente, se intentó la síntesis del compuesto **79a** en CH_2Cl_2 utilizando TiCl_4 (2 eq.) como catalizador sin obtener resultados satisfactorios (**Esquema 24**).



Esquema 24. Diferentes condiciones para la síntesis de **79a**.

Para optimizar la síntesis del derivado espiroindeno de la tigogenina (**117a**), se evaluaron diferentes ácidos como catalizadores, conservando al ácido acético en el medio de la reacción y utilizando como materiales de partida a la mezcla de acetato de tigogenina(**64a**)/benzaldehído(**78**) o a la bencilidentigogenina (**79a**) (**Esquema 25**). En la **Tabla 7** se concentran los resultados de este estudio y se observa que el tratamiento con $\text{HClO}_4/\text{AcOH}$ incrementó significativamente los rendimientos de obtención del producto deseado (56%), comparado con los descritos anteriormente con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (20%). No obstante, la reacción es extremadamente lenta y los mejores rendimientos se obtienen hasta después de 16 días.

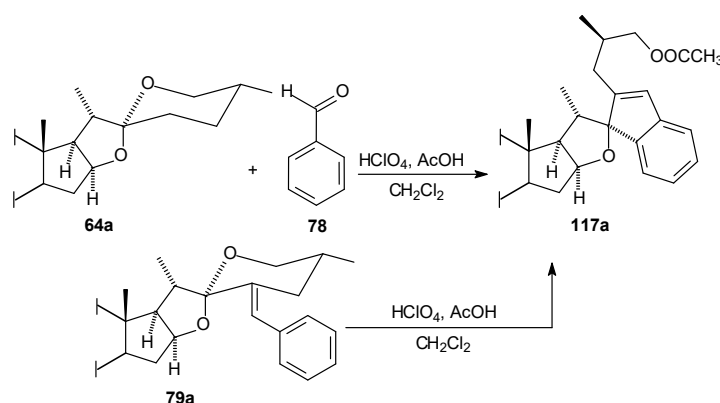


Esquema 25. Optimización de la síntesis de espiro[furan]indeno **117a**.

Tabla 7. Optimización de la síntesis de espiro[furan]indeno **117a**.

Materia prima	Condiciones	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
64a	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	384	56
64a	BF ₃ •2CH ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	96	4
79a	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	55	17
79a	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	192	26

Considerando lo anterior, se optimizó también la obtención del espiroindeno de la serie 25S, al tratar con HClO₄/AcOH a la mezcla de acetato de sarsasapogenina (**64b**)/benzaldehído (**78**) y a la bencilidensarsasapogenina (**79a**) (**Esquema 26**) y los resultados de este estudio se encuentran agrupados en la **tabla 8**.

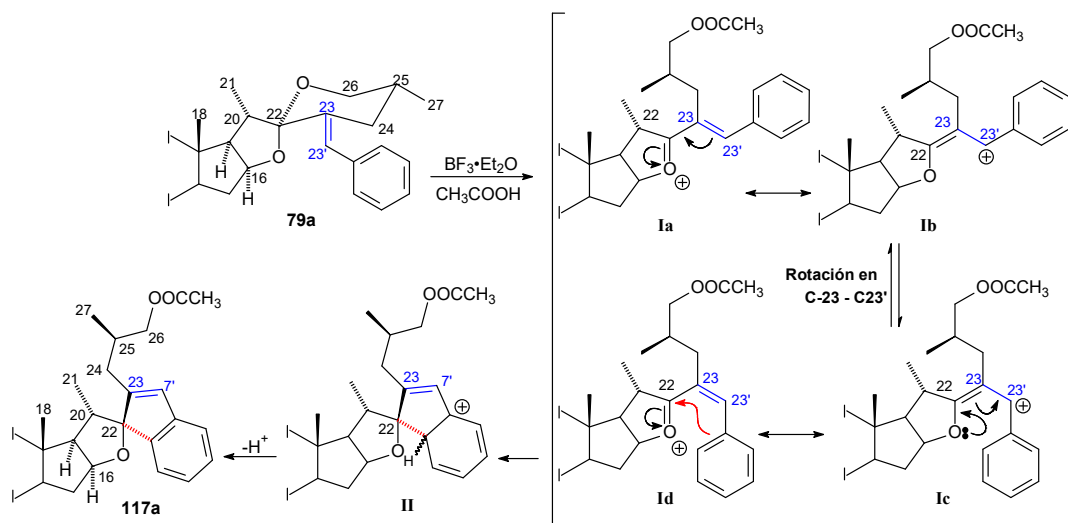


Esquema 26. Síntesis de espiro[furan]indeno **117b** con HClO₄/AcOH.

Tabla 8. Optimización de la síntesis de espiro[furan]indeno **117b**.

Materia prima	Condiciones	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
64b	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	384	50
79b	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	24	0
79b	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	384	46

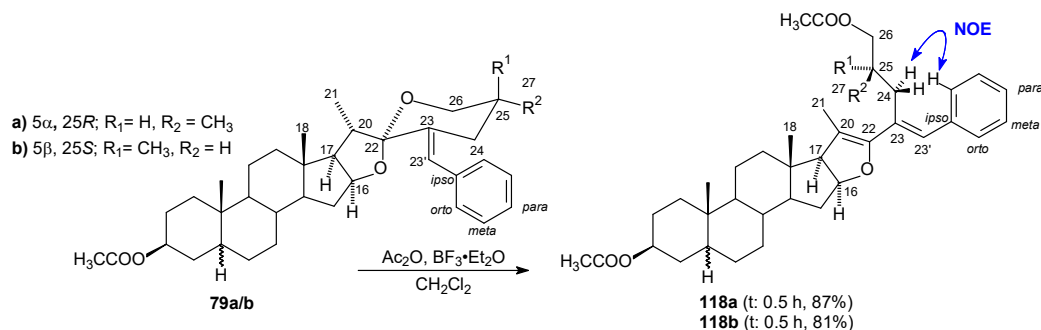
Para explicar la formación del fragmento espiroindeno en la cadena lateral, un mecanismo razonable comienza con la apertura del anillo F por la presencia del catalizador ácido, mientras que la activación del ácido acético por presencia del BF₃•Et₂O o el HClO₄ conduce a la acetilación del grupo hidroxilo unido a C-26, para generar el oxocarbenio **I**. La resonancia de este catión debilita el doble enlace y permite la rotación alrededor del enlace C-23 – C-23' que coloca al anillo aromático cerca del carbocation en C-22, permitiendo la SE_{Ar} intramolecular para formar el fragmento de indeno unido al carbono espiro C-22 (**Esquema 27**).



Esquema 27. Mecanismo de reacción propuesto.

3.1.4.2. Apertura oxidativa de los 23E-bencilidenespirostanos.

En un intento por optimizar la obtención de los derivados indenos **117a/b** y considerando que la formación del fragmento de indeno en estos compuestos ocurre cuando el hidroxilo de la posición C-26 se encuentra acetilado, se decidió llevar a cabo la síntesis de los espiroindenos a partir de los bencilidenespirostanos **79a/b** en CH_2Cl_2 y anhídrido acético, utilizando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalizador. El producto de esta reacción no fue el espiroindeno deseado, en su lugar se generó la apertura de la cadena lateral espiroestánica, obteniéndose los benciliden-furostenos correspondientes con buenos rendimientos (**Esquema 28**).



Esquema 28. Acetólisis catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ de los 23E-bencilidenespirostanos.

La pérdida de la señal correspondiente a H-20 y el desplazamiento a campo bajo, así como la pérdida de multiplicidad de H-21 en el espectro de RMN de ^1H es la principal evidencia de la formación del doble enlace C-20 – C-22. Por otro lado, en el espectro de RMN de ^{13}C se observa la

desaparición de la señal espirocetálica y se observan dos nuevas señales olefinicas correspondientes a C-20 y C-22. La correlación **NOE** entre H-24 y H-orto, permitió corroborar que la configuración *E* del fragmento bencilideno se conservó tras la apertura del anillo F (**Esquema 28**). Los corrimientos químicos de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C de las cadenas laterales de los benciliden-furostenos se encuentran agrupados en las **tablas 9 y 10**.

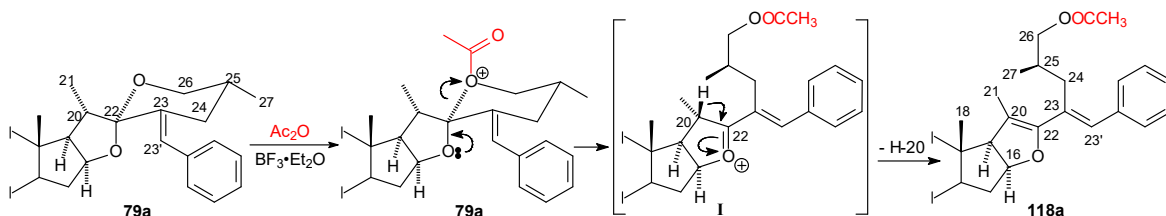
Tabla 9. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los benciliden-furostenos **118a/b**. Se incluyen las señales de las materias primas **79a/b** con fines comparativos

H	79a	118a	$\Delta_{\delta_{118a}-\delta_{79a}}$	79b	118b	$\Delta_{\delta_{118b}-\delta_{79b}}$
16	4.44	4.81	+0.37	4.47	4.81	+0.34
18	0.83	0.75	-0.08	0.85	0.76	-0.09
20	2.59	-	-	2.50	-	-
21	1.10 (d)	1.81 (s)	+0.71	1.11 (d)	1.82 (s)	+0.71
24a	2.10	2.32	+0.22	2.29	2.30	+0.01
24b	2.78	2.51	-0.27	2.72	2.56	-0.16
26a	3.55	3.85	+0.30	4.05	3.84	-0.21
26b	3.55	3.85	+0.30	3.32	3.84	+0.52
27	0.80	0.86	+0.06	0.99	0.89	-0.10
23'	6.57	6.68	+0.11	6.72	6.68	-0.04
orto	7.23	7.32	+0.09	7.21	7.28	+0.07
meta	7.34	7.25	-0.09	7.32	7.28	-0.04
para	7.23	7.25	+0.02	7.21	7.28	+0.07

Tabla 10. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los benciliden-furostenos **118a/b**. Se incluyen las señales de las materias primas **79a/b** con fines comparativos

C	79a	118a	$\Delta_{\delta_{118a}-\delta_{79a}}$	79b	118b	$\Delta_{\delta_{118b}-\delta_{79b}}$
16	80.4	84.3	+3.9	81.0	84.2	+3.2
17	61.6	65.3	+3.7	61.8	65.3	+3.5
18	16.7	14.2	-2.5	16.7	14.2	-2.5
20	37.3	107.7	+70.4	39.8	107.6	+67.8
21	14.8	13.1	-1.7	14.7	13.1	-1.6
22	110.5	151.8	+41.3	111.4	152.0	+40.6
23	137.1	132.1	-5.0	136.8	132.0	-4.8
24	32.9	31.8	-1.1	30.9	31.7	+0.8
25	33.1	31.7	-1.4	30.3	31.7	+1.4
26	66.1	68.8	+2.7	65.1	68.6	+3.5
27	17.2	16.9	-0.3	18.3	16.9	-1.4
23'	122.8	131.8	+9.0	122.8	131.8	+9.0
ipso	137.2	137.2	+0.0	137.2	137.2	+0.0
orto	129.1	128.1	-1.0	129.1	128.8	-0.3
meta	128.1	128.9	+0.8	128.0	128.1	+0.1
para	126.5	126.7	+0.2	126.5	126.7	+0.2

Un mecanismo racional inicia con la activación del anhídrido acético con el $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y produce la acetilación del átomo de oxígeno en C-26 de **79a**, esto provoca la apertura del anillo F para producir el oxocarbenio **I** que rápidamente pierde a H-20 para producir el dieno **118a** (**Esquema 29**). Se puede suponer un mecanismo similar para la formación de **118b**.

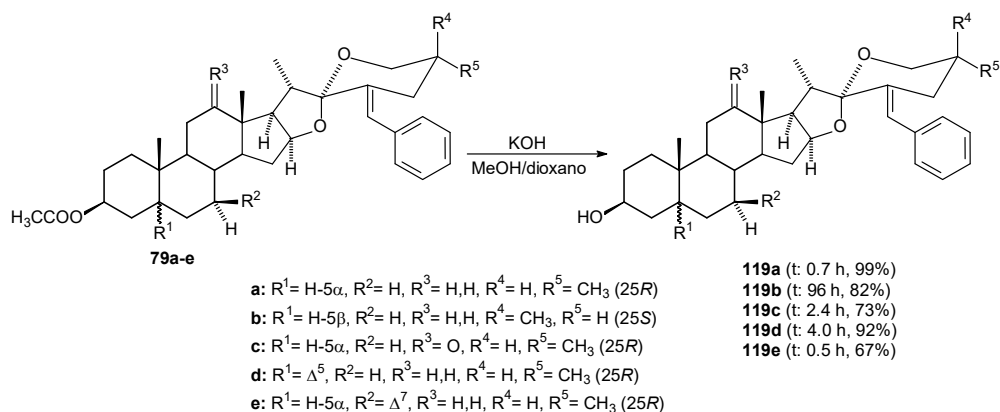


Esquema 29. Mecanismo de reacción propuesto para la acetólisis de los 23E-bencilidenespirostanos.

De manera muy interesante, se observa que la ausencia de un ácido prótico (AcOH) en el medio, conduce a la reacción a la formación de los dienos **118a/b** en lugar de los espiro[furanos]indenos.

3.1.5. Saponificación de los 23E-bencilidenespirostanos.

Debido a que las sapogeninas de origen natural presentan el hidroxilo libre en la posición C-3, para poder realizar pruebas de actividad biológica fue necesario realizar la desprotección del grupo hidroxilo de los diferentes 23E-bencilidenespirostanos (**79a-e**) en una disolución en metanol y dioxano con hidróxido de potasio. Con este tratamiento se obtuvieron los bencilidenespirostanoles (**119a-e**) con rendimientos entre moderados y buenos (99%, 82%, 73%, 92% y 67% respectivamente) (**Esquema 30**).



Esquema 30. Obtención de los bencilidenespirostanoles **119a-e**.

Las evidencias más importantes en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C son la desaparición de las señales correspondientes al grupo carbonilo y al metilo del acetato. Por otro lado, se observa el desplazamiento a campos más altos de las señales correspondientes a H-3 y C-3, que también es indicativo de la presencia del grupo hidroxilo libre en la posición C-3. Los desplazamientos químicos de las señales de H-3 y de C-3 de los derivados bencilidenespirostanos se presentan en las **tablas 11 y 12**.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de H-3 de los 23E-bencilidenespirostanos **79a-e** y de los 23E-bencilidenespirostanos **119a-e**.

Materia prima	H-3	Producto	H-3	$\Delta_{\delta\text{H-3prod.}-\delta\text{H-3m.p.}}$
79a	4.69 (ddd)	119a	3.57 (m)	-1.12
79b	5.07 (m)	119b	4.12 (m)	-0.95
79c	4.68 (ddd)	119c	3.60 (m)	-1.08
79d	4.60 (ddd)	119d	3.56 (m)	-1.04
79e	4.70 (tt)	119e	3.56 (m)	-1.14

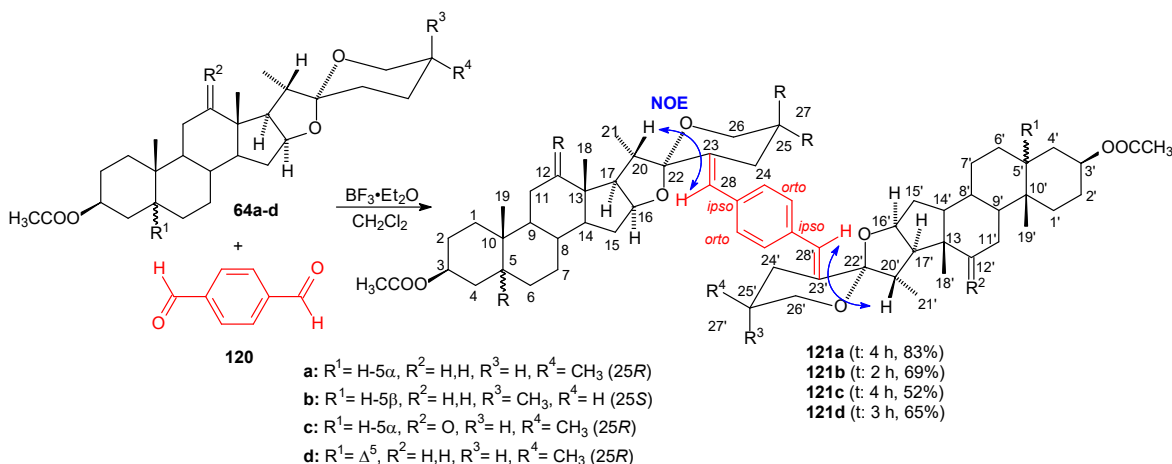
Tabla 12. Desplazamientos químicos de C-3 de los 23E-bencilidenespirostanos **79a-e** y de los 23E-bencilidenespirostanos **119a-e**.

Materia prima	C-3	Producto	C-3	$\Delta_{\delta\text{C-3prod.}-\delta\text{C-3m.p.}}$
79a	73.6	119a	71.3	-2.3
79b	70.7	119b	67.1	-3.6
79c	73.1	119c	70.9	-2.2
79d	73.9	119d	71.7	-2.2
79e	73.3	119e	71.0	-2.3

3.2. Síntesis y estudio de la reactividad de los dímeros 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos.

3.2.1. Síntesis de los dímeros simétricos 1,4-dimetiliden-diespirostanos.

Como parte del desarrollo de nuestro grupo de trabajo en la síntesis de dímeros esteroidales para estudiar sus propiedades en estado sólido, en disolución y su actividad biológica; se decidió llevar a cabo la síntesis de nuevos dímeros esteroidales a través de la doble condensación aldólica de sapogeninas esteroidales (**64**) con aldehído tereftálico (**120**) catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en CH_2Cl_2 . Con esta reacción se obtuvieron con buenos rendimientos, los dímeros simétricos derivados de los acetatos de las sapogeninas esteroidales tigogenina (**64a**, 83%), sarsasapogenina (**64b**, 69%), hecogenina (**64c**, 52%) y diosgenina (**64d**, 65%), en los que dos núcleos de sapogenina están conectados por un fragmento 1,4-dimetilidenbenceno unido a la posición C-23 de cada núcleo esteroidal (**Esquema 31**).



Esquema 31. Síntesis de los dímeros simétricos unidos por un fragmento 1,4-dimetilidenbenceno.

En la síntesis de estos derivados se obtienen mayores rendimientos y menores tiempos de reacción respecto a las reacciones con benzaldehído debido al efecto electroattractor provocado por la presencia del grupo aldehído adicional en el anillo aromático, lo que provoca una mayor deficiencia electrónica en el carbono carbonílico y favorece el ataque nucleofílico por parte de C-23 de la sapogenina. Se asume que el mecanismo involucrado en la síntesis de estos compuestos es el mismo que para los 23E-bencilidenespirostanos.⁵⁵ Se determinó la configuración *E* de los dobles enlaces generados, con ayuda de los efectos **NOE** observados entre $\text{H-20} \leftrightarrow \text{H-28}$ y $\text{H-20}' \leftrightarrow \text{H-28}'$ (**Esquema 31**). La caracterización completa de estos dímeros se llevó a cabo a través de experimentos de RMN mono- y bidimensionales y en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se

observa la presencia del fragmento 1,4-dimetilidenbencénico. En las **tablas 13** y **14** se presentan los desplazamientos químicos correspondientes a las cadenas laterales y al fragmento 1,4-dimetilidenbenceno de los dímeros simétricos obtenidos.

Tabla 13. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los dímeros simétricos **121a-d**.

H	121a	121b	121c	121d
16, 16'	4.43 (dt)	4.46 (dt)	4.37 (dt)	4.45 (dt)
18, 18'	0.82 (s)	0.84 (s)	1.09 (s)	0.85 (s)
20, 20'	2.58 (p)	2.48 (p)	2.44 (m)	2.59 (p)
21, 21'	1.09 (d)	0.99 (d)	1.18 (d)	1.10 (d)
24 ax., 24' ax	2.11 (dd)	2.31 (dd)	2.08 (m)	2.12 (ddd)
24' eq. 24' eq.	2.82 (dd)	2.73 (ddd)	2.81 (m)	2.82 (dd)
26 ax., 26' ax	3.56 (m)	4.04 (dd)	3.54 (m)	3.55 (m)
26' eq. 26' eq.	3.56 (m)	3.31 (dt)	3.54 (m)	3.55 (m)
27, 27'	0.80 (d)	1.10 (d)	0.79 (d)	0.81 (d)
28, 28'	6.54 (d)	6.69 (s)	6.50 (d)	6.55 (d)
orto	7.20 (s)	7.19 (s)	7.18 (d)	7.20 (s)

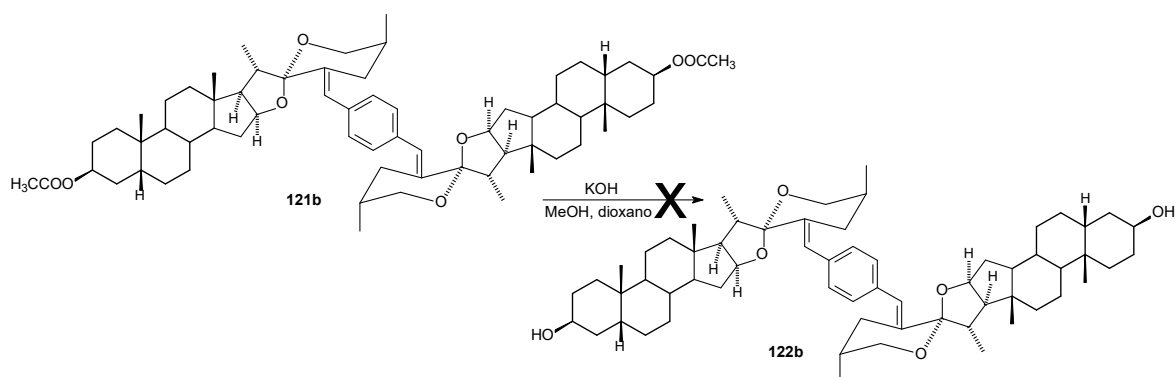
Tabla 14. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los dímeros simétricos **121a-d**.

C	121a	121b	121c	121d
16, 16'	80.4	81.1	78.8	80.4
17, 17'	61.6	61.8	52.9	61.5
18, 18'	16.7	16.7	16.1	16.5
20, 20'	37.3	39.8	37.8	37.7
21, 21'	14.8	18.3	13.6	14.8
22, 22'	110.6	11.4	110.5	110.6
23, 23'	137.2	136.8	137.1	137.2
24, 24'	33.0	30.9	33.0	32.9
25, 25'	33.1	30.3	33.0	33.1
26, 26'	66.0	65.1	66.1	66.0
27, 27'	17.2	14.7	17.2	17.2
28, 28'	122.6	124.8	122.6	122.6
ipso	135.4	135.4	135.3	135.4
orto	128.9	128.8	128.9	128.9

3.2.2. Saponificación de los dímeros simétricos 1,4-dimetiliden-diespirostanos.

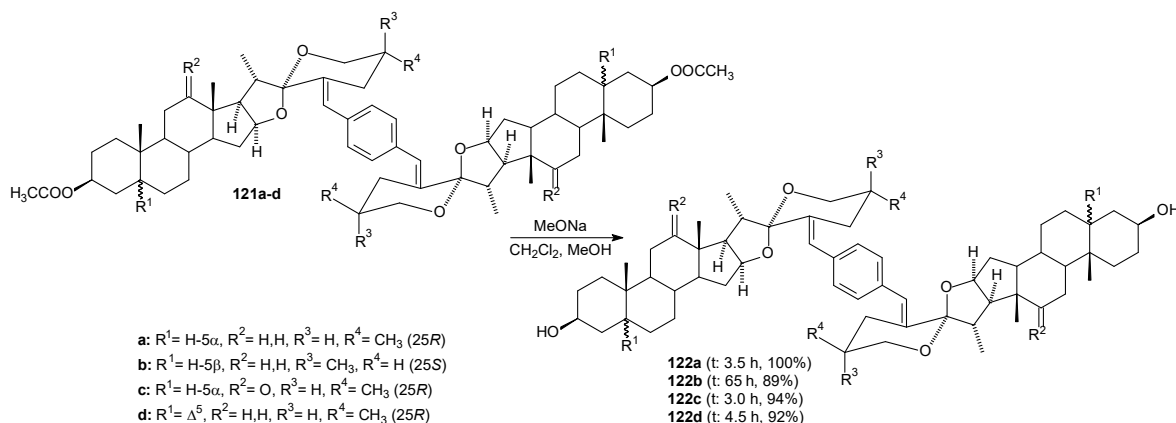
Los dímeros simétricos obtenidos mostraron ser ligeramente solubles en CH_2Cl_2 mientras que en el resto de disolventes orgánicos presentaron poca o nula solubilidad; esto dificultó la obtención de cristales adecuados para realizar experimentos de DRX y analizar sus propiedades en estado sólido. Con la intención de mejorar la solubilidad de estos compuestos y tomando en cuenta que para realizar las pruebas de actividad biológica de los dímeros simétricos los grupos hidroxilos de

C-3 y C-3' deben estar desprotegidos, se decidió llevar a cabo la saponificación de los 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos y obtener los diespirostanoles correspondientes. Esto a través del método convencional utilizando KOH en mezcla metanol/dioxano, 2/1. Sin embargo, al aplicar esta metodología a la desprotección del derivado **121b**, simplemente no se generó ningún producto pues el sustrato no se disolvió en el medio de reacción. (**Esquema 32**).



Esquema 32. Saponificación convencional del dímero **121b**.

Por lo anterior, fue necesario realizar la saponificación en un medio en el que todos los dímeros acetilados fueran solubles y esto se consiguió utilizando metóxido de sodio (MeONa) en una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ que permitió obtener los correspondientes dímeros 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanoles **122a-d** con muy buenos rendimientos (100%, 89%, 94% y 92%, respectivamente) (**Esquema 33**).



Esquema 33. Desprotección de los dímeros 1,4-dimetilidenbenzeno simétricos **121a-d**.

Lamentablemente, los derivados diespirostanoles obtenidos mostraron una solubilidad muy limitada y aun cuando fueron enviados para analizar su posible actividad como antitumorales,

todos los intentos por disolver los compuestos en los disolventes comúnmente empleados para realizar estas pruebas biológicas (EtOH, DMF, DMSO), no tuvieron éxito. La formación de geles o la precipitación de los esteroides diméricos, incluso en alta dilución, no permitieron la evaluación deseada.

3.2.3. Estudio de las reducciones de los dímeros 1,4-dimetiliden-diespirostanos.

Conociendo la reactividad particular que presentan los 23*E*-bencilidenespirostanos^{55,56} y debido a la similitud estructural de estos compuestos con los dímeros simétricos 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos (**Figura 25**), se decidió explorar la reactividad de estos dímeros para generar nuevos derivados diméricos simétricos y no simétricos que pudieran mostrar actividad biológica o ser útiles como materias primas en la síntesis de esteroides bioactivos. Para esto, se llevó a cabo el estudio de la reactividad de los dímeros 1,4-dimetilidenbencen-espirostanos de las series 25*R* y 25*S* a través de la reducción con NaBH₃CN en ácido acético e hidrogenación catalítica de estos compuestos.

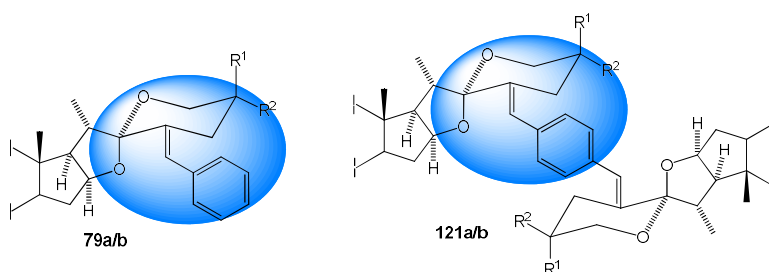
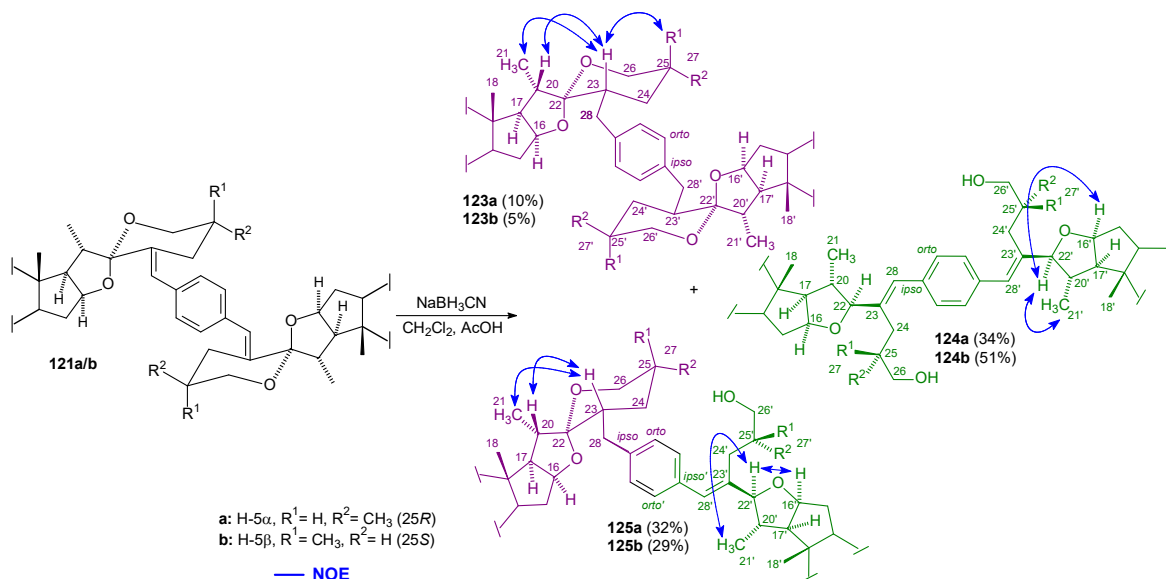


Figura 25. Similitud estructural entre los 23*E*-bencilidenespirostanos y los dímeros 1,4-dimetilidenbencen-espirostanos.

3.2.3.1. Reducción con NaBH₃CN en ácido acético.

El tratamiento del derivado **121a** con NaBH₃CN en ácido acético y CH₂Cl₂, generó los dímeros simétricos 1,4-dimetilbencen-espirostanos (**123a**, 10%) y 1,4-dimetilidenbencen-furostanos (**124a**, 34%) así como un derivado no simétrico con un fragmento espirostanbencilico y otro furostanbencilidénico (**125a**, 32%). Del mismo modo, la reducción en las mismas condiciones del compuesto **121b**, también generó los derivados simétricos 1,4-dimetilbencen-espirostanos (**123b**, 5%) y 1,4-dimetilidenbencen-furostanos (**124b**, 51%) así como el derivado no simétrico **125b** (29%) (**Esquema 34**).

En ambas reacciones se observa una preferencia a la adición de hidruro sobre la posición C-22 como ocurre en las sapogeninas estereoidales no funcionalizadas.⁶¹⁻⁶⁴ Sin embargo, en estos compuestos, así como en los bencilidenespirostanos, ocurre también la reducción sobre la posición bencílica (C-28 y C-28') lo que nos permite corroborar que la presencia del fragmento 1,4-dimetilidenbenceno induce desviaciones drásticas en la reactividad de los dímeros simétricos obtenidos. En la serie 25S la formación del derivado difurostánico se encuentra aún más favorecida debido a que la orientación axial del metilo C-25 facilita la apertura de la cadena lateral.



Esquema 34. Reducción con NaBH₃CN de los dímeros simétricos **121a/b**.

De manera muy similar a como ocurre con los bencil-espirostanos monoméricos,⁵⁶ en los espectros de RMN de ¹H de los derivados 1,4-dimetilbencen-espirostanos (**121a/b**), se hace evidente la reducción de los dobles enlaces C-23 – C-28 y C-23' – C-28' pues se observa la desaparición de las señales correspondientes a los protones olefínicos y la aparición de nuevas señales correspondientes a los pares de protones H-28a-b y H-28'a-b, además de la presencia de las señales correspondientes a H-23 y H-23'. Por otro lado, la desaparición de las señales correspondientes a los carbonos olefínicos C-23, C-23', C-28 y C-28' constituye la principal evidencia de la reducción del doble enlace observada en los espectros de RMN de ¹³C. Las correlaciones **NOE** H-23 \leftrightarrow H-20, H-23 \leftrightarrow H-21, H-23' \leftrightarrow H-20', H-23' \leftrightarrow H-21' en los compuestos **123a** y **123b** permiten determinar la configuración *S* a los centros quirales C-23 y C-23' (**Esquema 34**). Los corrimientos químicos de las señales de RMN de ¹H y ¹³C de las cadenas laterales y del

fragmento dimetil-benceno de los derivados **123a/b**, se encuentran recopilados en las **tablas 15 y 16**.

Tabla 15. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los derivados espirostánicos **123a** y **123b**. Se agregan las señales correspondientes a la materias primas **121a/b** con fines comparativos.

H	121a	123a	$\Delta_{\delta_{123a}-\delta_{121a}}$	121b	123b	$\Delta_{\delta_{123b}-\delta_{121b}}$
16, 16'	4.43	4.40	-0.03	4.46	4.42	-0.04
18, 18'	0.82	0.79	-0.03	0.84	0.79	-0.05
20, 20'	2.58	2.73	+0.15	2.48	2.41	-0.07
21, 21'	1.09	0.98	-0.11	0.99	1.01	+0.02
23, 23'	-	1.89	+1.89	-	2.09	+1.89
26a, 26'a	3.56	3.43	-0.13	4.04	3.88	-0.16
26b, 26'b	3.56	3.29	-0.27	3.31	3.25	-0.06
27, 27'	0.80	0.71	-0.09	1.10	0.97	-0.13
28a, 28'a	6.54	2.94	-3.60	6.69	2.93	-3.76
28b, 28'b	6.54	2.31	-4.23	6.69	2.41	-4.28
orto	7.20	7.06	-0.14	7.19	7.04	-0.15

Tabla 16. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los derivados espirostánicos **123a** y **123b**. Se agregan las señales correspondientes a la materias primas **121a/b** con fines comparativos.

C	121a	123a	$\Delta_{\delta_{123a}-\delta_{121a}}$	121b	123b	$\Delta_{\delta_{123b}-\delta_{121b}}$
16, 16'	80.4	80.8	+0.4	81.1	81.0	-0.1
17, 17'	61.6	61.6	0.0	61.8	61.5	-0.3
18, 18'	16.7	16.8	+0.1	16.7	16.8	+0.1
20, 20'	37.3	36.9	-0.4	39.8	37.3	-2.5
21, 21'	14.8	14.4	-0.4	18.3	14.2	-4.1
22, 22'	110.6	111.3	+0.7	111.4	111.9	+0.5
23, 23'	137.2	40.3	-96.9	136.8	34.6	-102.2
24, 24'	33.0	34.4	+1.4	30.9	31.9	+1.0
25, 25'	33.1	30.8	-2.3	30.3	28.1	-2.2
26, 26'	66.0	66.0	+0.0	65.1	64.6	-0.5
27, 27'	17.2	17.0	-0.2	14.7	16.6	+1.9
28, 28'	122.6	36.8	-85.8	124.8	36.7	-88.1
ipso	135.4	138.3	+2.9	135.4	138.3	+2.9
orto	128.9	129.0	+0.1	128.8	128.8	0.0

En los espectros de RMN de ^1H de los derivados 1,4-dimetiliden-furostánicos **124a/b**, la doble adición de hidruro sobre C-22 y C-22' puede notarse por la presencia de las señales correspondientes a los metinos H-22 y H-22'. En los espectros de RMN de ^{13}C , la principal

evidencia de la reducción efectuada es el corrimiento a campos más altos de las señales de C-22 y C-22', que en los materiales de partida espirocetólicos aparecen en 110.6 (**121a**) y 111.4 ppm (**121b**) mientras que en los productos de reducción aparecen en 97.2 (**124a**) y 94.8 ppm (**124b**). En las **tablas 17 y 18** se muestran los desplazamientos químicos de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C de las cadenas laterales de los derivados dimetiliden-furostanos **124a/b**.

Tabla 17. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los derivados furostánicos **124a** y **124b**. Se agregan las señales correspondientes a la materias primas **121a/b** con fines comparativos.

H	121a	124a	$\Delta_{\delta_{124a}-\delta_{121a}}$	121b	124b	$\Delta_{\delta_{124b}-\delta_{121b}}$
16, 16'	4.43	4.39	-0.04	4.46	4.36	-0.10
18, 18'	0.82	0.90	+0.08	0.84	0.86	+0.02
21, 21'	1.09	1.00	-0.09	0.99	1.06	+0.07
22, 22'	-	3.86	+3.86	-	3.87	+3.87
24a, 24'a	2.82	2.53	-0.29	2.73	2.48	-0.25
24b, 24'b	2.11	2.20	+0.09	2.31	2.18	-0.13
26a, 26'a	3.56	3.55	-0.01	4.04	3.28	-0.76
26b, 26'b	3.56	3.18	-0.38	3.31	3.28	-0.03
27, 27'	0.80	0.89	+0.09	1.10	0.79	-0.31
28, 28'	6.54	6.41	-0.13	6.69	6.59	-0.10
orto	7.20	7.28	+0.08	7.19	7.23	+0.04

Tabla 18. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los derivados furostánicos **124a** y **124b**. Se agregan las señales correspondientes a la materias primas **121a/b** con fines comparativos.

C	121a	124a	$\Delta_{\delta_{124a}-\delta_{121a}}$	121b	124b	$\Delta_{\delta_{124b}-\delta_{121b}}$
16, 16'	80.4	83.6	+3.2	81.1	83.3	+2.2
17, 17'	61.6	63.8	+2.2	61.8	64.6	+2.8
18, 18'	16.7	17.0	+0.3	16.7	16.7	0.0
20, 20'	37.3	37.0	-0.3	39.8	37.1	-2.7
21, 21'	14.8	17.7	+2.9	18.3	18.7	+0.4
22, 22'	110.6	97.2	-13.4	111.4	94.8	-16.6
23, 23'	137.2	139.2	+2.0	136.8	139.6	+2.8
24, 24'	33.0	30.0	-3.0	30.9	30.8	-0.1
25, 25'	33.1	34.3	+1.2	30.3	35.0	+4.7
26, 26'	66.0	64.5	-1.5	65.1	66.9	+1.8
27, 27'	17.2	18.2	+1.0	14.7	17.3	+2.6
28, 28'	122.6	128.4	+5.8	124.8	127.5	+2.7
ipso	135.4	135.9	+0.5	135.4	136.3	+0.9
orto	128.9	128.6	-0.3	128.8	128.7	-0.1

La configuración *S* en los nuevos centros quirales C-22 y C-22' fue determinada con ayuda de los efectos **NOE** observados entre H-22, H-21 y H-16 de los núcleos esteroidales, lo que sitúa a H-22 en la cara α de la molécula (**Esquema 34**).

En lo que respecta a los dímeros no simétricos **125a/b**, en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se observa una combinación de las características en RMN discutidas para los dímeros simétricos dimetilbencil-espirostanos y dimetilidencen-furostanos. La desaparición de las señales olefínicas en el hemisferio izquierdo de cada molécula (bencil-espiroetano) y el desplazamiento a campo más alto de la señal correspondiente a C-22' y la presencia de H-22' en el hemisferio derecho (bencil furoetano). En las **tablas 19** y **20** se muestran los desplazamientos químicos correspondientes a las señales antes mencionadas.

Tabla 19. Señales selectas de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los dímeros no simétricos **125a** y **125b**.

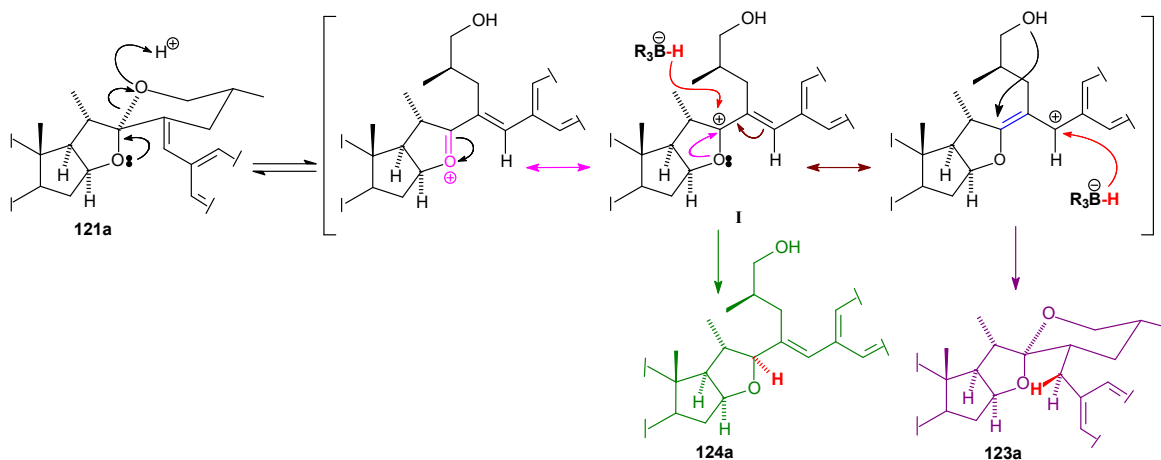
H	125a (h. izq.)	125b (h. izq.)	H	125a (h. der.)	125b (h. der.)
22	-	-	22'	3.86 (d)	3.89 (m)
23	1.89 (m)	2.12 (m)	23	-	-
28	2.94 (dd)	2.94 (dd)	28'	6.42 (d)	6.60 (s)
	2.33 (m)	2.30 (m)			
orto	7.10 (d)	7.08 (d)	orto'	7.25 (d)	7.19 (d)

Tabla 20. Señales selectas de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los dímeros no simétricos **125a** y **125b**.

C	125a (h. izq.)	125b (h. izq.)	C	125a (h. der.)	125b (h. der.)
22	111.3	111.8	22'	97.4	94.7
23	40.2	34.6	23'	138.3	138.7
28	36.8	36.8	28'	128.8	127.8
ipso	139.6	139.3	ipso'	135.0	135.3
orto	129.1	128.9	orto'	128.6	128.7

Por los productos obtenidos en esta reacción, podemos asumir que el mecanismo involucrado en la adición de hidruro de estos compuestos es prácticamente el mismo que se indicó para los bencilidenespirostanos en un documento anterior,⁵⁶ que comienza con la apertura del anillo F del espirocetal promovida por el ácido en el medio para generar el oxocarbenio **I**, que se estabiliza por resonancia. En las estructuras canónicas se puede observar que si la adición de hidruro se lleva

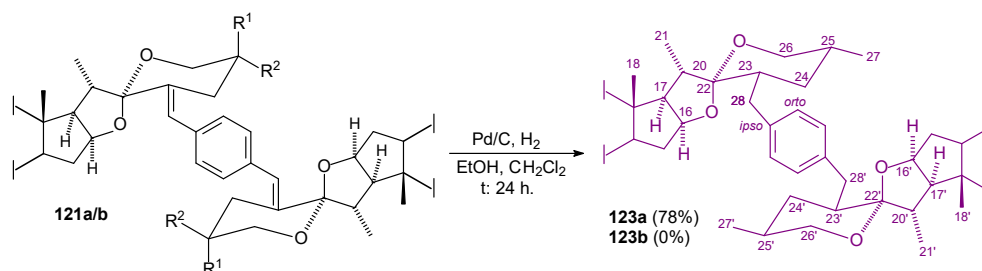
a cabo en C-22 se genera el fragmento **dimetilidenbencen-furostánico**, mientras que si la adición ocurre sobre C-28 se genera el fragmento **dimetilbencil-espirostánico**. Para los dímeros simétricos **123a/b** y **124a/b**, la reducción ocurre sobre la misma posición en ambos hemisferios del dímero, mientras que en los dímeros no simétricos **125a/b**, en un hemisferio la adición ocurre en C-22 y en el otro sobre C-28' (**Esquema 35**).



Esquema 35. Mecanismo de reacción propuesto

3.2.3.2. Hidrogenación catalítica.

Por otra parte, se llevó a cabo la reducción catalítica con Pd/C y atmósfera de H₂, del dímero simétrico **121a** derivado de la tigogenina y de esta reacción se obtuvo el dímero 1,4-dimetilbencil-espirostano **123a**, con un buen rendimiento (78%) (**Esquema 36**). Los intentos por obtener el derivado **123b** de la serie a partir del compuesto **121b**, derivado de la sarsasapogenina, con esta metodología fueron infructuosos y esto se debe a la baja solubilidad del sustrato en el medio de reacción y a la distinta reactividad que muestran los derivados bencilidenespirostanos de la serie 25S (ver sección 3.1.2.).



Esquema 36. Reducción catalítica de los derivados **121a/b**.

Parte experimental

General

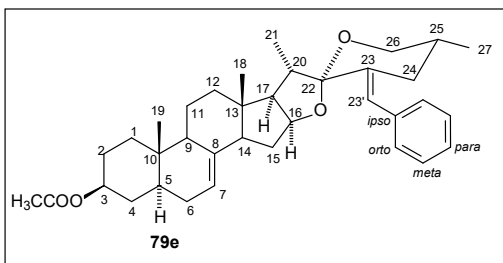
El curso de las reacciones se siguió mediante cromatografía en capa delgada (CCD), usando placas ALUGRAM®SIL G/UV₂₅₄ de MACHEREY-NAGEL. Las placas cromatográficas se sumergieron en una disolución de vainillina al 0.7% en H₂SO₄ etanólico al 2% y se calentaron hasta la aparición de color. Los productos se purificaron por cromatografía en columna, empleando gel de sílice de MACHEREY-NAGEL. Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Melt-Temp II. Los espectros de Masas fueron registrados en un espectrómetro Thermo-Electron modelo DFS (Double Focus Sector) cuando se hizo la medición por la técnica de Impacto Electrónico; en un equipo Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS cuando se realizaron las mediciones por técnica de Electro spray (ESI) y en un equipo PERKIN ELMER Model: AxION-2 TOF MS spectrometer cuando se hicieron las mediciones de los Espectros de Masas de Alta Resolución (HRMS) por la técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI). Los espectros de RMN se registraron en equipos Varian INOVA 400MHz, utilizando las señales del CDCl₃ en 7.26 ppm y 77.00 ppm como referencias para ¹H y ¹³C, respectivamente. La asignación de las señales de RMN se hizo con ayuda de la combinación de técnicas de RMN mono y bidimensional que incluyeron, RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY, NOESY, HSQC y HMBC y fueron procesados empleando el programa MestreNova.

3.1. Síntesis y estudio de la reactividad de los 23E-bencilidenespirostanos.

3.1.1. Obtención de los 23E-bencilidenespirostanos.

Los bencilidenespirostanos **79a-d** fueron obtenidos siguiendo exactamente el procedimiento descrito por nuestro grupo.⁵⁵ Para la obtención del derivado **79e** se siguió el siguiente procedimiento.

A una disolución de la sapogenina esterooidal **64e** (3.10 g, 6.8 mmol) y benzaldehído (**78**) (1.43 g, 13.5 mmol) en CH₂Cl₂ (200 ml), se le adicionó BF₃•Et₂O (40.56 mL, 329 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo, se agitó hasta que el hielo se fundió, se separó la fase orgánica y se evaporó por completo. El residuo se redisolvió en acetato de etilo (200 mL) y se lavó con agua (10 × 75 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 75 mL) se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó. El aceite obtenido se lixivió con metanol caliente y el precipitado se filtró y lavó con metanol para generar 1.73 g (46.8%) de:



Acetato de [23(23')E,25R]-23(23')-benciliden-espirost-7-en-3β-ol (79e):

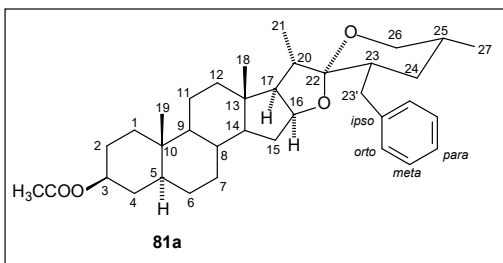
P.f. 177.9–179.7 °C
(recristalizado de acetona) RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.33 (dd, $J = 8.6, 6.7$ Hz, 2H, H-*meta*), 7.25 – 7.19 (m, 3 H, H-*orto* y H-*para*), 6.57 (d, $J = 1.9$

Hz, 1H, H-23'), 5.15 (dd, $J = 4.7, 2.3$ Hz, 1H, H-7), 4.70 (tt, $J = 11.3, 4.6$ Hz, 1H, H-3), 4.52 (m, 1H, H-16), 3.65 – 3.51 (m, 2H, H-26ax. y H-26eq.), 2.79 (ddd, $J = 13.4, 4.2, 1.6$ Hz, 1H, H-24eq.), 2.58 (p, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-20), 2.10 (m, 1H, H-24ax.), 1.12 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27), 0.72 (s, 3H, H-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: δ 36.8 C-1; 27.4 C-2; 73.3 C-3, 33.8 C-4, 40.1 C-5, 29.4 C-6, 117.9 C-7, 138.4 C-8, 48.9 C-9, 34.3 C-10, 21.4 C-11, 39.6 C-12, 41.6 C-13, 54.8 C-14, 31.0 C-15, 80.2 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 13.0 C-19, 37.7 C-20, 14.8 C-21, 110.6 C-22; 137.1 C-23, 32.9 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 122.9 C-23', 137.1 *ipso*, 129.1 *orto*, 128.1 *meta*, 126.5 *para*, 21.4 CH_3 acetilo, 170.7 C=O acetilo. ESIMS m/z : 545 MH^+ (2.5), 454 (26.8), 440 (13.6), 99 (13.9), 85 (100.0), 69 (15.0), 55 (10.8).

3.1.2. Hidrogenación catalítica.

Procedimiento general para la reducción catalítica de los 23E-bencilidenespirostanos. A una disolución purgada al vacío de 23E-bencilidenespirostanos (0.5 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) y etanol (17.7 mL), se le añadió paladio sobre carbono (Pd/C) (10% p/p), se purgó nuevamente y se agitó bajo atmósfera de H_2 a temperatura ambiente hasta que la materia prima se consumió completamente (24 horas, CCD hexano/acetato de etilo, 9/1 x 2). La mezcla de reacción se filtró sobre celita, el crudo se lavó con CH_2Cl_2 y el filtrado se evaporó a sequedad. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en una columna empaquetada con gel de sílice (15 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo de composición, 20/1, para producir los correspondientes bencil-espirostanos.

La reacción con 23E-bencilidentigogenina (**79a**) (273.4 mg, 0.5 mmol) con Pd/C (27.3 mg, 10% p/p) (24 h) generó 268.7 mg (98%) de:



Acetato de (23S,25R)-23-bencil-5 α -espirostan-3 β -ol

(81a). P.f. 207.0 – 209.7 °C. (recristalizado de

acetona/ CH₂Cl₂). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm:

7.28 (dd, *J*=8.4, 7.0 Hz, 2H, H-orto), 7.21 – 7.16 (m, 1H,

H-para), 7.16 – 7.12 (m, 2H, H-meta), 4.68 (tt, *J*=11.5,

4.9 Hz, 1H, H-3), 4.41 (dt, *J*=9.0, 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.43 (ddd, *J*=10.9, 4.6, 2.0 Hz, 1H, H-26 eq.), 3.30

(dd, *J*=11.0, 11.0 Hz, 1H, H-26 ax.), 2.97 (dd, *J*=13.8, 3.4 Hz, 1H, H-23'a), 2.43 – 2.35 (m, 1H, H-20),

2.34 – 2.27 (m, 1H, H-23'b), 1.89 (m, 1H, H-23), 2.01 (s, CH₃ acetilo), 1.00 (d, *J*=7.0 Hz, 3H, H- 21),

0.83 (s, 3H, H-19), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.71 (d, *J*=6.6 Hz, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm:

36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10,

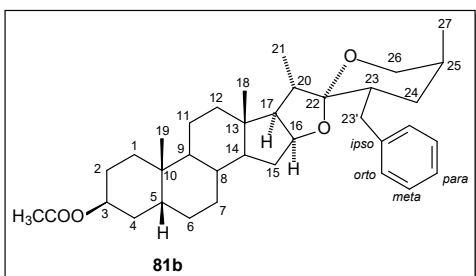
21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.0 C-13, 56.1 C-14, 31.6 C-15, 80.8 C-16, 61.6 C-17, 16.7 C-18, 12.3 C-19,

36.9 C-20, 14.4 C-21, 111.2 C-22, 40.3 C-23, 34.3 C-24, 30.7 C-25, 66.0 C-26, 16.9 C-27, 37.2 C-23',

140.9 ipso, 129.1 orto, 128.2 meta, 125.8 para, 21.4 CH₃ acetilo, 170.6 C=O acetilo. HRMS (APCI)

Observado 549.3945 C₃₆H₅₂O₄, calculado (MH⁺) 549.3943.

La reacción con 23*E*-bencilidensarsasapogenina (**79b**) (273.4 mg, 0.5 mmol) con Pd/C (27.3 mg, 10% p/p) (24 h) generó 245.0 mg (89%) de una mezcla de **81b** y **114b**. Las muestras analíticas de cada compuesto se obtuvieron por separación en columna cromatográfica como se describe en el procedimiento general.



Acetato de (23S,25S)-23-bencil-5 β -espirostan-3 β -ol

(81b). P.f. 180 – 181.1 °C (recristalizado de acetona/

CH₂Cl₂). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.27 (dd, *J*

= 10.0, 4.7 Hz, 2H, H-orto), 7.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-

para), 7.13 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-meta), 5.07 (s, 1H, H-3),

4.43 (dd, *J* = 15.9, 7.2 Hz, 1H, H-16), 3.88 (dd, *J* = 10.9,

2.4 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.26 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, H-26 eq.), 2.97 (dd, *J*=13.7, 3.5 Hz 1H, H-23'a), 2.33

(m, 2H, H-20, H-23'b), 2.16 – 2.07 (m, 1H, H- 23), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.03 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-

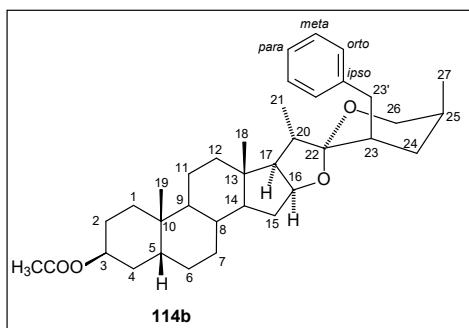
21), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.97 (d, *J*= 7.0 Hz, 3H, H-27), 0.80 (s, 3H, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz,

CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 30.7 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.5 C-7, 35.2 C-8, 40.0 C-9,

35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.1 C-13, 56.3 C-14, 31.6 C-15, 81.0 C-16, 61.5 C-17, 16.7 C-18,

23.9 C-19, 37.3 C-20, 14.2 C-21, 111.8 C-22, 34.6 C-23, 31.8 C-24, 28.0 C-25, 64.3 C-26, 16.6 C-27,

21.5 CH₃ acetilo, 170.6 C=O acetilo, 37.1 C-23', 140.9 *ipso*, 129.0 *orto*, 128.2 *meta*, 125.7 *para*. HRMS (APCI) Observado 549.3941 C₃₆H₅₂O₄ calculado (MH⁺) 549.3943.

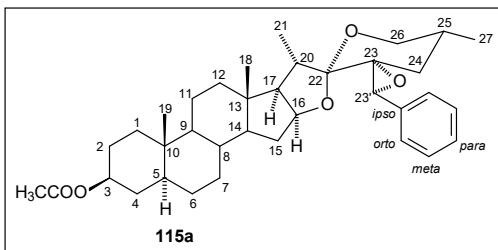


Acetato de (23R,25S)-23-bencil-5β-estriano-3β-ol (114b). P.f. 194.7 – 196.7 °C (recristalizado de CH₂Cl₂/acetato de etilo). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.23 (m, 2H *meta*), 7.12 (m, 3H H-*orto* y H-*para*), 5.00 (q, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-3), 4.42 (ddd, *J* = 8.9, 7.4, 6.1 Hz, 1H, H-16), 3.86 (dd, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.25 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, 1H, H-26 eq.), 2.97 (dd, *J* = 13.2, 3.7 Hz, 1H, H-23'a), 2.49 – 2.32 (m, 1H, H-23'b), 2.22 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 1.97 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-21), 0.94 – 0.89 (m, 6H, H-19 y H-27), 0.73 (s, 3H, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1; 25.0 C-2; 70.6 C-3, 31.8 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.4 C-7, 35.2 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.8 C-11, 40.2 C-12, 41.2 C-13, 56.2 C-14, 30.7 C-15, 80.4 C-16, 63.3 C-17, 16.5 C-18, 23.8 C-19, 38.3 C-20, 16.5 C-21, 112.3 C-22; 42.4 C-23, 30.0 C-24, 28.5 C-25, 65.8 C-26, 20.3 C-27, 37.7 C-23', 140.9 *ipso*, 129.1 *orto*, 128.2 *meta*, 125.8 *para*, 170.7 C=O acetilo, 21.5 CH₃ acetilo. HRMS (APCI) Observado 549.3924 C₃₆H₅₂O₄ calculado (MH⁺) 549.3943.

3.1.3. Epoxidación.

Procedimiento general para la epoxidación de los 23E-bencilidenespirostanos. A una disolución de 23E-bencilidenespirostanos (0.5 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL), se le adicionó ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) (1.25 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumió la materia prima (CCD CH₂Cl₂ puro x 2). La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 mL) y se lavó con disolución de Na₂SO₃ al 5% (4 x 30 mL), agua (3 x 15 mL), disolución de NaHCO₃ al 10% (6 x 15 mL), agua (4 x 15 mL) y disolución saturada de NaCl (2 x 15 mL), se secó (Na₂SO₄) y evaporó. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en una columna empacada con gel de sílice (20 g) y se eluyó con CH₂Cl₂ para producir los correspondientes 23-bencil-23,23'-epoxi-estriano-3β-ol.

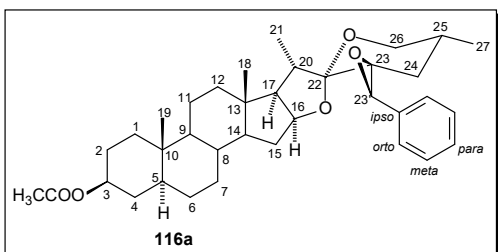
La reacción con 23E-bencilidentigogenina (**79a**) (273.4 mg, 0.5 mmol) con *m*-CPBA (216 mg, 1.25 mmol) (24 h) generó 123.8 mg (44%) de una mezcla de epóxidos epiméricos que se separó para obtener las muestras analíticas de **115a** y **116a**.



Acetato de [23R,23'S,25R]-23-bencil-23,23'-epoxi-5α-espirostan-3β-ol (115a). P.f. 236.8 – 238.5 °C

(recristalizado de CH_2Cl_2 /acetato de etilo). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.39 – 7.24 (m, 5H, H-Ar), 4.68 (tt, $J=11.5, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.48 (td, $J=7.9, 5.7$ Hz,

1H, H-16), 4.10 (s, 1H, H-23'), 3.48 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H-26a), 3.46 (s, 1H, H-26b), 2.19 (p, $J=6.8$ Hz, 1H, H-20 β), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.12 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.86 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.63 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 36.8 C-1, 27.5 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.7 C-5, 28.5 C-6, 32.1 C-7, 35.2 C-8, 54.3 C-9, 35.6 C-10, 20.9 C-11, 40.0 C-12, 41.3 C-13, 56.4 C-14, 31.9 C-15, 81.2 C-16, 63.1 C-17, 16.4 C-18, 12.3 C-19, 33.3 C-20, 16.7 C-21, 109.9 C-22, 62.5 C-23, 31.1 C-24, 30.9 C-25, 66.0 C-26, 16.7 C-27, 61.2 C-23', 135.1 *ipso*, 126.3 *orto*, 128.0 *meta*, 127.5 *para*, 21.5 CH_3 acetilo, 170.7 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado 563.3703 $C_{36}H_{50}O_5$ calculado (MH^+) 563.3736.

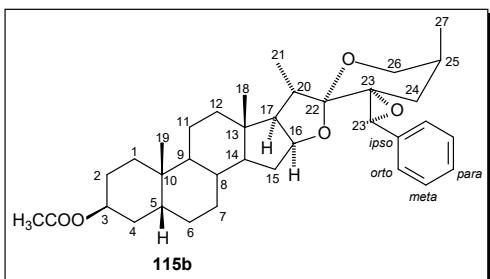


Acetato de [23S,23'R,25R]-23-bencil-23,23'-epoxi-5α-espirostan-3β-ol (116a). P.f. 199 – 200.3 °C

(recristalizado de CH_2Cl_2 /acetona). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.40 – 7.21 (m, 5H H-Ar), 4.69 (tt, $J=10.9, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.51 (td, $J=8.0, 5.9$ Hz, 1H, H-

16), 4.27 (s, 1H, H-23'), 3.58 (ddd, $J=11.0, 4.5, 2.1$ Hz, 1H, H-26 eq.), 3.43 (t, $J=11.1$ Hz, 1H, H-26 ax.), 2.11 (p, $J=7.1$ Hz, 1H, H-20 β), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.09 (d, $J=6.7$ Hz, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.85 (s, 3H, H-19), 0.72 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 36.7 C-1, 27.5 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.1 C-7, 35.2 C-8, 54.1 C-9, 35.6 C-10, 20.9 C-11, 39.7 C-12, 41.4 C-13, 56.3 C-14, 31.8 C-15, 81.8 C-16, 62.3 C-17, 16.8 C-18, 12.2 C-19, 35.8 C-20, 16.1 C-21, 109.6 C-22, 63.2 C-23, 33.1 C-24, 29.1 C-25, 66.0 C-26, 16.9 C-27, 59.5 C-23', 135.4 *ipso*, 126.3 *orto*, 128.0 *meta*, 127.4 *para*, 21.4 CH_3 acetilo, 170.7 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado 563.3674 $C_{36}H_{50}O_5$ calculado (MH^+) 563.3736.

La reacción con 23*E*-bencilidensarsasapogenina (**79b**) (273.4 mg, 0.5 mmol) con *m*-CPBA (215.8 mg, 1.25 mmol, tiempo de reacción 96 h) generó 111.1 mg (40%) de:



Acetato de [23R,23'S,25S]-23-bencil-23,23'-epoxi-5 β -espirostan-3 β -ol (115b). P.f. 279.4 – 280.4 °C

(recristalizado de CH₂Cl₂/acetato de etilo). RMN de ¹H
RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.36 – 7.26 (m, 5H H-Ar),
5.07 (q, *J*=2.8 Hz, 1H, H-3), 4.49 (ddd, *J*=8.7, 7.6, 6.0 Hz,
1H, H-16), 4.14 (s, 1H, H-23'), 4.03 (dd, *J*=11.0, 2.8 Hz,

1H, H-26 ax.), 3.26 (dt, *J*=11.2, 1.8 Hz, 1H, H-26 eq.), 2.32 (dd, *J*=13.1, 5.0 Hz, 1H, H-24 ax.), 2.17 (p, *J*=7.3, 6.8 Hz, 1H, H-20 β), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.78 (d, *J*=5.8 Hz, 1H, H-17 α), 1.22 (t, *J*=2.3 Hz, 1H, H-24 eq.), 1.17 (d, *J*=7.0 Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.64 (d, *J*=7.2 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.7 C-1, 24.9 C-2, 70.7 C-3, 31.8 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.4 C-7, 35.3 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.8 C-11, 40.2 C-12, 41.3 C-13, 56.5 C-14, 30.6 C-15, 81.2 C-16, 62.7 C-17, 16.4 C-18, 23.9 C-19, 33.6 C-20, 16.2 C-21, 110.5 C-22, 61.0 C-23, 27.7 C-24, 30.1 C-25, 64.5 C-26, 17.1 C-27, 62.1 C-23', 135.2 *ipso*, 126.8 *orto*, 127.8 *meta*, 127.5 *para*, 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado 563.3773 C₃₆H₅₀O₅ calculado (MH⁺) 563.3736.

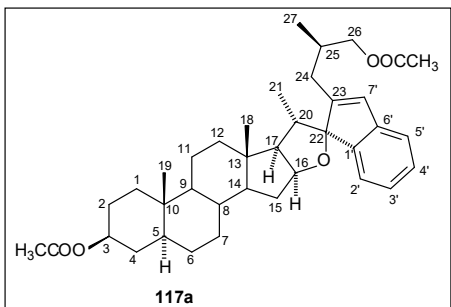
3.1.4. Reordenamientos de la cadena lateral catalizados por ácidos.

3.1.4.1 Síntesis de los espiro[furan-indenos] derivados de sapogeninas esteroidales.

Reordenamiento catalizado por BF₃•Et₂O a partir de sapogeninas esteroidales y benzaldehído

Utilizando BF₃•Et₂O como catalizador. A una disolución de sapogenina esteroideal acetilada (1 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) y ácido acético (6 mL), se le agregó BF₃•Et₂O (0.6 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregó benzaldehído (212.2 mg, 2 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (2 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Al concluir, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con agua (3 x 30 mL), disolución al 10% de Na₂CO₃ (3 x 30 mL), agua (4 x 30 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó. El aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna, para generar los espiro[furan]indenos deseados.

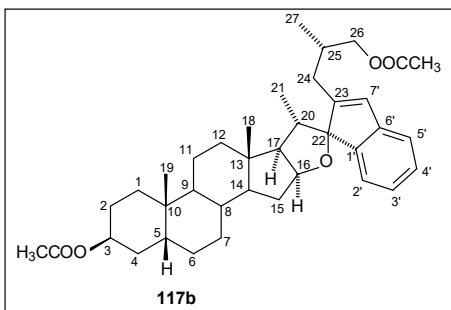
La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol, tiempo de reacción: 63 h) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (25 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1 para generar 116.0 mg (20%) de:



Diacetato de (22R,25R)Indeno[9',8':22,23]-5 α -furostan-3 β ,26-diol (117a**).** P.f. 194.5 – 196.7 °C (*recristalizado de CH₂Cl₂/MeOH*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 – 7.29 (m, 1H, H-2'), 7.16 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H, H-3'), 7.12 – 7.09 (m, 1H, H-5'), 7.05 (td, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H, H-4'), 6.36 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-7'), 4.99 (dt, *J* = 9.2, 7.0 Hz, 1H, H-16), 4.70

(tt, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 1H, H-3), 4.09 – 3.92 (m, 2H, H-26), 2.58 – 2.52 (m, 1H, H-20), 2.49 (ddd, *J* = 15.3, 5.2, 1.8 Hz, 1H, H-24a), 2.31 (ddt, *J* = 13.2, 6.5, 1.7 Hz, 1H, H-25), 2.20 (dd, *J* = 9.3, 7.8 Hz, 1H, H-17), 2.07 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.05 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 0.99 (s, 3H, H-18), 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-27), 0.87 (s, 3H, H-19), 0.72 (td, *J* = 11.8, 10.4, 3.1, 1H, H-9), 0.55 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.5 C-2, 73.7 C-3, 34.0 C-4, 44.7 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.3 C-12, 41.6 C-13, 56.7 C-14, 32.5 C-15, 84.3 C-16, 63.2 C-17, 16.9 C-18, 12.3 C-19, 36.2 C-20, 15.3 C-21, 101.2 C-22, 148.5 C-23, 31.0 C-24, 31.4 C-25, 69.6 C-26, 17.1 C-27, 128.5 C-7', 142.8 C-1', 124.0 C-2', 127.9 C-3', 124.6 C-4', 120.6 C-5', 145.5 C-6', 21.5, 21.0 CH₃ acetilo, 170.7, 171.2 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₅ 589.3867 (MH⁺) calculado 589.3893.

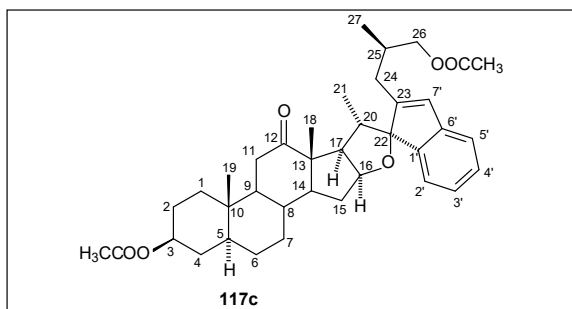
La reacción con acetato de sarsasapogenina (**64b**) (458.7 mg, 1 mmol, tiempo de reacción: 30 h) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (25 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1 para generar 64.5 mg (11%) de:



Diacetato de (22R,25S)Indeno[9',8':22,23]-5 β -furostan-3 β ,26-diol (117b**).** Aceite. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.32 (dd, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H, H-2'), 7.16 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H, H-3'), 7.10 (m, 1H, H-5'), 7.05 (td, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H, H-4'), 6.36 (s, 1H, H-7'), 5.09 (m, 1H, H-3), 5.00 (td, *J* = 9.2, 8.2, 4.6 Hz, 1H, H-16), 4.05 (dd, *J* = 10.8, 5.1 Hz, 1H, H-26a), 3.96 (dd, *J* = 10.8, 6.3 Hz, 1H, H-26b), 2.53 (p, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-20), 2.21 (m, 1H, H-17), 2.07

(s, 3H, CH₃ acetilo), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.03 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-27), 1.01 (s, 3H, H-19), 0.99 (s, 3H, H-18), 0.55 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.6 C-3, 30.7 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.4 C-7, 35.2 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 21.0 C-11, 40.5 C-12, 41.7 C-13, 56.8 C-14, 32.5 C-15, 84.3 C-16, 63.3 C-17, 17.0 C-18, 23.8 C-19, 36.2 C-20, 15.3 C-21, 101.0 C-22, 148.6 C-23, 30.4 C-24, 31.5 C-25, 69.0 C-26, 17.5 C-27, 128.1 C-7', 142.8 C-1', 123.9 C-2', 127.9 C-3', 124.5 C-4', 120.6 C-5', 145.3 C-6', 21.5, 21.0 CH₃ acetilo, 170.7, 171.2 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₅ 589.3862 (MH⁺) calculado 589.3893.

La reacción con acetato de hecogenina (**64c**) (472.7 mg, 1 mmol, tiempo de reacción: 50 h) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (25 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 15/1 para generar 306.7 mg (51%) de:



(22R,25R)Indeno[9',8':22,23]-3β,26-diacetoxi-5α-furostan-12-ona (117c). P.f. 249.0 – 249.3 °C (*recristalizado de hexano/acetona*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.33 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-20), 7.18 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H, H-3'), 7.13 – 7.09 (m, 1H, H-5'), 7.07 (td, *J* = 7.4, 1.3

Hz, 1H, H-4'), 6.38 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-7'), 4.92 (td, *J* = 8.4, 7.3, 4.2 Hz, 1H, H-16), 4.77 – 4.56 (m, 1H, H-3α), 4.15–3.87 (m, 2H, H-26), 3.04 (dd, *J* = 9.4, 8.1 Hz, 1H, H-17), 2.44 (1H, m, H-24a), 2.39 (m, 1H, H-20), 2.30 (m, 1H, H-25), 2.07 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.03 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.01 (m, 1H, H-24b), 1.26 (s, 3H, H-18), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H-27), 0.95 (s, 3H, H-19), 1.19 (m, 1H, H-9), 0.64 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.1 C-3, 33.8 C-4, 44.5 C-5, 28.1 C-6, 32.5 C-7, 34.2 C-8, 55.5 C-9, 36.1 C-10, 37.7 C-11, 213.0 C-12, 55.8 C-13, 56.0 C-14, 32.0 C-15, 82.5 C-16, 53.9 C-17, 16.5 C-18, 11.9 C-19, 36.7 C-20, 14.0 C-21, 101.2 C-22, 147.9 C-23, 30.9 C-24, 31.3 C-25, 69.5 C-26, 17.0 C-27, 128.8 C-7', 142.6 C-1', 124.0 C-2', 128.1 C-3', 124.7 C-4', 120.6 C-5', 145.1 C-6', 21.4, 21.0 CH₃ acetilo, 170.6, 171.1 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₁O₆ 603.3592 (MH⁺) calculado 603.3686.

Reordenamiento catalizado por el complejo $BF_3 \cdot 2CH_3COOH$ a partir de sapogeninas esteroideas y benzaldehído

Utilizando complejo de $BF_3 \cdot 2CH_3COOH$ como catalizador. A una disolución de acetato de tigogenina (**64a**) (229.3 mg, 1 mmol) y benzaldehído (**78**) (106.1 mg, 1 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL), se le añadió complejo de $BF_3 \cdot 2CH_3COOH$ al 98% (1 mL, 7.1 mmol de BF_3). La mezcla se purgó con argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 96 h (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se diluyó con acetato de etilo (50 mL). La fase orgánica se lavó con agua (10 x 20 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 20 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó. El sólido obtenido se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (12 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1, para obtener 10.4 mg (4%) de **diacetato de (22R,25R)Indeno[9',8':22,23]-5 α -furostan-3 β ,26-diol (117a)** idéntico al descrito en la sección anterior.

Reordenamiento catalizado por $HClO_4$ a partir de sapogeninas esteroideas y benzaldehído.

Utilizando $HClO_4$ como catalizador. A una disolución de acetato de tigogenina (82.6 mg, 0.18 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) y ácido acético (1.1 mL), se le agregó $HClO_4$ conc. (0.3 mL, 3.4 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregó benzaldehído (38.2 mg, 0.36 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (0.5 mL) y se agitó a temperatura ambiente (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Al concluir, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con agua (4 x 15 mL), disolución al 10% de Na_2CO_3 (1 x 15 mL), agua (4 x 15 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 15 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó. El aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel (10 g) y se y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1, para generar 59.0 mg (56%) de diacetato de (22R,25R)Indeno[9',8':22,23]-5 α -furostan-3 β ,26-diol (**117a**).

Utilizando $HClO_4$ como catalizador. Un tratamiento similar aplicado al acetato de sarsasapogenina (**64b**) (82.6 mg, 0.18 mmol) generó 53.1 mg (50%) del espiro[furan]indeno diacetato de (22R,25S)Indeno[9',8':22,23]-5 β -furostan-3 β ,26-diol (**117b**).

Reordenamiento catalizado por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a partir de 23E-bencilidenespirostanos.

Utilizando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalizador. A una disolución de 23E-bencilidenespiroetano (0.18 mmol) en CH_2Cl_2 (0.9 mL) y ácido acético (1.1 mL), se le agregó $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.11 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Al concluir la reacción, la mezcla se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con agua (3 x 20 mL), disolución al 10% de Na_2CO_3 (2 x 20 mL), agua (4 x 20 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 20 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó. El aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna, para generar los espiro[furan]indenos deseados.

La reacción con la 23E-bencilidentigogenina (**79a**) (100 mg, 0.18 mmol, tiempo de reacción: 48 h) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1, para obtener 14.0 mg (13%) de **117a** idéntico al descrito anteriormente.

La reacción con la 23E-bencilidensarsasapogenina (**79b**) (100 mg, 0.18 mmol, tiempo de reacción: 240 h) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1, para obtener 32.8 mg (26%) de **117b** idéntico al descrito anteriormente.

La reacción con la 23E-bencilidenehecogenina (**79c**) (102 mg, 0.18 mmol, tiempo de reacción: 48 h) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 16/1, para obtener 43.8 mg (40%) de **117c** idéntico al descrito anteriormente.

Reordenamiento catalizado por HClO_4 a partir de 23E-bencilidenespirostanos.

Utilizando HClO_4 como catalizador. A una disolución de 23E-bencilidenespiroetano (0.18 mmol) en CH_2Cl_2 (0.9 mL) y ácido acético (1.1 mL), se le agregó HClO_4 conc. (0.3 mL, 3.4 mmol) y la mezcla agitó a temperatura ambiente (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Al concluir, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con agua (4 x 15 mL), disolución al 10% de Na_2CO_3 (1 x 15 mL), agua (4 x 15 mL), disolución

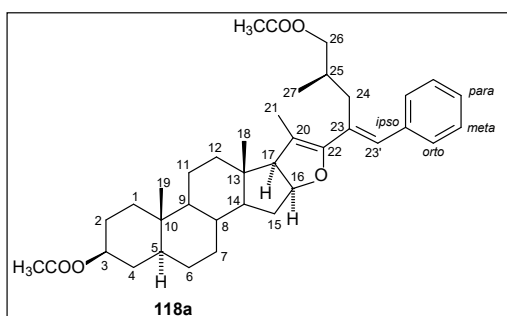
saturada de NaCl (1 x 15 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó. El aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna, para generar los espiro[furan]indenos deseados.

La reacción con la 23*E*-bencilidentigogenina (**79a**) (100 mg, 0.18 mmol) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1, para obtener **117a** idéntico al descrito previamente. (*Condición 1*: Tiempo de reacción: 55 h, Rendimiento: 18.7 mg, 17%. *Condición 2*: Tiempo de reacción: 192 h, Rendimiento: 28.0 mg, 26%).

La reacción con la 23*E*-bencilidensarsasapogenina (**79b**) (100 mg, 0.18 mmol, tiempo de reacción: 384 h) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 99/1, para generar 49.0 mg (46%) de **117b** idéntico al descrito anteriormente.

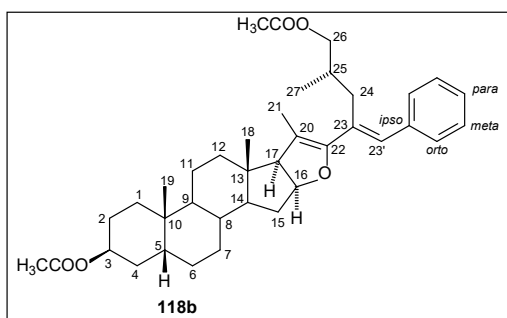
3.1.4.2. Apertura oxidativa de los 23*E*-bencilidenespirostanos.

*Procedimiento general para la acetólisis catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ de los 23*E*-bencilidenespirostanos.*
A una disolución de 23*E*-bencilidenespirostano (0.5 mmol) en CH_2Cl_2 (2.5 mL) y Ac_2O (3 mL), se le añadió $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.3 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 h (CCD hexano/acetato de etilo, 4/1). Al transcurrir este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua (40 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con agua (7 x 25 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó. El sólido obtenido se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (10 g) y se eluyó con sistema de disolvente hexano/acetato de etilo, 10/1, para obtener los 23*E*-benciliden-furostenos deseados.



La reacción con 23*E*-bencilidentigogenina (**79a**) (273.4 mg, 0.5 mmol) generó 255.2 mg (87%) de: **Diacetato de (25*R*,23*E*)-23-benciliden-5 α -furost-20(22)-en-3 β ,26-diol (118a)**. *Aceite*. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.32 (m, 2H, H-*orto*), 7.25(m, 3H H-*meta* y H-*para*), 6.68 (s, 1H, H-23'), 4.81 (ddd, $J=10.2$,

7.8, 5.6 Hz, 1H, H-16), 4.69 (tt, $J=11.3, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 3.85 (dt, $J=7.7, 3.6$ Hz, 2H, H-26), 2.58 (d, $J=10.2$ Hz, 1H, H-17), 2.51 (ddd, $J=14.2, 6.8, 1.3$ Hz, 1H, H-24a), 2.32 (dd, $J=13.9, 8.0$ Hz, 1H, H-24b), 2.20 (ddd, $J=12.3, 7.9, 5.9$ Hz, 1H, H-15a), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.95 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.81 (d, $J=0.9$ Hz, 3H, H-21), 0.86 (d, $J=8.4$ Hz, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-19), 0.75 (s, 3H, H-18). 0.70 (td, $J=11.3, 4.2$ Hz, 1H, H-9 α). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.13 C-11, 39.7 C-12, 44.2 C-13, 54.9 C-14, 34.2 C-15, 84.3 C-16, 65.3 C-17, 14.2 C-18, 12.9 C-19, 107.7 C-20, 13.1 C-21, 151.8 C-22, 132.1 C-23, 31.8 C-24, 31.7 C-25, 68.8 C-26, 16.9 C-27, 131.8 C-23', 137.2 *ipso*, 128.1 *orto*, 128.9 *meta*, 126.7 *para*, 20.3 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 171.1 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₅ 589.3896 (MH⁺) calculado 589.3893.



La reacción con 23*E*-bencilidensarsasapogenina (**79b**) (273.4 mg, 0.5 mmol) generó 239.2 mg (81%) de: **Diacetato de (25*S*,23*E*)-23-benciliden-5 β -furost-20(22)-en-3 β ,26-diol (**118b**)**. Aceite. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.45 – 7.11 (m, 5H, H-fenilo), 6.68 (s, 1H, H-23'), 5.07 (m, 1H, H-3), 4.81 (ddd, $J=10.3,$

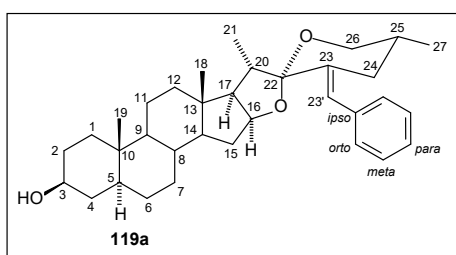
7.8, 5.6 Hz, 1H, H-16), 3.84 (d, $J=5.6$ Hz, 2H, H-26), 2.60 (d, $J=10.1$ Hz, 1H, H-15), 2.56 (m, 1H, H-24a), 2.30 (ddd, $J=13.8, 7.7, 1.1$ Hz, 1H, H-24b), 2.21 (ddd, $J=12.4, 7.9, 5.9$ Hz, 1H, H-15a), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.92 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.82 (s, 3H, H-21), 1.00 (s, 3H, H-19), 0.89 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, H-27), 0.76 (s, 3H, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 30.8 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.5 C-7, 35.1 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 21.0 C-11, 39.9 C-12, 44.4 C-13, 55.1 C-14, 34.2 C-15, 84.2 C-16, 65.3 C-17, 14.2 C-18, 23.8 C-19, 107.6 C-20, 13.1 C-21, 152.0 C-22, 132.0 C-23, 31.7 C-24, 31.7 C-25, 68.6 C-26, 16.9 C-27, 131.8 C-23', 137.2 *ipso*, 128.8 *orto*, 128.1 *meta*, 126.7 *para*, 20.7 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 171.2 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₅ 589.3893 (MH⁺) calculado 589.3893.

3.1.5. Saponificación de los 23*E*-bencilidenespirostanos.

Procedimiento general de la saponificación de los 23E-bencilidenespirostanos. A una disolución de 23*E*-bencilidenespirostanos (200 mg) en metanol (10 mL) y dioxano (5 mL) se le agregó KOH (600 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la materia prima se consumió

completamente. Los disolventes volátiles se evaporaron y el sólido producido se disolvió en acetato de etilo (50mL). La fase orgánica se lavó con agua (6 x 25 mL) y una disolución saturada de NaCl (2 x 25 mL), se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en una columna para producir los correspondientes bencilidenespirostanos.

La reacción con acetato de 23*E*-bencilidentigogenina (**79a**) (200 mg, 0.37 mmol, tiempo de reacción: 0.7 h), se purificó por una columna cromatográfica empacada con gel de sílice (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 6/1, para generar 183.9 mg (99%) de:

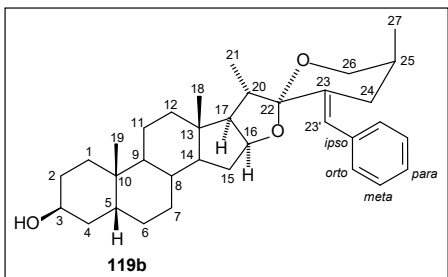


[23(23')*E*,25*R*]-23(23')-benciliden-5α-espirostan-3β-ol

(119a). P.f. 200.8 – 201.8 (*recristalizado de acetato de etilo*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.33 (dd, *J*=8.2, 7.0 Hz, 2H, H-*meta*), 7.26 – 7.20 (m, 3H, H-*orto* y H-*para*), 6.57 (d, *J*=2.2 Hz, 1H, H-23'), 4.43 (dt, *J*=9.0, 7.1 Hz, 1H, H-

16), 3.66 – 3.47 (m, 3H, H-3, H-26ax. y H-26eq.), 2.78 (ddd, *J*=13.3, 4.4, 1.5 Hz, 1H, H-24eq.), 2.60 (q, *J*=6.9 Hz, 1H, H-20), 2.10 (ddd, *J*=13.5, 11.7, 1.9 Hz, 1H, H-24ax.), 2.00 (ddd, *J*=12.2, 7.5, 5.2 Hz, 1H, H-15), 1.89 (dd, *J*=9.0, 7.1 Hz, 1H, H-17), 1.10 (d, *J*=6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, H-27), 0.67 (ddd, *J*=12.2, 10.3, 4.1 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.9 C-1; 31.5 C-2; 71.3 C-3, 38.2 C-4, 44.8 C-5, 28.6 C-6, 32.3 C-7, 35.0 C-8, 54.4 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.3 C-12, 40.8 C-13, 56.3 C-14, 31.6 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.4 C-19, 37.3 C-20, 14.8 C-21, 110.6 C-22; 137.1 C-23, 32.8 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 122.9 C-23', 137.1 *ipso*, 129.1 *orto*, 128.1 *meta*, 126.6 *para*. ESIMS *m/z* (%): 505 MH⁺ (9.3), 454 (42.8), 440 (22.3), 99 (14.3), 98 (11.5), 85 (100), 69 (15.9), 55 (12.1).

La reacción con acetato de 23*E*-bencilidensarsasapogenina (**79b**) (200 mg, 0.37 mmol, tiempo de reacción: 96 h), se purificó por una columna cromatográfica empacada con gel de sílice (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 6/1, para generar 153.8 mg (82%) de:

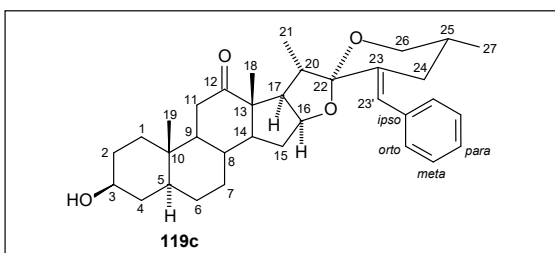


[23(23')E,25S]-23(23')-benciliden-5β-espirostan-3β-ol

(119b). P.f. 129.6 – 130.8 (*recristalizado de CH₂Cl₂/acetona*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.36 – 7.29 (m, 2H, H-*meta*), 7.23 (d, *J*=7.5 Hz, 3H, H-*orto* y H-*para*), 6.72 (s, 1H, H-23'), 4.47 (dt, *J*=8.9, 7.1 Hz, 1H, H-16), 4.15 – 4.09 (m, 1H, H-3), 4.05 (dd, *J*=11.0, 4.2 Hz, 1H, H-26ax.),

3.32 (dt, *J*=11.2, 1.7 Hz, 1H, H-26eq.), 2.72 (ddd, *J*=13.7, 5.8, 1.7 Hz, 1H, H-24eq.), 2.49 (p, *J*=6.9 Hz, 1H, H-20), 2.29 (dd, *J*=13.7, 5.2 Hz, 1H, H-24ax.), 1.11 (d, *J*=6.9 Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.99 (d, *J*=6.9 Hz, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 29.9 C-1; 27.8 C-2; 67.1 C-3, 33.5 C-4, 36.5 C-5, 26.5 C-6, 26.5 C-7, 35.2 C-8, 39.8 C-9, 35.3 C-10, 20.9 C-11, 40.4 C-12, 40.9 C-13, 56.4 C-14, 31.6 C-15, 81.0 C-16, 61.8 C-17, 16.7 C-18, 23.9 C-19, 39.7 C-20, 14.7 C-21, 111.5 C-22; 136.7 C-23, 30.8 C-24, 30.3 C-25, 65.1 C-26, 18.3 C-27, 125.0 C-23', 137.2 *ipso*, 129.0 *orto*, 128.0 *meta*, 126.5 *para*. ESIMS *m/z* (%): 505 MH⁺ (7.9), 454 (36.7), 440 (18.8), 99 (14.5), 98 (10.1), 85 (100), 69 (15.7), 55 (12.4).

La reacción con acetato de 23*E*-bencilidenhecogenina (**79c**) (200 mg, 0.36 mmol, tiempo de reacción: 2.4 h), se purificó por una columna cromatográfica empacada con gel de sílice (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 3/2, para generar 135.4 mg (73%) de:

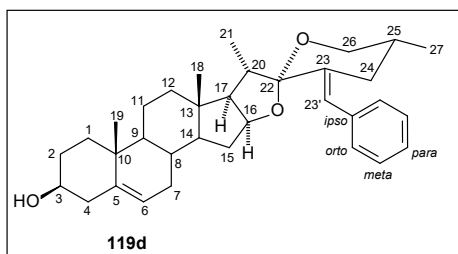


[23(23')E,25R]-23(23')-benciliden-3β-hidroxi-5α-espirostan-12-ona (119c). *Aceite*. RMN de ¹H

(400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.33 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, H-*meta*), 7.26 – 7.15 (m, 3H, H-*orto* y H-*para*), 6.55 (d, *J*=1.9 Hz, 1H, H-23'), 4.38 (dt, *J*=8.9, 6.8 Hz, 1H,

H-16), 3.69 – 3.51 (m, 1H, H-3), 2.79 (dd, *J*=13.4, 3.7 Hz, 1H, H-24eq.), 2.67 (dd, *J*=9.1, 7.0 Hz, 1H, H-17), 2.51 – 2.37 (m, 1H, H-20), 2.25 (dd, *J*=14.4, 5.0 Hz, 1H, H-11eq.), 2.12 – 2.05 (m, 1H, H-24ax.), 1.20 (d, *J*=6.9 Hz, 3H, H-21), 1.11 (s, 3H, H-18), 0.91 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.5 C-1; 31.2 C-2; 70.9 C-3, 37.8 C-4, 44.6 C-5, 28.3 C-6, 31.0 C-7, 34.2 C-8, 55.5 C-9, 36.1 C-10, 37.8 C-11, 213.4 C-12, 55.3 C-13, 55.7 C-14, 31.6 C-15, 78.8 C-16, 52.9 C-17, 16.2 C-18, 12.0 C-19, 37.8 C-20, 13.6 C-21, 110.6 C-22; 137.0 C-23, 32.9 C-24, 33.0 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 123.0 C-23', 137.0 *ipso*, 129.0 *orto*, 128.0 *meta*, 126.6 *para*. ESIMS *m/z*: 541 M⁺Na (<1), 454 (36.1), 440 (18.3), 99 (14.0), 85 (100.0), 69 (14.8), 55 (11.2).

La reacción con acetato de 23*E*-bencilidendiosgenina (**79d**) (200 mg, 0.37 mmol, tiempo de reacción: 4.0 h), se purificó por una columna cromatográfica empacada con gel de sílice (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 6/1, para generar 171.8 mg (92%) de:



[23(23')*E*,25*R*]-23(23')-benciliden-5α-espirost-5-en-3β-ol

(119d). P.f. 148.3 – 150.6 (*recristalizado de*

CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm:

7.36 – 7.30 (m, 2H, H-*meta*), 7.25 – 7.20 (m, 3H, H-*orto* y

H-*para*), 6.58 (s, 1H, H-23'), 5.35 (m, 1H, H-6), 4.46 (dt,

J=9.0, 7.0 Hz, 1H, H-16), 3.68 – 3.44 (m, 3H, H-3, H-26ax. y H-26eq.), 2.78 (dd, *J*=13.3, 3.5 Hz, 1H, H-

24eq.), 2.60 (p, *J*=7.0 Hz, 1H, H-20), 2.10 (ddd, *J*=13.5, 11.8, 2.0 Hz, 1H, H-24ax.), 1.11 (d, *J*=6.9 Hz,

3H, H-21), 1.03 (s, 3H, H-19), 0.86 (s, 3H, H-18), 0.80 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz,

CDCl₃) δ ppm: 37.2 C-1; 31.6 C-2; 71.7 C-3, 42.3 C-4, 140.8 C-5, 121.4 C-6, 32.1 C-7, 31.4 C-8, 50.1

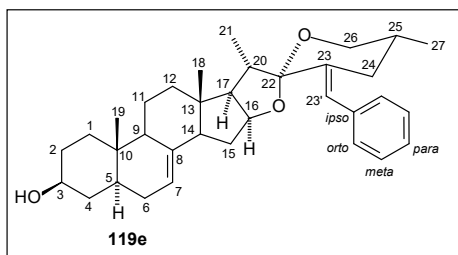
C-9, 36.7 C-10, 20.9 C-11, 40.0 C-12, 40.5 C-13, 56.5 C-14, 31.7 C-15, 80.4 C-16, 61.5 C-17, 16.5 C-

18, 19.4 C-19, 37.3 C-20, 14.9 C-21, 110.6 C-22; 137.1 C-23, 32.9 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-

27, 122.9 C-23', 137.1 *ipso*, 129.1 *orto*, 128.1 *meta*, 126.5 *para*. ESIMS *m/z*: 541 M⁺K (<1), 454

(39.8), 440 (25.9), 99 (15.1), 98 (17.0), 97 (13.7), 95 (10.6), 85 (100.0), 69 (15.7), 55 (12.1).

La reacción con acetato de 23*E*-benciliden-Δ⁷-tigogenina (**79e**) (200 mg, 0.37 mmol, tiempo de reacción: 0.5 h), se purificó por una columna cromatográfica empacada con gel de sílice (10 g) que se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 4/1, para generar 124.4 mg (67%) de:



[23(23')*E*,25*R*]-23(23')-benciliden-5α-espirost-7-en-3β-ol

(119e). Aceite. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.33

(t, *J*=7.6 Hz, 2H, H-*meta*), 7.25 – 7.20 (m, 3H, H-*orto* y H-

para), 6.57 (s, 1H, H-23'), 5.16 (m, 1H, H-7), 4.52 (m, 1H,

H-16), 3.68 – 3.43 (m, 2H, H-26ax. y H-26eq.), 2.79 (m, 1H,

H-24eq.), 2.58 (q, *J*=7.0 Hz, 1H, H-20), 1.12 (d, *J*=6.8 Hz, 3H, H-21), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J*=6.9

Hz, 3H, H-27), 0.72 (s, 3H, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 37.1 C-1; 31.4 C-2; 71.0 C-3,

37.9 C-4, 40.3 C-5, 29.6 C-6, 118.0 C-7, 138.5 C-8, 49.1 C-9, 34.3 C-10, 21.5 C-11, 39.6 C-12, 41.6 C-

13, 54.9 C-14, 31.0 C-15, 80.2 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 13.1 C-19, 37.8 C-20, 14.8 C-21, 110.6 C-

22; 137.1 C-23, 32.9 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 122.9 C-23', 137.0 *ipso*, 129.1 *orto*,

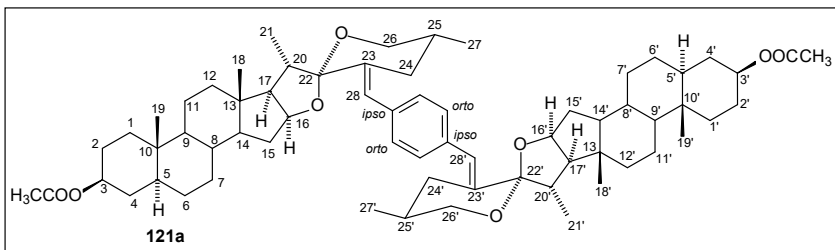
128.1 *meta*, 126.5 *para*. ESIMS m/z : 541 M^+K (<1), 454 (46.7), 440 (25.8), 99 (14.0), 85 (100), 69 (15.5), 55 (11.3).

3.2. Síntesis y estudio de la reactividad de los dímeros 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos.

3.2.1. Síntesis de los dímeros simétricos 1,4-dimetiliden-diespirostanos.

Procedimiento general para la síntesis de los dímeros simétricos 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos. A una disolución de sapogenina esteroidal acetilada (2 mmol) y tereftalaldehído (134.1 mg, 1 mmol) en CH_2Cl_2 (60 mL), se le agregó $BF_3 \cdot Et_2O$ (12 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la materia prima se consumió por completo (CCD). Al concluir, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo, se agitó hasta que el hielo se fundió y se extrajo con acetato de etilo (180 mL). La fase orgánica se lavó con agua (8 x 70 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 70 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y se evaporó a sequedad. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna para obtener los dímeros deseados.

Para la reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (917.4 mg, 2 mmol; CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2; tiempo de reacción 4 h), se llevó a cabo la purificación con una columna empacada con sílica gel (30 g), el crudo se fijó en 5 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 10/1, para generar 841.6 mg (83%) de:

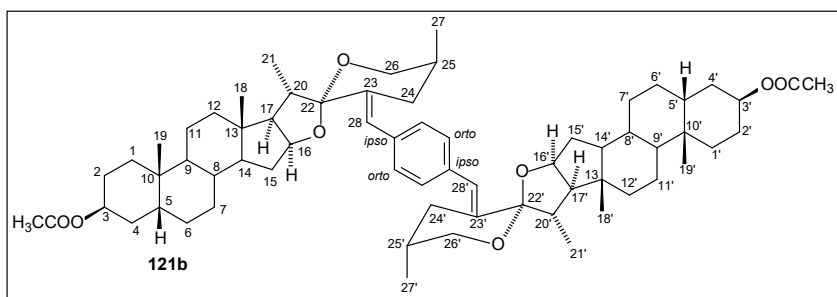


Diacetato de [23(28)*E*,23'(28')*E*,25*R*,25'*R*]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidenbencen-5 α ,5' α -diespirostan-3 β ,3' β -diol (121a): P.f. 286.6 – 289.4 °C (*recristalizado de hexano/acetate de etilo*).

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.20 (s, 4H, H-fenilo), 6.54 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H, H-28, H-28'), 4.68 (tt, $J = 10.9, 4.8$ Hz, 2H, H-3, H-3'), 4.43 (dt, $J = 9.1, 7.1$ Hz, 2H, H-16, H-16'), 3.56 (m, 4H H-26, H-26'), 2.82 (dd, $J = 13.3, 3.7$ Hz, 2H, H-24 eq.), 2.58 (p, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-20), 2.11 (dd, $J = 12.5, 12.5$ Hz, 2H, H-24 ax.), 1.09 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-21, H-21'), 0.84 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.82 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.80 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, H-27, H-27'), 0.68 (m, 2H, H-9, H-9'). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ

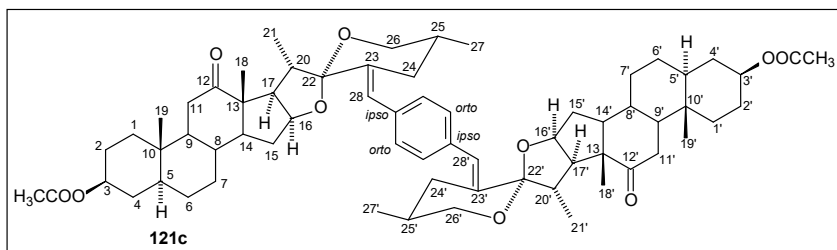
ppm: 36.7 C-1 C-1', 27.4 C-2 C-2', 73.6 C-3 C-3', 34.0 C-4 C-4', 44.6 C-5 C-5', 28.5 C-6 C-6', 32.2 C-7 C-7', 35.0 C-8 C-8', 54.2 C-9 C-9', 35.6 C-10 C-10', 21.0 C-11 C-11', 40.2 C-12 C-12', 40.8 C-13 C-13', 56.2 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 80.4 C-16 C-16', 61.6 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 12.3 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.8 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 33.0 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.0 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 *ipso*, 128.9 *orto*, 21.4 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo.

Para la reacción con acetato de sarsasapogenina (**64b**) (917.4 mg, 2 mmol; CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2; tiempo de reacción 2 h), se utilizaron 100 mL de CH₂Cl₂ para extraer la mezcla de reacción, en lugar de acetato de etilo. La purificación se llevó a cabo con una columna empacada con sílica gel (30 g), el crudo se fijó en 5 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 10/1, para retirar las impurezas menos polares y se continuó con CH₂Cl₂/acetato de etilo 20/1, para generar 702.1 mg (69%) de:



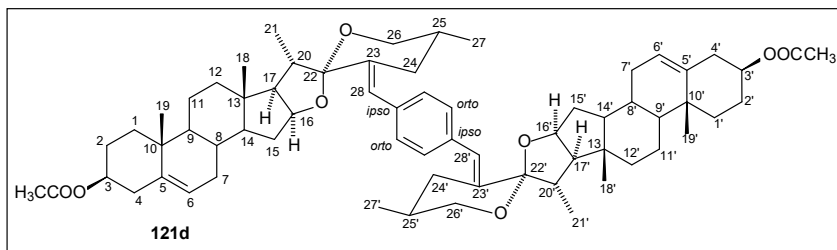
Diacetato de [23(28)E,23'(28')E,25S,25'S]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidenbencen-5β,5'β-diespirostan-3β,3'β-diol (121b): P.f. 281.3 – 282.2 °C (*sólido amorfo*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.19 (s, 4H, H-fenilo), 6.69 (s, 2H, H-28 H-28'), 5.07 (m, 2H, H-3 H-3'), 4.46 (dt, *J* = 8.6, 6.9 Hz, 2H, H-16 H-16'), 4.04 (dd, *J* = 11.0, 4.2 Hz, 2H, H-26' ax. H-26 ax.), 3.31 (dt, *J* = 10.9, 1.8 Hz, 2H, H-26 H-26' eq), 2.73 (ddd, *J* = 13.8, 5.6, 1.6 Hz, 2H, H-24 H-24' eq.), 2.48 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.31 (dd, *J* = 13.7, 5.3 Hz, 2H, H-24 ax. H-24' ax.), 2.04 (s, 6H, CH₃ acetilo), 1.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H H-27 H-27'), 0.99 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.84 (s, 6H, H-18 H-18'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1 C-1', 25.0 C-2 C-2', 70.7 C-3 C-3', 31.6 C-4 C-4', 37.3 C-5 C-5', 26.4 C-6 C-6', 26.4 C-7 C-7', 35.2 C-8 C-8', 40.0 C-9 C-9', 35.0 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 40.4 C-12 C-12', 40.9 C-13 C-13', 56.3 C-14 C-14', 30.7 C-15 C-15', 81.1 C-16 C-16', 61.8 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 23.8 C-19 C-19', 39.8 C-20 C-20', 18.3 C-21 C-21', 111.4 C-22 C-22', 136.8 C-23 C-23', 30.9 C-24 C-24', 30.3 C-25 C-25', 65.1 C-26 C-26', 14.7 C-27 C-27', 124.8 C-28 C-28', 135.4 *ipso*, 128.8 *orto*, 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo.

Para la reacción con acetato de hecogenina (**64c**) (945.3 mg, 2 mmol; CCD hexano/acetato de etilo, 4/1 x 2; tiempo de reacción 4 h), se llevó a cabo la purificación con una columna empacada con sílica gel (30 g), el crudo se fijó en 5 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 5/1, para generar 532.1 mg (52%) de:



Diacetato de [23(28)E,23'(28')E,25R,25'R]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidencen-3 β ,3' β -diacetoxi-5 α ,5' α -diespirostan-12,12'-diona (121c): P.f. 287.6 – 289.1 °C (*sólido amorfo*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.18 (s, 4H H-fenilo), 6.50 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, H-28 H-28'), 4.66 (tt, $J = 10.9, 4.9$ Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.37 (dt, $J = 8.9, 6.5$ Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.54 (m, 4H, H-26 H-26'), 2.81 (m, 2H, H-24 H-24' eq.), 2.65 (dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 2H, H-17 H-17'), 2.44 (m, 2H, H-20 H-20'), 2.39 (m, H-11 H-11' eq.) 2.24 (dd, $J = 14.4, 5.0$ Hz, 2H, H-11 H-11' ax.), 2.00 (s, 6H, CH_3 acetilo) 1.18 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-21 H-21'), 1.09 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.91 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.79 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-27 H-27'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.0 C-1 C-1', 27.2 C-2 C-2', 73.1 C-3 C-3', 33.7 C-4 C-4', 44.4 C-5 C-5', 28.1 C-6 C-6', 31.4 C-7 C-7', 34.2 C-8 C-8', 55.3 C-9 C-9', 36.2 C-10 C-10', 37.7 C-11 C-11', 213.2 C-12 C-12', 55.3 C-13 C-13', 55.5 C-14 C-14', 31.0 C-15 C-15', 78.8 C-16 C-16', 52.9 C-17 C-17', 16.1 C-18 C-18', 11.8 C-19 C-19', 37.8 C-20 C-20', 13.6 C-21 C-21', 110.5 C-22 C-22', 137.1 C-23 C-23', 33.0 C-24 C-24', 33.0 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.3 *ipso*, 128.9 *orto*, 21.3 CH_3 acetilo, 170.5 C=O acetilo.

La reacción con acetato de diosgenina (**64d**) se llevó a cabo con 1.4 g (3 mmol) y las cantidades de reactivos señaladas en el procedimiento general se ajustaron a esta cantidad de material de partida (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2; tiempo de reacción 3 h). Se purificó con una columna empacada con sílica gel (45 g), el crudo se fijó en 7.5 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 10/1, para generar 991.6 mg (65%) de:

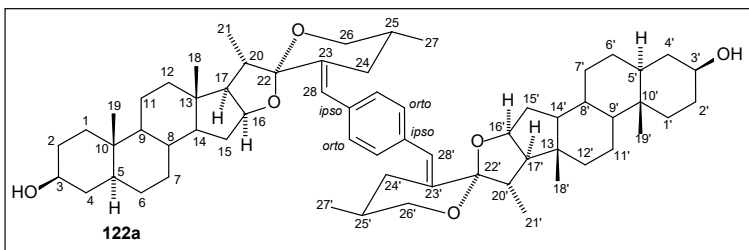


Diacetato de [23(28)*E*,23'(28')*E*,25*R*,25'*R*]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidenbencen-5,5'-dien-diespirostan-3 β ,3' β -diol (121d): P.f. 297.4 – 298.2 °C (*sólido amorfo*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.20 (s, 4H, H-fenilo), 6.55 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, H-28 H-28'), 5.37 (dd, $J = 4.6, 2.7$ Hz, 2H, H-6 H-6'), 4.60 (qd, $J = 10.7, 5.2$ Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.45 (dt, $J = 8.9, 7.1$ Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.55 (m, 4H, H-26 H-26'), 2.82 (dd, $J = 13.3, 3.9$ Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.59 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.12 (ddd, $J = 13.4, 11.6, 1.9$ Hz, 2H, H-24 H-24' eq.), 2.02 (s, 6H, CH_3 acetilo), 1.10 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-21 H-21'), 1.04 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.98 (dd, $J = 11.1, 5.4$ Hz, 1H, H-9 H-9'), 0.85 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-27 H-27'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.9 C-1 C-1', 27.7 C-2 C-2', 73.9 C-3 C-3', 38.1 C-4 C-4', 139.7 C-5 C-5', 122.3 C-6 C-6', 32.0 C-7 C-7', 31.3 C-8 C-8', 49.9 C-9 C-9', 36.7 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 39.9 C-12 C-12', 40.5 C-13 C-13', 56.4 C-14 C-14', 31.7 C-15 C-15', 80.4 C-16 C-16', 61.5 C-17 C-17', 16.5 C-18 C-18', 19.3 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.8 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 32.9 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.0 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 *ipso*, 128.9 *orto*, 21.4 CH_3 acetilo, 170.5 C=O acetilo.

3.2.1. Saponificación de los dímeros simétricos 1,4-dimetiliden-diespirostanos.

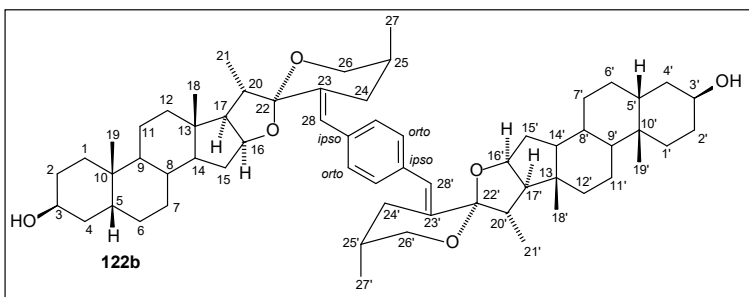
Procedimiento general para la saponificación de los dímeros simétricos 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos. A una disolución de dímero 1,4-dimetiliden-diespirostano (0.1 mmol) en CH_2Cl_2 (9 mL) y metanol (1 mL), se le agregó metóxido de sodio (54 mg, 1 mmol, 5 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la materia prima se consumió por completo (CCD, hexano/acetato de etilo, 1/1). Se evaporaron los disolventes volátiles y el sólido obtenido se filtró y se lavó con agua para generar los 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanoles deseados.

La reacción con 1,4-dimetilidenbencen-ditigogenina (**121a**) (101.5 mg, 0.1 mmol; tiempo de reacción 3.5 h), generó 93.3 mg (100%) de:



[23(28)*E*,23'(28')*E*,25*R*,25'*R*]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidenbencen-5 α ,5' α -diespirostan-3 β ,3' β -diol (122a**):** P.f. 272.5 – 274.3 °C (*sólido amorfo*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.20 (s, 4H, H-fenilo), 6.55 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H-28 H-28'), 4.43 (dt, $J = 9.0, 7.1$ Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.57 (m, 6H, H-3 H-3' and H-26 H-26'), 2.82 (dd, $J = 13.5, 4.5$ Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.58 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.12 (ddd, $J = 13.4, 11.6, 1.8$ Hz, 2H, H-24 H-24' eq.), 2.00 (ddd, $J = 12.2, 7.5, 5.2$ Hz, 2H H-15, H-15'), 1.89 (dd, $J = 8.9, 7.0$ Hz, 2H, H-17 H-17'), 1.09 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.82 (s, 12H, H-18 H-18' and H-19 H-19'), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-27 H-27'), 0.66 (td, $J = 11.1, 10.4, 4.0$ Hz, 2H, H-9 H-9'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.9 C-1 C-1', 31.5 C-2 C-2', 71.2 C-3 C-3', 38.2 C-4 C-4', 44.8 C-5 C-5', 28.6 C-6 C-6', 32.3 C-7 C-7', 35.0 C-8 C-8', 54.4 C-9 C-9', 35.6 C-10 C-10', 21.1 C-11 C-11', 40.3 C-12 C-12', 40.8 C-13 C-13', 56.3 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 80.5 C-16 C-16', 61.6 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 12.4 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.9 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 32.9 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 *ipso*, 128.9 *orto*.

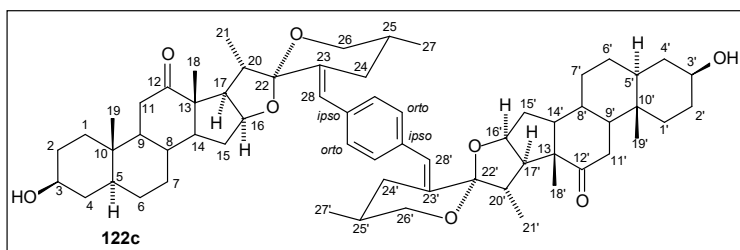
Para llevar a cabo la reacción con la 1,4-dimetilidenbencen-disarsasapogenina (**121b**) (101.5 mg, 0.1 mmol; tiempo de reacción 65 h) fue necesario utilizar 10 eq. de MeONa para generar 83.0 mg (89%) de:



[23(28)*E*,23'(28')*E*,25*S*,25'*S*]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidenbencen-5 β ,5' β -diespirostan-3 β ,3' β -diol (122b**):** P.f. 334.1 – 336.2 °C (*sólido amorfo*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.20 (s, 4H, H fenilo), 6.69 (s, 2H, H-28 H-28'), 4.46 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-16 H-16'), 4.11 (s, 2H, H-3 H-3'), 4.05 (dd, $J = 11.2, 4.2$ Hz, 2H, H-26 H-26' eq.), 3.32 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H H-26 H-26' ax.), 2.74 (dd, $J = 13.9,$

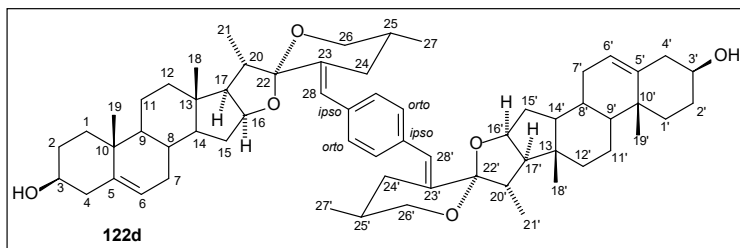
5.6 Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.48 (p, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.31 (dd, $J = 13.8, 5.3$ Hz, 2H, H-24 H-24 eq.), 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-27 H-27'), 0.99 (m, H-19 H-19' and H-21 H-21'), 0.85 (s, 6H, H-18 H-18'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 29.9 C-1 C-1', 27.8 C-2 C-2', 67.1 C-3 C-3', 33.5 C-4 C-4', 36.5 C-5 C-5', 26.6 C-6 C-6', 26.6 C-7 C-7', 35.2 C-8 C-8', 39.9 C-9 C-9', 35.2 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 40.5 C-12 C-12', 41.0 C-13 C-13', 56.5 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 81.1 C-16 C-16', 61.8 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 23.9 C-19 C-19', 39.8 C-20 C-20', 18.4 C-21 C-21', 111.5 C-22 C-22', 136.8 C-23 C-23', 31.0 C-24 C-24', 30.3 C-25 C-25', 65.1 C-26 C-26', 14.7 C-27 C-27', 124.8 C-28 C-28', 135.5 *ipso*, 128.8 *orto*.

La reacción con 1,4-dimetilidenbencen-dihecogenina (**121c**) (104.3 mg, 0.1 mmol; tiempo de reacción 3 h), generó 89.7 mg (94%) de:



[23(28)*E*,23'(28')*E*,25*R*,25'*R*]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidenbencen-3 β ,3' β -dihidroxi-5 α ,5' α -diespirostan-12,12'-diona (122c**):** P.f. 279.8 – 281.1 °C (*sólido amorfo*). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.19 (s, 4H, H fenilo), 6.52 (d, $J=1.8$ Hz, 2H, H-28 H-28'), 4.38 (dt, $J=8.8, 6.7$ Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.61 (dt, $J=10.4, 4.9$ Hz, 2H, H-3 H-3'), 3.56 (m, 4H, H-26 H-26' eq and H-26 H-26' ax.), 2.82 (dd, $J=13.3, 4.3$ Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.66 (dd, $J=9.0, 7.0$ Hz, 2H, H-17 H-17'), 2.45 (m, 4H, H-20 H-20'), 2.25 (dd, $J=14.4, 5.0$ Hz, 2H, H-11 H-11' ax.), 1.19 (d, $J=6.9$ Hz, 6H, H-21 H-21'), 1.10 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.91 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.80 (d, $J=6.5$ Hz, 6H, H-27 H-27'). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.5 C-1 C-1', 31.2 C-2 C-2', 70.9 C-3 C-3', 37.9 C-4 C-4', 44.6 C-5 C-5', 28.3 C-6 C-6', 31.6 C-7 C-7', 34.3 C-8 C-8', 55.7 C-9 C-9', 36.1 C-10 C-10', 37.8 C-11 C-11', 213.5 C-12 C-12', 55.3 C-13 C-13', 55.5 C-14 C-14', 31.0 C-15 C-15', 78.8 C-16 C-16', 52.9 C-17 C-17', 16.2 C-18 C-18', 12.0 C-19 C-19', 37.8 C-20 C-20', 13.6 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.1 C-23 C-23', 32.9 C-24 C-24', 33.0 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.7 C-28 C-28', 135.3 *ipso*, 128.9 *orto*.

La reacción con 1,4-dimetilidenbencen-ddiosgenina (**121d**) (101.1 mg, 0.1 mmol; tiempo de reacción 4.5 h), generó 85.0 mg (92%) de:



[23(28)*E*,23'(28')*E*,25*R*,25'*R*]-23(28),23'(28')-1,4-dimetilidenbencen-5,5'-dien-diespirostan-

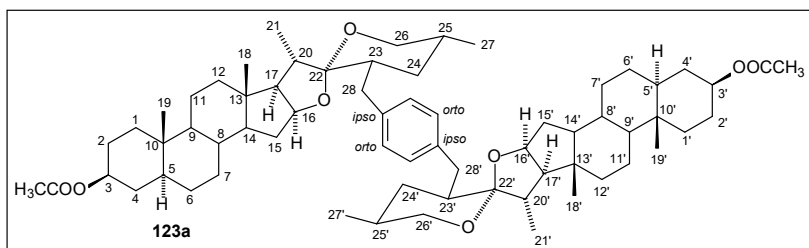
3β,3'β-diol (122d): P.f. 298.9 – 302.6 °C (*sólido amorfo*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.21 (s, 4H, H fenilo), 6.56 (d, *J*=1.8 Hz, 2H, H-28 h-28'), 5.35 (d, *J*=2.1 Hz, 2H, H-6 H-6'), 4.45 (dt, *J*=8.9, 7.1 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.54 (m, 6H, , H-3 H-3' and , H-26 H-26' ax. , H-26 H-26' eq.), 2.86 – 2.77 (m, 2H), 2.60 (p, *J*=6.9 Hz, 2H, , H-20 H-20'), 1.11 (d, *J*=6.9 Hz, 6H, , H-21 H-21'), 1.03 (s, 6H, , H-19 H-19'), 0.86 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.81 (d, *J*=6.6 Hz, 6H, , H-27 H-27'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 37.2 C-1 C-1', 31.6 C-2 C-2', 71.7 C-3 C-3', 42.3 C-4 C-4', 140.8 C-5 C-5', 121.3 C-6 C-6', 32.1 C-7 C-7', 31.4 C-8 C-8', 50.1 C-9 C-9', 36.7 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 40.0 C-12 C-12', 40.5 C-13 C-13', 56.5 C-14 C-14', 31.7 C-15 C-15', 80.4 C-16 C-16', 61.5 C-17 C-17', 16.5 C-18 C-18', 19.4 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.8 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 33.0 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 *ipso*, 128.9 *orto*.

3.2.3. Estudio de las reducciones de los dímeros 1,4-dimetiliden-diespirostanos.

3.2.3.1. Reducción con NaBH₃CN en ácido acético.

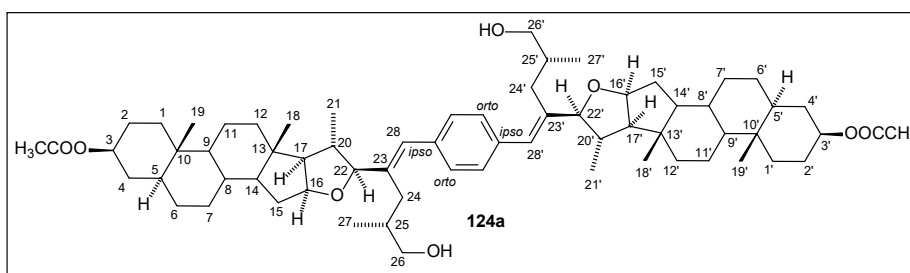
Procedimiento general para la reducción con NaBH₃CN en ácido acético de los dímeros 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos. A una disolución de diacetato de 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos (0.1 mmol) en ácido acético (2 mL) y CH₂Cl₂ (2 ml), se le añadió NaBH₃CN (18.9 mg, 0.3 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos (CCD, hexano/acetato de etilo, 4/1 x 2). Al concluir, la mezcla de reacción se vertió sobre agua (15 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3x10 mL). La fase orgánica se lavó con agua (5x10 mL) y con disolución saturada de NaCl (3x10 mL), se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó. El aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel (9 g), el crudo se fijó en sílica (0.5 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 10/1, hasta obtener los primeros dos productos y se continuó con sistema hexano/acetato de etilo, 4/1 para generar los correspondientes dímeros reducidos.

La reducción del diacetato de 1,4-dimetilidenbencen-ditigogenina (**121a**) (101.5 mg, 0.1 mmol) generó:



Dímero 123a. Rendimiento: 10.2 mg (10%). P.f. 263.9 – 265.8 °C (*sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/acetato de etilo*).

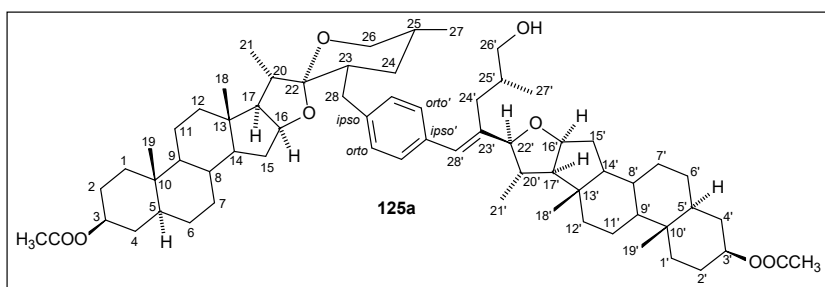
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.06 (s, 4H, H-fenilo), 4.68 (tt, *J*=11.0, 4.9 Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.40 (dt, *J*=9.0, 7.2 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.43 (ddd, *J*=11.0, 4.8, 1.9 Hz, 2H, H-26 eq. H-26' eq.), 3.29 (dd, *J*=11.1, 11.1 Hz, 2H, H-26 ax. H-26' ax.), 2.94 (dd, *J*=13.8, 3.4 Hz, 2H, H-28a H-28a'), 2.37 (m, 2H, H-20b H-20b'), 2.31 (m, 2H, H-28b H-28b'), 2.02 (s, 6H, CH₃ acetilo), 0.98 (d, *J*=6.8 Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.83 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.79 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.71 (d, *J*=6.6 Hz, 6H, H-27 H-27'), 0.68 – 0.63 (m, 2H, H-9 H-9'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1 C-1', 27.5 C-2 C-2', 73.7 C-3 C-3', 34.0 C-4 C-4', 44.6 C-5 C-5', 28.5 C-6 C-6', 32.2 C-7 C-7', 35.0 C-8 C-8', 54.2 C-9 C-9', 35.6 C-10 C-10', 21.0 C-11 C-11', 40.1 C-12 C-12', 41.1 C-13 C-13', 56.1 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 80.8 C-16 C-16', 61.6 C-17 C-17', 16.8 C-18 C-18', 12.3 C-19 C-19', 36.9 C-20 C-20', 14.4 C-21 C-21', 111.3 C-22 C-22', 40.3 C-23 C-23', 34.4 C-24 C-24', 30.8 C-25 C-25', 66.0 C-26 C-26', 17.0 C-27 C-27', 36.8 C-28 C-28', 138.3 *ipso*, 129.0 *orto*, 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₆₆H₉₉O₈ 1019.7165 (MH⁺), calculado 1019.7340.



Dímero 124a. Rendimiento: 34.9 mg (34%). P.f. 188.9 – 190.2 °C (*sólido amorfo recristalizado de*

CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.28 (s, 4H H-fenilo), 6.41 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, H-28 H-28'), 4.68 (tt, *J* = 11.4, 4.9 Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.39 (ddd, *J* = 9.0, 7.6, 5.7 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.86 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H-22 H-22'), 3.55 (dd, *J* = 11.6, 3.0 Hz, 2H, H-26a H-26a'), 3.18 (dd, *J* = 11.6, 3.9 Hz, 2H, H-26b H-26b'), 2.53 (ddd, *J* = 14.4, 4.3, 1.9 Hz, 2H, H-24a H-24a'), 2.20 (dd, *J* = 14.4, 10.9 Hz, 2H, H-24b H-24b'), 2.01 (s, 6H, CH₃ acetilo), 1.00 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.90 (s, 6H, H-

18 H-18'), 0.89 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H, H-27 H-27'), 0.83 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.66 (ddd, $J = 12.3, 10.3, 4.1$ Hz, 2H, H-9 H-9'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1 C-1', 27.4 C-2 C-2', 73.6 C-3 C-3', 34.0 C-4 C-4', 44.7 C-5 C-5', 28.4 C-6 C-6', 32.1 C-7 C-7', 35.0 C-8 C-8', 54.1 C-9 C-9', 35.6 C-10 C-10', 20.8 C-11 C-11', 39.7 C-12 C-12', 41.5 C-13 C-13', 56.7 C-14 C-14', 31.9 C-15 C-15', 83.6 C-16 C-16', 63.8 C-17 C-17', 17.0 C-18 C-18', 12.2 C-19 C-19', 37.0 C-20 C-20', 17.7 C-21 C-21', 97.2 C-22 C-22', 139.2 C-23 C-23', 30.0 C-24 C-24', 34.3 C-25 C-25', 65.4 C-26 C-26', 18.2 C-27 C-27', 128.4 C-28 C-28', 135.9 *ipso*, 128.6 *orto*, 21.5 CH_3 acetilo, 170.7 C=O acetilo.

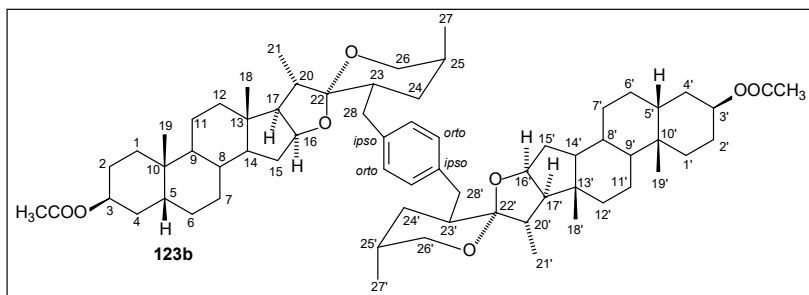


Dímero 125a.

Rendimiento: 32.5 mg (32%). P.f. 159.3 – 160.1 °C (sólido amorfo *recristalizado de* CH_2Cl_2 /hexano).

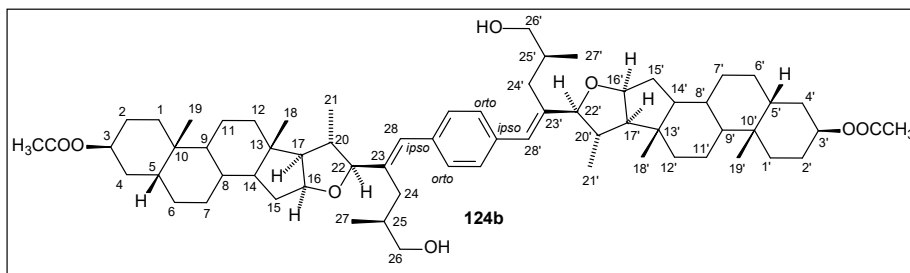
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.25 (d, $J=8.1$ Hz, 2H *orto'*), 7.10 (d, $J=8.0$ Hz, 2H *orto*), 4.68 (m, 2H H-3 H-3'), 4.40 (tdd, $J=7.8, 6.4, 4.8$ Hz, 2H H-16 H-16'), 3.86 (d, $J=9.2$ Hz, 1H H-22'), 3.57 (dd, $J=11.6, 3.0$ Hz, 1H, H-26'a), 3.43 (ddd, $J=11.0, 4.7, 1.9$ Hz, 1H, H-26eq.), 3.29 (dd, $J=11.1, 11.1$ Hz, 1H, H-26ax.), 3.19 (dd, $J=11.6, 3.8$ Hz, 1H, H-26'b), 2.94 (dd, $J=13.8, 3.4$ Hz, 1H, H-28a), 2.54 (ddd, $J=14.2, 4.4, 2.0$ Hz, 1H, H-24'a), 2.33 (m, 2H, H-20 y H-28b), 2.19 (dd, $J=14.4, 10.9$ Hz, 1H, H-24'b), 2.02 (d, $J=1.3$ Hz, 6H 2x CH_3 acetilo), 1.00 (d, $J=7.0$ Hz, 3H, H-21'), 0.98 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, H-21), 0.90 (m, 6H, H-18' H-27'), 0.84 (d, $J=1.7$ Hz, 6H, H-19 H-19'), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.71 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.7 C-3, 34.0 C-4, 44.7 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 31.6 C-15, 80.8 C-16, 61.6 C-17, 16.8 C-18, 12.3 C-19, 36.9 C-20, 14.4 C-21, 111.3 C-22, 40.2 C-23, 34.5 C-24, 30.8 C-25, 66.0 C-26, 17.0 C-27, 36.8 C-28, 139.6 *ipso*, 129.1 *orto*, 36.7 C-1', 27.4 C-2', 73.6 C-3', 34.0 C-4', 44.6 C-5', 28.4 C-6', 32.1 C-7', 35.0 C-8', 54.1 C-9', 35.6 C-10', 20.9 C-11', 39.8 C-12', 41.5 C-13', 56.7 C-14', 31.8 C-15', 83.6 C-16', 63.8 C-17', 17.0 C-18', 12.2 C-19', 36.9 C-20', 17.7 C-21', 97.4 C-22', 138.3 C-23', 30.0 C-24', 34.2 C-25', 65.4 C-26', 18.3 C-27', 128.8 C-28', 135.0 *ipso'*, 128.6 *orto'*, 21.4 CH_3 acetilo, 170.7 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{66}\text{H}_{99}\text{O}_8$ 1019.6936 (MH^+), calculado 1019.7340.

La reducción del diacetato de 1,4-dimetilidenbencen-disarsasapogenina (**121b**) (203.0 mg, 0.2 mmol, procedimiento general ajustado para 0.2 mmol) generó:



Dímero 123b. Rendimiento: 11.0 mg (5%). P.f. 275.9 – 277.2 °C (*Sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/acetato de etilo.* RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)

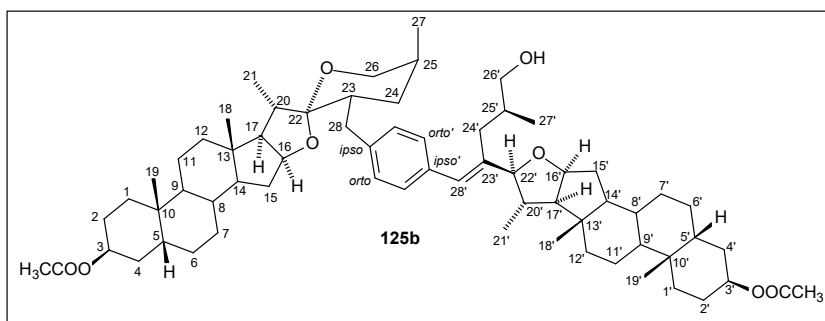
δ ppm: 7.04 (s, 4H, H-fenilo), 5.07 (t, *J* = 2.9 Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.42 (dt, *J* = 8.8, 7.0 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.88 (dd, *J* = 10.9, 2.6 Hz, 2H, H-26eq. H-26'eq), 3.25 (dd, *J* = 11.7 Hz, 2H, H-26eq. H-26'eq), 2.93 (dd, *J* = 13.9, 3.6 Hz, 2H, H-28a, H-28'a), 2.40 – 2.22 (m, 4H, H-20 H-20' y H-28b H-28'b), 2.04 (s, 6H, CH₃ acetilo), 1.01 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.98 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 6H, H-27 H-27'), 0.79 (s, 6H, H-18 H-18'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.7 C-1 C-1', 25.0 C-2 C-2', 70.7 C-3 C-3', 30.6 C-4 C-4', 37.3 C-5 C-5', 26.4 C-6 C-6', 26.5 C-7 C-7', 35.2 C-8 C-8', 40.0 C-9 C-9', 35.0 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 40.3 C-12 C-12', 41.1 C-13 C-13', 56.3 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 81.0 C-16 C-16', 61.5 C-17 C-17', 16.8 C-18 C-18', 23.9 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.2 C-21 C-21', 111.9 C-22 C-22', 34.6 C-23 C-23', 31.9 C-24 C-24', 28.1 C-25 C-25', 64.3 C-26 C-26', 16.6 C-27 C-27', 36.7 C-28 C-28', 138.3 *ipso*, 128.8 *orto*, 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo.



Dímero 124b. Rendimiento 104.1 mg (51%). P.f. 197.8 – 200.3 °C (*Sólido amorfo recristalizado de*

CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.23 (s, 4H, H-fenilo), 6.59 (s, 2H, H-28 H-28'), 5.06 (q, *J* = 2.8 Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.36 (td, *J* = 7.8, 5.3 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-22 H-22'), 3.33 – 3.23 (m, 4H, H-26a H-26'a y H-26b H-26'b), 2.48 (dd, *J* = 13.9, 8.0 Hz, 2H, H-24a H-24'a), 2.18 (dd, *J* = 13.9, 6.5 Hz, 2H, H-24b H-24'b), 2.04 (s, 6H, CH₃ acetilo), 1.06 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.98 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.86 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, H-27 H-27'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.7 C-1 C-1', 25.0 C-2 C-2', 70.7 C-3 C-3', 30.6 C-4 C-

4', 37.3 C-5 C-5', 26.3 C-6 C-6', 26.3 C-7 C-7', 35.3 C-8 C-8', 39.9 C-9 C-9', 35.0 C-10 C-10', 20.7 C-11 C-11', 39.9 C-12 C-12', 41.4 C-13 C-13', 56.9 C-14 C-14', 32.0 C-15 C-15', 83.3 C-16 C-16', 64.6 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 23.8 C-19 C-19', 37.1 C-20 C-20', 18.7 C-21 C-21', 94.8 C-22 C-22', 139.6 C-23 C-23', 30.8 C-24 C-24', 35.0 C-25 C-25', 66.9 C-26 C-26', 17.3 C-27 C-27', 127.5 C-28 C-28', 136.3 *ipso*, 128.7 *orto*, 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo.



Dímero 125b.

Rendimiento: 59.8 mg (29%). P.f. 197.1 – 198.4 °C (Sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/hexano).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-*orto'*), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-*orto*), 6.60 (s, 1H, H-28'), 5.07 (t, *J* = 2.9 Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.39 (dtd, *J* = 16.2, 8.4, 7.8, 6.1 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.94 – 3.84 (m, 2H, H-26eq. y H-22'), 3.32 (qd, *J* = 11.0, 5.1 Hz, 2H, H-26'a y H-26'b), 3.27 – 3.23 (m, 1H, H-26ax.), 2.94 (dd, *J* = 13.9, 3.6 Hz, 1H, H-28a), 2.43 (dd, *J* = 13.9, 8.4 Hz, 1H, H-24a), 2.37 – 2.23 (m, 3H, H-20, H-24b, H-28b), 2.17 – 2.06 (m, 2H, H-23 y H-20'), 1.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H-21'), 1.01 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.98 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.96 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-27), 0.87 (s, 3H, H-18'), 0.80 – 0.77 (m, 6H, H-18 y H-27'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.8 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 30.6 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.4 C-7, 35.2 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.1 C-13, 56.3 C-14, 31.5 C-15, 81.0 C-16, 61.5 C-17, 16.8 C-18, 23.8 C-19, 37.3 C-20, 14.2 C-21, 111.8 C-22, 34.6 C-23, 31.3 C-24, 28.0 C-25, 64.3 C-26, 16.6 C-27, 36.8 C-28, 139.3 *ipso*, 128.9 *orto*, 30.7 C-1', 25.0 C-2', 70.7 C-3', 30.6 C-4', 37.3 C-5', 26.4 C-6', 36.4 C-7', 35.4 C-8', 40.0 C-9', 35.0 C-10', 20.7 C-11', 39.9 C-12', 41.4 C-13', 56.9 C-14', 32.1 C-15', 83.3 C-16', 64.7 C-17', 16.7 C-18', 23.8 C-19', 37.1 C-20', 18.8 C-21', 94.7 C-22', 138.7 C-23', 31.8 C-24', 35.0 C-25', 67.0 C-26', 17.4 C-27', 127.8 C-28', 135.3 *ipso'*, 128.7 *orto'*, 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₆₆H₉₉O₈ 1019.7395 (MH⁺), calculado 1019.7340.

3.2.3.2. Hidrogenación catalítica.

Procedimiento general para la reducción catalítica de los dímeros 1,4-dimetilidenbencendiespirostanos. A una disolución purgada con vacío de diacetato de 1,4-dimetilidenbencendiespiroetano (0.3 mmol) en CH_2Cl_2 (12 mL) y etanol (21.2 mL), se le agregó paladio sobre carbono (10% p/p). La mezcla se purgó nuevamente y se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de H_2 hasta que la materia prima se consumió por completo (24 h. CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Al terminar la reacción, la mezcla se filtró sobre sílica gel, el lecho se lavó con acetato de etilo y el filtrado se evaporó al vacío. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel (20 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 15/1 para generar el dímero reducido deseado.

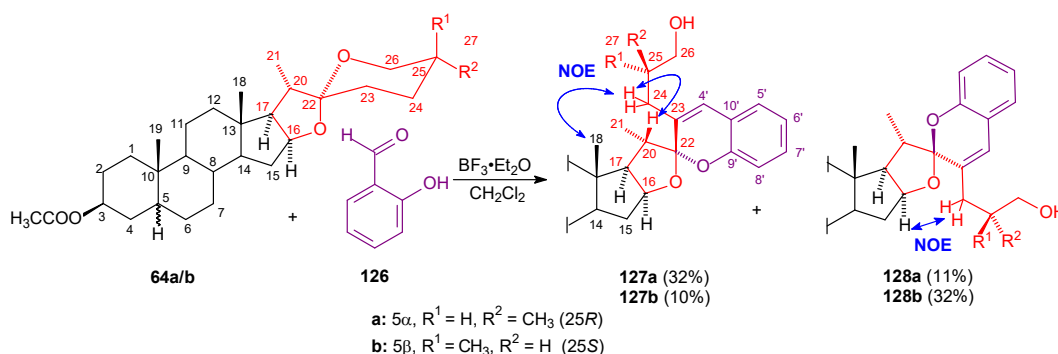
La reacción con el diacetato de 1,4-dimetilidenbencenditigogenina (**121a**) (304.6 mg, 0.3 mmol) generó 251.6 mg (82.3%) del espiroetano dímérico 1,4-dimetil-bencil **123a** idéntico al descrito anteriormente.

Capítulo 4. Síntesis de los espirocromenos derivados de sapogeninas esteroidales.

Con el antecedente de la reacción de condensación aldólica catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ entre sapogeninas esteroidales y el benzaldehído, se exploró el desarrollo de esta reacción al utilizar como materia prima al 2-hidroxibenzaldehído, con el fin de estudiar si bajo las mismas condiciones de reacción se favorecía el cierre del anillo por parte del fenol en lugar del grupo hidroxilo de C-26 de la sapogenina, para generar derivados con un heterociclo aromático unido a la cadena lateral y analizar la influencia de este nuevo fragmento en el perfil de reactividad y en la potencial actividad biológica de los derivados a obtener.

4.1. Productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2-hidroxibenzaldehído.

El tratamiento de una disolución de acetato de tigogenina (**64a**) en CH_2Cl_2 con dos equivalentes de 2'-hidroxibenzaldehído (**126**) y un exceso de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (48 mmol), generó una mezcla de los compuestos epiméricos **127a** y **128a** (32% y 11%, respectivamente) que fueron denominados como 22*R* y 22*S*-espirocromenos respectivamente, junto con pequeñas cantidades de subproductos no identificados y materia prima sin reaccionar. Una extensión de esta metodología con el acetato de sarsasapogenina (**64b**) produjo los esperados espirocromenos diastereoméricos **127b** y **128b** (10% y 32%, respectivamente) (Esquema 37).



Esquema 37. Condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales (**64**) y salicilaldehído (**126**).

La configuración en C-22 de los compuestos obtenidos puede ser corroborada con la ayuda de experimentos NOESY. En los derivados de la serie 22*R* se observan efectos **NOE** entre H-18 \leftrightarrow H-24 y H-24 \leftrightarrow H-20 que indican que el fragmento alifático que incluye átomos de C-23 a C-27 está situado en la cara β del anillo E, lo cual sólo es posible cuando el oxígeno del cromeno se encuentra orientado hacia la cara α del esteroide. Por el contrario, el efecto **NOE** en los epímeros

22S se observa entre H-16 \leftrightarrow H-24 e indica que el fragmento alifático está situado por debajo de la molécula y la orientación del oxígeno del cromeno es β (**Esquema 37**).

En los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C de los espirocromenos se pueden observar claras diferencias entre los isómeros 22R y 22S. Una de las más importantes que se puede mencionar es el desplazamiento químico de C-22, pues en los derivados de la 22R tiene un valor de 113.5 ppm, mientras para la serie 22S, C-22 aparece en 112.8 ppm. También, se puede notar una diferencia en C-24 pues mientras en la serie 22R aparece en 35.1 ppm, en la serie 22S presenta un desplazamiento de 36.8 ppm, esto debe ser consecuencia de la cercanía con el oxígeno de C-16 que provoca la desprotección de este carbono. Además, un efecto similar se observa en C-26, el cual se encuentra con un mayor corrimiento en la serie 22S (67.5 ppm) en comparación con la serie 22R (66.9 ppm). En las **tablas 21 y 22** se encuentran recopilados los desplazamientos químicos de las señales de ^1H y ^{13}C , respectivamente, correspondientes a las cadenas laterales de los derivados 22R y 22S-espirocromenos obtenidos.

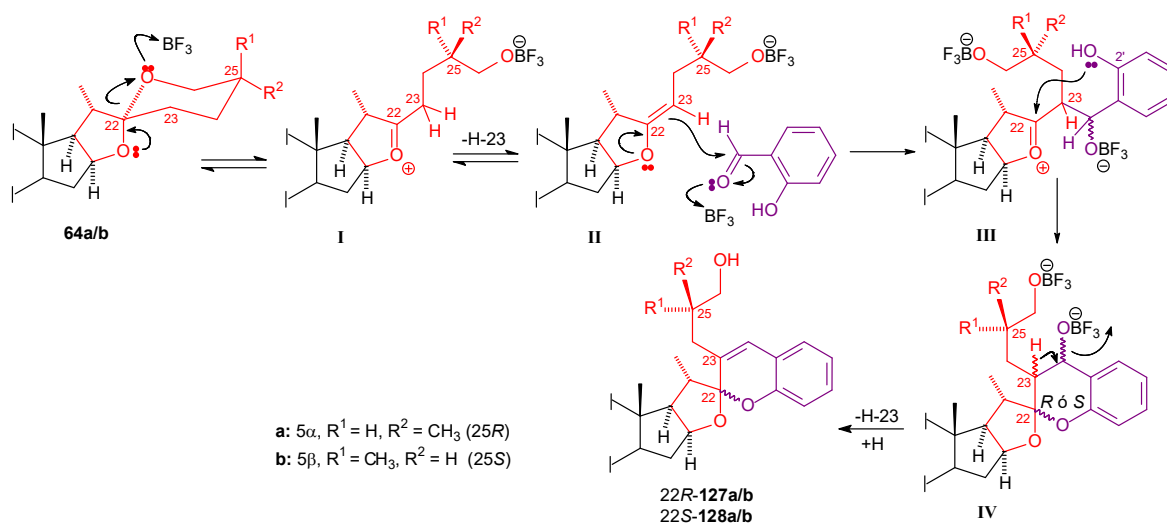
Tabla 21. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los espirocromenos derivados de sapogeninas esteroideas.

H	Serie 22R		Serie 22S		$\Delta_{\delta_{127a}-\delta_{128a}}$	$\Delta_{\delta_{127b}-\delta_{128b}}$
	127a	127b	128a	128b		
16	4.72 (m)	4.73 (ddd)	4.68 (m)	4.68 (ddd)	+0.04	+0.05
18	0.89 (s)	0.89 (s)	0.88 (s)	0.89 (s)	+0.01	0.00
20	2.53 (p)	2.54 (p)	2.56 (p)	2.57 (p)	-0.03	-0.03
21	1.02 (d)	1.03 (d)	1.06 (d)	1.06 (d)	-0.04	-0.03
24a	2.36 (dd)	2.36 (dd)	2.34 (dd)	2.35 (ddd)	+0.02	+0.01
24b	2.10 (m)	2.11 (m)	2.14 (m)	2.14 (m)	-0.04	-0.03
26a	3.63 (dd)	3.62 (dd)	3.58 (dd)	3.57 (dd)	+0.05	+0.05
26b	3.45 (dd)	3.45 (dd)	3.51 (dd)	3.51 (dd)	-0.06	-0.06
27	1.00 (d)	0.99 (d)	0.99 (d)	0.99 (d)	+0.01	0.00
4'	6.47 (s)	6.47 (s)	6.48 (s)	6.48 (s)	-0.01	-0.01
5'	7.02 (dd)	7.02 (dd)	7.05 (dd)	7.06 (dd)	-0.03	-0.04
6'	6.87 (dd)	6.87 (ddd)	6.88 (m)	6.90 (m)	-0.01	-0.03
7'	7.11 (ddd)	7.13 (m)	7.12 (td)	7.13 (m)	-0.01	0.00
8'	6.87 (dd)	6.87 (ddd)	6.88 (m)	6.90 (m)	-0.01	-0.03

Tabla 22. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los espirocromenos derivados de sapogeninas esteroidales.

C	Serie 22R		Serie 22S		$\Delta_{\delta 127a-6128a}$	$\Delta_{\delta 127b-6128b}$
	127a	127b	128a	128b		
16	82.6	82.6	82.4	82.4	+0.2	+0.2
17	60.5	60.6	60.7	60.8	-0.2	-0.2
18	16.7	16.7	16.6	16.6	+0.1	+0.1
20	40.3	40.3	39.5	39.4	+0.8	+0.9
21	14.7	14.7	14.8	14.8	-0.1	-0.1
22	113.6	113.5	112.8	112.8	+0.8	+0.7
23	130.9	130.9	130.8	130.8	+0.1	+0.1
24	35.1	35.1	36.8	36.8	-1.7	-1.7
25	34.8	35.7	35.1	35.1	-0.3	+0.6
26	66.9	66.9	67.5	67.5	-0.6	-0.6
27	17.1	17.1	17.4	17.4	-0.3	-0.3
4'	125.4	125.4	125.9	125.8	-0.5	-0.4
5'	126.0	126.0	126.1	126.1	-0.1	-0.1
6'	120.9	120.9	121.1	121.1	-0.2	-0.2
7'	128.4	128.4	128.4	128.4	0	0
8'	115.4	115.5	115.8	115.8	-0.4	-0.3
9'	151.4	151.3	151.2	151.2	+0.2	+0.1
10'	120.8	120.8	121.2	121.2	-0.4	-0.4

La obtención de los espirocromenos puede justificarse a través de un mecanismo que inicia con la apertura del anillo F catalizada por el $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, para producir el éter de enol **II** que reacciona con el aldehído para producir el intermedio **III**. El cierre del anillo se lleva a cabo a través del grupo hidroxilo fenólico en la posición C-2' del anillo aromático y posteriormente una reacción de eliminación genera los espirocromenos observados (**Esquema 38**).

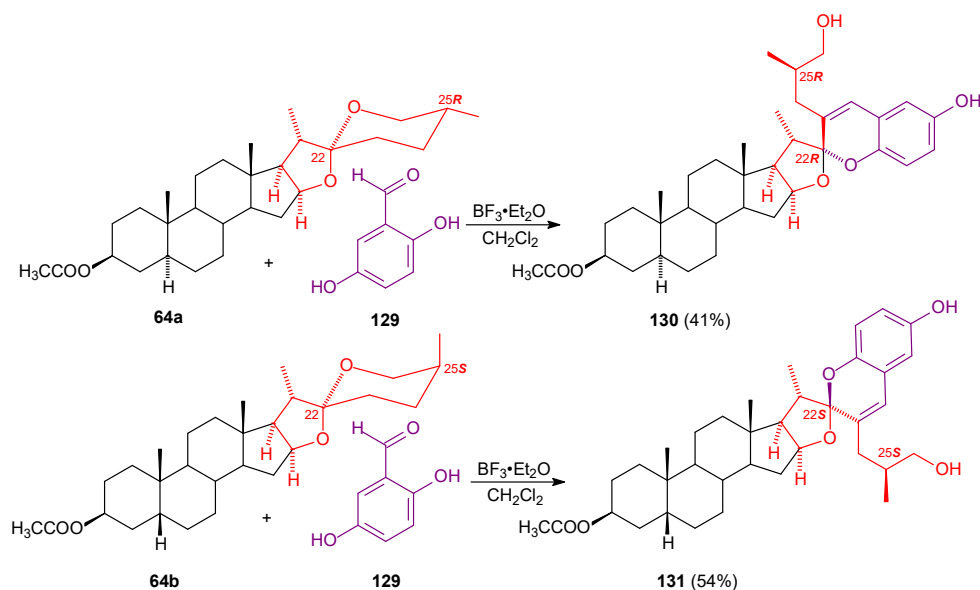


Esquema 38. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los espirocromenos **127** y **128**.

Sorprendentemente, la distribución de los productos en cada reacción muestra una clara dependencia a la configuración en C-25. Mientras que el acetato de tigogenina (**64a**), perteneciente a la serie 25*R*, da lugar al 22*R*-espirocromeno como el producto principal, en el caso de la 25*S*-sapogenina **64b**, el compuesto predominante es el epímero 22*S*. Aunque hasta el momento no hay una explicación para este fenómeno, se puede suponer que la orientación de C-27 tiene un papel importante en la forma que interaccionan el 2-hidroxibenzaldehído y el intermediario **II** (**Esquema 38**), influyendo directamente en la configuración de los nuevos centros quirales formados en los intermediarios **III** y **IV**. Dicho efecto está estrechamente relacionado con la configuración de los productos obtenidos.

4.2. Productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2,5-hidroxibenzaldehído.

Como una extensión de la metodología descrita previamente, se realizó el tratamiento de las sapogeninas acetiladas **64a** (25*R*) y **64b** (25*S*) con el 2,5-dihidroxibenzaldehído (**129**), obteniéndose para la sapogenina de la serie 25*R* únicamente el 22*R*-espirocromeno **130** (41%) y para la serie 25*S* solo se obtuvo el epímero 22*S*-**130** (54%) (**Esquema 39**). La configuración en C-22, en ambos compuestos, fue corroborada en experimentos NOESY tal como se describe en el **Esquema 37**.



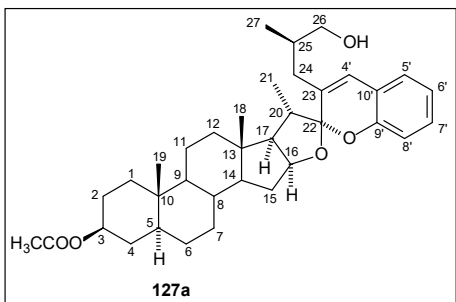
Esquema 39. Condensación aldólica entre las sapogeninas esteroidales **64a** y **64b** y 2,5-dihidroxibenzaldehído (**129**).

Parte experimental

4.1. Productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2-hidroxibenzaldehído.

Procedimiento general de síntesis de los espirocromenos. A una disolución sapogenina esteroideal acetilada (1 mmol) y el aldehído (2 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL) se le adicionó BF₃•Et₂O (6 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumió la materia prima (24 hrs, CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 3). Al concluir la reacción, la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con agua (10 x 15 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 15 mL), se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó. El aceite producido se purificó por cromatografía en una columna empacada con sílica gel para obtener los correspondientes espirocromenos.

La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 2-hidroxibenzaldehído (**126**) (244.2 mg, 2 mmol) generó una mezcla de los compuestos **127a** y **128a** que se separó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (54 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo aumentando lenta y gradualmente la polaridad, desde 95/5 hasta 8/1 para obtener:

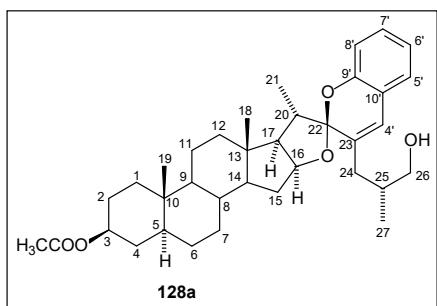


3-monoacetato de (22R,25R)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro[cromen]-5α-colestan-3β,26-diol (127a). Rendimiento

168.8 mg (32%). Aceite amarillento. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.11 (ddd, *J* = 8.0, 7.3, 1.7 Hz, 1H, H-7'), 7.02 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H-5'), 6.87 (dd, *J* = 7.5, 6.8 Hz, 2H, H-6' y H-8'), 6.47 (s, 1H, H-4'), 4.83 – 4.60 (m, 2H, H-3

and H-16), 3.63 (dd, *J* = 10.9, 4.6 Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, *J* = 10.9, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.53 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.36 (dd, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H, H-24a), 2.14 – 2.06 (m, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.02 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 1.00 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-27), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.70 (ddd, *J* = 12.2, 10.4, 4.3 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 35.8 C-8, 54.1 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.6 C-15, 82.6 C-16, 60.5 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 40.3 C-20,

14.7 C-21, 113.6 C-22, 130.9 C-23, 35.1 C-24, 34.8 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.4 C-4', 126.0 C-5', 120.9 C-6', 128.4 C-7', 115.4 C-8', 151.4 C-9', 120.8 C-10', 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo. EM (IE, 70 eV) m/z (%): 563 MH⁺ (6.8), 269 (23.3), 243 (24.6), 220 (14.0), 219 (100.0), 201 (60.1), 161 (11.7), 159 (24.3), 147 (10.6), 145 (10.2), 131 (1.2), 122 (19.9), 121 (11.8), 107 (24.1), 105 (12.1), 95 (11.3), 93 (16.1), 91 (11.2), 81 (14.9), 79 (10.8).

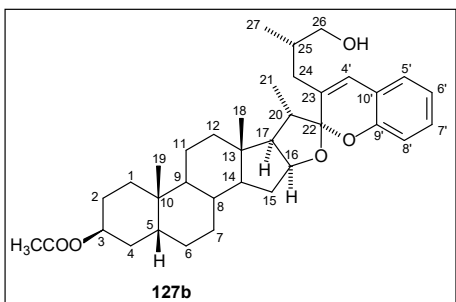


3-monoacetato de (22S,25R)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro[cromen]-5α-cholestan-3β,26-diol (128a). Rendimiento: 62.6 mg (11%). *Aceite amarillento.* RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm:

7.12 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H-7'), 7.05 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H-5'), 6.91 – 6.85 (m, 2H, H-6' and H-8'), 6.48 (s, 1H, H-4'), 4.68 (m, 2H, H-3 and H-16), 3.58 (dd, *J* = 10.7,

5.9 Hz, 1H, H-26a), 3.51 (dd, *J* = 10.6, 5.2 Hz, 1H, H-26b), 2.56 (p, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-20), 2.34 (dd, *J* = 14.5, 7.6 Hz, 1H, H-24a), 2.19 – 2.09 (m, 1H, H-24b), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.70 (ddd, *J* = 11.7, 11.7, 4.3 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.8 C-1, 27.4 C-2, 73.7 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 34.8 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.0 C-13, 56.0 C-14, 31.5 C-15, 82.4 C-16, 60.7 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 39.5 C-20, 14.8 C-21, 112.8 C-22, 130.8 C-23, 36.8 C-24, 35.1 C-25, 67.5 C-26, 17.4 C-27, 125.9 C-4', 126.1 C-5', 121.1 C-6', 128.4 C-7', 115.8 C-8', 151.2 C-9', 121.2 C-10', 21.5 CH₃ acetilo, 170.8 C=O acetilo. EM (IE, 70 eV) m/z (%): 562 M⁺ (13), 456 (21), 329 (10), 315 (13), 269 (29), 255 (11), 243 (24), 220 (15), 219 (100), 202 (11), 201 (68), 161 (13), 160 (13), 147 (11), 122 (12), 107 (15).

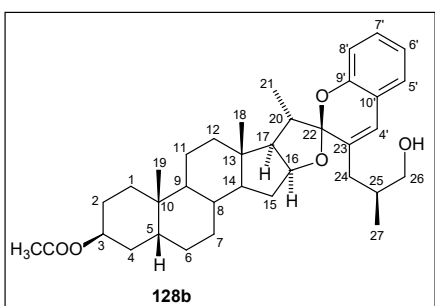
La reacción con acetato de sarsasapogenina (**64b**) (458.7 mg, 1 mmol) y 2-hidroxibenzaldehído (**126**) (244.2 mg, 2 mmol) generó una mezcla de los compuestos **127b** y **128b** que se separó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (54 g) y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo aumentando lenta y gradualmente la polaridad desde 20/1 hasta 8/1 para obtener:



3-monoacetato de (22R,25S)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro[cromen]-5β-colestan-3β,26-diol (127b).

Rendimiento: 54.5 mg (10%). *Aceite amarillento*. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.19 – 7.07 (m, 1H, H-7'), 7.02 (dd, $J=7.8$, 1.7 Hz, 1H, H-5'), 6.87 (ddd, $J=7.4$, 6.2, 1.3 Hz, 2H, H-6' and H-8'), 6.47 (s, 1H, H-4'), 5.07 (p, $J=2.7$ Hz, 1H, H-3), 4.73

(ddd, $J=11.0$, 8.1, 5.0 Hz, 1H, H-16), 3.62 (dd, $J=11.0$, 4.6 Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, $J=10.9$, 4.9 Hz, 1H, H-26b), 2.54 (p, $J=7.1$ Hz, 1H, H-20), 2.36 (dd, $J=14.0$, 6.8 Hz, 1H, H-24a), 2.15 – 2.07 (m, 2H, H-17 and H-24b) 2.04 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.03 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, $J=7.7$ Hz, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 30.6 C-1, 24.9 C-2, 70.6 C-3, 31.6 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 39.9 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.2 C-13, 56.1 C-14, 29.7 C-15, 82.6 C-16, 60.6 C-17, 16.7 C-18, 23.8 C-19, 40.3 C-20, 14.7 C-21, 113.5 C-22, 130.9 C-23, 35.1 C-24, 35.7 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.4 C-4', 126.0 C-5', 120.9 C-6', 128.4 C-7', 115.5 C-8', 151.3 C-9', 120.8 C-10', 21.5 CH_3 acetilo, 170.7 C=O acetilo. EM (IE, 70 eV) m/z (%): 562 M^+ (5.4), 284 (10.6), 269 (24.7), 255 (14.9), 243 (21.7), 220 (14.4), 219 (100), 202 (10.5), 201 (63.5), 173 (10.4), 161 (14.7), 160 (16.9), 159 (29.2), 147 (15.1), 145 (13.9), 133 (12.3), 131 (14.8), 122 (14.3), 121 (15.1), 119 (11.4), 107 (27.8), 105 (16.6), 95 (14.3), 93 (21.1), 91 (15.7), 81 (17.5), 79 (15.4), 67 (11.9), 55 (11.1).



3-monoacetato de (22S,25S)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro[cromen]-5β-cholestan-3β,26-diol (128b).

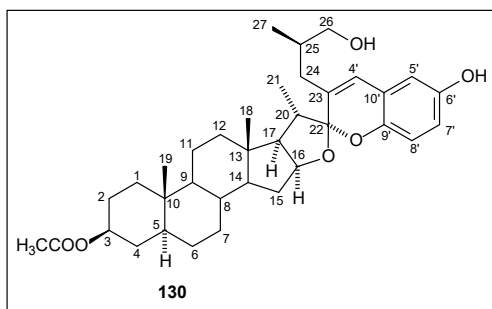
Rendimiento: 178.1 mg (32%). *Aceite amarillento*. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.16 – 7.09 (m, 1H, H-7'), 7.06 (dd, $J=7.7$, 1.6 Hz, 1H, H-5'), 6.92 – 6.87 (m, 2H H-6' and H-8'), 6.48 (s, 1H, H-4'), 5.13 – 5.01 (m, 1H, H-3), 4.68 (ddd, $J=11.0$, 8.1, 5.0

Hz, 1H, H-16), 3.57 (dd, $J=10.7$, 5.9 Hz, 1H, H-26a), 3.51 (dd, $J=10.7$, 5.2 Hz, 1H, H-26b), 2.57 (p, $J=6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.35 (ddd, $J=14.7$, 7.7, 1.1 Hz, 1H, H-24a), 2.18 – 2.10 (m, 1H, H-24b), 2.05 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.06 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, H-27) 0.99 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz,) δ ppm: 30.6 C-1, 24.9 C-2, 70.6 C-3, 31.6 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 39.9 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 30.7 C-15, 82.4 C-16, 60.8 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 39.4 C-20, 14.8 C-21, 112.8 C-22, 130.8 C-23, 36.8 C-24, 35.1 C-25, 67.5 C-26, 17.4 C-27, 125.8 C-4', 126.1 C-5', 121.1 C-6', 128.4 C-7', 115.8 C-8', 151.2

C-9', 121.2 C-10', 21.5 CH₃ acetilo, 170.7 C=O acetilo. EM (IE, 70 eV) m/z (%): 562 M⁺ (5.5), 284 (10.4), 269 (25.6), 255 (12.7), 243 (22.9), 220 (14.3), 219 (100), 202 (10.6), 201 (65.4), 173 (10.4), 161 (14.3), 160 (17.3), 159 (30.1), 147 (14.9), 145 (13.9), 133 (12.0), 131 (14.6), 122 (14.4), 121 (14.7), 119 (11.3), 107 (26.9), 105 (16.2), 95 (13.9), 93 (20.7), 91 (15.0), 81 (17.1), 67 (11.5), 55 (10.0).

4.2. Productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2,5-hidroxibenzaldehído.

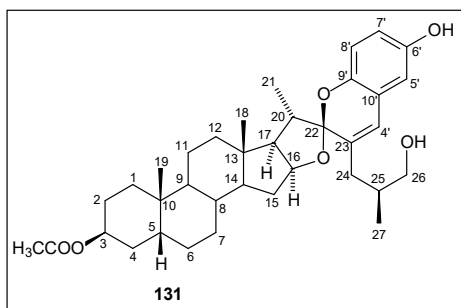
La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (1.832 g, 4 mmol) 2,5-dihidroxibenzaldehído (**129**) (1.104 g, 8 mmol) (CCD hexano/acetato de etilo, 4/1 x 3) se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel (90 g) y se eluyó con 300 mL de mezcla de disolventes hexano/acetona, 8/1 y se continuó con hexano/acetona, 5/1 para obtener 945.5 mg (41 mg) de:



3-monoacetato de (22R,25R)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro[cromen]-5α-colestan-3β,6',26-triol (130). P.f. 162.1 – 163.8 °C (*Sólido amorfo*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-8'), 6.57 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 1H, H-7'), 6.45 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-5'), 6.35 (s, 1H, H-4'), 4.78 – 4.61 (m, 2H, H-3 and H-16), 3.61

(dd, *J* = 11.0, 4.7 Hz, 1H, H-26a), 3.46 (dd, *J* = 10.9, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.53 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-20), 2.35 (dd, *J* = 14.4, 7.2 Hz, 1H, H-24a), 2.09 (dd, *J* = 14.9, 6.5 Hz, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.02 (d, *J* = 13.4 Hz, 3H, H-21). 1.00 (d, *J* = 12.9 Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.6 C-1, 27.4 C-2, 82.4 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 34.8 C-8, 54.1 C-9, 35.4 C-10, 21.0 C-11, 40.0 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.5 C-15, 82.4 C-16, 60.7 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 39.8 C-20, 14.7 C-21, 113.1 C-22, 131.6 C-23, 35.1 C-24, 35.6 C-25, 66.9 C-26, 17.2 C-27, 125.4 C-4', 112.3 C-5', 144.8 C-6', 115.3 C-7', 116.1 C-8', 150.1 C-9', 121.4 C-10', 21.4 CH₃ acetilo, 170.9 C=O acetilo. EM (IE, 70 eV) m/z (%): 579 MH⁺ (12), 578 M⁺ (29), 456 (15), 455 (44), 269 (22), 259 (46), 236 (14), 235 (100), 234 (68), 219 (13), 217 (94), 216 (70), 215 (11), 204 (40), 203 (10), 201 (17), 199 (10), 189 (11), 188 (19), 187 (14), 177 (14), 176 (87), 175 (31), 161 (19), 147 (24), 133 (10), 122 (13), 121 (14), 119 (10), 107 (21), 95 (11), 93 (17), 91 (11), 81 (13).

La reacción con acetato de sarsasapogenina (**64b**) (458 mg, 1 mmol) 2,5-dihidroxibenzaldehído (**129**) (276 mg, 2 mmol) generó se purificó por una columna cromatográfica empacada con sílica gel con sílica gel (54 g) y se eluyó con 100 mL de mezcla de disolventes hexano/acetona, 8/1 y se continuó con hexano/acetona, 5/1 para obtener 312.2 mg (54%) de:



3-monoacetato de (22S,25S)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro-[cromen]-5β-colestan-3β,6',26-triol (131). P.f. 204.1 – 205.4 °C (*Sólido amorfo*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ

ppm: 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-8'), 6.57 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 1H, H-7'), 6.43 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-5'), 6.36 (s, 1H, H-4'), 5.11 – 5.03 (m, 1H, H-3), 4.62 (dt, *J* = 9.3, 6.7 Hz, 1H, H-

16), 3.57 (dd, *J* = 10.7, 5.7 Hz, 1H, H-26a), 3.49 (dd, *J* = 10.7, 5.2 Hz, 1H, H-26b), 2.54 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.30 (dd, *J* = 14.7, 8.1 Hz, 1H, H-24a), 2.21 – 2.10 (m, 1H, H-24b), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.87 (s, 3H, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.8 C-3, 31.5 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 30.7 C-15, 82.4 C-16, 60.7 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 39.1 C-20, 14.7 C-21, 112.4 C-22, 131.5 C-23, 37.1 C-24, 34.9 C-25, 67.3 C-26, 17.6 C-27, 125.9 C-4', 112.4 C-5', 144.7 C-6', 115.4 C-7', 116.4 C-8', 150.3 C-9', 121.8 C-10', 21.5 CH₃ acetilo, 170.9 C=O acetilo. EM (IE, 70 eV) *m/z* (%): 579 MH⁺(11), 578 M⁺(28), 456 (16), 455 (42), 269 (22), 259 (44), 255 (13), 236 (14), 235 (100), 234 (60), 218 (13), 217 (87), 216 (59), 215 (11), 204 (32), 201 (15), 188 (16), 177 (12), 176 (72), 175 (25), 161 (15), 147 (21), 121 (12), 107 (16), 105 (11), 93 (13).

Capítulo 5. Síntesis y estudios de la reactividad de los productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y benzaldehídos monohidroxilados.

5.1. Síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la tigogenina

Para analizar el efecto de un sustituyente hidroxilo en el anillo aromático sobre la actividad biológica y la reactividad de los bencilidenespirostanos, se llevaron a cabo las condensaciones aldólicas entre sapogeninas esteroidales y benzaldehídos monohidroxilados con diferentes patrones de sustitución (OH-*orto*, OH-*meta*, OH-*para*). Anteriormente, se describió que la reacción entre sapogeninas esteroidales (**64**) y 2-hidroxibenzaldehído (**126**) genera los espirocromenos correspondientes (Capítulo 4) y cuando se realizó un primer intento de la condensación aldólica entre una sapogenina esteroideal y el 4-hidroxibenzaldehído, el hidroxi-bencilidenespirostando deseado se generó con un rendimiento muy bajo. Debido a lo anterior, se decidió llevar a cabo las reacciones de síntesis de los bencilidenespirostanos pero utilizando los benzaldehídos hidroxilados acetilados.

5.1.1. Primera síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos.

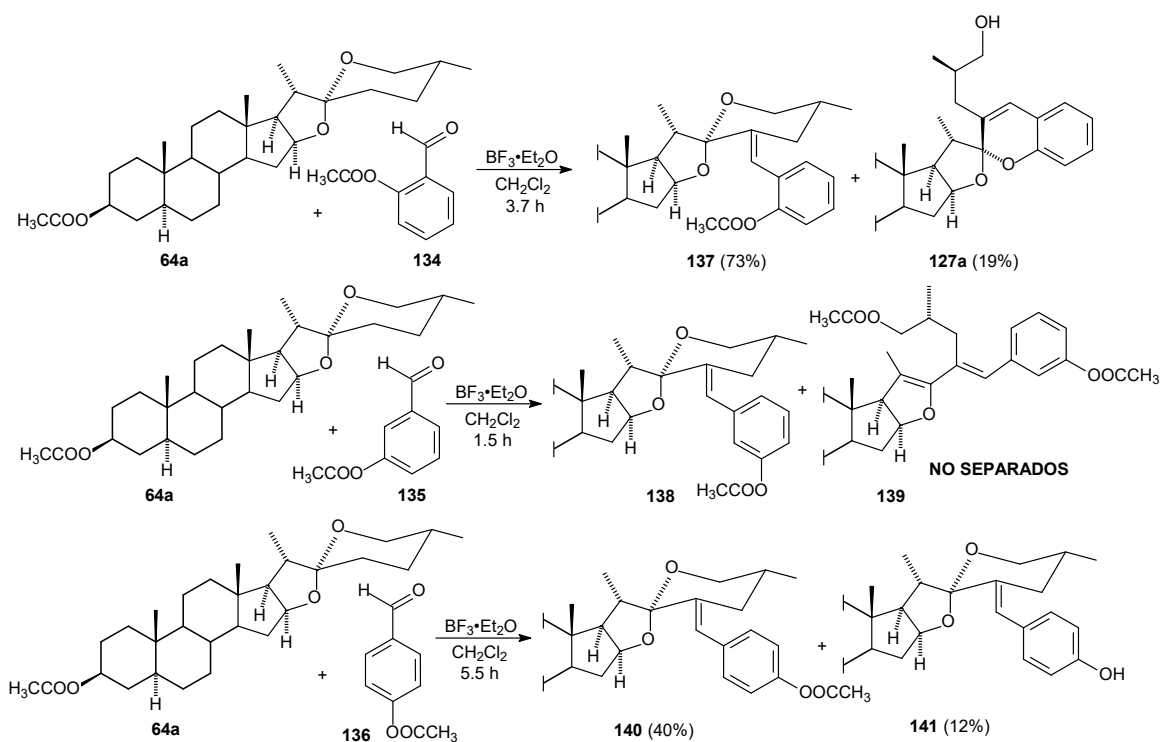
Como primer paso para la obtención de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos, se acetilaron los compuestos 2-hidroxibenzaldehído (**126**), 3-hidroxibenzaldehído (**132**) y 4-hidroxibenzaldehído (**133**) a través de una metodología convencional utilizando piridina y anhídrido acético en CH₂Cl₂, para generar los correspondientes acetoxibenzaldehídos **134**, **135** y **136** (Esquema 40).

Cabe señalar que durante la acetilación de estos compuestos en las condiciones mencionadas, se observó que los aldehídos protegidos eran inestables y por tanto las reacciones subsecuentes se llevaron a cabo utilizando los crudos de reacción y la transformación realizada únicamente se verificó a través de cromatografía en capa delgada (CCD).

Usando los acetoxibenzaldehídos mencionados anteriormente, se llevó a cabo la síntesis de los bencilidenespirostanos de la tigogenina a través de la metodología reportada por nuestro grupo de trabajo⁵⁵ (Esquema 40). En el caso de las síntesis de los compuestos 2'-acetoxi (**137**) y 4'-acetoxi-bencilideno (**140**), se obtuvieron mezclas de los productos que conservaron el grupo protector en el anillo aromático con los derivados que presentan el grupo fenólico libre (**137**, 73%; **127a**, 19%; **140**, 40%; y **141**, 12%). Notamos también que la presencia de ácido acético remanente

en el aldehído o bien la formación de ácido acético *in situ* producto de la descomposición de los acetoxi-benzaldehídos, generó la apertura de la cadena lateral espirocetálica formando la correspondiente pseudosapogenina. En el caso de la síntesis del compuesto **138**, se obtuvo una mezcla del compuesto deseado **138** y del acetoxibenciliden-furosteno **139** (determinados por señales características de cada compuesto por técnicas de RMN) no separable por métodos convencionales.

Si bien es cierto que con este procedimiento se lograron obtener los productos deseados, hay que señalar que el procesamiento y la purificación de estos compuestos, fueron complicados debido a la presencia de subproductos de reacción y seguramente también a la presencia de reactivos remanentes de la acetilación de los acetoxibenzaldehídos.



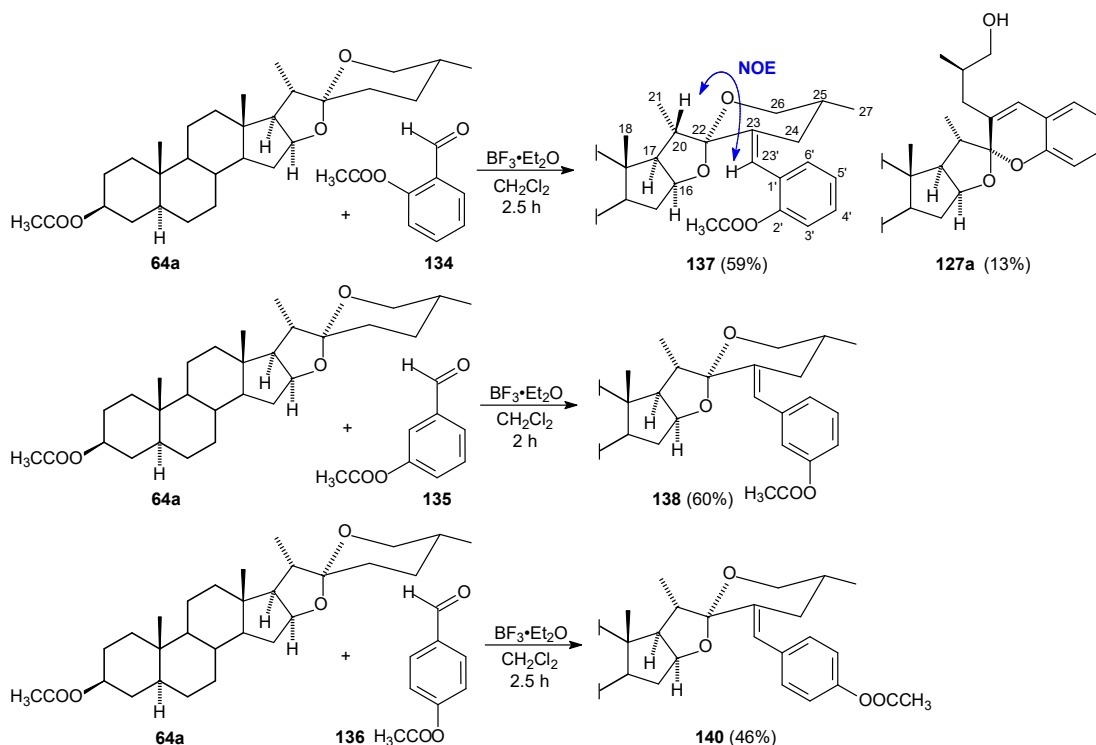
Esquema 40. Síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos de la tigogenina.

5.1.2. Optimización en la síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos.

Al notar que el manejo y procesamiento de los aldehídos acetilados eran complicados al obtenerlos a través del método con piridina y el anhídrido acético, así como la presencia de ácido acético remanente en los productos afectaba la reacción de síntesis de los bencilidenespirostanos acetoxilados, se buscó un método que permitiera reducir la cantidad de anhídrido acético y

facilitara la obtención de los acetoxibenzaldehídos. Por esta razón, se implementó un nuevo método de acetilación de los aldehídos fenólicos con anhídrido acético y bicarbonato de sodio en acetato de etilo, lo que generó los compuestos deseados con buenos tiempos de reacción (0.5 h), buenos rendimientos (**134**, 97%; **135**, 99%; **136**, 99%), un fácil procesado que permite retirar en su totalidad los reactivos remanentes y permitiendo la caracterización de los compuestos deseados.¹⁰⁷

Una vez obtenidos los aldehídos, se llevó a cabo nuevamente la síntesis de los derivados 23*E*-bencilidenespirostanos monoacetoxilados con mejoras en los rendimientos (59% y 13% para **137** y **127a**, respectivamente; 69% para **138** y 46% para **140**), tiempos de reacción más cortos (2 – 2.5 h) y una purificación menos problemática de estos compuestos, pues se logró disminuir la formación de subproductos durante la reacción. En la reacción de síntesis del compuesto 2'-acetoxi-bencilidenespirostanano **137**, se obtuvo nuevamente el 22*R*-espirocromeno **127a** que es producto de la desprotección del hidroxilo fenólico pues como se ha notado, los acetatos de hidroxialdehídos aromáticos son lábiles en medio ácido. (**Esquema 41**).



Del mismo modo que se observa en los 23*E*-bencilidenespirostanos no sustituidos,⁵⁵ la presencia del fragmento bencilideno unido a la cadena lateral se corroboró por la presencia de las señales aromáticas presentes en los espectros de RMN de ¹H y ¹³C. Además, las señales olefínicas en RMN de ¹³C RMN de C-23 y C-23' así como la señal del protón olefínico H-23' corroboran la transformación producida. El efecto **NOE** observado entre H-20↔H-23' ayudó a determinar la configuración *E* de la olefina generada (**Esquema 41**).

Los compuestos bencilideno acetoxilados derivados de la tigogenina, mostraron cierta facilidad para cristalizar y las estructuras propuestas a través de experimentos de RMN de los derivados **137**, **138** y **140** se pudieron corroborar por difracción de Rayos X de monocristal (**Figura 26**).

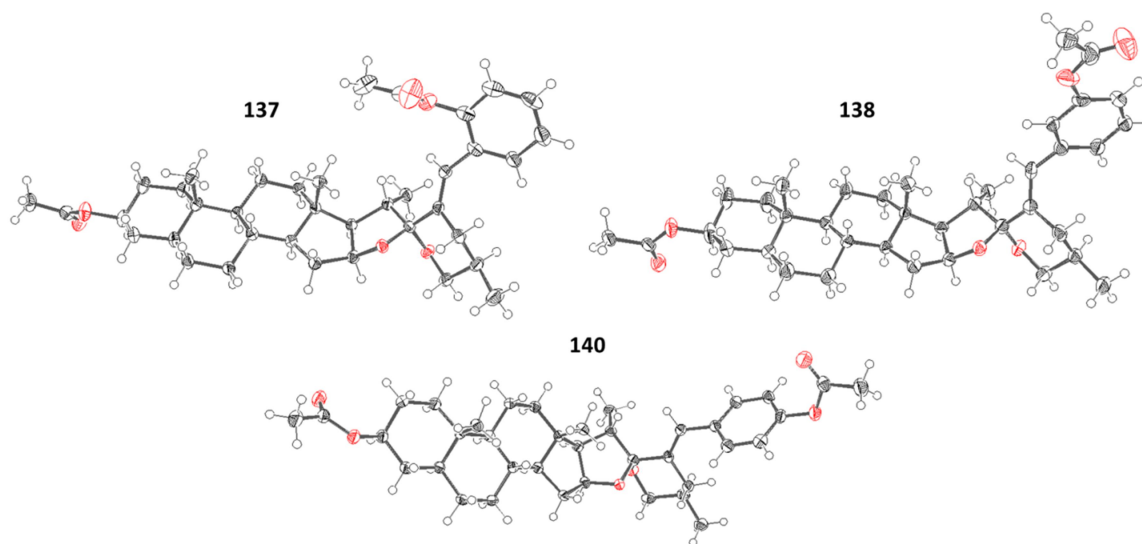
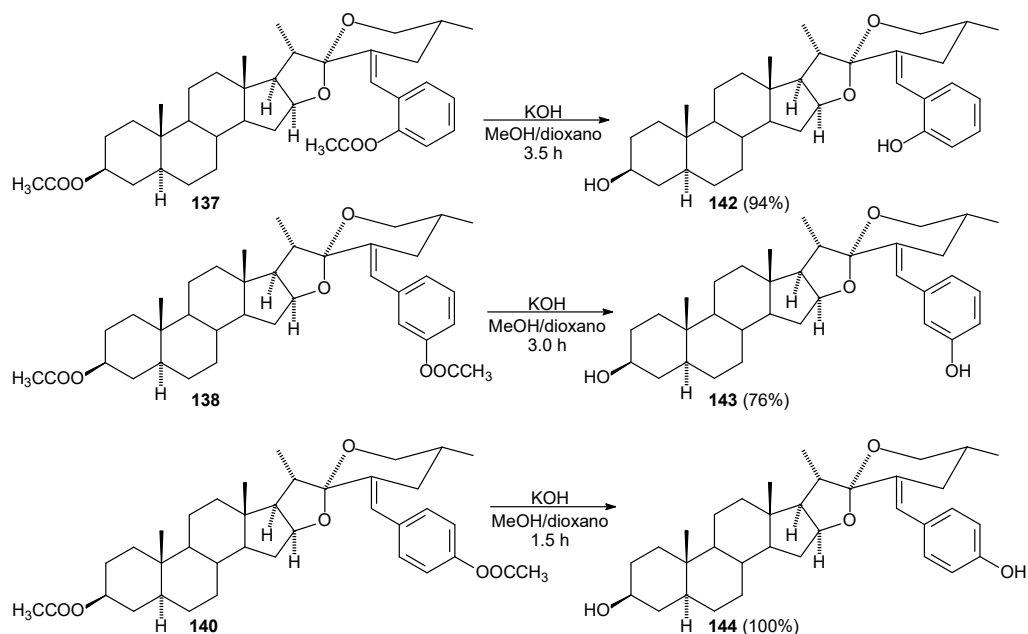


Figura 26. Estructura cristalina de los compuestos **137**, **138** y **140** con los elipsoides térmicos trazados al 50% de probabilidad

5.1.3. Saponificación de los derivados monoacetoxi-bencilidenespirostanos.

Como paso final para obtener los 23*E*-hidroxi-bencilidenespirostanos, fue necesario llevar a cabo la saponificación de los compuestos acetoxilados a través del método convencional utilizando KOH en una disolución de dioxano/metanol, del cual se obtuvieron los espirostanos deseados **142**, **143** y **144** con buenos rendimientos (94%, 76% y 100% respectivamente) y se utilizaron para evaluar sus propiedades biológicas como antitumorales y antioxidantes (**Esquema 42**).



Esquema 42. Obtención de los 23E-bencilidenespirostanos hidroxilados.

Cabe mencionar que la evaluación antitumoral de estos 23E-hidroxi-bencilidenespirostanos mostró que no presentan actividad en la línea celular U251 derivada de glioblastoma humano y tampoco mostraron tener la capacidad como atrapadores de radicales libres en el ensayo de DPPH[•].

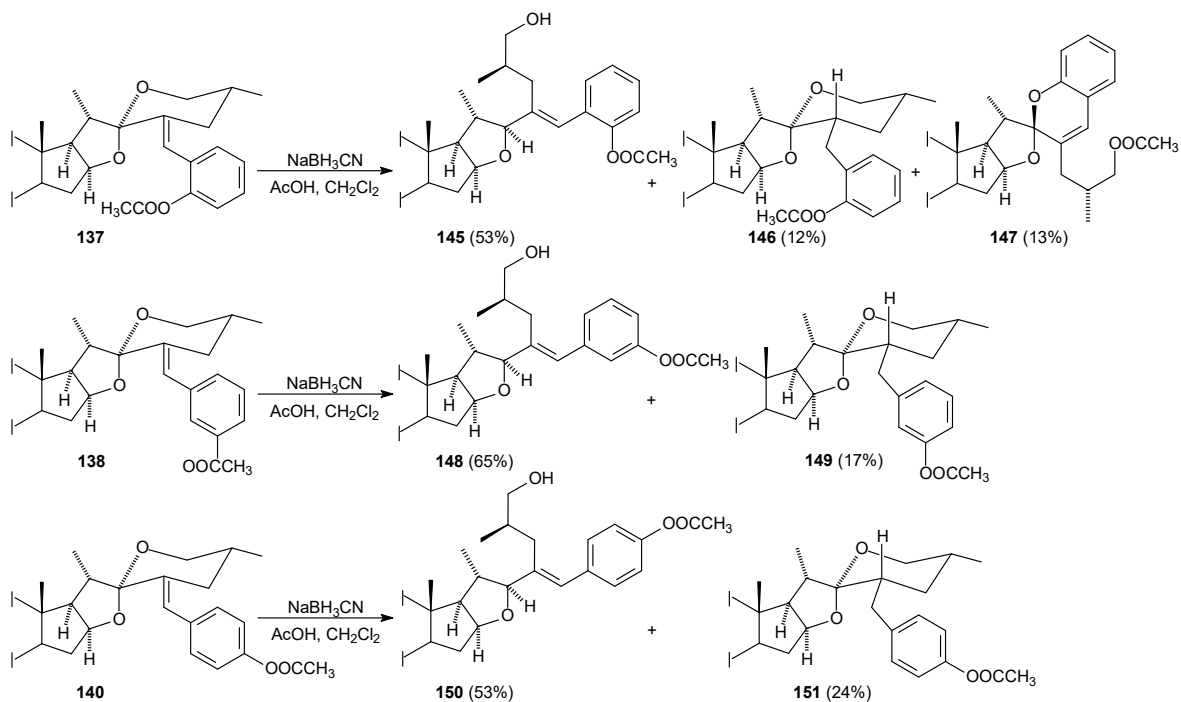
5.2. Estudio de las reducciones de los bencilidenespirostanos monoacetoxilados derivados de la tigogenina.

Debido a que la presencia de un sustituyente acetoxilo en el anillo aromático podría afectar la reactividad del fragmento benciliden en los nuevos derivados obtenidos, se decidió llevar a cabo un análisis de la reactividad de estos compuestos en las reacciones de reducción con NaBH₃CN y reducción catalítica.

5.2.1. Reducción con NaBH₃CN en ácido acético.

Cuando los compuestos **137**, **138** y **140** fueron tratados con NaBH₃CN en ácido acético, utilizando la metodología descrita por nuestro grupo de trabajo⁵⁶ (**Esquema 43**), se obtuvieron los derivados 22S-benciliden-furostanos (**145**, 53%; **148**, 65%; y **150**, 53%) y los 23S-bencil-espirostanos (**146**, 12%, **149**, 17%; y **151**, 24%) correspondientes, con una distribución muy similar a la obtenida en los bencilidenespirostanos no sustituidos. Esto demuestra que la presencia del grupo acetoxilo en

el fragmento bencilideno de la cadena lateral no influye en el curso de la adición de hidruro de estos compuestos. En el caso de la reducción del compuesto 2'-acetoxi--bencilidentigogenina (**137**) se obtuvo también el 22*S*-espirocromeno **147** (13%) que es consecuencia de la ciclación por parte del hidroxilo fenólico y la acetilación del grupo OH de la posición C-26, promovida por el ácido del medio.



Esquema 43. Reducción con NaBH_3CN de los compuestos monoacetoxi-bencilidenespirostanos.

La caracterización completa a través de experimentos de RMN de los compuestos reducidos, demostró que presentan cambios muy similares a los observados en los bencilidenespirostanos no sustituidos⁵⁶ e incluso con los 1,4-dimetilidenbencen-diespirostanos (Ver sección **3.2.3.1**). En las **Tablas 23** y **24** se recopilan las señales correspondientes a las cadenas laterales de los acetoxi-bencilidenfurostanos obtenidos y se puede notar que, nuevamente, la presencia del hidrógeno en C-22, así como el desplazamiento de este carbono a campo más alto indican la adición de hidruro en esta posición. Debido a que el anillo F no está presente en estos compuestos, se observa el corrimiento a campo más bajo de C-23' y de modo contrario H-23' se encuentra ligeramente más protegido, lo que parece indicar que al estar abierta la cadena lateral se disminuye el efecto anisotrópico en esta posición. La configuración *S* de los bencilidenfurostanos se determinó tal y como se describió para los dímeros 1,4-dimetiliden-difurostanos en la sección **3.2.3.1** de este documento.

Tabla 23. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los derivados acetoxibencilidenfurostanos **145**, **148** y **150**. Se agregan las señales de las materias primas **137**, **138** y **140** con fines comparativos.

H	Sustituyente en C-2'			Sustituyente en C-3'			Sustituyente en C-4'		
	137	145	$\Delta_{145-137}$	138	148	$\Delta_{148-138}$	140	150	$\Delta_{150-140}$
16	4.43	4.40	-0.03	4.42	4.39	-0.03	4.43	4.38	-0.05
18	0.81	0.89	+0.08	0.81	0.90	+0.09	0.82	0.88	+0.06
21	1.07	1.02	-0.05	1.08	1.00	-0.08	1.09	0.99	-0.10
22	-	3.88	-	-	3.86	-	-	3.85	-
24a	2.46	2.33	-0.13	2.75	2.48	-0.27	2.76	2.49	-0.27
24b	2.01	2.11	+0.10	2.09	2.22	+0.13	2.09	2.20	+0.11
26a	3.53	3.51	-0.02	3.55	3.54	-0.01	3.57	3.54	-0.03
26b	3.53	3.18	-0.35	3.55	3.19	-0.36	3.57	3.19	-0.38
27	0.76	0.77	+0.01	0.80	0.99	+0.19	0.80	0.90	+0.10
23'	6.35	6.35	+0.00	6.53	6.43	-0.10	6.53	6.41	-0.12
2'	-	-	-	6.94	7.07	+0.13	7.22	7.32	+0.10
3'	7.05	7.04	-0.01	-	-	-	7.05	7.04	-0.01
4'	7.22	7.19	-0.03	6.94	6.93	-0.01	-	-	-
5'	7.29	7.27	-0.02	7.33	7.32	-0.01	7.05	7.04	-0.01
6'	7.22	7.34	+0.12	7.09	7.16	+0.07	7.22	7.32	+0.10

Tabla 24. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los derivados acetoxibencilidenfurostanos **145**, **148** y **150**. Se agregan las señales de las materias primas **137**, **138** y **140** con fines comparativos.

C	Sustituyente en C-2'			Sustituyente en C-3'			Sustituyente en C-4'		
	137	145	$\Delta_{145-137}$	138	148	$\Delta_{148-138}$	140	150	$\Delta_{150-140}$
16	80.5	83.7	+3.2	80.5	83.6	+3.1	80.6	83.6	+3.0
17	61.6	63.9	+2.3	61.6	63.8	+2.2	61.6	63.8	+2.2
18	16.6	16.9	+0.3	16.7	17.0	+0.3	16.7	18.2	+1.5
20	36.9	36.9	0.0	37.3	37.0	-0.3	37.3	36.9	-0.4
21	14.7	17.8	+3.1	14.8	17.7	+2.9	14.8	17.7	+2.9
22	110.1	96.0	-14.1	110.4	96.8	-13.6	110.5	97.1	-13.4
23	139.2	141.4	+2.2	138.2	140.3	+2.1	137.6	139.3	+1.7
24	33.4	29.9	-3.5	32.9	29.9	-3.0	32.9	29.9	-3.0
25	33.1	34.6	+1.5	33.2	34.4	+1.2	33.1	34.3	+1.2
26	66.0	65.4	-0.6	66.1	65.5	-0.6	66.1	65.4	-0.7
27	17.1	18.0	+0.9	17.2	18.0	+0.8	17.2	17.0	-0.2
23'	117.4	123.3	+5.9	122.0	127.7	+5.7	122.0	127.8	+5.8
1'	130.3	130.7	+0.4	138.7	139.0	+0.3	134.8	135.1	+0.3
2'	148.7	148.2	-0.5	122.2	121.7	-0.5	130.2	129.6	-0.6
3'	122.0	122.3	+0.3	150.5	150.6	+0.1	121.2	121.4	+0.2
4'	125.7	125.9	+0.2	119.7	119.7	0.0	149.2	149.2	0.0
5'	128.1	128.1	0.0	129.1	129.2	+0.1	121.2	121.4	+0.2
6'	130.6	129.6	-1.0	126.6	126.1	-0.5	130.2	129.6	-0.6

En lo que respecta a los derivados 23S-acetoxibencil-espirostanos **146**, **149** y **151**, en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se observan la desaparición de la olefina C-23 – C-23' y la presencia de los protones alifáticos que corresponden a H-23, H-23'a y H-23'b. Los corrimientos químicos de las señales correspondientes a las cadenas laterales de estos compuestos, se encuentran agrupados en las **tablas 25** y **26**.

La determinación de la configuración *S* de C-23 se llevó a cabo tal y como se describió para los bencil-espirostanos no sustituidos en la sección **3.1.2.** de este documento.

Podemos asumir que el mecanismo involucrado en la adición de hidruro en estos compuestos es el mismo que en los bencilidenespirostanos no sustituidos⁵⁶ y con los 1,4-dimetilidenbencendiespirostanos (Ver sección **3.2.3.1.**) y podemos notar que la presencia de un sustituyente en el anillo aromático de los 23*E*-bencilidenespirostanos no afecta el perfil de reactividad de estos compuestos.

Tabla 25. Señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los acetoxi-bencil-espirostanos **146**, **149** y **151**. Se agregan las señales de las materias primas **137**, **138** y **140** con fines comparativos.

H	Sustituyente en C-2'			Sustituyente en C-3'			Sustituyente en C-4'		
	137	146	$\Delta_{146-137}$	138	149	$\Delta_{149-138}$	140	151	$\Delta_{151-140}$
16	4.43	4.41	-0.02	4.42	4.40	-0.02	4.43	4.40	-0.03
18	0.81	0.81	0.00	0.81	0.79	-0.02	0.82	0.80	-0.02
20	2.57	2.38	-0.19	2.55	2.37	-0.18	2.56	2.36	-0.2
21	1.07	1.01	-0.06	1.08	0.99	-0.09	1.09	0.99	-0.1
23	-	1.87	-	-	1.88	-	-	1.86	-
24eq.	2.46	2.89	+0.43	2.75	2.97	0.22	2.76	2.95	0.19
24ax.		2.26	2.26	2.09	2.37	0.28	2.09	2.36	0.27
26ax.	3.53	3.42	-0.11	3.55	3.43	-0.12	3.57	3.43	-0.14
26eq.	3.53	3.28	-0.25	3.55	3.29	-0.26	3.57	3.29	-0.28
27	0.76	0.71	-0.05	0.80	0.71	-0.09	0.80	0.71	-0.09
23'a	6.35	1.44	-4.91	6.53	1.46	-5.07	6.53	1.48	-5.05
23'b		1.09	-5.26		1.11	-5.42		1.09	-5.44
2'	-	-	-	6.94	6.86	-0.08	7.22	7.14	-0.08
3'	7.05	7.06	+0.01	-	-	-	7.05	6.99	-0.06
4'	7.22	7.16	-0.06	6.94	6.92	-0.02	-	-	-
5'	7.29	7.23	-0.06	7.33	7.28	-0.05	7.05	6.99	-0.06
6'	7.22	7.16	-0.06	7.09	7.01	-0.08	7.22	7.14	-0.08

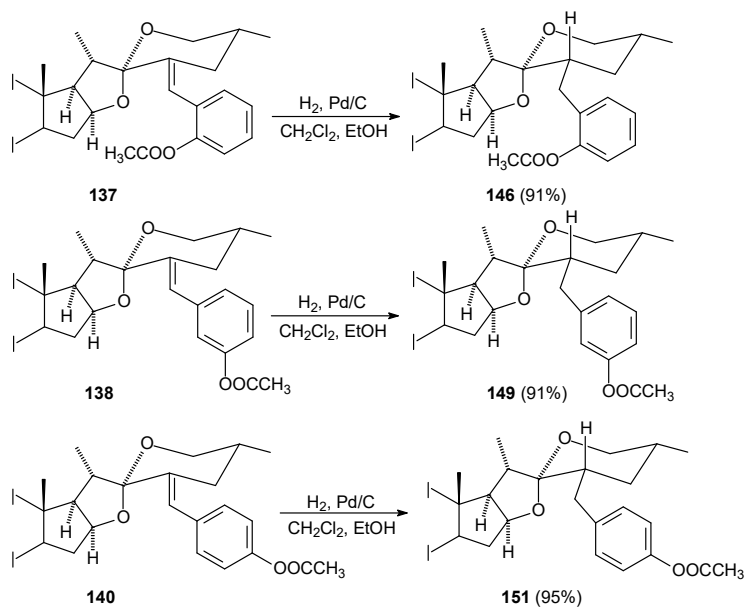
Tabla 26. Señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los acetoxibencil-espirostanos **146**, **149** y **151**. Se agregan las señales de las materias primas **137**, **138** y **140** con fines comparativos.

C	Sustituyente en C-2'			Sustituyente en C-3'			Sustituyente en C-4'		
	137	146	$\Delta_{146-137}$	138	149	$\Delta_{149-138}$	140	151	$\Delta_{151-140}$
16	80.5	80.8	+0.3	80.5	80.8	+0.3	80.6	80.8	+0.2
17	61.6	61.7	+0.1	61.6	61.6	0.0	61.6	61.6	+0.0
18	16.6	16.8	+0.2	16.7	16.7	0.0	16.7	16.8	+0.1
20	36.9	36.9	0.0	37.3	36.9	-0.4	37.3	36.9	-0.4
21	14.7	14.7	0.0	14.8	14.4	-0.4	14.8	14.4	-0.4
22	110.1	110.0	-0.1	110.4	110.1	-0.3	110.5	111.1	+0.6
23	139.2	38.7	-100.5	138.2	40.1	-98.1	137.6	40.3	-97.3
24	33.4	32.0	-1.4	32.9	37.0	+4.1	32.9	36.6	+3.7
25	33.1	30.6	-2.5	33.2	30.7	-2.5	33.1	30.7	-2.4
26	66.0	66.0	0.0	66.1	65.9	-0.2	66.1	66.0	-0.1
27	17.1	16.9	-0.2	17.2	16.9	-0.3	17.2	17.0	-0.2
23'	117.4	34.3	-83.1	122.0	34.2	-87.8	122.0	34.3	-87.7
1'	130.3	132.5	+2.2	138.7	142.7	+4.0	134.8	138.4	+3.6
2'	148.7	149.2	+0.5	122.2	122.0	-0.2	130.2	129.9	-0.3
3'	122.0	122.3	+0.3	150.5	150.6	+0.1	121.2	121.2	0.0
4'	125.7	125.8	+0.1	119.7	119.0	-0.7	149.2	148.7	-0.5
5'	128.1	127.1	-1.0	129.1	129.1	0.0	121.2	121.2	0.0
6'	130.6	131.6	+1.0	126.6	126.6	0.0	130.2	129.9	-0.3

5.2.2. Hidrogenación catalítica.

La hidrogenación catalítica con Pd/C en CH_2Cl_2 y etanol bajo atmósfera de H_2 de los derivados acetoxi-bencilidenespirostanos de la tigogenina, generó los esperados 23S-acetoxibencil espirostanos **146**, **149** y **151** con buenos rendimientos (91%, 91% y 95% respectivamente) (Esquema 44).

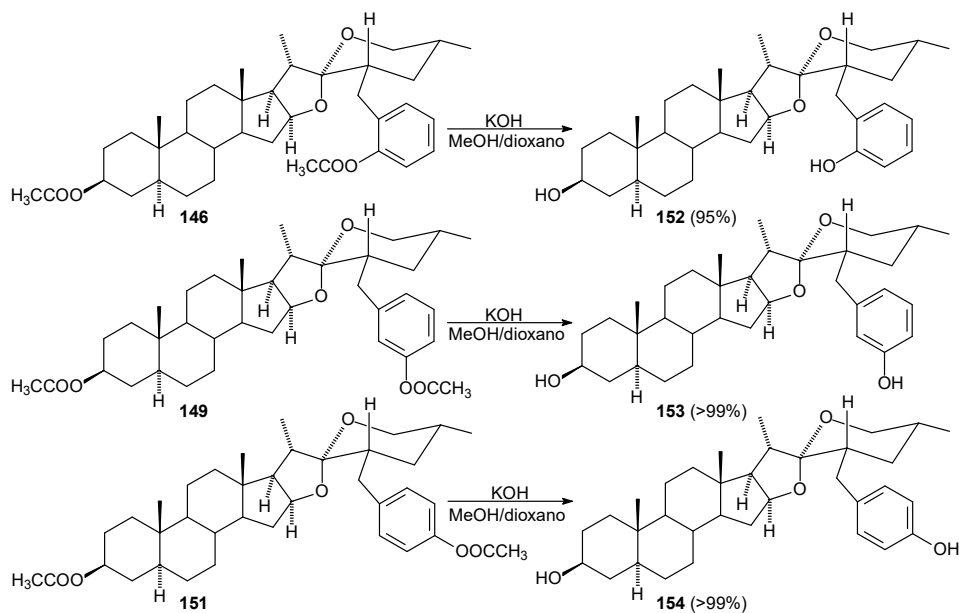
En esta reacción también se observó que la reactividad del fragmento bencilideno no se ve afectada por la presencia del grupo acetoxilo en el anillo aromático y se mantiene la estereoselectividad en la reducción, provocada por la orientación del oxígeno de C-26 y del metilo 21 como ocurre con los bencilidenespirostanos no sustituidos (ver sección 3.1.2.)



Esquema 44. Hidrogenación catalítica de los compuestos **137**, **138** y **140**.

5.2.3. Saponificación de los monoacetoxi-bencilspirostanos.

Con el fin de obtener los compuestos hidroxibencil-espirostanos y poder evaluar posteriormente su posible actividad antitumoral, se llevó a cabo la saponificación de los compuestos 2', 3' y 4'-acetoxibencil-espirostanos de la tigogenina a través del método convencional utilizando KOH en dioxano/metanol y se obtuvieron los espirostanos deseados con rendimientos cuantitativos. (Esquema 45).



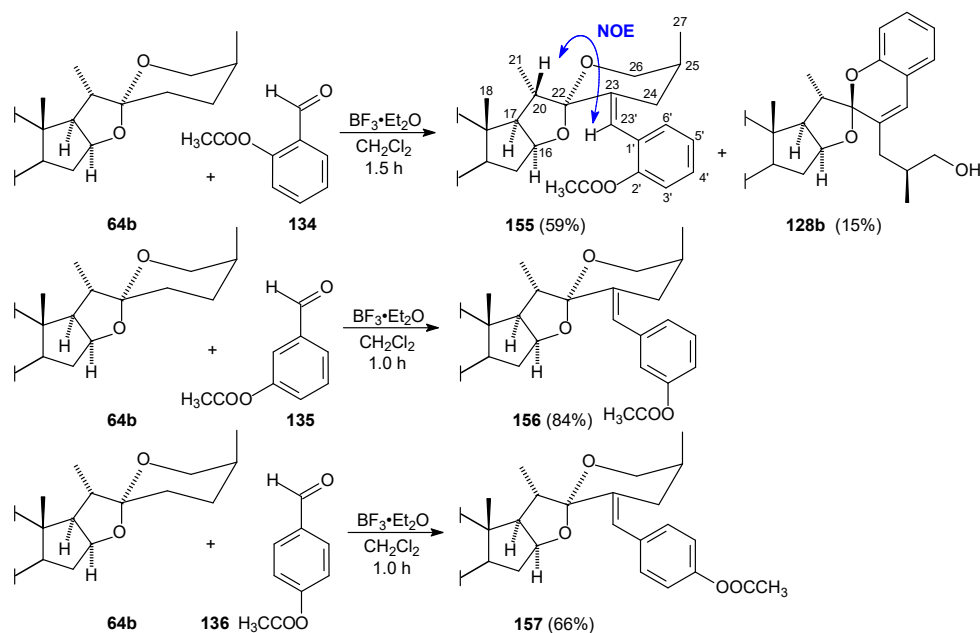
Esquema 45. Saponificación de los derivados bencil-espirostanos acetoxilados de la tigogenina.

5.4. Extensión de la síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos a otras sapogeninas esteroidales.

Después de establecer las condiciones de reacción más adecuadas para la obtención de los acetoxi-bencilidenespirostanos, se aplicó esta metodología a los acetatos de sarsasapogenina (**64b**) y hecogenina (**64c**). Los aldehídos acetilados se obtuvieron con la metodología descrita previamente.

5.4.1. Obtención de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la sarsasapogenina.

Se realizó la síntesis de los compuestos bencilideno acetoxilados utilizando al acetato de sarsasapogenina (**64b**) como materia prima para generar los derivados de la serie 25S. De la reacción con el aldehído **134** se obtuvieron el bencilidenespirostanano **155** y 22S-espirocromeno **128b** esperados con rendimientos del 59% y 15% respectivamente, mientras que las reacciones con los aldehídos **135** y **136** únicamente generaron los derivados bencilidenespirostanos **156** (84%) y **157** (66%) en buenos rendimientos (**Esquema 46**). En el caso de esta materia prima, los rendimientos y los tiempos de reacción (1 – 1.5 h) fueron ligeramente mejores que cuando se lleva a cabo la reacción con el acetato de tigogenina (**Sección 5.1.2., Esquema 41**) y esto se debe a la influencia de la configuración de C-25. Al encontrarse el metilo 27 con orientación axial, se favorece la apertura del anillo F promovida por el ácido del medio y de esta manera la condensación aldólica entre el aldehído y la sapogenina ocurre de manera más efectiva.



Esquema 46. Síntesis de los acetoxi-bencilidenespirostanos de la sarsasapogenina.

Del compuesto **156** se obtuvieron cristales adecuados para su análisis por DRX de monocristal y se corroboró la estructura propuesta (**Figura 27**).

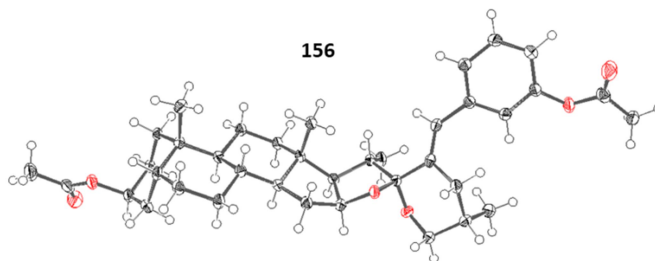


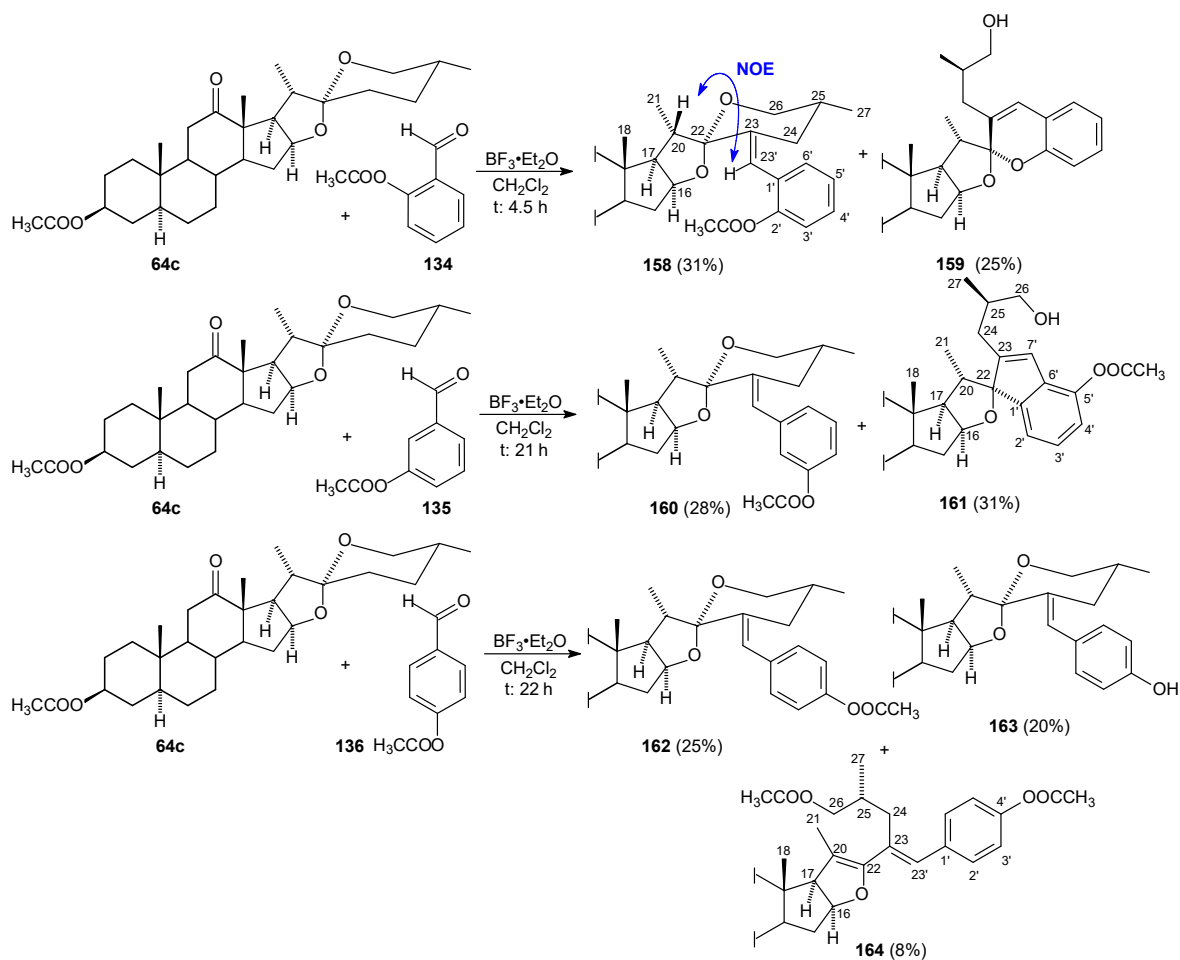
Figura 27. DRX de monocristal del compuesto **156** con los elipsoides térmicos trazados al 50% de probabilidad.

5.4.2. Obtención de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la hecogenina.

La condensación aldólica entre el acetato de hecogenina (**64c**) y el 2-acetoxibenzaldehído (**134**) generó los esperados compuestos bencilidenespirostanos **158** y el espirocromeno **159** (con rendimientos del 31% y 25% respectivamente) como ocurrió con las otras sapogeninas esteroidales. Sin embargo, la distribución en los productos obtenidos es muy distinta en el caso de esta materia prima, pues se obtienen casi en la misma proporción (**Esquema 47**).

Por otra parte, cuando se llevó a cabo la reacción entre esta sapogenina esteroideal y el 3-acetoxibenzaldehído (**135**) se obtuvieron el bencilidenespirostanos **160** (28%) y el espiroindeno acetoxilado **161** (31%). La presencia de este compuesto puede explicarse pues la posición C-6' se encuentra activada por la presencia del grupo acetoxilo del anillo aromático y esto permite que ocurra el ataque nucleofílico sobre la posición C-22 generando el espiroindeno (**Esquema 47**). Aunque es cierto que esta reacción podría ocurrir con cualquiera de los otros espirostanos, el tiempo de reacción con el compuesto **64c** es particularmente prolongado (21 h) lo que permitió que solo con esta materia prima se observara la formación del acetoxi-espiroindeno.

Como resultado de la reacción entre el acetato de hecogenina y el 4-acetoxibenzaldehído (**136**) se obtuvieron los compuestos bencilidenespirostanos **162** y **163** (con rendimientos del 25% y 20% respectivamente), siendo este último producto de la desacetilación del OH fenólico. También, en esta reacción se generó el furosteno **164** de forma minoritaria (8%), que se produce por la acetilación del OH en la posición C-26 y posterior eliminación de H-23, este nuevo grupo acetato debe provenir de una transesterificación con **163** (**Esquema 47**).



Esquema 47. Síntesis de los acetoxi-bencilidenespirostanos de la hecogenina.

Como se puede notar, en las síntesis de los derivados bencilideno acetoxilados de la hecogenina los rendimientos de los productos deseados son menores, los tiempos de reacción son más prolongados y se observa una mayor formación de subproductos, en comparación con otras sapogeninas esteroidales. Esto es consecuencia de la presencia del carbonilo en la posición C-12, que influye en la catálisis ácida haciendo la reacción menos efectiva.

5.5. Síntesis de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol.

Continuando con el proyecto de nuestro grupo de trabajo para la síntesis y estudio de las propiedades de los dímeros esteroidales y debido a la similitud estructural que presenta el 2-formilestradiol con el 2-hidroxibenzaldehído (**126**) (**Figura 28**), se decidió llevar a cabo condensaciones aldólicas catalizadas por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ entre sapogeninas esteroidales acetiladas y el 2-formilestradiol. Esto como alternativas para el desarrollo de nuevos dímeros esteroidales

híbridos en los que un núcleo estrogénico procedente del reino animal, está unido a la cadena lateral de sapogeninas esteroidales aisladas de las plantas; con el fin de obtener sustancias con potencial actividad biológica como antiestrogénicos o antitumorales.

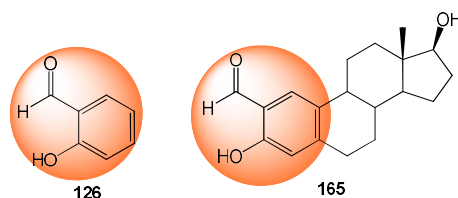
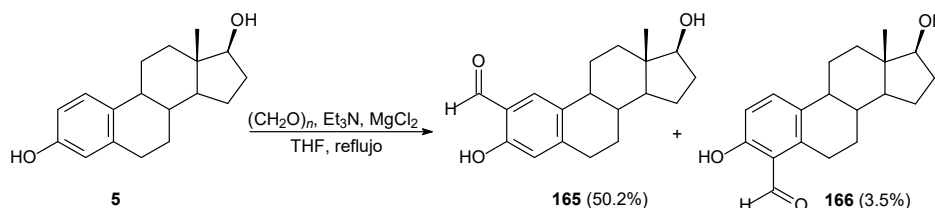


Figura 28. Similitud estructural entre el salicilaldehído y el 2-formilestradiol.

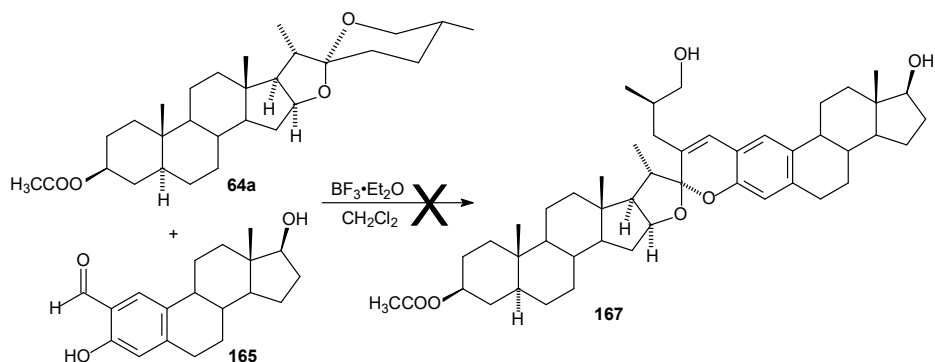
5.5.1. Obtención de los productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2-formilestradiol.

El primer paso para la obtención de los dímeros híbridos fue llevar a cabo la formilación del estradiol (**5**) siguiendo la metodología descrita por Hansen y colaboradores con MgCl_2 y paraformaldehído,¹⁰⁸ obteniéndose una mezcla de los compuestos **165** y **166** (**Esquema 48**) con rendimientos similares a los descritos.



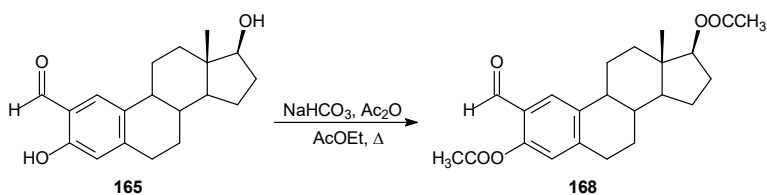
Esquema 48. Síntesis de los compuestos 2-formil y 4-formilestradiol.

Una vez que se obtuvo el 2-formilestradiol (**165**), se utilizó como materia prima en la metodología de síntesis de los espirocromenos derivados de sapogeninas esteroidales (Capítulo 4). Esto a través de la condensación aldólica entre este benzaldehído esteroide y el acetato de tigogenina. Sin embargo, aún después de 6 días de reacción no se observó la formación de algún producto definido (**Esquema 49**). Se puede suponer que la presencia de hidroxilo fenólico del estradiol impide una catálisis ácida adecuada y no permite la condensación entre la sapogenina y el aldehído. También hay que considerar que el carbonilo del 2-formilestradiol (**165**) presenta un mayor impedimento estérico y dificulta la reacción deseada.



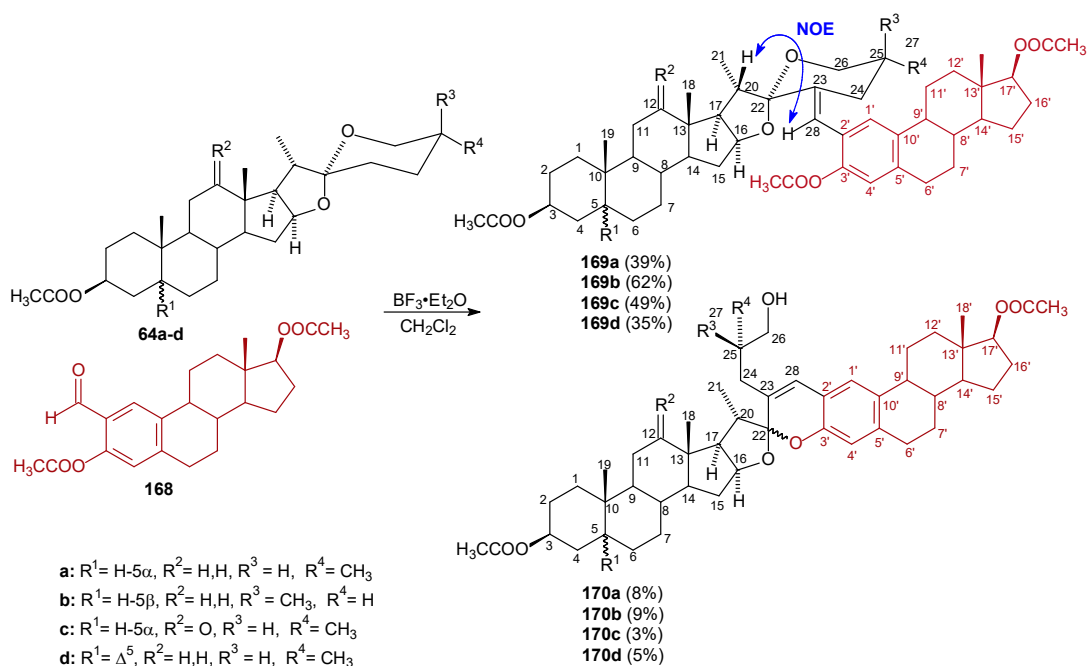
Esquema 49. Síntesis del dímero híbrido tipo-espirocromeno **167**.

Debido a los resultados anteriores y para impedir la interferencia en la catálisis ácida por parte del fenol del 2-formilestradiol en las reacciones de condensación con las sapogeninas esteroidales, se llevó a cabo la acetilación del aldehído **165** con NaHCO_3 , anhídrido acético y acetato de etilo, para obtener el diacetato de 2-formilestradiol (**168**) con rendimiento cuantitativo (**Esquema 50**).



Esquema 50. Obtención del diacetato de 2-formilestradiol(**168**).

Como se ha señalado en este capítulo, las reacciones entre sapogeninas esteroidales acetiladas y el 2-acetoxibenzaldehído generaron los 2'-acetoxi-bencilidenespirostanos correspondientes. Tomando en cuenta esto, se llevaron a cabo las reacciones de condensación catalizadas por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ entre las sapogeninas **64a-d** y el diacetato de 2-formilestradiol (**168**) para obtener los dímeros híbridos de tipo bencilideno **169a-d** con rendimientos moderados (39%, 62%, 49% y 35% respectivamente) y como subproductos de esta reacción, se obtuvieron los dímeros tipo-espirocromeno **170a-d** con rendimientos que van de 3 a 9%. (**Esquema 51**).



Esquema 51. Síntesis de los dímeros esteroidales **169** y **170**.

En los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de los dímeros híbridos de tipo bencilideno, se observan efectos muy similares a los presentes en los 23*E*-2'-acetoxi-bencilidenespirostanos (Sección 5.1.2.). En las **tablas 27** y **28** se encuentran los desplazamientos químicos de las señales correspondientes a las cadenas laterales del fragmento de sapogenina y al anillo aromático del fragmento de estradiol. Como se puede observar, la presencia de las señales sp² de C-23 y C-28 así como la señal del protón olefínico de H-28 corroboran la formación del doble enlace que une a ambos fragmentos.

Se puede notar que las señales correspondientes al anillo aromático del fragmento de estradiol presentan regularidad en todos los dímeros, lo que indica que dicho fragmento está unido a la cadena lateral de la sapogenina del mismo modo en todos los derivados obtenidos y el efecto **NOE** observado entre H-20 \leftrightarrow H-28 ayudó a determinar la configuración *E* de la olefina generada.

Tabla 27. Algunas señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los dímeros híbridos tipo bencilidenespiroetano **169a-d**.

H	169a	169b	169c	169d
16	4.42 (dt)	4.45 (dt)	4.37 (m)	4.44 (dt)
18	0.83 (s)	0.81 (s)	1.08 (s)	0.83 (s)
20	2.56 (p)	2.50 (dq)	2.44 (m)	2.57 (p)
21	1.06 (d)	1.08 (d)	1.17 (d)	1.08 (d)
26ax.	3.53 (m)	4.05 (dd)	3.52 (m)	3.52 (m)
26eq.	3.53 (m)	3.30 (dt)	3.52 (m)	3.52 (m)
27	0.77 (d)	0.94 (d)	0.77 (d)	0.77 (d)
28	6.30 (s)	6.45 (s)	6.28 (s)	6.31 (s)
1'	7.11 (s)	7.11 (s)	7.10 (s)	7.11 (s)
4'	6.75 (s)	6.74 (s)	6.75 (s)	6.76 (s)

Tabla 28. Algunas señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los dímeros híbridos tipo bencilidenespiroetano **169a-d**.

C	169a	169b	169c	169d
16	80.5	80.9	78.9	80.5
17	61.6	61.8	53.0	61.5
18	16.6	16.6	16.1	16.4
20	36.9	38.6	37.5	36.9
21	14.7	14.6	13.5	14.8
22	110.2	111.0	110.2	110.2
23	138.6	137.5	138.4	138.6
24	33.5	31.3	33.6	33.5
25	33.1	30.3	33.0	33.1
26	66.1	65.0	66.2	66.1
27	17.1	17.6	17.2	17.2
28	117.8	119.9	118.0	117.8
1'	127.6	127.5	127.6	127.6
2'	137.7	137.6	137.7	137.7
3'	146.4	146.4	146.4	146.4
4'	121.8	121.7	121.8	121.8
5'	137.0	136.9	137.1	137.0
10'	127.1	127.1	126.9	127.0

Por otro lado, en los espectros de RMN de los dímeros híbridos de tipo espirocromeno se encuentran efectos muy similares a los observados en los espirocromenos derivados de sapogeninas esteroidales (Sección 4.1). Los compuestos **170a**, **170c** y **170d** pertenecientes a la serie 22R presentan los desplazamientos característicos de C-22 a 113.5 ppm, C-24 a 35.1 ppm y C-26 alrededor de 66.9 ppm; mientras que en el derivado **170b** se observan C-22 a 112.7 ppm, C-24 a 37.3 ppm y C-26 a 67.6 ppm, que son desplazamientos particulares para la cadenas laterales de

los espirocromenos de la serie 22S. Los desplazamientos químicos correspondientes a las cadenas laterales de los fragmentos de sapogenina y del fragmento espirocromeno se encuentran recopilados en las **tablas 29 y 30**.

Tabla 29. Algunas señales de RMN de ^1H de las cadenas laterales de los dímeros híbridos tipo espirocromeno **170a-d**.

H	22R-170a	22S-170b	22R-170c	22R-170c
16	4.67 (m)	4.66 (m)	4.66 (m)	4.70 (m)
18	0.88 (s)	0.88 (s)	1.16 (s)	0.91 (s)
20	2.52 (p)	2.54 (p)	2.40 (m)	2.52 (q)
21	1.01 (d)	1.05 (d)	1.10 (d)	1.03 (d)
26a	3.62 (dd)	3.57 (dd)	3.61 (dd)	3.62 (dd)
26b	3.43 (dd)	3.51 (dd)	3.43 (dd)	3.44 (dd)
27	0.98 (d)	0.97 (d)	0.97 (d)	0.99 (d)
28	6.43 (s)	6.45 (s)	6.44 (s)	6.44 (s)
1'	6.93 (s)	6.97 (s)	6.94 (s)	6.94 (s)
4'	6.60 (s)	6.63 (s)	6.61 (s)	6.61 (m)

Tabla 30. Algunas señales de RMN de ^{13}C de las cadenas laterales de los dímeros híbridos tipo espirocromeno **170a-d**.

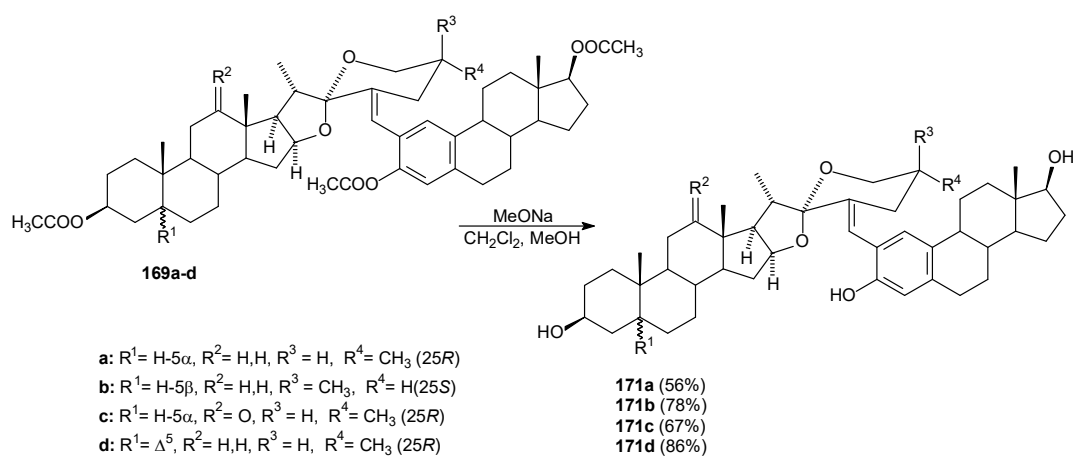
C	170a	170b	170c	170d
16	82.4	82.8	80.7	82.3
17	60.6	60.9	51.6	60.4
18	16.7	16.6	16.4	16.5
20	40.1	39.3	40.3	40.0
21	14.7	14.7	13.4	14.7
22	113.5	112.7	113.4	113.5
23	130.0	129.9	129.5	129.9
24	35.1	37.3	35.3	35.1
25	34.8	35.0	35.6	35.8
26	66.9	67.6	67.0	66.9
27	17.1	17.6	17.0	17.1
28	125.7	126.2	126.0	125.7
1'	122.9	123.1	122.9	122.9
2'	118.5	118.9	118.4	118.4
3'	149.2	149.1	149.0	149.1
4'	115.3	115.6	115.4	115.3
5'	132.8	133.0	133.0	132.8
10'	137.4	137.4	137.5	137.4

Se puede asumir que la formación de los dímeros tipo espirocromeno, al igual que ocurre en la síntesis de los 2'-acetoxi-bencilidenespirostanos, es producto del cierre del anillo por parte del OH fenólico que se desacetiló en el medio ácido de la reacción. La configuración en C-22 de los compuestos obtenidos se determinó de la misma forma que se describió para los espirocromenos derivados de saponinas esteroideas (Sección 4.1).

También es importante hacer notar que en estos dímeros híbridos se mantiene la tendencia de estereoselectividad en la formación del fragmento de espirocromeno dependiendo de la configuración de C-25, como lo ocurrido en la síntesis de los espirocromenos, pues todas las materias primas de la serie 25*R* generaron como subproducto al 22*R*-espirocromeno, pero cuando la reacción se llevó a cabo con el derivado **64b** de la serie 25*S*, se generó el correspondiente 22*S*-espirocromeno. Esto último indica que la influencia de la orientación del metilo C-27 es determinante en las transformaciones de la cadena lateral de las saponinas esteroideas.

5.5.2. Saponificación de los dímeros híbridos tipo bencilideno.

Se llevó a cabo la desprotección de los grupos hidroxilo de los dímeros híbridos de tipo bencilideno, para poder llevar a cabo la evaluación de sus propiedades biológicas, a través del tratamiento con metóxido de sodio en mezcla 9/1 de CH₂Cl₂/metanol. De esta manera, se obtuvieron los derivados **171a-d** con los hidroxilos libres con rendimientos que van de moderados a buenos (56 – 86%) (**Esquema 52**).



Esquema 52. Saponificación de los dímeros híbridos de tipo bencilideno.

Parte experimental

5.1. Síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la tigogenina.

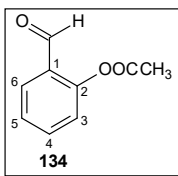
5.1.1. Primera síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos.

Procedimiento general para la acetilación de los monohidroxibenzaldehídos con anhídrido acético y piridina. A una disolución de hidroxibenzaldehído (1.2212 g, 10 mmol) en CH_2Cl_2 (15 mL), se le agregaron 1.6 mL (20 mmol) de piridina y se agitó a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 1.7 mL (17.5 mmol) de anhídrido acético y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos (CCD hexano/acetato de etilo 2:1). Al consumirse por completo la materia prima, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (60 mL) y la fase orgánica se lavó con agua (3 x 25 mL), disolución al 5% de CuSO_4 (4 x 25 mL), agua (5 x 25 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 25 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó. El producto obtenido se guardó en congelación inmediatamente para evitar la descomposición.

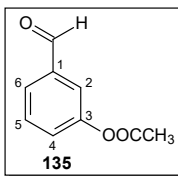
Procedimiento general para la síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos. A una disolución de sapogenina esteroideal acetilada (458.7 mg, 1 mmol) y monoacetoxi-benzaldehído crudo (328.3 mg, 2 mmol, que se obtuvo a través de la acetilación con anhídrido acético y piridina) en CH_2Cl_2 (30 mL), se le adicionó $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (6 mL) y el curso de la reacción se siguió por CCD (hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Al consumirse la materia prima la mezcla de reacción se vertió sobre hielo, se diluyó con acetato de etilo (80 mL) y la fase orgánica se lavó con agua (8 x 25 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 25 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó a sequedad. El aceite obtenido se redisolvió en acetato de etilo (25 mL), se le agregaron 25 mL de una disolución acuosa de NaHSO_4 al 10% y se agitó durante toda la noche para retirar el benzaldehído. Transcurrido este tiempo, la mezcla se diluyó con 30 mL de acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua (5 x 30 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y se evaporó a sequedad. Como se mencionó anteriormente, los compuestos obtenidos con esta metodología no pudieron ser caracterizados adecuadamente.

5.1.2. Optimización en la síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos.

Procedimiento general para la acetilación de los monohidroxibenzaldehídos con anhídrido acético y NaHCO₃. A una disolución de hidroxibenzaldehído (244.2 mg, 2 mmol) en acetato de etilo (secado con Na₂SO₄ anh.) (6 mL), se le agregaron Ac₂O (0.4 mL, 4.3 mmol) y NaHCO₃ (336 mg, 4 mmol), y la mezcla se agitó a reflujo hasta que la materia prima se consumió por completo (30 min, CCD hexano/acetato de etilo 2/1). La reacción se terminó agregando 2 mL de etanol, la mezcla se enfrió, se agregaron 10 mL de agua y se agitó durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 30 mL de acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua (5 x 15 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 15 mL), se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó. El residuo se secó durante 30 minutos en la bomba de alto vacío para generar el monoacetoxi-benzaldehído deseado puro y poder utilizarse. Esta metodología se escaló a 4 y 8 mmol.

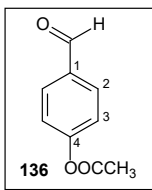


La reacción con el 2-hidroxibenzaldehído (**126**) generó 333.8 mg (98%) de: **2-acetoxibenzaldehído (134)**. *Aceite translúcido*. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 10.11 (s, 1H, H-aldehído), 7.88 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.63 (ddd, *J* = 8.1, 7.4, 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.45 – 7.35 (m, 1H, H-5), 7.19 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H, H-3), 2.39 (s, 3H, CH₃ acetilo). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 128.0 C-1, 151.5 C-2, 123.5 C-3, 135.3 C-4, 126.4 C-5, 131.3 C-6, 188.7 C=O aldehído, 169.2 C=O acetilo, 20.9 CH₃ acetilo. Descrito en *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12*, 8762 – 8769; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 10.11 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, aldehído), 7.88 (1H, dt, *J* = 7.8, *J* = 1.2 Hz, H-6), 7.63 (1H, ddd, *J* = 8.4, *J* = 7.4, *J* = 1.3 Hz, H-4), 7.40 (1H, dd, *J* = 7.8, *J* = 7.4 Hz, H-5), 7.18 (1H, bd, *J* = 8.4, H-3), 2.38 (3H, s, CH₃ acetilo). RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm: 188.74 C=O aldehído, 169.20 C=O acetilo, 151.42 C-2, 135.26 C-4, 131.24 C-6, 127.98 C-1, 126.38 C-5, 123.44 C-3, 20.77 CH₃ acetilo.



La reacción con el 3-hidroxibenzaldehído (**132**) generó 312.5 mg (95%) de: **3-acetoxibenzaldehído (135)**. *Aceite amarillo pálido*. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.99 (s, 1H, H-aldehído), 7.74 (dt, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.62 (dd, *J* = 2.3, 1.6 Hz, 1H, H-2), 7.54 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.36 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 1.1 Hz, 1H, H-4), 2.32 (s, 3H, CH₃ acetilo). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 137.6 C-1, 122.1 C-2, 151.1 C-3, 127.6 C-4, 130.0 C-5, 127.2 C-6, 191.0 C=O aldehído, 169.0 C=O acetilo, 20.9 CH₃ acetilo. Descrito

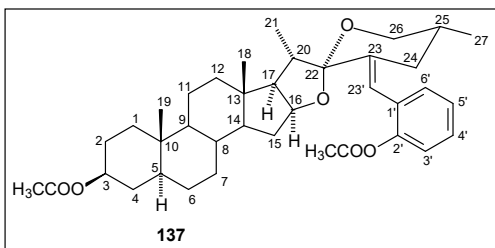
en *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9150 – 9160; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 2.22 (s, 3H), 7.24–7.26 (m, 1H), 7.44 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.50–7.51 (m, 1H), 7.62–7.65 (m, 1H), 9.88 (s, 1H).



La reacción con el 4-hidroxibenzaldehído (**133**) generó 321.7 mg (98%) de: **4-acetoxibenzaldehído (136)**. Aceite translúcido. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.97 (s, 1H, H-aldehído), 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2), 7.27, (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3), 2.32 (s, 3H, CH_3 acetilo). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 133.8 C-1, 131.1 C-2, 122.3 C-3, 155.2 C-4, 190.8 C=O aldehído, 168.5 C=O acetilo, 21.0 CH_3 acetilo. Descrito en *Org. Biom. Chem.* **2013**, *11*, 3674 - 3691; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 9.90 (s, 1H), 7.83 (d, $J = 8.7$, 2H), 7.20 (d, $J = 8.6$, 2H), 2.25 (s, 3H); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 190.9 (0), 168.7 (0), 155.4 (0), 134.0 (0), 131.2 (1), 122.4 (1), 21.1 (3)

Procedimiento optimizado para la síntesis de los 23E-bencilidenespirostanos monoacetoxilados. A una disolución de esteroide (1 mmol) y el acetoxibenzaldehído recién preparado y completamente seco (2 mmol, preparado por el método con Ac_2O y NaHCO_3) en CH_2Cl_2 (30 mL), se le adicionó $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (6 mL) y se agitó a temperatura ambiente. El curso de la reacción se siguió por CCD, hexano/acetato de etilo, 4/1 x 2. La reacción se terminó vertiendo la mezcla sobre hielo y agitando hasta que el hielo se fundió. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (80 mL) y la fase orgánica se lavó con agua (8 x 30 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y se evaporó a sequedad. El aceite obtenido se redisolvió en acetato de etilo (25 mL), se le agregaron 25 mL de una disolución acuosa de NaHSO_3 al 10% y se agitó durante toda la noche para retirar el exceso de aldehído. Transcurrido este tiempo, la mezcla se diluyó con 30 mL de acetato de etilo y la fase orgánica se lavó agua (5 x 30 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y se evaporó a sequedad. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna para generar el correspondiente 23E-bencilidenespirostano monoacetoxilado.

La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 2-acetoxibenzaldehído (**134**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 3.5 h) generó una mezcla de los productos **137** y **127a** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (25 g). El crudo de reacción se fijó con 2 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 95/5 hasta obtener el primer producto y se continuó con 8/1 para generar:



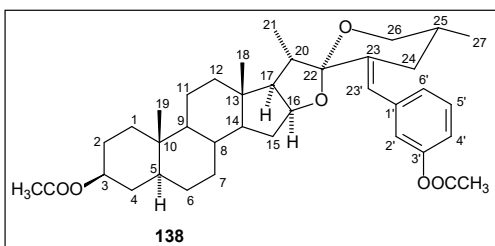
Diacetato de [23(23')E,25R]-23(23')-2'-hidroxibenciliden-5 α -espirostan-3 β -ol (137).

Rendimiento: 355.2 mg (59%). P.f. 188.2–190.0 °C (*recristalizado de hexano/acetato de etilo*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.29 (m, 1H, H-5'), 7.24 –

7.19 (m, 2H, H-4' and H-6'), 7.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-3'), 6.35 (s, 1H, H-23'), 4.68 (tq, $J = 9.9, 5.0$ Hz, 1H, H-3), 4.43 (dt, $J = 8.8, 6.9$ Hz, 1H, H-16), 3.60 – 3.46 (m, 2H, H-26), 2.57 (p, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-20), 2.46 (dd, $J = 13.3, 3.5$ Hz, 1H, H-24eq.), 2.24 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.01 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.07 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.76 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.1 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 40.9 C-13, 56.2 C-14, 31.6 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.3 C-19, 36.9 C-20, 14.7 C-21, 110.1 C-22, 139.2 C-23, 33.4 C-24, 33.1 C-25, 66.0 C-26, 17.1 C-27, 117.4 C-23', 130.3 C-1', 148.7 C-2', 122.0 C-3', 125.7 C-4', 128.1 C-5', 130.6 C-6', 21.4, 20.8 CH_3 acetilo, 170.7, 169.0 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{O}_6$ 605.3799 (MH^+) calculado 605.3842.

3-monoacetato de (22R,25R)-16 β :22-epoxi-22,2'-espiro-[cromeno]-5 α -colestano-3 β ,26-diol (127a). Rendimiento: 70.2 mg (13%). Idéntico al descrito en la sección 4.1.

La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 3-acetoxibenzaldehído (**135**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 2 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (25 g). El producto se fijó con 2 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo 95/5 para generar 417.4 mg (69%) de:



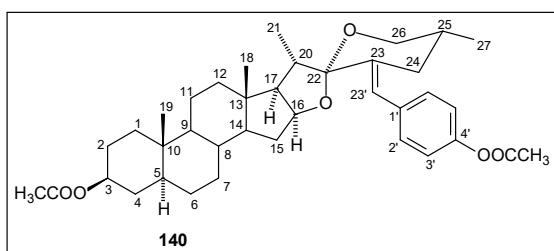
Diacetato de [23(23')E,25R]-23(23')-3'-hidroxibenciliden-5 α -espirostan-3 β -ol (138). P.f.

160.3– 161.1 °C (*recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.33 (dd, $J = 8.8,$

7.7 Hz, 1H, H-5'), 7.09 (dt, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1H, H-6'), 6.97 – 6.90 (m, 2H, H-2' and H-4'), 6.53 (m, 1H, H-23'), 4.68 (tt, $J = 11.5, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.42 (dt, $J = 8.9, 7.0$ Hz, 1H, H-16), 3.61 – 3.48 (m, 2H, H-26), 2.75 (dd, $J = 13.4, 4.0$ Hz, 1H, H-24eq.), 2.55 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.29 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.09 (ddd, $J = 13.5, 11.8, 1.9$ Hz, 1H, H-24ax.), 2.01 (s,

3H, 3H, CH₃ acetilo), 1.88 (dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 1H, H-17), 1.08 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27), 0.68 (ddd, *J* = 12.3, 10.4, 4.1 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.5 C-2, 73.7 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.2 C-12, 40.8 C-13, 56.2 C-14, 31.6 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.7 C-18, 12.3 C-19, 37.3 C-20, 14.8 C-21, 110.4 C-22, 138.2 C-23, 32.9 C-24, 33.2 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 122.0 C-23', 138.7 C-1', 122.2 C-2', 150.5 C-3', 119.7 C-4', 129.1 C-5', 126.6 C-6', 21.5, 21.2 CH₃ acetilo, 170.7, 169.5 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₆ 605.3823 (MH⁺) calculado 605.3842.

La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 4-acetoxibenzaldehído (**136**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 2.5 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (25 g). El producto se fijó con 2 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 95/5 para generar 276.7 mg (46%) de:



Diacetato de [23(23')E,25R]-23(23')-4'-hidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (140). P.f. 247.6–248.4 °C (*recristalizado de CH₂Cl₂/acetato de etilo*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.22

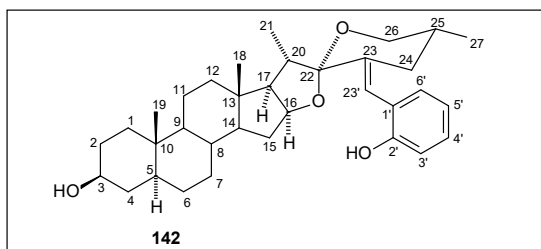
(d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-3' and H-5'), 6.53 (s, 1H, H-23'), 4.69 (tt, *J* = 11.4, 4.9 Hz, 1H, H-3), 4.43 (dt, *J* = 8.9, 7.0 Hz, 1H, H-16), 3.63 – 3.50 (m, 2H, H-26), 2.76 (ddd, *J* = 13.4, 4.5, 1.3 Hz, 1H, H-24eq.), 2.56 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.30 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.09 (ddd, *J* = 13.5, 11.7, 1.9 Hz, 1H, H-24ax.), 1.09 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.82 (s, 1H, H-18), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27), 0.74 – 0.62 (m, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.5 C-2, 73.7 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.2 C-12, 40.8 C-13, 56.2 C-14, 31.6 C-15, 80.6 C-16, 61.6 C-17, 16.7 C-18, 12.3 C-19, 37.3 C-20, 14.8 C-21, 110.5 C-22, 137.6 C-23, 32.9 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 122.0 C-23', 134.8 C-1', 130.2 C-2', 121.2 C-3', 149.2 C-4', 21.5, 21.2 CH₃ acetilo, 170.7, 169.5 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₆ 605.3952 (MH⁺) calculado 605.3842.

5.1.3. Saponificación de los derivados monoacetoxi-bencilidenespirostanos.

Procedimiento general para la saponificación de los 23E-bencilidenespirostanos monoacetoxilados.

A una suspensión de acetoxi-bencilidentigogenina (0.165 mmol) en dioxano (5 mL) y metanol (10 mL) se le adicionó KOH (600 mg) y la mezcla se agitó hasta que la reacción concluyó (CCD hexano/acetato de etilo 2/1). Al consumirse la materia prima, se evaporaron los disolventes volátiles y se le adicionó agua (10 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3x15 mL). La fase orgánica se lavó con agua (3x15 mL) se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó. El crudo se purificó por cromatografía en columna para generar los hidroxibencilidenespirostanos correspondientes.

La reacción con acetato del 2'-acetoxi-bencilidentigogenina (**137**) (400 mg, 0.661 mmol) (tiempo de reacción 3.5 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (25 g). El crudo de reacción se fijó con 4 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 2/1 para generar 321.5 mg (94%) de:

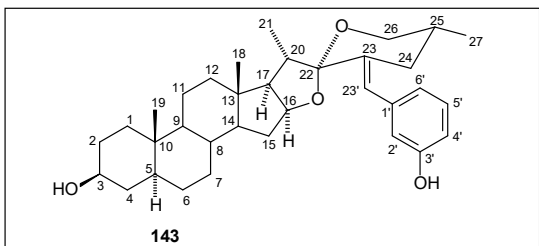


[23(23')E,25R]-23(23')-2'-hidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (142). P.f. 190.6–191.7 °C (*Sólido amorfo, recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.19 (ddd, *J*=8.6, 7.5, 1.7 Hz, 1H, H-5'), 7.07 (dd, *J*=7.6, 1.7 Hz, 1H, H-6'),

6.94 – 6.85 (m, 2H, H-3' y H-4'), 6.45 (s, 1H, H-23'), 4.45 (dt, *J*=9.1, 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.67 – 3.58 (m, 1H, H-3), 3.58 – 3.52 (m, 2H, H-26), 2.62 (p, *J*=6.9 Hz, 1H, H-20), 2.47 – 2.35 (m, 1H, H-24), 1.11 (d, *J*=6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 6H, H-18 y H-19), 0.79 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 37.0 C-1, 28.6 C-2, 71.3 C-3, 38.1 C-4, 44.8 C-5, 31.5 C-6, 32.3 C-7, 35.0 C-8, 54.4 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.2 C-12, 40.8 C-13, 56.3 C-14, 31.6 C-15, 80.7 C-16, 61.6 C-17, 16.7 C-18, 12.4 C-19, 37.4 C-20, 14.8 C-21, 110.1 C-22, 141.1 C-23, 33.5 C-24, 33.2 C-25, 65.3 C-26, 17.1 C-27, 117.1 C-23', 123.0 C-1', 152.9 C-2', 115.4 C-3', 120.2 C-4', 128.8 C-5', 129.9 C-6'. HRMS (APCI) Observado C₃₄H₄₉O₄ 521.3654 (MH⁺) calculado 521.3631.

La reacción con acetato del 3'-acetoxi-bencilidentigogenina (**138**) (200 mg, 0.33 mmol) (tiempo de reacción 3 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (9 g). El

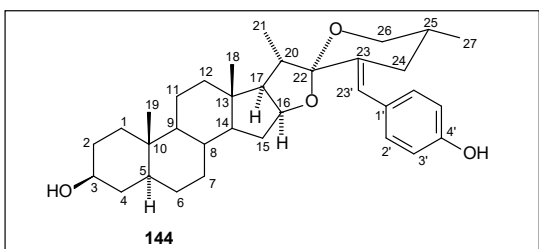
crudo de reacción se fijó con 0.9 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 4/1 para generar 131.3 mg (76%) de:



[23(23')E,25R]-23(23')-3'-hidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (143). P.f. 232.4–232.8 °C (*Sólido amorfo, recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.67 – 6.57 (m, 3H, H-2', H-4' y H-6'),

6.46 (s, 1H, H-23'), 4.31 (q, *J* = 7.5, 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.49 (dd, *J* = 10.6, 4.9 Hz, 1H, H-26a), 2.77 – 2.68 (m, 1H, H-24a), 2.55 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-20), 1.01 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H-21), 0.76 (t, *J* = 6.0 Hz, 9H, H-18, H-19, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 36.7 C-1, 28.3 C-2, 69.3 C-3, 38.2 C-4, 44.4 C-5, 31.4 C-6, 31.9 C-7, 34.6 C-8, 53.9 C-9, 35.2 C-10, 20.7 C-11, 39.7 C-12, 40.4 C-13, 55.7 C-14, 31.2 C-15, 79.9 C-16, 61.4 C-17, 16.3 C-18, 12.2 C-19, 36.6 C-20, 15.1 C-21, 109.8 C-22, 137.7 C-23, 32.9 C-24, 32.7 C-25, 65.2 C-26, 17.1 C-27, 122.1 C-23', 136.7 C-1', 119.7 C-2', 157.2 C-3', 113.8 C-4', 129.3 C-5', 115.6 C-6'. HRMS (APCI) Observado C₃₄H₄₉O₄ 521.3698 (MH⁺) calculado 521.3631.

La reacción con acetato del 4'-acetoxi-bencilidentigogenina (**140**) (100 mg, 0.165 mmol) (tiempo de reacción 1.5 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (10 g). El crudo de reacción se fijó con 0.85 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 4/1 para generar 86.7 mg (100%) de:



[23(23')E,25R]-23(23')-4'-hidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (144). P.f. 255.3–256.8 °C (*Sólido amorfo, recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2'), 6.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3'), 6.43 (s, 1H,

H-23'), 4.30 (dt, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H, H-16), 3.48 (dd, *J* = 10.5, 4.5 Hz, 1H, H-26ax.), 3.40 (t, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-26eq.), 2.73 (dd, *J* = 13.8, 3.1 Hz, 1H, H-24a), 2.55 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-20), 1.01 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.75 (t, *J* = 5.7 Hz, 9H, H-18, H-19 y H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 36.6 C-1, 28.3 C-2, 69.3 C-3, 38.2 C-4, 44.4 C-5, 31.4 C-6, 31.9 C-7, 34.6 C-8, 53.8 C-9, 35.2 C-10, 20.7 C-11, 39.7 C-12, 40.3 C-13, 55.6 C-14, 31.2 C-15, 79.7 C-16, 61.4 C-17, 16.3 C-18, 12.2 C-19,

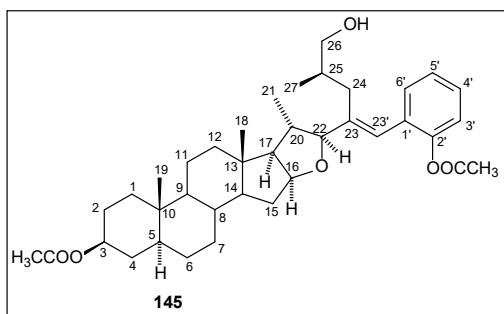
36.5 C-20, 15.0 C-21, 109.9 C-22, 134.7 C-23, 32.6 C-24, 32.7 C-25, 65.2 C-26, 17.2 C-27, 121.8 C-23', 127.0 C-1', 130.2 C-2', 115.0 C-3', 156.2 C-4'. HRMS (APCI) Observado $C_{34}H_{49}O_4$ 521.3717 (MH^+) calculado 521.3631.

5.2. Estudio de las reducciones de los bencilidenespirostanos monoacetoxilados derivados de la tigogenina.

5.2.1. Reducción con $NaBH_3CN$ en ácido acético.

Procedimiento general para la reducción con $NaBH_3CN$ en ácido acético de los 23E-bencilidenespirostanos monoacetoxilados. A una disolución de acetato de acetoxi-bencilidenespirostanos (0.5 mmol) en ácido acético (5 mL) y CH_2Cl_2 (2 mL), se le agregó $NaBH_3CN$ (94.5 mg, 1.5 mmol) y la mezcla se agitó hasta desaparición de la materia prima (30 minutos, CCD hexano/acetato de etilo, 4/1 x2). Al concluir, la mezcla de reacción se vertió sobre agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL). La fase orgánica se lavó con agua (5 x 30 mL) y con disolución saturada de NaCl (3 x 20 mL), se secó y se evaporó. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (15 g). El producto crudo se fijó en 1 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 15/1 para obtener los correspondientes 23E-bencilidenfurostano y 23-bencil-espirostanos monoacetoxilados.

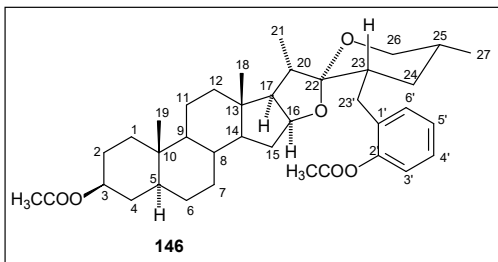
La reacción con acetato de 2'-acetoxi-bencilidentigogenina (**137**) (302.4 mg, 0.5 mmol) generó:



3-monoacetato de [23(23')E,22S,25R]-23(23')-2'-acetoxibenciliden-5 α -furostan-3 β ,26-diol (**145**).

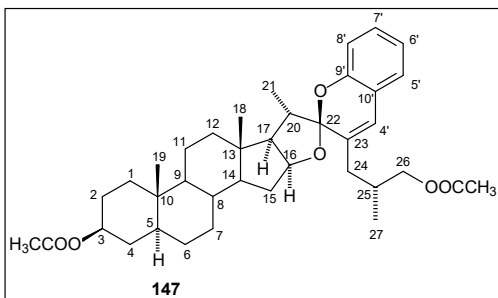
Rendimiento: 161.7 mg (53%). P.f. 71.4 – 72.4 °C (recristalizado de acetato de etilo/metanol). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.34 (dd, $J = 7.5, 1.8$ Hz, 1H, H-6'), 7.27 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H, H-5'), 7.19 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H, H-4'), 7.04 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, H-3'), 6.35 (s, 1H, H-23'), 4.68 (tt, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.47 – 4.32 (m, 1H, H-16), 3.88 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-22), 3.55 – 3.46 (m, 1H, H-26a), 3.18 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H-26b), 2.33 (ddd, $J = 14.1, 5.4, 1.8$ Hz, 1H, H-24a), 2.25 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.11 (dd, $J = 14.0, 10.3$ Hz, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.02 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H-21), 0.89

(s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.77 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.0 C-7, 35.0 C-8, 54.1 C-9, 35.5 C-10, 20.8 C-11, 39.7 C-12, 41.4 C-13, 56.7 C-14, 31.8 C-15, 83.7 C-16, 63.9 C-17, 16.9 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 17.8 C-21, 96.0 C-22, 141.4 C-23, 29.9 C-24, 34.6 C-25, 65.4 C-26, 18.0 C-27, 123.3 C-23', 130.7 C-1', 148.2 C-2', 122.3 C-3', 128.1 C-4', 125.9 C-5', 129.6 C-6', 21.4, 20.9 CH_3 acetilo, 170.6, 169.0 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{O}_6$ 607.3990 (MH^+) calculado 607.3999.



Diacetato de (23S,25R)-23-bencil-5 α -spirostan-3,2'-diol (146). Rendimiento: 35.3 mg (12%). P.f. 158.1 – 159.4 $^{\circ}\text{C}$ (recristalizado de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.23 (ddd, $J = 7.9, 6.6, 2.5$ Hz, 1H, H-5'), 7.20 – 7.12 (m, 2H, H-4' y H-6'), 7.03 (dt,

$J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H, H-3'), 4.68 (tt, $J = 11.4, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.41 (dt, $J = 8.7, 7.0$ Hz, 1H, H-16), 3.42 (ddd, $J = 10.9, 4.6, 1.9$ Hz, 1H, H-26a), 3.28 (dd, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-26b), 2.89 (dd, $J = 13.7, 3.0$ Hz, 1H, H-24a), 2.38 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.32 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.30 – 2.22 (m, 1H, H-24b), 2.01 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.71 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.0 C-13, 56.1 C-14, 31.6 C-15, 80.8 C-16, 61.7 C-17, 16.8 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 14.7 C-21, 110.0 C-22, 38.7 C-23, 32.0 C-24, 30.6 C-25, 66.0 C-26, 16.9 C-27, 34.3 C-23', 132.5 C-1', 149.2 C-2', 122.3 C-3', 125.8 C-4', 127.1 C-5', 131.6 C-6', 21.4, 21.0 CH_3 acetilo, 170.7, 169.3 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{O}_6$ 607.3922 (MH^+) calculado 607.3999.

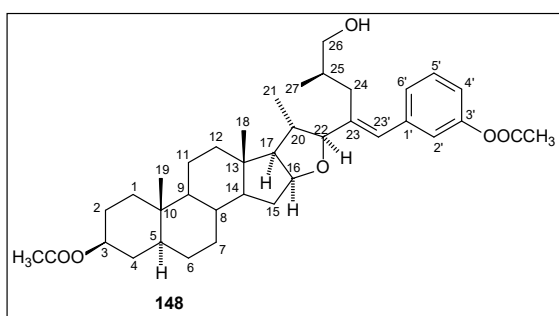


Diacetato de (22S,25R)-16 β :22-epoxi-22,2'-espiro[cromeno]-5 α -colestan-3 β ,26-diol (147).

Rendimiento: 29.5 mg (13%). P.f. 173.7 – 174.9 $^{\circ}\text{C}$ (recristalizado de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.17 – 7.09 (m, 1H, H-7'), 7.05 (dd, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H, H-5'), 6.92 – 6.85 (m, 2H, H-6' y H-8'), 6.45 (s, 1H, H-4'), 4.68 (ddd, $J = 13.5, 10.3, 6.7$ Hz, 2H, H-3 y H-16), 3.97 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-26), 2.60 – 2.44 (m, 2H, H-20 y H-24a), 2.13 (dd, $J = 9.3, 7.7$ Hz, 1H, H-17), 2.07 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-16), 0.98 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H-27), 0.87 (s, 3H, H-

18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.76 – 0.66 (m, 1H, H-9). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.2 C-7, 34.8 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.2 C-12, 41.0 C-13, 56.0 C-14, 31.6 C-15, 82.4 C-16, 60.5 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 39.6 C-20, 14.6 C-21, 112.8 C-22, 130.3 C-23, 36.8 C-24, 31.8 C-25, 69.3 C-26, 16.4 C-27, 125.8 C-4', 126.1 C-5', 121.0 C-6', 128.5 C-7', 115.7 C-8', 151.4 C-9', 121.1 C-10', 21.4, 20.9 CH_3 acetilo, 170.7, 171.1 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{O}_6$ 605.3852 (MH^+) calculado 605.3842.

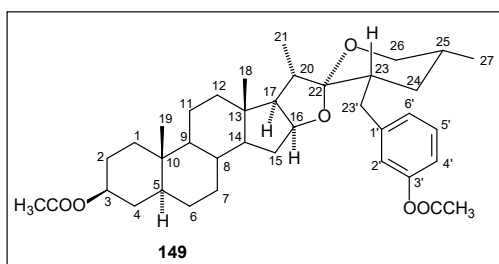
La reacción con acetato de 3'-acetoxi-bencilidentigogenina (**138**) (302.4 mg, 0.5 mmol) generó:



3-monoacetato de [23(23')E,22S,25R]-23(23')-3'-acetoxibenciliden-5 α -furostan-3 β ,26-diol (148**).**

Rendimiento: 197.2 mg (65%). P.f. 72.8 – 73.7 °C (*recristalizado de acetato de etilo/metanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.32 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5'), 7.16 (dt, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.07

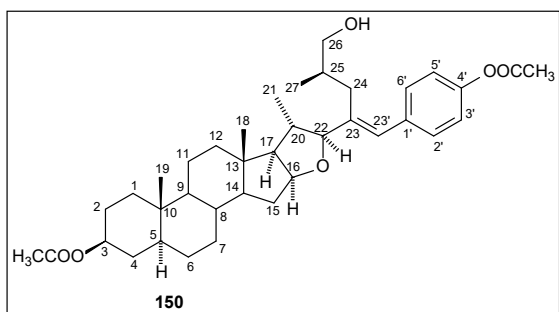
(t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.93 (ddd, $J = 8.1, 2.4, 1.0$ Hz, 1H, H-4'), 6.43 (s, 1H), 4.68 (tt, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H-3'), 4.42 – 4.35 (m, 1H, H-26), 3.86 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-22), 3.54 (dd, $J = 11.6, 3.1$ Hz, 1H, H-26a), 3.19 (dd, $J = 11.5, 4.1$ Hz, 1H, H-26b), 2.48 (ddd, $J = 14.4, 4.9, 1.9$ Hz, 1H, H-24a), 2.29 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.22 (dd, $J = 14.3, 10.6$ Hz, 1H, H-24b), 2.13 – 2.03 (m, 1H, H-15a), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.00 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H-21), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-27), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.67 (ddd, $J = 12.2, 10.3, 4.2$ Hz, 1H, H-9). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.0 C-7, 35.0 C-8, 54.1 C-9, 35.6 C-10, 20.8 C-11, 39.7 C-12, 41.4 C-13, 56.7 C-14, 31.8 C-15, 83.6 C-16, 63.8 C-17, 17.0 C-18, 12.2 C-19, 37.0 C-20, 17.7 C-21, 96.8 C-22, 140.3 C-23, 29.9 C-24, 34.4 C-25, 65.5 C-26, 18.0 C-27, 127.7 C-23', 139.0 C-1', 121.7 C-2', 150.6 C-3', 119.7 C-4', 129.2 C-5', 126.1 C-6', 21.4, 21.1 CH_3 acetilo, 170.7, 169.4 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{O}_6$ 607.4010 (MH^+) calculado 607.3999.



Diacetato de (23S,25R)-23-bencil-5 α -epirostan-3,3'-diol (149**).** Rendimiento: 52.9 mg (17%). P.f. 180.5 – 182.0 °C (*recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 7.01 (dt, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H, H-6'), 6.92 (ddd, $J = 8.1,$

2.4, 1.0 Hz, 1H, H-4'), 6.86 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 4.68 (tt, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.40 (dt, $J = 8.9, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.43 (ddd, $J = 10.8, 4.6, 2.0$ Hz, 1H, H-26a), 3.29 (dd, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-26b), 2.97 (dd, $J = 13.8, 3.3$ Hz, 1H, H-24a), 2.42 – 2.31 (m, 2H, H-20 y H-24b), 2.30 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.82 (dd, $J = 9.0, 7.1$ Hz, 1H, H-17), 0.99 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.79 (s, 3H, H-18), 0.71 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.0 C-13, 56.1 C-14, 31.5 C-15, 80.8 C-16, 61.6 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 14.4 C-21, 110.1 C-22, 40.1 C-23, 37.0 C-24, 30.7 C-25, 65.9 C-26, 16.9 C-27, 34.2 C-23', 142.7 C-1', 122.0 C-2', 150.6 C-3', 119.0 C-4', 129.1 C-5', 126.6 C-6', 21.4, 21.2 CH₃ acetilo, 170.7, 169.5 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₅O₆ 607.4011 (MH⁺) calculado 607.3999.

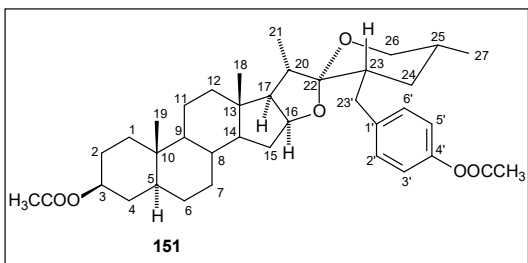
La reacción con acetato de 4'-acetoxi-bencilidentigogenina (**140**) (302.4 mg, 0.5 mmol) generó:



3-monoacetato de [23(23')E,22S,25R]-23(23')-4'-acetoxibenciliden-5α-furostan-3β,26-diol (150).

Rendimiento: 161.8 mg (53%). P.f. 91.8 – 93.0 °C (recristalizado de acetato de etilo/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.32 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 7.04 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-3' y H-5')

6.41 (s, 1H, H-23'), 4.67 (tt, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.42 – 4.34 (m, 1H, H-16), 3.85 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-22), 3.54 (dd, $J = 11.6, 3.0$ Hz, 1H, H-26a), 3.19 (dd, $J = 11.5, 3.9$ Hz, 1H, H-26b), 2.49 (ddd, $J = 14.2, 4.8, 1.9$ Hz, 1H, H-24a), 2.28 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.20 (dd, $J = 14.3, 10.8$ Hz, 1H, H-24b), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetilo), 0.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H-21), 0.90 (s, 3H, H-27), 0.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.66 (ddd, $J = 12.2, 10.3, 4.2$ Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.0 C-7, 35.0 C-8, 54.1 C-9, 35.5 C-10, 20.8 C-11, 39.7 C-12, 41.4 C-13, 56.7 C-14, 31.8 C-15, 83.6 C-16, 63.8 C-17, 18.2 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 17.7 C-21, 97.1 C-22, 139.3 C-23, 29.9 C-24, 34.3 C-25, 65.4 C-26, 17.0 C-27, 127.8 C-23', 135.1 C-1', 129.6 C-2', 121.4 C-3', 149.2 C-4', 21.4, 21.1 CH₃ acetilo, 170.6, 169.4 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₅O₆ 607.4029 (MH⁺) calculado 607.3999.



Diacetato de (23S,25R)-23-bencil-5α-espirostan-3,4'-diol (151). Rendimiento: 71.9 mg (24%). P.f.

188.1 – 188.9 °C (*recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3' y H-

5'), 4.68 (tt, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 1H, H-3), 4.40 (dt, *J* = 8.9, 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.43 (ddd, *J* = 10.8, 4.6, 1.9 Hz, 1H, H-26a), 3.29 (t, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-26b), 2.95 (dd, *J* = 13.9, 3.3 Hz, 1H, H-24a), 2.41 – 2.31 (m, 2H, H-20 y H-24b), 2.29 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetilo), 0.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.71 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.0 C-13, 56.1 C-14, 31.5 C-15, 80.8 C-16, 61.6 C-17, 16.8 C-18, 12.3 C-19, 36.9 C-20, 14.4 C-21, 111.1 C-22, 40.3 C-23, 36.6 C-24, 30.7 C-25, 66.0 C-26, 17.0 C-27, 34.3 C-23', 138.4 C-1', 129.9 C-2', 121.2 C-3', 148.7 C-4', 21.5, 21.2 CH₃ acetilo, 170.6, 169.6 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₅O₆ 607.4001 (MH⁺) calculado 607.3999.

5.2.2. Hidrogenación catalítica.

Procedimiento general para la reducción con catalítica de los 23E-bencilidenespirostanos monoacetoxilados. A una disolución purgada de acetato de acetoxi-bencilidentigogenina (1 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) y etanol (35.4 mL), se le añadió paladio sobre carbono (Pd/C) (60.4 mg, 10% p/p), se purgó nuevamente y se agitó bajo atmósfera de H₂ a temperatura ambiente durante 24 horas (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2). Una vez consumida la materia prima, se retiraron los disolventes volátiles. El producto crudo se purificó inmediatamente por cromatografía en columna, usando como soporte sílica gel (25 g) y la mezcla de reacción se fijó en sílica gel (4 g). Se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 12/1 para generar el correspondiente acetoxi-bencilspirostano deseado.

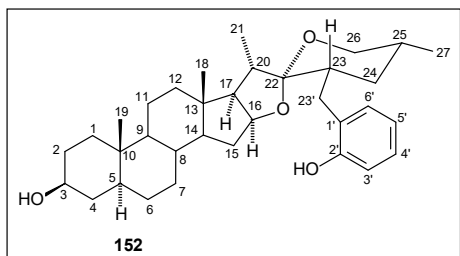
La reacción con acetato de 2'-acetoxi-bencilidentigogenina (**137**) (604.8 mg, 1 mmol) generó 551.5 mg (91%) de **diacetato de (23S,25R)-23-bencil-5α-espirostan-3,2'-diol (146)** idéntico al descrito en la sección 5.2.1.

La reacción con acetato de 3'-acetoxi-bencilidentigogenina (**138**) (604.8 mg, 1 mmol) generó 554.8 mg (91%) de **diacetato de (23S,25R)-23-bencil-5 α -espirostan-3,3'-diol (149)** idéntico al descrito en la sección sección **5.2.1**.

La reacción con acetato de 2'-acetoxi-bencilidentigogenina (**140**) (604.8 mg, 1 mmol) generó 575.4 mg (95%) de **diacetato de (23S,25R)-23-bencil-5 α -espirostan-3,4'-diol (151)** idéntico al descrito en la sección sección **5.2.1**.

5.2.3. Saponificación de los monoacetoxi-bencilespirostanos.

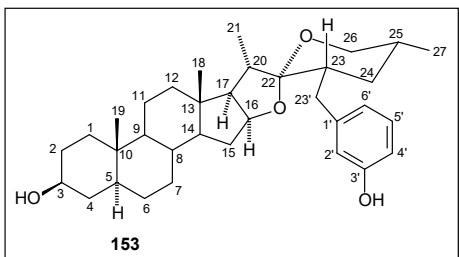
Procedimiento general para la saponificación de los 23E-bencilespirostanos monoacetoxilados. A una disolución de acetoxi-benciltigogenina (0.165 mmol) en dioxano (5 mL) y metanol (10 mL) se le adicionó KOH (600 mg) y la mezcla se agitó hasta que la reacción concluyó (CCD hexano/acetato de etilo 1/1). Al consumirse la materia prima, se evaporaron los disolventes volátiles y se le adicionó agua (10 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3x15 mL). La fase orgánica se lavó con agua (3x15 mL) se secó (Na₂SO₄ anh.) y evaporó, para generar los hidroxibencilespirostanos correspondientes puros.



La reacción con el acetato de 2'-acetoxi-benciltigogenina (**146**) (100 mg, 0.165 mmol, tiempo de reacción 3.0 h) generó 82.2 mg (95%) de: **(23S,25R)-23-bencil-5 α -espirostan-3,4'-diol (152)**. P.f. 306.7 – 307.5 °C (*Sólido amorfo, recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H

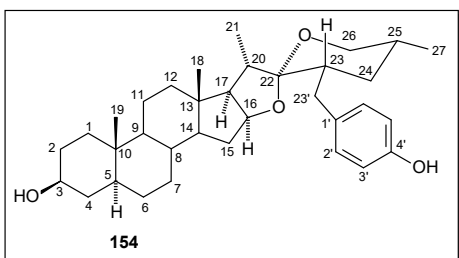
(400 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ ppm: 6.82 – 6.74 (m, 2H, H-4' y H-6'), 6.51 (ddt, $J = 7.0, 5.4, 2.1$ Hz, 2H, H-3' y H-5'), 4.17 (dt, $J = 9.0, 7.2$ Hz, 1H, H-16), 3.29 (tt, $J = 10.7, 4.7$ Hz, 1H, H-3), 3.17 (ddd, $J = 10.8, 4.6, 1.9$ Hz, 1H, H-26a), 3.03 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-26b), 2.80 (dd, $J = 13.2, 3.1$ Hz, 1H, H-23'a), 2.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-20), 1.98 (dd, $J = 13.2, 10.4$ Hz, 1H, H-23'b), 0.75 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.61 (s, 3H, H-18), 0.58 (s, 3H, H-19), 0.47 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ ppm: 36.7 C-1, 30.7 C-2, 70.6 C-3, 37.4 C-4, 44.6 C-5, 28.6 C-6, 32.0 C-7, 34.7 C-8, 54.1 C-9, 35.3 C-10, 20.8 C-11, 39.9 C-12, 40.8 C-13, 56.0 C-14, 31.2 C-15, 80.7 C-16, 61.2 C-17, 16.4 C-18, 12.0 C-19, 36.5 C-20, 13.9 C-21, 111.9 C-22, 37.8 C-23, 33.9 C-24, 30.5 C-25, 65.9 C-26 ,

16.6 C-27, 31.6 C-23', 126.9 C-1', 154.9 C-2', 114.7 C-3', 126.8 C-4', 118.9 C-5', 131.1 C-6'. HRMS (APCI) Observado $C_{34}H_{51}O_4$ 523.3783 (MH^+) calculado 523.3787.



La reacción con el acetato de 3'-acetoxi-benciltigogenina (**149**) (100 mg, 0.165 mmol, tiempo de reacción 3.0 h) generó 87.3 mg (>99%) de: **(23S,25R)-23-bencil-5α-epiostan-3,3'-diol (153)**. P.f. 268.2 – 269.5 °C (recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ ppm: 7.08 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-5'), 6.72 – 6.53 (m, 3H, H-2', H-4' y H-6'), 4.37 (dt, $J = 9.0, 7.2$ Hz, 1H, H-16), 3.54 (tt, $J = 11.2, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 3.40 (ddd, $J = 11.3, 4.8, 2.0$ Hz, 1H, H-26a), 3.25 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-26b), 2.88 (dd, $J = 13.7, 3.4$ Hz, 1H, H-23'a), 2.34 (q, $J = 5.3, 3.5$ Hz, 1H, H-20), 2.22 (dd, $J = 13.6, 10.7$ Hz, 1H, H-23'b), 0.96 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.77 (s, 3H, H-18), 0.68 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27).

RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ ppm: 36.8 C-1, 31.1 C-2, 71.0 C-3, 37.8 C-4, 44.7 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.5 C-10, 21.0 C-11, 40.0 C-12, 41.0 C-13, 56.1 C-14, 31.4 C-15, 80.8 C-16, 61.4 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 36.8 C-20, 14.2 C-21, 111.4 C-22, 40.0 C-23, 34.1 C-24, 30.6 C-25, 65.9 C-26, 16.8 C-27, 37.0 C-23', 142.5 C-1', 115.9 C-2', 156.4 C-3', 112.6 C-4', 129.2 C-5', 120.6 C-6'. HRMS (APCI) Observado $C_{34}H_{51}O_4$ 523.3781 (MH^+) calculado 523.3787.



La reacción con el acetato de 4'-acetoxibencil tigogenina (**151**) (100 mg, 0.165 mmol, tiempo de reacción 22.5 h) generó 88.5 mg (>99%) de: **(23S,25R)-23-bencil-5α-epiostan-3,4'-diol (154)**. P.f. 217.0 – 217.8 °C (recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ ppm: 6.93 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.73 – 6.68 (m, 2H, H-3 y H-5'), 4.36 (dt, $J = 9.0, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.57 – 3.47 (m, 1H, H-3), 3.38 (ddt, $J = 9.5, 4.9, 2.5$ Hz, 1H, H-26a), 3.24 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-26b), 2.84 (dd, $J = 13.9, 3.4$ Hz, 1H, H-23'a), 2.34 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.19 (dd, $J = 13.8, 10.7$ Hz, 1H, H-23'b), 0.94 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.77 (s, 3H, H-19), 0.76 (s, 3H, H-18), 0.67 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27).

RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ ppm: 36.8 C-1, 31.1 C-2, 71.0 C-3, 37.8 C-4, 44.7 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.9 C-8, 54.2 C-9, 35.5 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.0 C-13, 56.1 C-14, 31.4 C-15, 80.8 C-16, 61.4 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 36.8 C-20, 14.2 C-

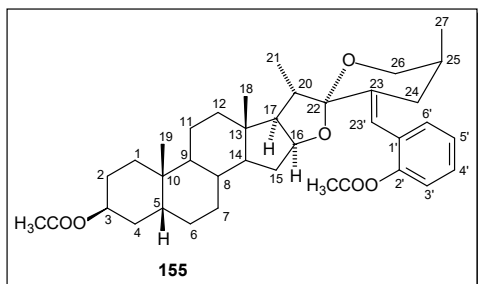
21, 111.5 C-22, 40.4 C-23, 34.1 C-24, 30.6 C-25, 65.9 C-26, 16.9 C-27, 36.1 C-23', 131.8 C-1', 129.9 C-2', 114.9 C-3', 154.5 C-4'. HRMS (APCI) Observado $C_{34}H_{51}O_4$ 523.3783 (MH^+) calculado 523.3787.

5.4. Extensión de la síntesis de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos a otras sapogeninas esteroidales.

Para la síntesis de los 23E-bencilidenespirostanos monohidroxilados derivados de otras sapogeninas esteroidales, se aplicó exactamente el mismo procedimiento optimizado descrito en la sección 5.1.2. para el acetato de tigogenina. Del mismo modo, los hidroxibenzaldehídos acetilados se obtuvieron por el método con Ac_2O y $NaHCO_3$ descrito en la sección 5.1.2.

5.4.1. Obtención de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la sarsasapogenina.

La reacción entre el acetato de sarsasapogenina (**64b**) (458.7 mg, 1 mmol) y el 2-acetoxibenzaldehído (**134**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 1.5 h) generó una mezcla de los productos **155** y **128b** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (28 g). La mezcla se fijó con 2.5 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo 15/1 hasta salir el primer producto y se continuó con 12/1 para obtener:



Diacetato de [23(23')E,25S]-23(23')-2'-hidroxibenciliden-5 β -espirostan-3 β -ol (**155**).

Rendimiento: 357.1 mg (59%). P.f. 120.5–121.4 °C (recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.30 – 7.17 (m, 3H, H-4', H-5' Y H-6'), 7.05 (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H, H-3'), 6.50 (s, 1H, H-23'), 5.09 –

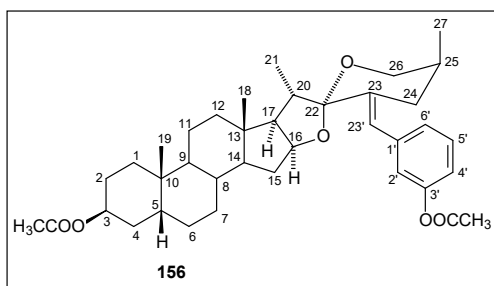
5.06 (m, 1H, H-3), 4.51 – 4.42 (m, 1H, H-16), 4.05 (dd, $J = 11.0, 3.7$ Hz, 1H, H-26a), 3.31 (dt, $J = 11.0, 1.8$ Hz, 1H, H-26b), 2.60 (ddd, $J = 13.6, 5.5, 1.8$ Hz, 1H, H-24a), 2.51 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.25 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.05 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.10 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.94 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-27), 0.83 (s, 3H, H-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 30.7 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 31.7 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.4 C-7, 35.3 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.0 C-13, 56.3 C-14, 30.6 C-15, 80.9 C-16, 61.8 C-17, 16.7 C-18, 23.9 C-19, 38.7 C-20, 14.6 C-21, 110.9 C-22, 138.3 C-23, 31.3 C-24, 30.4 C-25, 65.0 C-26, 17.6 C-27, 119.6 C-23', 130.3 C-1', 148.7 C-2',

122.0 C-3', 128.1 C-4', 125.7 C-5', 130.6 C-6', 21.5, 20.8 CH₃ acetilo, 170.7, 169.0 C=O acetilo.
HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₆ 605.3799 (MH⁺) calculado 605.3842.

3-monoacetato de (22S,25S)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro-[cromeno]-5β-colestan-3β,26-diol (128b).

Rendimiento: 85.6 mg (15%). Idéntico al descrito en la sección 4.1.

La reacción entre el acetato de sarsasapogenina (**64b**) (458.7 mg, 1 mmol) y 3-acetoxibenzaldehído (**135**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 1.0 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (25 g). El crudo se fijó con 2.5 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo 15/1 y generó 509.2 mg (84%) de:



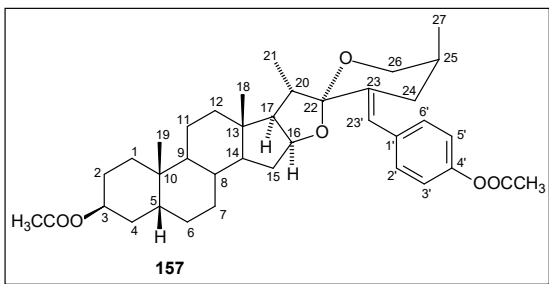
Diacetato de [23(23')E,25S]-23(23')-3'-hidroxibenciliden-5β-espirostan-3β-ol (156). P.f.

173.5–174.9 °C (*recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*).

RMN de ¹H (400 MHz, benceno-*d*₆) δ ppm: 7.11 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-2'), 7.06 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.99 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-6'), 6.94 (ddd, *J* = 8.0, 2.4, 1.2 Hz, 1H, H-

4'), 5.22 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-3), 4.69 (ddd, *J* = 8.8, 7.5, 6.5 Hz, 1H, H-16), 4.19 (dd, *J* = 10.9, 3.7 Hz, 1H, H-26a), 3.32 (dt, *J* = 10.9, 1.7 Hz, 1H, H-26b), 2.86 (ddd, *J* = 13.5, 5.5, 1.7 Hz, 1H, H-24a), 2.69 (p, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-20), 2.44 (dd, *J* = 13.6, 3.7 Hz, 1H, H-24b), 2.08 – 1.96 (m, 2H, H-15a y H-17), 1.77 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.75 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.95 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-27), 0.89 (d, *J* = 1.7 Hz, 6H, H-18 y H-19). RMN de ¹³C (100 MHz, benceno-*d*₆) δ ppm: 31.2 C-1, 25.3 C-2, 70.6 C-3, 31.0 C-4, 37.8 C-5, 26.6 C-6, 26.8 C-7, 35.5 C-8, 40.1 C-9, 35.2 C-10, 21.2 C-11, 40.6 C-12, 41.6 C-13, 56.5 C-14, 32.1 C-15, 81.3 C-16, 62.8 C-17, 16.8 C-18, 24.1 C-19, 39.3 C-20, 15.4 C-21, 111.4 C-22, 138.4 C-23, 31.4 C-24, 31.2 C-25, 65.1 C-26, 17.9 C-27, 124.1 C-23', 139.3 C-1', 122.9 C-2', 151.4 C-3', 120.2 C-4', 129.3 C-5', 126.7 C-6', 21.1, 20.6 CH₃ acetilo, 169.7, 168.4 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₆ 605.3794 (MH⁺) calculado 605.3842.

La reacción entre el acetato de sarsasapogenina (**64b**) (458.7 mg, 1 mmol) y 4-acetoxibenzaldehído (**136**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 1.0 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (30 g). El crudo se fijó con 3 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo 15/1 y generó 396.1 mg (66%) de:



Diacetato de [23(23')E,25S]-23(23')-4'-hidroxibenciliden-5 β -espirostan-3 β -ol (157).

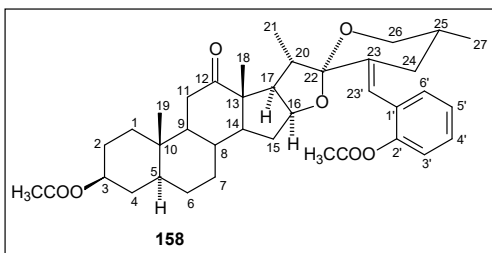
P.f. 175.2–176.2 °C (*recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*).

RMN de ¹H (400 MHz, benceno-*d*₆) δ ppm: 7.13 – 7.09 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.06 – 7.01 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.88 (s, 1H, H-23'), 5.22 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-

3), 4.71 (ddd, *J* = 8.8, 7.6, 6.6 Hz, 1H, H-16), 4.22 (dd, *J* = 10.9, 3.7 Hz, 1H, H-26a), 3.34 (dt, *J* = 10.9, 1.7 Hz, 1H, H-26b), 2.83 (ddd, *J* = 13.5, 5.6, 1.7 Hz, 1H, H-24a), 2.72 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.38 (dd, *J* = 13.2, 4.3 Hz, 1H, H-24b), 2.12 – 1.96 (m, 2H, H, H-15a y H-17), 1.77 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.76 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.39 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.97 – 0.90 (m, 6H, H-18 y H-27), 0.89 (s, 3H, H-19). RMN de ¹³C (100 MHz, benceno-*d*₆) δ ppm: 31.2 C-1, 25.2 C-2, 70.6 C-3, 30.9 C-4, 37.7 C-5, 26.6 C-6, 26.7 C-7, 35.5 C-8, 40.1 C-9, 35.2 C-10, 21.2 C-11, 40.6 C-12, 41.2 C-13, 56.4 C-14, 32.1 C-15, 81.3 C-16, 62.8 C-17, 16.8 C-18, 24.1 C-19, 39.3 C-20, 15.4 C-21, 111.5 C-22, 137.7 C-23, 31.4 C-24, 31.1 C-25, 65.2 C-26, 18.0 C-27, 124.1 C-23', 135.1 C-1', 130.5 C-2', 121.7 C-3', 150.1 C-4', 21.1, 20.6 CH₃ acetilo, 169.7, 168.5 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₃O₆ 605.3750 (MH⁺) calculado 605.3842.

5.4.2. Obtención de los monoacetoxi-bencilidenespirostanos derivados de la hecogenina.

La reacción entre el acetato de hecogenina (**64c**) (472.7 mg, 1 mmol) y 2-acetoxibenzaldehído (**134**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 4.5 h) generó una mezcla de los productos **158** y **159** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (28 g). La mezcla se fijó con 4 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 6/1 hasta obtener el primer producto y se continuó con 4/1 para aislar:



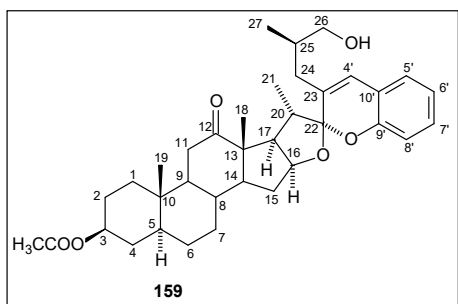
[23(23')E,25R]-23(23')-2'-acetoxibenciliden-3 β -

acetoxi-5 α -espirostan-12-ona (158). Rendimiento:

194.5 mg (31%). P.f. 128.1–129.7 °C (*recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm:

7.29(m, 1H, H-5'), 7.21 (m, 2H, H-4' and H-6'), 7.05 (m, 1H, H-3'), 6.33 (s, 1H, H-23'), 4.68 (tt, *J* = 11.2, 4.9 Hz, 1H, H-3), 4.39 (m, 1H, H-16), 3.52 (m, 2H, H-26), 2.64 (dd, *J* = 8.9, 6.8 Hz, 1H, H-17), 2.48 (dd, *J* = 13.7, 3.5 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.24 (s, 3H, CH₃

acetilo), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.18 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 1.09 (s, 3H, H-18), 0.93 (s, 3H, H-19), 0.77 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.1 C-3, 33.8 C-4, 44.4 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.3 C-8, 55.3 C-9, 36.1 C-10, 37.7 C-11, 213.1 C-12, 55.3 C-13, 55.6 C-14, 31.0 C-15, 78.9 C-16, 52.9 C-17, 16.0 C-18, 11.8 C-19, 37.5 C-20, 13.5 C-21, 110.1 C-22, 139.0 C-23, 33.5 C-24, 33.0 C-25, 66.1 C-26, 17.1 C-27, 117.6 C-23', 130.1 C-1', 148.7 C-2', 122.0 C-3', 125.8 C-4', 128.2 C-5', 130.5 C-6', 21.3, 20.8 CH₃ acetilo, 170.5, 169.0 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₁O₇ 619.3638 (MH⁺) calculado 619.3635.

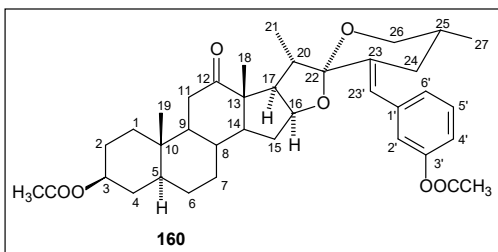


3-monoacetato de (22*R*,25*R*)-16β:22-epoxi-22,2'-espiro-[cromeno]-12-oxo-5α-colestan-3β,26-diol (159).

Rendimiento: 142.7 mg (25%). P.f. 190.5–193.7 °C (recristalizado de acetona/hexano). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.13 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H-7'), 7.04 (m, 1H, H-5'), 6.89 (m, 2H, H-6' and H-8'), 6.48 (s, 1H, H-4'),

4.79 – 4.45 (m, 2H, H-3 and H-16), 3.62 (dd, *J* = 10.8, 4.4 Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, *J* = 10.8, 4.9 Hz, 1H, H-26b), 2.95 (dd, *J* = 9.4, 7.8 Hz, 1H, H-17), 1.17 (s, 3H, H-18), 1.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, H-27), 0.92 (s, 3H, H-19). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.1 C-3, 33.7 C-4, 44.4 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.0 C-8, 55.3 C-9, 36.1 C-10, 37.6 C-11, 212.9 C-12, 55.4 C-13, 55.4 C-14, 31.0 C-15, 80.8 C-16, 51.5 C-17, 16.3 C-18, 11.8 C-19, 40.5 C-20, 13.4 C-21, 113.4 C-22, 130.4 C-23, 35.3 C-24, 35.6 C-25, 67.0 C-26, 16.9 C-27, 125.1 C-4', 126.1 C-5', 121.1 C-6', 128.6 C-7', 115.6 C-8', 151.2 C-9', 120.7 C-10', 21.4 CH₃ acetilo, 170.6 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₆H₄₉O₆ 577.3518 (MH⁺) calculado 577.3529.

La reacción entre el acetato de hecogenina (**64c**) (472.7 mg, 1 mmol) y el 3-acetoxibenzaldehído (**135**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 21 h) generó una mezcla de los productos **160** y **161** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (30 g). La mezcla se fijó con 4 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 6/1 hasta obtener el primer producto y se continuó con 2/1 para aislar:



[23(23')E,25R]-23(23')-3'-acetoxibenciliden-3β-

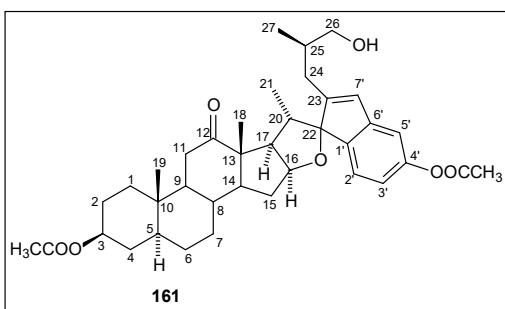
acetoxi-5α-estirostan-12-ona (160). Rendimiento:

174.3 mg (28%). P.f. 166.7–167.0 °C (*recristalizado de*

CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm:

7.33 (td, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H, H-5'), 7.08 (dt, *J* = 7.6, 1.4

Hz, 1H, H-6'), 6.95 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 2H, H-2' y H-4'), 6.51 (s, 1H, H-23'), 4.68 (ddd, *J* = 11.3, 6.4, 4.9 Hz, 1H, H-16), 4.46 – 4.29 (m, 1H, H-3), 3.62 – 3.43 (m, 2H, H-26a y H-26b), 2.81 – 2.72 (m, 1H, H-24a), 2.66 (dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 1H, H-17), 2.49 – 2.34 (m, 2H, H-11a y H-20), 2.29 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.28 – 2.19 (m, 1H, H-11b), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.18 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 1.10 (s, 3H, H-18), 0.93 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.1 C-3, 33.8 C-4, 44.4 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.2 C-8, 55.3 C-9, 36.1 C-10, 37.7 C-11, 213.1 C-12, 55.3 C-13, 55.5 C-14, 31.0 C-15, 78.8 C-16, 52.9 C-17, 16.1 C-18, 11.8 C-19, 37.8 C-20, 13.5 C-21, 110.3 C-22, 138.0 C-23, 32.9 C-24, 33.0 C-25, 66.0 C-26, 17.1 C-27, 122.0 C-23', 138.5 C-1', 122.0 C-2', 150.5 C-3', 119.7 C-4', 129.0 C-5', 126.5 C-6', 21.3, 21.1 CH₃ acetilo, 170.5, 169.4 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₁O₇ 619.3549 (MH⁺) calculado 619.3635.



(22R,25R)-4'-acetoxi-indeno[9',8':22,23]-3β-acetoxi-

26-hidroxi-5α-furostan-12-ona (161). Rendimiento:

191.6 mg (31%). P.f. 163.1–164.3°C (*recristalizado de*

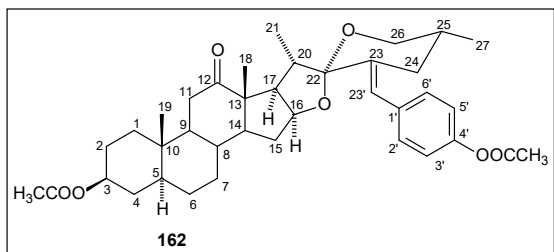
CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm:

7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2'), 6.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-

5'), 6.78 (dd, *J* = 8.0, 2.2 Hz, 1H, H-3'), 6.36 (s, 1H, H-

7'), 4.90 (dt, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 1H, H-16), 4.68 (tt, *J* = 11.1, 5.0 Hz, 1H, H-3), 3.61 (dd, *J* = 11.3, 4.2 Hz, 1H, H-26a), 3.37 (dd, *J* = 11.3, 4.2 Hz, 1H, H-26b), 3.05 (dd, *J* = 9.5, 8.3 Hz, 1H, H-17), 2.55 – 2.37 (m, 2H, H-11a y H-20), 2.28 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.27 (s, 3H, H-18), 1.03 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H-17), 0.94 (s, 3H, H-19), 0.64 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.1 C-3, 33.7 C-4, 44.5 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.1 C-8, 55.5 C-9, 36.1 C-10, 37.6 C-11, 212.8 C-12, 55.9 C-13, 55.9 C-14, 31.8 C-15, 82.7 C-16, 53.6 C-17, 16.6 C-18, 11.8 C-19, 36.6 C-20, 13.9 C-21, 101.1 C-22, 150.7 C-23, 29.4 C-24, 36.4 C-25, 66.0 C-26, 17.9 C-27, 128.3 C-7', 144.4 C-1', 124.3 C-2', 117.1 C-3', 150.9 C-4', 114.2 C-5', 141.7 C-6', 21.4, 21.2 CH₃ acetilo, 170.6, 169.3 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₃₈H₅₁O₇ 619.3602 (MH⁺) calculado 619.3635.

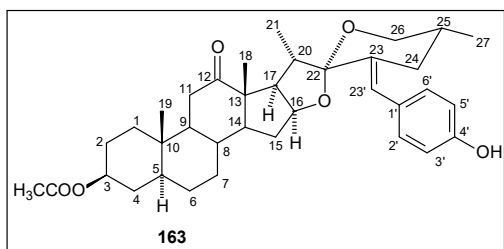
La reacción con acetato de hecogenina (**64c**) (472.7 mg, 1 mmol) y 4-acetoxibenzaldehído (**136**) (328.3 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 22 h) generó una mezcla de los productos **162**, **163** y **164** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (30 g). La mezcla se fijó con 3.2 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetona, 12/1 hasta obtener el primer producto y se continuó la columna aumentando gradualmente la polaridad desde 10/1 hasta 6/1 para obtener:



[23(23')E,25R]-23(23')-4'-acetoxibenciliden-3β-acetoxi-5α-espirostan-12-ona (162).

Rendimiento: 156.2 mg (25%). 183.6–184.3 (recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.24 – 7.17 (m, 2H, H-2'

y H-6'), 7.08 – 7.01 (m, 2H, H-3' H-5'), 6.50 (s, 1H, H-23'), 4.68 (tt, $J = 11.2, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.44 – 4.32 (m, 1H, H-16), 3.61 – 3.49 (m, 2H, H-26), 2.80 – 2.74 (m, 1H, H-24a), 2.66 (dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 1H, H-17), 2.49 – 2.35 (m, 2H, H-11a y H-20), 2.30 (s, 2H, CH_3 acetilo), 2.25 (dd, $J = 14.4, 5.0$ Hz, 1H, H-11b), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.19 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 1.10 (s, 3H, H-18), 0.92 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.2 C-3, 33.8 C-4, 44.5 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.2 C-8, 55.4 C-9, 36.1 C-10, 37.7 C-11, 213.2 C-12, 55.3 C-13, 55.6 C-14, 31.0 C-15, 78.8 C-16, 52.9 C-17, 16.1 C-18, 11.8 C-19, 37.8 C-20, 13.5 C-21, 110.5 C-22, 137.5 C-23, 32.9 C-24, 33.0 C-25, 66.1 C-26, 17.1 C-27, 122.1 C-23', 134.6 C-1', 130.1 C-2', 121.2 C-3', 149.2 C-4', 21.4, 21.1 CH_3 acetilo, 170.6, 169.5 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $C_{38}H_{51}O_7$ 619.3634 (MH^+) calculado 619.3635.

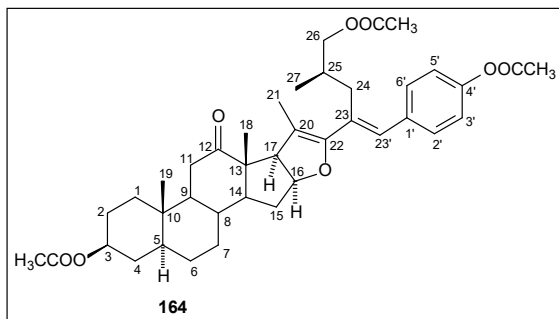


[23(23')E,25R]-23(23')-4'-hidroxibenciliden-3β-acetoxi-5α-espirostan-12-ona (163).

Rendimiento: 117.7 mg (20%). P.f. 260.6–262.1 °C (recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.13 – 7.06 (m, 2H, H-2' y H-6'), 6.83 – 6.78 (m, 2H, H-

3' y H-5'), 6.47 (s, 1H, H-23'), 5.28 (s, 1H, H-fenol), 4.68 (tt, $J = 10.9, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 4.45 – 4.31 (m, 1H, H-16), 3.59 – 3.48 (m, 2H, H-26), 2.78 (dd, $J = 13.7, 4.0$ Hz, 1H, H-24a), 2.67 (dd, $J = 9.1, 7.1$ Hz, 1H, H-17), 2.50 – 2.37 (m, 2H, H-11a y H-20), 2.25 (dd, $J = 14.4, 5.0$ Hz, 1H, H-11b), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 1.10 (s, 3H, H-18), 0.92 (s, 3H, H-19), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz,

3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.2 C-3, 33.8 C-4, 44.4 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.2 C-8, 55.3 C-9, 36.1 C-10, 37.7 C-11, 213.5 C-12, 55.4 C-13, 55.6 C-14, 31.0 C-15, 78.8 C-16, 52.9 C-17, 16.2 C-18, 11.9 C-19, 37.8 C-20, 13.6 C-21, 110.8 C-22, 135.8 C-23, 32.9 C-24, 32.9 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 122.6 C-23', 129.4 C-1', 130.4 C-2', 115.0 C-3', 154.5 C-4', 21.4 CH_3 acetilo, 170.7 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{O}_7$ 577.3530 (MH^+) calculado 577.3529.



Triacetato de (25R,23E)-23(23')-benciliden-5 α -furost-20(22)-en-3 β ,26,4'-triol (164).

Rendimiento: 54.9 mg, (8%) Aceite. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2'), 7.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-3'), 6.66 (s, 1H, H-23'), 4.78 (ddd, $J = 10.5, 7.6, 5.5$ Hz, 1H, H-16),

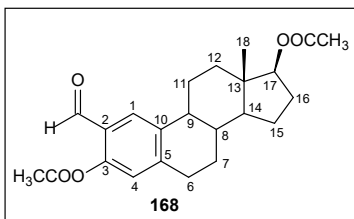
4.68 (dq, $J = 11.0, 5.4, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 3.85 (dd, $J = 5.9, 1.7$ Hz, 2H, H-26), 3.39 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H-17), 2.60 – 2.41 (m, 2H, H-11a y H-24a), 2.30 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.96 (s, 2H, CH_3 acetilo), 1.81 (s, 3H, H-21), 1.02 (s, 3H, H-18), 0.93 (s, 3H, H-19), 0.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.3 C-1, 27.2 C-2, 73.2 C-3, 33.7 C-4, 44.4 C-5, 28.1 C-6, 31.6 C-7, 34.1 C-8, 55.4 C-9, 36.1 C-10, 37.9 C-11, 213.3 C-12, 57.9 C-13, 54.4 C-14, 33.6 C-15, 82.4 C-16, 56.7 C-17, 14.1 C-18, 11.8 C-19, 107.3 C-20, 12.7 C-21, 132.1 C-22, 152.3 C-23, 31.8 C-24, 31.7 C-25, 68.6 C-26, 16.8 C-27, 131.1 C-23', 134.7 C-1', 129.9 C-2', 121.3 C-3', 149.3 C-4', 21.4 21.1 20.8 CH_3 acetilo, 170.7 171.1 169.4 C=O acetilo.

5.5. Síntesis de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol.

5.5.1. Obtención de los productos de la condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y el 2-formilestradiol.

Acetilación del 2-formilestradiol. A una disolución de 2-formilestradiol (314.4 mg, 1 mmol) en acetato de etilo (12 mL, secado con Na_2SO_4 anh.), se le agregaron Ac_2O (1.51 mL, 16 mmol) y NaHCO_3 (340 mg, 4 mmol) y se agitó a reflujo (6 horas, CCD hexano/acetato de etilo, 10/1). Una vez consumida por completo la materia prima, se agregó 1 mL de EtOH, la mezcla se enfrió, se agregaron 10 mL de agua y se agitó. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (60 mL), se lavó con

agua (5 x 25 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 25 mL) se secó (Na₂SO₄ anh.) y se evaporó para generar 389.3 mg (101%) de:

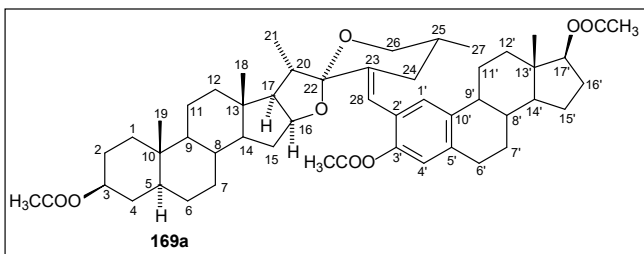


Diacetato de 2-formilestradiol (168): P.f. 105.1 – 105.7 °C (*recristalizado de metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 10.00 (s, 1H, CHO), 7.76 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-1), 6.86 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, H-4), 4.69 (dd, *J* = 9.2, 7.8 Hz, 1H, H-17), 2.91 (m, 2H, H-6), 2.36 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.32 – 2.13 (m, 2H, H-16a y H-9), 2.06 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.98 – 1.87 (m, 2H, H-12a y H-7a), 1.75 (dddd, *J* = 12.2, 9.7, 6.8, 3.1 Hz, 1H, H-15a), 0.83 (m, 3H, H-18).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 128.8 C-1, 125.5 C-2, 149.0 C-3, 123.3 C-4, 145.8 C-5, 29.8 C-6, 26.6 C-7, 37.9 C-8, 43.7 C-9, 138.9 C-10, 25.9 C-11, 36.6 C-12, 42.8 C-13, 49.7 C-14, 23.2 C-15, 27.5 C-16, 82.5 C-17, 188.8 C=O aldehído, 20.8, 21.1 CH₃ acetilo, 169.6, 171.1 C=O acetilo.

Procedimiento general para la síntesis de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol. A una disolución de sapogenina esteroidal acetilada (0.5 mmol) y diacetato de 2-formilestradiol (384.5 mg, 1 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL), se le agregó BF₃•Et₂O (6 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas (CCD hexano/acetato de etilo, 8/1 x 2 ó hexano/acetato de etilo, 4/1 x 2 para el derivado de la hecogenina). Al concluir la reacción, la mezcla se vertió sobre hielo, se agitó hasta que el hielo se fundió y se diluyó con acetato de etilo (50 mL). La fase orgánica se lavó con agua (8 x 25 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 25 mL), se secó (Na₂SO₄ anh.) y se evaporó a sequedad. El aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna para obtener los dímeros deseados.

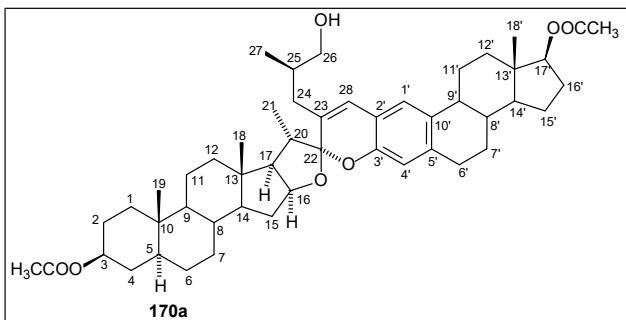
La reacción entre el acetato de tigogenina (**64a**) y el diacetato de 2-formilestradiol (**168**) generó una mezcla de los compuestos **169a** y **170a** que se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel (25 g). El crudo se fijó en 2.5 g de sílica, se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 15/1 y se aumentó gradual y lentamente hasta 8/1 para obtener:



Dímero 169a (tipo-bencilideno):

Rendimiento: 161 mg (39%). P.f. 171.2 – 172.1 °C (*sólido amorfo recristalizado de hexano/éter etílico*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.11 (s, 1H, H-1'), 6.75

(s, 1H, H-4'), 6.30 (s, 1H, H-28), 4.67 (m, 2H, H-3 and H-17'), 4.42 (dt, $J=9.0, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.53 (m, 2H, H-26), 2.91 – 2.80 (m, 2H, H-6'), 2.56 (p, $J=6.6$ Hz, 1H, H-20), 2.49 (ddd, $J=13.4, 4.5, 1.5$ Hz, 1H, H-24 eq.), 2.22 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.05 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.01 (s, 3H, CH_3 acetilo) 1.06 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.83 (s, 3H, H-18'), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.77 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 40.8 C-13, 56.1 C-14, 31.6 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 14.7 C-21, 110.2 C-22, 138.6 C-23, 33.5 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.1 C-27, 117.8 C-28. **Fragmento de estradiol** 127.6 C-1', 137.7 C-2', 146.4 C-3', 121.8 C-4', 137.0 C-5', 29.2 C-6', 27.0 C-7', 38.2 C-8', 44.0 C-9', 127.1 C-10', 26.0 C-11', 36.8 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.6 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 20.9, 21.2 CH_3 acetilo, 170.7, 169.4, 171.2 C=O acetilo. HRMS (ESI) Observado 825.5304 $\text{C}_{52}\text{H}_{73}\text{O}_8$ (MH^+) calculado 825.5305.



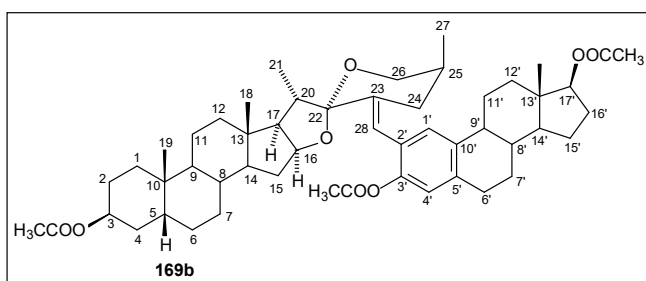
Dímero 170a (tipo-espirocromeno):

Rendimiento: 32 mg (8%). P.f. 185.9 – 187.6 °C (*sólido amorfo recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 6.93 (s, 1H, H-1'), 6.60 (s, 1H, H-4'), 6.43 (s, 1H, H-28), 4.77 – 4.59 (m, 3H, H-3, H-16 and H-17') 3.62 (dd, $J=11.0, 4.6$

Hz, 1H, H-26a), 3.43 (dd, $J=11.0, 4.9$ Hz, 1H, H-26b), 2.80 (dd, $J=8.6, 4.2$ Hz, 2H, H-6'), 2.52 (p, $J=6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.33 (dd, $J=14.1, 7.2$ Hz, 1H, H-24), 2.05 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.01 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.01 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.98 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 3H, H-18'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.2 C-7, 35.8 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.6 C-15, 82.4 C-16, 60.6 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 40.1 C-20, 14.7 C-21, 113.5 C-22, 130.0 C-23, 35.1 C-24, 34.8 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.7 C-28 **Fragmento de**

estradiol 122.9 C-1', 118.5 C-2', 149.2 C-3', 115.3 C-4', 132.8 C-5', 29.6 C-6', 26.3 C-7, 38.4 C-8', 43.7 C-9', 137.4 C-10', 27.2 C-11', 36.9 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.7 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 21.2 CH₃ acetilo, 170.7, 171.2 C=O acetilo. HRMS (ESI) Observado 783.5197 C₅₀H₇₁O₇ (MH⁺) calculado 783.5200.

La reacción entre el acetato de sarsasapogenina (**64b**) y el diacetato de 2-formilestradiol (**168**) generó una mezcla de los compuestos **169b** y **170b** que se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel (30 g). El crudo se fijó en 2.5 g de sílica, se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 15/1 y al salir el primer dímero se cambió el mezcla de disolventes a hexano/acetona, 5/1 para obtener:

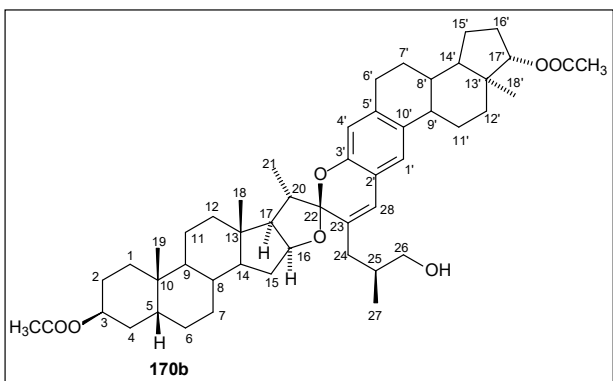


Dímero 169b (tipo-bencilideno):

Rendimiento: 255.6 mg (62%). P.f. 163.8 – 166.6 °C (*sólido amorfo* recristalizado de acetona/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.11 (s, 1H, H-1'), 6.74 (s, 1H, H-4'), 6.45 (s, 1H, H-28), 5.07 (m, 1H,

H-3), 4.68 (dd, *J* = 9.2, 7.6 Hz, 1H, H-17'), 4.45 (dt, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 1H, H-16), 4.05 (dd, *J* = 10.9, 3.6 Hz, 1H, H-26ax.), 3.30 (dt, *J* = 11.0, 1.7 Hz, 1H, H-26eq.), 2.84 (m, 2H, H-6'), 2.59 (ddd, *J* = 13.7, 5.3, 1.9 Hz, 1H, H-24eq.), 2.50 (dq, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-20), 2.22 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.08 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-21), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.94 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-27), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-18'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm:

Fragmento de saponina 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 31.6 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.4 C-7, 35.3 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.0 C-13, 56.3 C-14, 30.7 C-15, 80.9 C-16, 61.8 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 38.6 C-20, 14.6 C-21, 111.0 C-22, 137.5 C-23, 31.3 C-24, 30.3 C-25, 65.0 C-26, 17.6 C-27, 119.9 C-28. **Fragmento de estradiol** 127.5 C-1', 137.6 C-2', 146.4 C-3', 121.7 C-4', 136.9 C-5', 29.2 C-6', 27.0 C-7', 38.2 C-8', 44.0 C-9', 127.1 C-10', 26.1 C-11', 36.8 C-12', 42.8 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.6 C-17', 12.1 C-18', 21.5, 20.8, 21.2 CH₃ acetilo, 170.7, 169.3, 171.2 C=O acetilo. HRMS (IE) Observado 824.5240 C₅₂H₇₂O₈ (M⁺) calculado 824.5227.

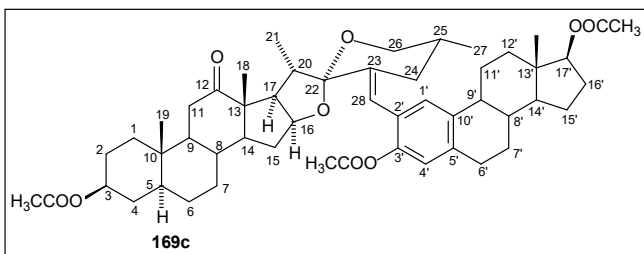


Dímero 170b (tipo-epiromenone):

Rendimiento: 35.4 mg (9%). P.f. 231.7 – 233.4 °C (*sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 6.97 (s, 1H, H-1'), 6.63 (s, 1H, H-4'), 6.45 (s, 1H, H-28), 5.07 (m, 1H, H-3), 4.66 (m, 2H, H-16, H-17'), 3.57 (dd, *J*=10.6, 5.9 Hz, 1H, H-26a), 3.51 (dd, *J*=10.7, 5.0 Hz,

1H, H-26b), 2.81 (m, 2H, H-6'), 2.54 (p, *J*=7.0 Hz, 1H, H-20), 2.17 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.05 (s, 6H, 2 × CH₃ acetilo), 1.05 (d, *J*=6.8 Hz, 3H, H-21), 0.97 (d, *J*=6.8 Hz, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-18'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 31.6 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.2 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.4 C-12, 41.1 C-13, 56.2 C-14, 30.7 C-15, 82.8 C-16, 60.9 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 39.3 C-20, 14.7 C-21, 112.7 C-22, 129.9 C-23, 37.3 C-24, 35.0 C-25, 67.6 C-26, 17.6 C-27, 126.2 C-28, **Fragmento de estradiol** 123.1 C-1', 118.9 C-2', 149.1 C-3', 115.6 C-4', 133.0 C-5', 29.7 C-6', 27.2 C-7', 38.5 C-8', 43.7 C-9', 137.4 C-10', 26.5 C-11', 36.9 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.3 C-15', 27.6 C-16', 82.3 C-17', 12.0 C-18', 21.2, 21.5 CH₃ acetilo, 170.8, 171.3 C=O acetilo. HRMS (IE) Observado 782.5127 C₅₀H₇₀O₇ (MH⁺) calculado 782.5122.

La reacción entre el acetato de hecogenina (**64c**) y el diacetato de 2-formilestradiol (**168**) generó una mezcla de los compuestos **169c** y **170c** que se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel (35 g). El crudo se fijó en 2.5 g de sílica, se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 15/1 y se aumentó gradual y lentamente hasta 3/1 para obtener:

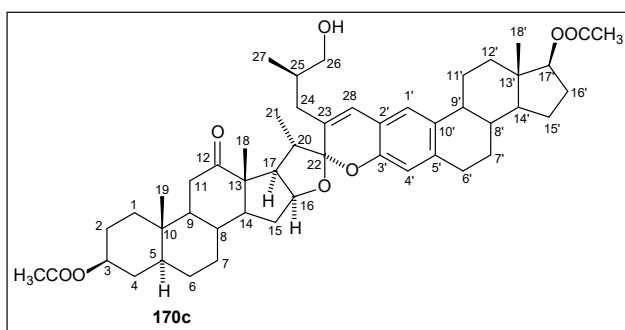


Dímero 169c (tipo-bencilideno):

Rendimiento: 203.4 mg (49%). P.f. 163.8 – 166.6 °C (*sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/hexano*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.10 (s, 1H, H-1'), 6.75 (s,

1H, H-4'), 6.28 (s, 1H, H-28), 4.68 (m, 2H, H-3 and H-17'), 4.37 (m, 1H, H-16), 3.52 (d, *J*=8.6 Hz, 2H, H-26), 2.85 (dd, *J*=10.6, 5.8 Hz, 2H, H-6'), 2.63 (dd, *J*=8.9, 6.8 Hz, 1H, H-17), 2.52 (dd, *J*=13.3, 4.3 Hz, 1H, H-24eq.), 2.44 (m, 1H, H-20), 2.22 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.02 (s, 3H, CH₃

acetilo), 1.17 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, H-21), 1.08 (s, 3H, H-18), 0.92 (s, 3H, H-19), 0.83 (s, 3H, H-18'), 0.77 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.3 C-1, 27.2 C-2, 73.2 C-3, 33.8 C-4, 44.5 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.3 C-8, 55.3 C-9, 36.1 C-10, 37.7 C-11, 213.2 C-12, 55.3 C-13, 55.6 C-14, 31.0 C-15, 78.9 C-16, 53.0 C-17, 16.1 C-18, 11.9 C-19, 37.5 C-20, 13.5 C-21, 110.2 C-22, 138.4 C-23, 33.6 C-24, 33.0 C-25, 66.2 C-26, 17.2 C-27, 118.0 C-28. **Fragmento de estradiol** 127.6 C-1', 137.7 C-2', 146.4 C-3', 121.8 C-4', 137.1 C-5', 29.3 C-6', 27.0 C-7', 38.2 C-8', 44.0 C-9', 126.9 C-10', 26.0 C-11', 36.8 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.6 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 20.8, 21.2 CH_3 acetilo, 170.6, 169.4, 171.2 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado 839.5090 $\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{O}_9$ (MH^+) calculado 839.5098.



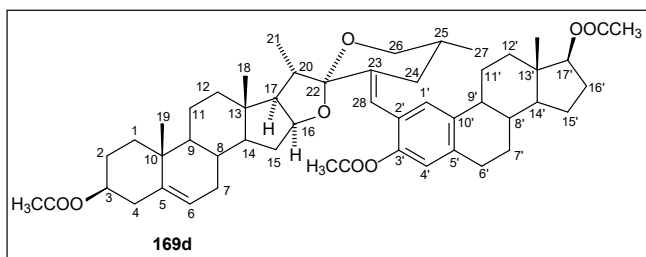
Dímero 170c (tipo-espirocromeno):

Rendimiento: 12.7 mg (3%). P.f. 173.9 – 175.2 °C (*sólido amorfo recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 6.94 (s, 1H, H-1'), 6.61 (s, 1H, H-4'), 6.44 (s, 1H, H-28), 4.74 – 4.57 (m, 3H, H-16, H-17' y H-3), 3.61 (dd, $J = 10.9, 4.5$ Hz,

1H, H-26a), 3.43 (dd, $J = 10.9, 5.0$ Hz, 1H, H-26b), 2.92 (dd, $J = 9.4, 7.8$ Hz, 1H, H-17), 2.80 (dd, $J = 8.9, 4.4$ Hz, 2H, H-6'), 2.05 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.01 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.16 (s, 3H, H-18), 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27), 0.91 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 3H, H-18'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.2 C-3, 33.7 C-4, 44.5 C-5, 28.1 C-6, 31.5 C-7, 34.0 C-8, 55.4 C-9, 36.1 C-10, 37.6 C-11, 213.0 C-12, 55.4 C-13, 55.3 C-14, 31.0 C-15, 80.7 C-16, 51.6 C-17, 16.4 C-18, 11.8 C-19, 40.3 C-20, 13.4 C-21, 113.4 C-22, 129.5 C-23, 35.3 C-24, 35.6 C-25, 67.0 C-26, 17.0 C-27, 126.0 C-28. **Fragmento de estradiol** 122.9 C-1', 118.4 C-2', 149.0 C-3', 115.4 C-4', 133.0 C-5', 29.6 C-6', 26.2 C-7', 38.4 C-8', 43.7 C-9', 137.5 C-10', 29.7 C-11', 36.9 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.8 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 21.2, CH_3 acetilo, 170.6, 171.2 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado 797.4996 $\text{C}_{50}\text{H}_{69}\text{O}_8$ (MH^+) calculado 797.4992.

La reacción entre el acetato de diosgenina (**64d**) y el diacetato de 2-formilestradiol (**168**) generó una mezcla de los compuestos **169d** y **170d** que se purificó por cromatografía en columna

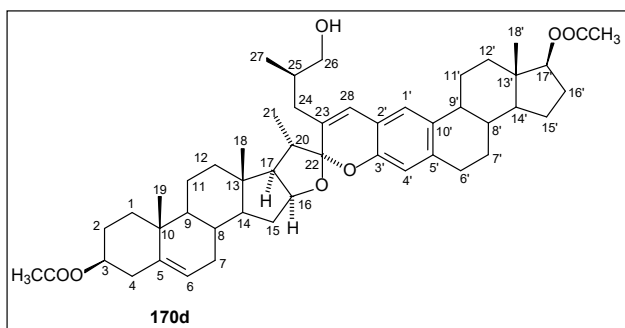
empacada con sílica gel (30 g). El crudo se fijó en 2.5 g de sílica, se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 15/1 y se aumentó gradual y lentamente hasta 6/1 para obtener:



Dímero 169d (tipo-bencilideno):

Rendimiento: 145.3 mg (35%). P.f. 169.1–170.3 °C (*sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.11 (s, 1H, H-1'), 6.76 (s,

1H, H-4'), 6.31 (s, 1H, H-28), 5.38 (d, *J*=5.0 Hz, 1H, H-6), 4.69 (dd, *J*=9.1, 7.8 Hz, 1H, H-17'), 4.60 (m, 1H, H-3), 4.44 (dt, *J*=8.7, 7.0 Hz, 1H, H-16), 3.52 (m, 2H, H-26), 2.85 (m, 2H, H-6), 2.57 (p, *J*=6.8 Hz, 1H, H-20), 2.50 (ddd, *J*=13.4, 4.4, 1.5 Hz, 1H, H-24eq.), 2.22 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.03 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.08 (d, *J*=6.9 Hz, 3H, H-21), 1.04 (s, 3H, H-19), 0.83 (s, 6H, H-18 y H-18'), 0.77 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, H-27). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.8 C-1, 27.7 C-2, 73.9 C-3, 38.1 C-4, 139.7 C-5, 122.3 C-6, 32.0 C-7, 31.3 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.8 C-11, 39.8 C-12, 40.5 C-13, 56.4 C-14, 31.7 C-15, 80.5 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 19.3 C-19, 36.9 C-20, 14.8 C-21, 110.2 C-22, 138.6 C-23, 33.5 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 117.8 C-28. **Fragmento de estradiol** 127.6 C-1', 137.7 C-2', 146.4 C-3', 121.8 C-4', 137.0 C-5', 29.2 C-6', 27.0 C-7', 38.1 C-8', 44.0 C-9', 127.0 C-10', 26.0 C-11', 36.9 C-12', 42.8 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.6 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 20.9, 21.2 CH₃ acetilo, 170.6, 169.5, 171.2 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado 823.5176 C₅₂H₇₁O₈ (MH⁺) calculado 823.5148.



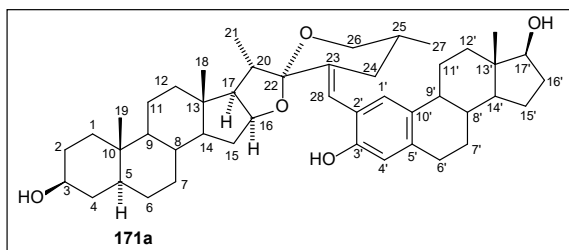
Dímero 170d (tipo-espirocromeno):

Rendimiento: 17.8 mg (5%). P.f. 151.7 – 153.0 °C (*sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 6.94 (s, 1H, H-1'), 6.62 – 6.60 (m, 1H, H-4'), 6.44 (s, 1H, H-28), 5.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.76 – 4.63 (m, 2H, H-16 y H-17'), 4.64 – 4.52 (m, 1H, H-3), 3.62 (dd, *J* = 11.0, 4.7 Hz, 1H, H-26a), 3.44 (dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.81 (dd, *J* = 8.6, 4.2 Hz, 2H, H-6'), 2.52 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-20), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.03 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.03 (d, *J* = 6.5 Hz, 7H, H-21), 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27), 0.91 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-18'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.9 C-1,

27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.0 C-4, 139.6 C-5, 122.2 C-6, 32.0 C-7, 31.1 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.8 C-11, 39.8 C-12, 40.7 C-13, 56.2 C-14, 31.6 C-15, 82.3 C-16, 60.4 C-17, 16.5 C-18, 19.2 C-19, 40.0 C-20, 14.7 C-21, 113.5 C-22, 129.9 C-23, 35.1 C-24, 35.8 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.7 C-28. **Fragmento de estradiol** 122.9 C-1', 118.4 C-2', 149.1 C-3', 115.3 C-4', 132.8 C-5', 29.6 C-6', 26.2 C-7', 38.4 C-8', 43.7 C-9', 137.4 C-10', 27.2 C-11', 36.8 C-12', 42.8 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.7 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 21.2, CH₃ acetilo, 170.6, 171.3 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado 781.4985 C₅₀H₆₉O₇ (MH⁺) calculado 781.5043.

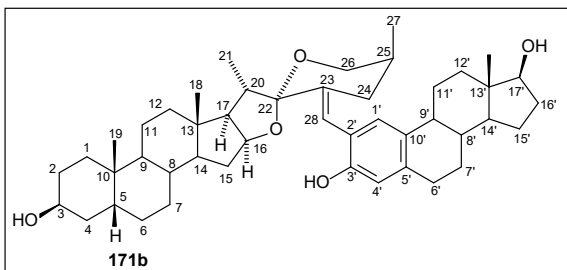
5.5.2. Saponificación de los dímeros híbridos tipo-bencilidenespirostanos.

Procedimiento general para la saponificación de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol. A una disolución de dímero híbrido (0.129 mmol) en CH₂Cl₂ (9 mL) y metanol (1 mL), se le agregó metóxido de sodio (104.5 mg, 1.935 mmol, 5 eq. o 156.8 mg, 2.903 mmol, 7.5 eq. para el derivado de la serie 25S) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la materia prima se consumió por completo (CCD, hexano/acetato de etilo, 1/1). Se evaporaron los disolventes volátiles y el sólido obtenido se filtró y se lavó con agua para generar los dímeros híbridos desacetilados puros.



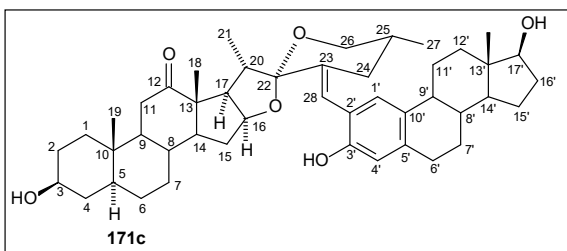
La reacción con el dímero **169a**, derivado de la tigogenina, generó 50.2 mg (56%) de: **Dímero 171a**. P.f. 195.5 – 196.3 °C (*Sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 9.04 (s, 1H OH-arom.), 6.87 (s, 1H, H-1), 6.50 (s, 1H, H-4'), 6.44 (s, 1H, H-23), 4.47 (d, *J*=4.7 Hz, 1H, 17-OH), 4.41 (d, *J*=4.6 Hz, 1H, 3-OH), 4.30 (q, *J*=7.4 Hz, 1H H-16), 3.50 m, 2H, H-17 and H-26 eq.), 3.40 (m, 1H, H-26a), 2.69 (m, 2H, H-6'), 2.54 (m, 1H, H-20), 1.02 (d, *J*=6.7 Hz, 3H, H-21), 0.74 (m, 9H, H-19, H-18 and H-27), 0.66 (s, 3H, H-18'). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 38.6 C-1, 31.4 C-2, 69.3 C-3, 38.2 C-4, 44.4 C-5, 28.3 C-6, 31.9 C-7, 34.6 C-8, 53.8 C-9, 35.2 C-10, 20.7 C-11, 39.7 C-12, 40.2 C-13, 55.6 C-14, 31.2 C-15, 79.7 C-16, 61.3 C-17, 16.3 C-18, 12.1 C-19, 36.7 C-20, 15.0 C-21, 110.1 C-22, 134.7 C-23, 33.1 C-24, 32.8 C-25, 65.2 C-26, 17.2 C-27, 118.8 C-28. **Fragmento de estradiol** 126.7 C-1', 120.6 C-2', 152.9 C-3', 115.0 C-4', 136.2 C-5', 28.9 C-6', 27.0 C-7', 38.6 C-8', 43.5 C-9', 130.0 C-10', 26.1 C-11', 26.6 C-12', 42.8 C-13', 49.6 C-14', 22.8 C-15', 29.9

C-16', 80.0 C-17', 11.3 C-18'. HRMS (APCI) Observado 699.4996 C₄₆H₆₆O₅ (MH⁺) calculado 699.4988.



La reacción con el dímero **169b**, derivado de la sarsasapogenina, generó 70.5 mg (78%) de: **Dímero 171b**. P.f. 181.1 – 183.8 (Sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 6.94 (s, 1H, H-1'), 6.62 (s, 1H, H-4'), 6.55 (s, 1H, H-28), 4.47 (dt, J=8.9,

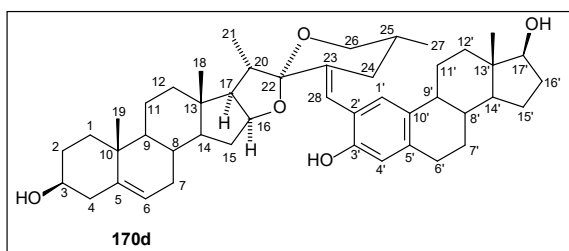
7.0 Hz, 1H, H-16), 4.11 (t, J=2.8 Hz, 1H, H-3), 4.01 (dd, J=11.1, 4.2 Hz, 1H, H-26a), 3.72 (t, J=8.5 Hz, 1H, H-17'), 3.32 (ddd, J=10.9, 10.9, 1.8 Hz, 1H, H-26b), 2.82 (dd, J=7.5, 3.3 Hz, 2H, H-6'), 2.60 (ddd, J=13.6, 5.7, 1.5 Hz, 1H, H-24a), 2.50 (m, 1H, H-20), 1.11 (d, J=6.9 Hz, 3H, H-21), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.96 (d, J=6.9 Hz, 3H), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.78 (s, 3H, H-18') RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 29.9 C-1, 27.7 C-2, 67.1 C-3, 33.5 C-4, 36.5 C-5, 26.5 C-6, 26.6 C-7, 35.2 C-8, 39.8 C-9, 35.3 C-10, 20.9 C-11, 40.4 C-12, 41.0 C-13, 56.4 C-14, 31.5 C-15, 81.3 C-16, 61.7 C-17, 16.6 C-18, 23.9 C-19, 39.9 C-20, 14.7 C-21, 111.3 C-22, 139.4 C-23, 31.4 C-24, 30.1 C-25, 65.0 C-26, 18.1 C-27, 120.1 C-28. **Fragmento de estradiol** 126.7 C-1', 120.5 C-2', 151.0 C-3', 115.4 C-4', 137.4 C-5', 29.4 C-6', 30.5 C-7', 38.8 C-8', 43.9 C-9', 131.9 C-10', 26.3 C-11', 36.7 C-12', 43.2 C-13', 50.0 C-14', 23.1 C-15', 27.2 C-16', 81.9 C-17', 11.1 C-18'. HRMS (APCI) Observado 699.4967 C₄₆H₆₆O₅ (MH⁺) calculado 699.4988.



La reacción con el dímero **169c**, derivado de la hecogenina, generó 61.7 mg (67%) de: **Dímero 171c**. P.f. 234.8 – 236.1 °C (Sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ ppm: 6.88 (s, 1H H-

1'), 6.52 (s, 1H, H-4'), 6.40 (d, J=1.9 Hz, 1H, H-28), 4.32 (td, J=9.4, 8.3, 5.3 Hz, 1H, H-16), 3.62 (t, J=8.5 Hz, 1H, H-15), 3.49 (m Hz, 2H, H-3 and H-26b), 3.43 (t, J=11.1 Hz, 1H, H-26a), 2.74 (m, 2H, H-6'), 2.62 (dd, J=9.1, 7.3 Hz, 1H, H-17), 1.12 (d, J=6.7 Hz, 3H, H-21), 1.04 (s, 3H, H-16), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.71 (m, 6H, H-17 and H-18'). RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.5 C-1, 31.4 C-2, 70.4 C-3, 37.3 C-4, 44.5 C-5, 28.1 C-6, 29.9 C-7, 34.1 C-8, 55.5 C-9, 36.0 C-10, 37.7 C-11, 214.0 C-12, 55.2 C-13, 55.5 C-14, 30.7 C-15, 78.9 C-16, 52.5 C-17, 16.0 C-18,

11.7 C-19, 37.9 C-20, 13.2 C-21, 110.8 C-22, 137.2 C-23, 33.1 C-24, 32.3 C-25, 66.1 C-26, 17.0 C-27, 119.6 C-28. **Fragmento de estradiol** 126.8 C-1', 120.4 C-2', 151.4 C-3', 115.6 C-4', 137.3 C-5', 29.2 C-6', 30.7 C-7', 38.7 C-8', 43.8 C-9', 131.5 C-10', 26.2 C-11', 36.3 C-12', 43.1 C-13', 49.9 C-14', 22.9 C-15', 27.1 C-16', 81.4 C-17', 10.9 C-18'. HRMS (APCI) Observado 713.4787 C₄₆H₆₄O₆ calculado (MH⁺) 713.4781.



La reacción con el dímero **169d**, derivado de la diosgenina, generó 77.4 mg (86.1%) de: **Dímero 171d**. P.f. 230.7 – 232.0 °C (*Sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 9.03 (s, 1H OH-arom.), 6.87 (s, 1H H-1'), 6.50 (s, 1H, H-4'), 6.45 (s, 1H, H-28), 5.26 (d, *J*=4.9 Hz, 1H, h-5), 4.59 (d, *J*=4.5 Hz, 1H, 17-OH), 4.47 (d, *J*=4.7 Hz, 1H, 3-OH), 4.32 (q, *J*=7.4 Hz, 1H, H-16), 3.50 (m, 2H, H-17 and H-26a), 3.40 (dd, *J*=11.2, 11.2 Hz, 1H), 3.25 (td, *J*=10.7, 5.8 Hz, 1H, H-3), 2.67 (m, 2H, H-6'), 2.55 (p, *J*=6.8 Hz, 1H, H-20), 1.03 (d, *J*=6.7 Hz, 3H, H-21), 0.95 (s, 3H, H-19), 0.78 (s, 3H, H-18), 0.74 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, H-27), 0.66 (s, 3H, H-18').

RMN de ¹³C (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm: **Fragmento de sapogenina** 36.9 C-1, 31.4 C-2, 70.0 C-3, 42.2 C-4, 141.3 C-5, 120.2 C-6, 31.5 C-7, 30.9 C-8, 49.6 C-9, 36.2 C-10, 20.5 C-11, 39.4 C-12, 40.0 C-13, 55.7 C-14, 31.3 C-15, 79.7 C-16, 61.2 C-17, 16.1 C-18, 19.2 C-19, 36.7 C-20, 15.0 C-21, 110.1 C-22, 134.7 C-23, 33.1 C-24, 32.8 C-25, 65.3 C-26, 17.2 C-27, 118.8 C-28. **Fragmento de estradiol** 126.7 C-1', 120.6 C-2', 152.9 C-3', 115.0 C-4', 136.2 C-5', 28.9 C-6', 27.0 C-7', 38.6 C-8', 43.5 C-9', 130.0 C-10', 26.1 C-11', 36.6 C-12', 42.8 C-13', 49.6 C-14', 22.8 C-15', 29.9 C-16', 80.0 C-17', 11.3 C-18'. HRMS (APCI) Observado 697.4828 C₄₆H₆₄O₅ calculado (MH⁺) 697.4832.

Capítulo 6. Síntesis de los bencilidenespirostanos dihidroxilados derivados de la tigogenina.

En la búsqueda por obtener nuevos derivados esteroidales con potencial actividad como antioxidantes, se decidió llevar a cabo la síntesis de los derivados 23*E*-bencilidenespirostanos derivados de la tigogenina que tuvieran dos grupos hidroxilo en el anillo aromático. Para este fin, se pensó en utilizar como materias primas los benzaldehídos dihidroxilados que en su patrón de sustitución tuvieran subestructuras de tipo: **quinoide (129)**, **catecol (172, 174)** o **resorcinol (173, 175)** (Figura 29).

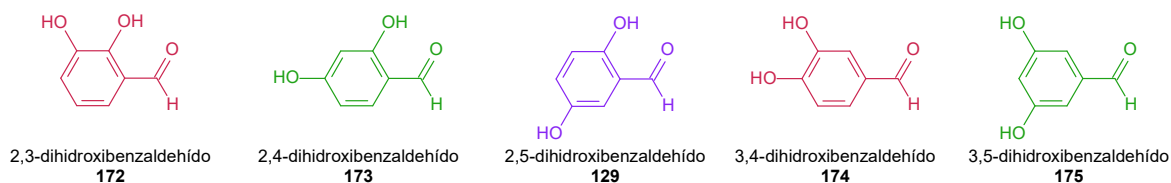


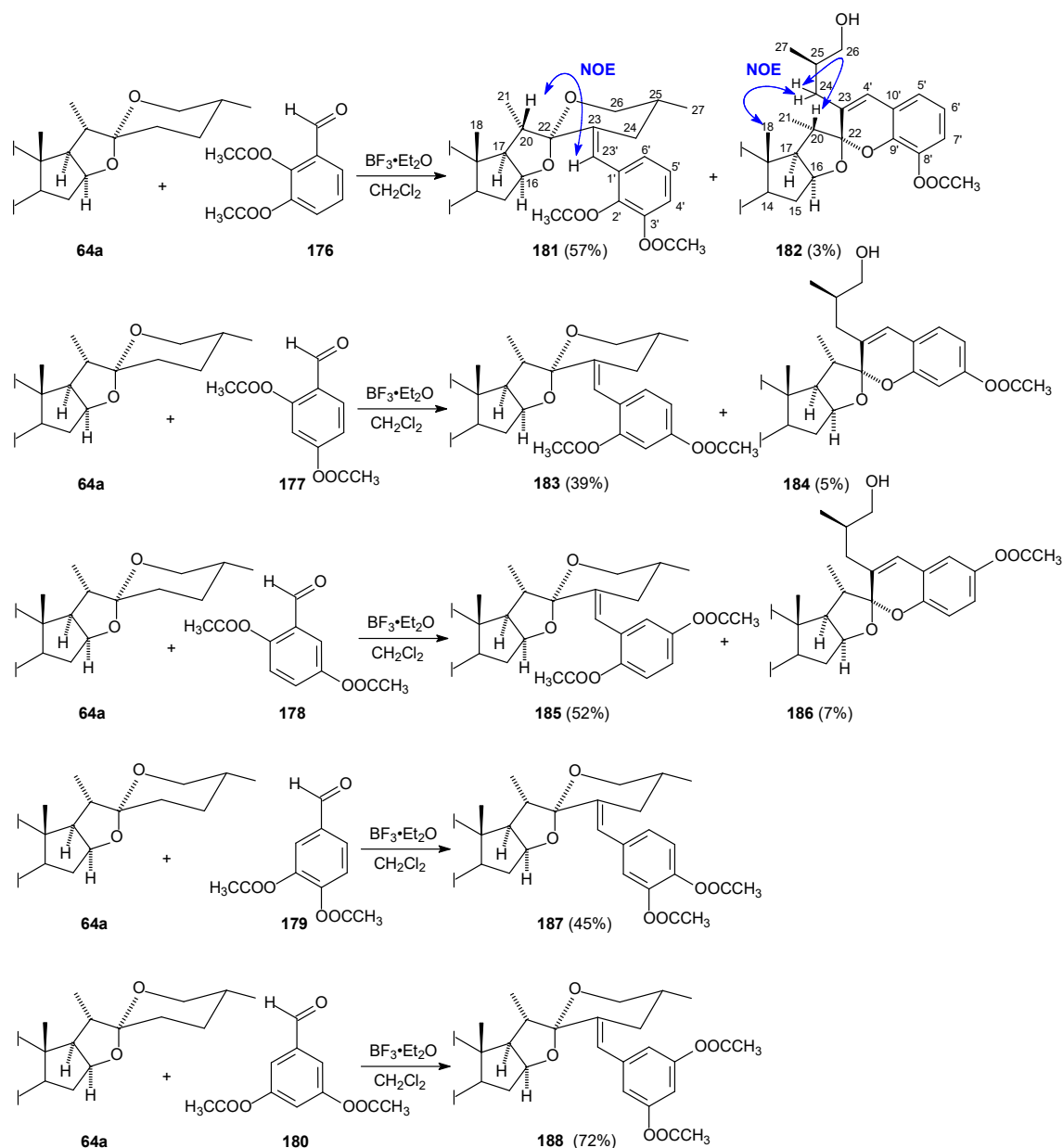
Figura 29. Aldehídos dihidroxilados seleccionados para la síntesis de los bencilidenespirostanos.

6.1. Síntesis de los bencilidenespirostanos diacetoxilados.

Como se ha señalado antes, para llevar a cabo la síntesis de los bencilidenespirostanos hidroxilados, es necesaria la previa acetilación de los grupos fenólicos de los aldehídos y después realizar la condensación aldólica con la sapogenina esteroidal.

Debido a esto y aunado a que se observó que los hidroxibenzaldehídos son poco estables, la protección de estas sustancias se llevó a cabo a través del método descrito en el Capítulo 5 con anhídrido acético y NaHCO_3 , que permitió obtener los diacetoxibenzaldehídos deseados con rendimientos cuantitativos. Es necesario mencionar que la estabilidad de estos compuestos es incluso menor que la de sus similares monohidroxilados, por lo que aun cuando pudieron obtenerse, no se pudo realizar la completa caracterización por RMN. Sin embargo, las transformaciones realizadas se corroboraron por la presencia de las señales correspondientes a los grupos acetato en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , que se distinguían aun cuando el aldehído acetilado se encontraba descompuesto al momento de los experimentos y además se observó el cambio por CCD en cada reacción.

Una vez obtenidos los derivados diacetoxilados del benzaldehído, se llevó a cabo la síntesis de los derivados bencilideno de la tigogenina a través de la condensación aldólica catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ generándose los bencilidenespirostanos diacetoxilados deseados con rendimientos que van de moderados a buenos (39 – 72%) (**Esquema 53**).



Esquema 53. Síntesis de los derivados diacetoxilados de los 23*E*-bencilidenespirostanos.

Estos compuestos fueron completamente caracterizados por experimentos de RMN mono- y bidimensionales y cabe señalar que en los espectros de ^1H y ^{13}C se pueden observar efectos muy

similares a los reportados para los bencilidenespirostanos no sustituidos⁵⁵ y para los monoacetoxi-bencilidenespirostanos (Capítulo 5).

En los espectros de RMN de ¹H de estos derivados se encuentra la señal olefínica característica de H-23' y un efecto a notar en estos compuestos es que la presencia de un acetoxilo en C-2' protege al hidrógeno olefínico debido a la cercanía con este grupo, que aparece alrededor de 6.30 ppm (como en los bencilidenespirostanos no sustituidos y monoacetoxilados); mientras que en los derivados que no tienen un sustituyente en esta posición se observa un desplazamiento a campo más bajo (6.49 ppm).

Por otra parte, en los espectros de RMN de ¹³C se observa la presencia de las señales olefínicas de C-23 y C-23' del nuevo doble enlace formado entre ambos compuestos. Del mismo modo se puede constatar la integridad del anillo aromático en el compuesto, pues se encuentran las señales correspondientes a este fragmento. La configuración *E* de la olefina obtenida se determinó gracias a la correlación **NOE** observada entre H-23'y H-20, que es característica en este tipo de compuestos (**Esquema 53**).

Los compuestos **181** y **185** generaron cristales adecuados para su análisis por experimentos de DRX de monocristal y se corroboraron las estructuras propuestas (**Figura 30**).

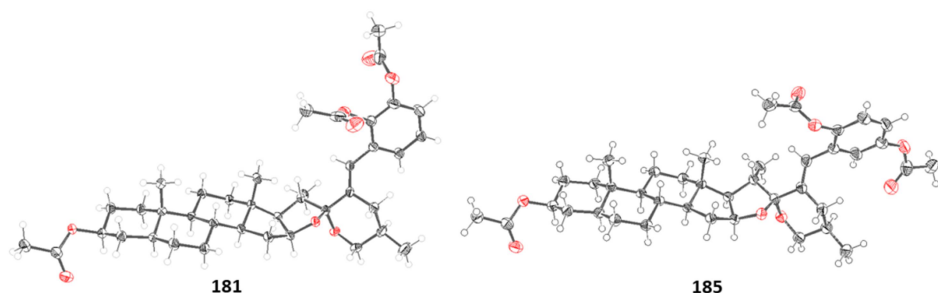


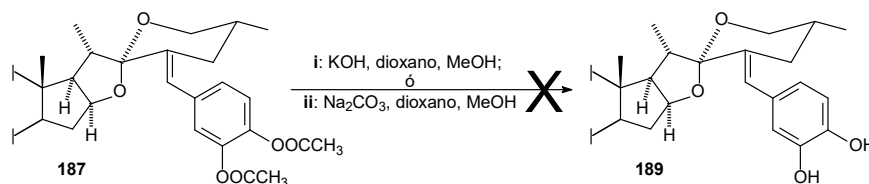
Figura 30. DRX de monocristal de los compuestos **181** y **185** con los elipsoides térmicos trazados al 50% de probabilidad.

Se observó que en las síntesis de los compuestos diacetoxi-bencilidenespirostanos que involucraron un aldehído con un acetoxilo en la posición 2 (**176**, **177** y **178**), siempre se obtiene como subproducto de reacción al 22*R*-espirocromeno correspondiente con rendimientos muy

bajos (entre 3 – 7%), debido a que ocurre el proceso de desprotección del hidroxilo y posterior cierre del anillo por parte del fenol.

6.2. Desprotección y reordenamientos catalizados por HCl de los diacetoxi-bencilidenespirostanos.

Para realizar las pruebas de actividad como atrapadores de radicales libres de estos compuestos, era necesario obtener los derivados correspondientes con los hidroxilos fenólicos libres. Sin embargo, al tratar de realizar la desprotección en medio básico de estos compuestos, el producto se descomponía en el medio de reacción (**Esquema 54**).

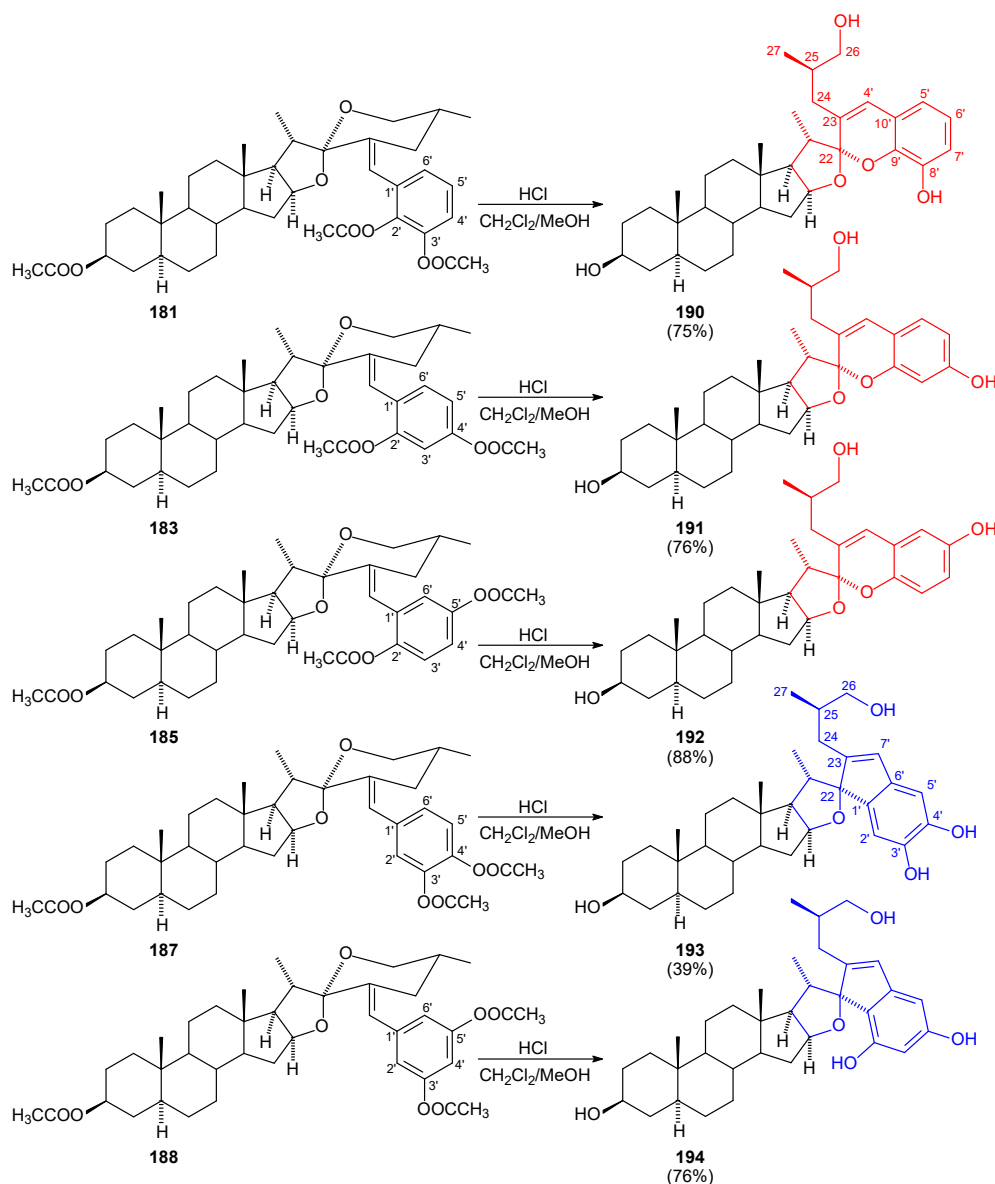


Esquema 54. Desprotección en medio básico de los derivados bencilidenespirostanos diacetoxilados.

Con el fin de obtener los bencilidenespirostanos diacetoxilados y tras notar que los grupos protectores de los hidroxilos fenólicos eran lábiles en medio ácido, se diseñó una metodología para la desacetilación de estos compuestos en medio ácido a través de una transesterificación de Fischer con HCl en CH₂Cl₂/MeOH.

Con este método no se lograron obtener los derivados bencilidenespirostanos dihidroxilados deseados, pero se logró la desacetilación completa de las materias primas. Al aplicar esta nueva metodología a la desprotección de los derivados bencilideno diacetoxilados con un sustituyente en la posición C-2' (**181**, **183** y **185**) se obtuvieron los espirocromenos monohidroxilados **190**, **191**, y **192** con rendimientos del 75%, 76% y 88% respectivamente; que son producto de la desprotección, apertura del anillo F del espirostanos y posterior cierre del anillo por el hidroxilo fenólico. Por otra parte, cuando esta misma se aplicó a la desprotección a los derivados 3',4'-diacetoxi-bencilidentigogenina (**187**) y 3',5'-diacetoxi-bencilidentigogenina (**188**), se obtuvieron los derivados espiroindenos dihidroxilados **193** y **194**. Esto se debe a que la posición C-6' del anillo aromático en ambos compuestos se encuentra muy activada, al tener un hidroxilo fenólico en

posición *para*, lo que favorece el ataque nucleofílico por parte del anillo aromático sobre C-22 para generar el espiroindeno con rendimientos que van de moderados a buenos (**193**, 39%; y **194**, 76%) (Esquema 55).



Esquema 55. Desprotección en medio ácido de los derivados benzilidenespirostanos dihidroxilados.

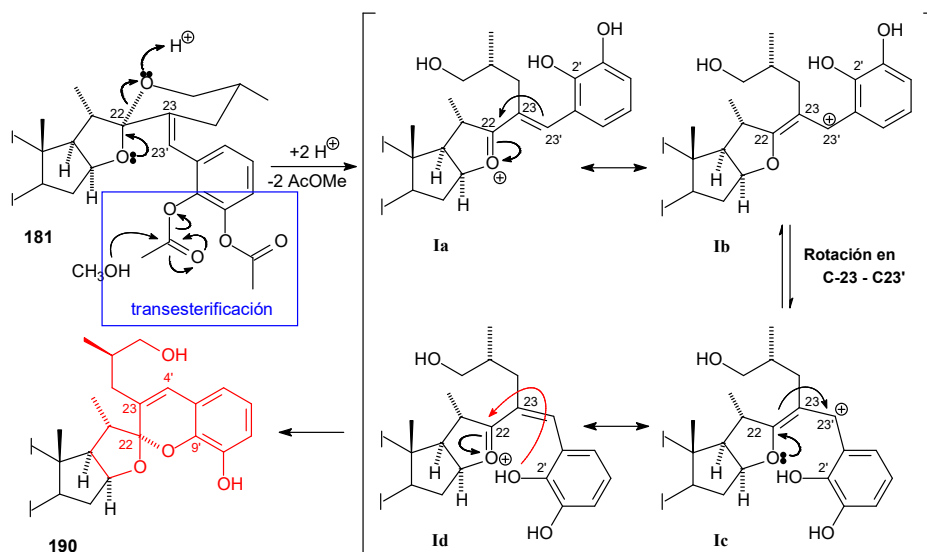
Lo anterior indica que la desprotección en medio ácido genera los espiro[furan]indenos dihidroxilados cuando en la posición C-2' no hay un grupo hidroxilo, mientras que cuando hay presente un grupo OH en dicha posición, se genera el espirocromeno correspondiente. Es decir, no solo se diseñó un método de desprotección de los 23*E*-diacetoxi-benzilidenespirostanos, sino un

método que permite obtener los derivados espiroindenos y espirocromenos hidroxilados con buenos rendimientos y con un procedimiento simple.

En los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los 22*R*-espirocromenos hidroxilados se observa una coherencia en los desplazamientos químicos de estos derivados al compararlos con el 22*R*-espirocromeno no sustituido **127a**. En todos los compuestos obtenidos tras la desprotección, se encuentran las señales características del fragmento de 22*R*-espirocromeno como C-22 con un desplazamiento químico alrededor de 113.5 ppm, C-24 en 35.1 ppm y C-26 que aparece en 66.9 ppm. Además la configuración R de C-22, se confirmó del mismo modo que se describió en el Capítulo 4 para los espirocromenos no sustituidos.

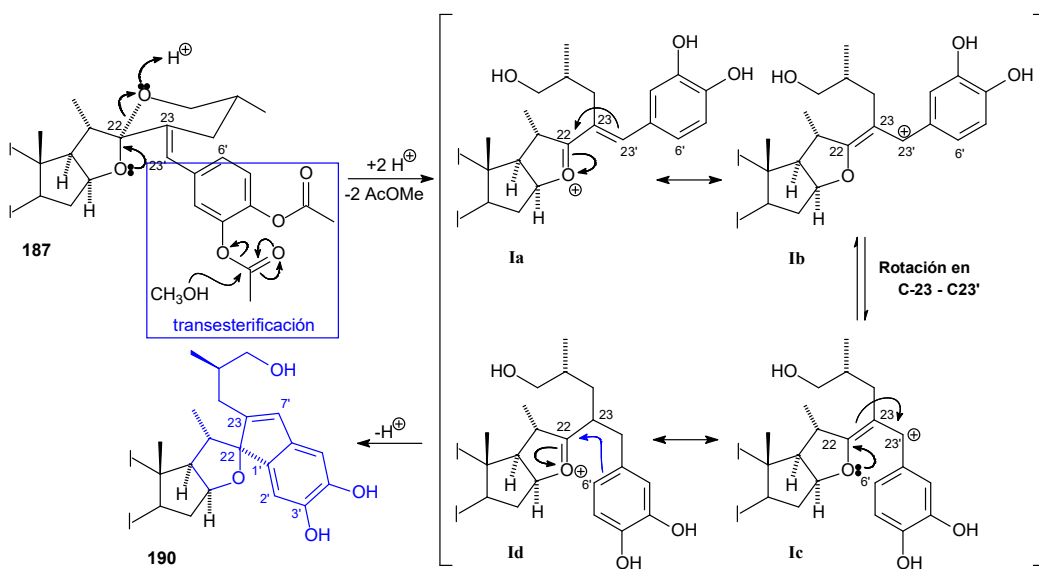
Del mismo modo, los espiroindenos dihidroxilados obtenidos muestran desplazamientos químicos y efectos muy similares al espiroindeno no sustituido **117a (Sección 3.1.4.1)**. En los espectros de RMN de ^1H se observa la pérdida del protón H-1' y la presencia de la señal olefínica de H-7' alrededor de 6.23 ppm. Mientras que en los espectros de RMN de ^{13}C se observa la presencia de la señal del espiro carbinólico correspondiente a C-22 alrededor de 103 ppm lo que indica la pérdida del espirocetal.

La formación de los espirocromenos se justifica a través de un mecanismo que inicia con la apertura del anillo F y la desacetilación de los hidroxilos fenólicos mediada por la presencia del ácido en el medio (HCl) a través de una transesterificación de Fischer, para producir el oxocarbenio **I**. La resonancia de este catión debilita el doble enlace y permite la rotación alrededor del enlace entre C-23 – C-23', esto coloca al hidroxilo fenólico de C-2' cerca de la posición C-22 y finalmente se lleva a cabo el cierre del anillo por este grupo hidroxilo para formar el fragmento de espirocromeno (**Esquema 56**).



Esquema 56. Mecanismo propuesto para la formación de los espirocromenos **190-192**.

Un mecanismo muy similar al descrito anteriormente sirve para explicar la formación de los espiroindenos **193** y **194**. Pero en este caso, al no estar presente un grupo fenólico en la posición C-6', se lleva a cabo el ataque nucleofílico por parte del anillo aromático sobre C-22 para dar lugar a la SE_{Ar} y finalmente a la formación del fragmento de espiroindeno (**Esquema 57**).



Esquema 57. Mecanismo propuesto para la formación de los espiroindenos **193** y **194**.

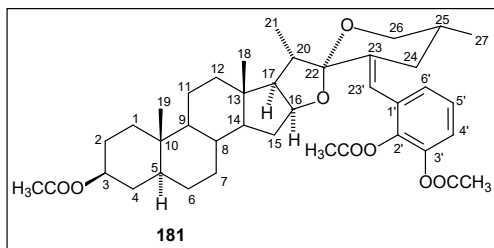
Parte experimental

6.1. Síntesis de los bencilidenespirostanos diacetoxilados.

Procedimiento general para la acetilación de los dihidroxibenzaldehídos. A una disolución de dihidroxibenzaldehído (2 mmol) en acetato de etilo (secado con Na_2SO_4 anh.) (12 mL), se le agregaron Ac_2O (0.8 mL, 8.6 mmol) y NaHCO_3 (672 mg, 8 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 30 minutos (CCD, hexano/acetato de etilo, 1/1). La reacción se terminó agregando 2 mL de EtOH y la mezcla se enfrió, posteriormente se agregaron 10 mL de agua y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 30 mL de acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua (5 x 15 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 15 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó para generar el diacetoxibenzaldehído deseado. El crudo se secó al alto vacío durante 30 minutos para utilizarse en la siguiente reacción. Los aldehídos diacetoxilados mostraron ser mucho más inestables que los derivados monoacetoxilados y no fue posible su caracterización por técnicas de RMN.

Procedimiento general para la síntesis de los 23E-bencilidenespirostanos diacetoxilados. A una disolución de acetato de tigogenina (**64a**) (1 mmol) y diacetoxibenzaldehído recién preparado (2 mmol) en CH_2Cl_2 (30 mL), se le agregó $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (6 mL). El curso de la reacción se siguió por CCD, hexano/acetato de etilo, 4/1 eluida dos veces. La reacción se terminó vertiendo la mezcla sobre hielo y se agitó hasta que el hielo se fundió. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (80 mL), se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua (8 x 30 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y se evaporó a sequedad. El aceite obtenido se redisolvió en acetato de etilo (25 mL), se le agregaron 25 mL de una disolución acuosa de NaHSO_3 al 10% y se agitó durante toda la noche para retirar el exceso de aldehído. Transcurrido este tiempo, la mezcla se diluyó con 30 mL de acetato de etilo y la fase orgánica se lavó agua (5 x 30 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se secó (Na_2SO_4 anh.) y se evaporó a sequedad. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna para generar el correspondiente 23E-bencilidenespirostano diacetoxilado.

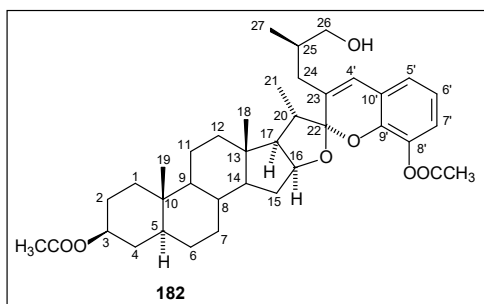
La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 2,3-diacetoxibenzaldehído (**176**) (444.4 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 1 h) generó una mezcla de los productos **181** y **182** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (27 g). El crudo se fijó con 2.7 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 10/1 para y hasta salir el primer producto y después se continuó con 6/1 para generar:



Triacetato de [23(23')E,25R]-23(23')-2',3'-dihidroxibenciliden-5 α -espirostan-3 β -ol (181).

Rendimiento 375.1 mg (57%). P.f. 217.7–219.5 °C (recristalizado de CH₂Cl₂/MeOH). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.22 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 7.12 – 7.07

(m, 2H, H-4' y H-6'), 6.32 (s, 1H, H-23'), 4.75 – 4.61 (m, 1H, H-3), 4.42 (dt, J = 8.7, 6.9 Hz, 1H, H-16), 3.59 – 3.44 (m, 2H, H-26ax. y H-26eq.), 2.55 (q, J = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.48 (ddd, J = 13.3, 4.3, 1.5 Hz, 1H, H-24eq.), 2.28 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.24 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.05 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.77 (d, J = 6.6 Hz, 3H, H-27), 0.68 (ddd, J = 12.3, 10.4, 4.1 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.1 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 40.8 C-13, 56.2 C-14, 31.6 C-15, 80.6 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.3 C-19, 37.0 C-20, 14.7 C-21, 110.0 C-22, 140.0 C-23, 33.4 C-24, 33.2 C-25, 66.1 C-26, 17.1 C-27, 116.7 C-23', 140.4 C-1', 142.7 C-2', 132.3 C-3', 121.9 C-4', 126.0 C-5', 127.8 C-6', 21.4, 20.7, 20.3 CH₃ acetilo, 170.7, 167.8, 168.4 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₄₀H₅₅O₈ 663.3850 (MH⁺) calculado 663.3897.

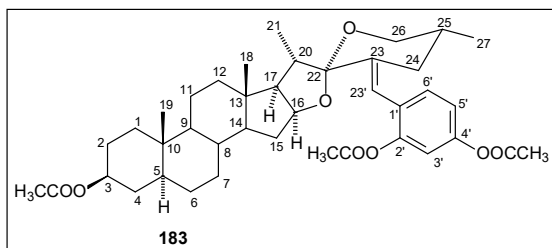


3,8'-Diacetato de (22R,25R)-16 β :22-epoxy-22,2'-espiro-[8'-acetoxi-cromeno]-5 α -colestán-3 β ,26-diol (182).

Rendimiento 20.2 mg (3%). Aceite. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.94 – 6.90 (m, 1H, H-6'), 6.89 – 6.82 (m, 2H, H-7' and H-5'), 4.75 – 4.55 (m, 2H, H-3 y H-16), 3.61 (dd, J = 10.9, 4.6 Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, J = 10.9, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.54 (p, J = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.37 (dd, J = 14.1, 6.8 Hz, 1H, H-24a), 2.32 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.01 (d, J = 6.1 Hz, H-21), 0.99 (d, J = 5.2 Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.70 (td, J = 11.2, 4.2 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100

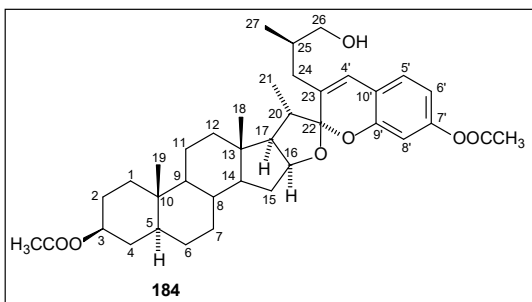
MHz, CDCl₃) δ (ppm): 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.7 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 35.7 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.2 C-12, 41.1 C-13, 55.9 C-14, 31.5 C-15, 82.8 C-16, 60.7 C-17, 16.8 C-18, 12.2 C-19, 40.4 C-20, 14.5 C-21, 113.9 C-22, 131.4 C-23, 35.2 C-24, 34.8 C-25, 67.0 C-26, 17.0 C-27, 125.0 C-4', 121.8 C-5', 123.6 C-6', 120.5 C-7', 138.3 C-8', 142.5 C-9', 122.2 C-10', 21.4, 20.5 CH₃ acetilo, 170.7, 168.8 C=O acetilo.

La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 2,4-diacetoxibenzaldehído (**177**) (444.4 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 1.3 h) generó una mezcla de los productos **183** y **184** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (30 g). El crudo se fijó con 3 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo, 14/1 hasta salir el primer producto y se continuó con 6/1 para generar:



Triacetato de [23(23')E,25R]-23(23')-2',4'-dihidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (183).

Rendimiento: 260.1 mg (39%). P.f. 192.3 – 193.4 °C (recristalizado de CH₂Cl₂/metanol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 6.98 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H-5'), 6.90 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 6.29 (s, 1H, H-23'), 4.67 (td, *J* = 11.4, 5.7 Hz, 1H, H-3), 4.47 – 4.37 (m, 1H, H-16), 3.57 – 3.46 (m, 2H, H-26ax. y H-26 eq.), 2.55 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.46 (ddd, *J* = 13.3, 4.3, 1.5 Hz, 1H, H-24eq.), 2.28 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.23 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.86 (dd, *J* = 8.9, 6.9 Hz, 1H, H-17), 1.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.77 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27), 0.68 (ddd, *J* = 12.1, 10.3, 4.1 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 40.9 C-13, 56.2 C-14, 31.6 C-15, 80.6 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 14.7 C-21, 110.0 C-22, 139.6 C-23, 33.4 C-24, 33.2 C-25, 66.0 C-26, 17.0 C-27, 116.7 C-23', 127.8 C-1', 148.9 C-2', 115.7 C-3', 149.9 C-4', 118.8 C-5', 130.8 C-6', 21.4, 21.1, 20.8 CH₃ acetilo, 170.7, 169.0, 168.6 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₄₀H₅₅O₈ 663.3835 (MH⁺) calculado 663.3897.

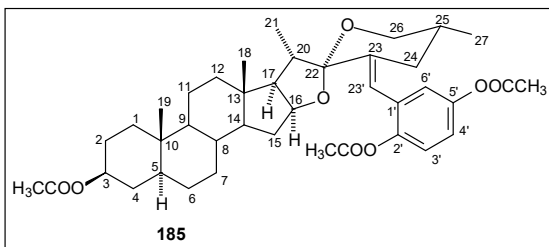


3,7'-Diacetato de (22*R*,25*R*)-16β:22-epoxy-22,2'-espiro-[7'-acetoxi-cromeno]-5α-colestan-3β,26-

diol (184). Rendimiento 29.2 mg (5%). Aceite. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 6.65 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-8'), 6.61 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H, H-6'), 6.45 (s, 1H, H-4'), 4.69 (m, *J* =

14.1, 10.8, 5.8 Hz, 2H, H-3 y H-16), 3.61 (dd, *J* = 10.9, 4.6 Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, *J* = 10.9, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.53 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.35 (dd, *J* = 14.2, 6.9 Hz, 1H, H-24a), 2.26 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.01 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.74 – 0.65 (m, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 34.8 C-8, 54.1 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.0 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.5 C-15, 82.7 C-16, 60.4 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 40.3 C-20, 14.6 C-21, 113.8 C-22, 130.5 C-23, 35.1 C-24, 35.7 C-25, 66.9 C-26, 17.0 C-27, 124.8 C-4', 126.3 C-5', 114.0 C-6', 150.6 C-7', 109.2 C-8', 152.0 C-9', 118.7 C-10', 21.4, 21.1 CH₃ acetilo, 170.7, 169.3 C=O acetilo.

La reacción con acetato de tigenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 2,5-diacetoxibenzaldehído (**178**) (444.4 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 1.5 h) generó una mezcla de los productos **185** y **186** que se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (30 g). El crudo se fijó con 4 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo partiendo con proporción 15/1 y se continuó aumentando la polaridad a gradiente hasta llegar a 6/1 para generar:

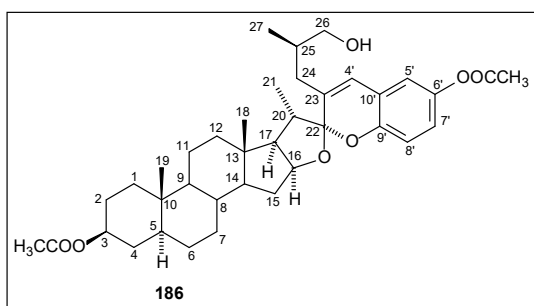


Triacetato de [23(23')*E*,25*R*]-23(23')-2',4'-dihidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (185).

Rendimiento: 345.1 mg (52%). P.f. 184.2 – 184.6 °C (recristalizado de CH₂Cl₂/acetato de etilo). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.05 (d, *J* = 8.7

Hz, 1H, H-3'), 7.00 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H, H-4'), 6.96 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-6'), 6.29 (s, 1H, H-23'), 4.68 (tt, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 1H, H-3), 4.42 (dt, 1H, H-16), 3.57 – 3.47 (m, 2H, H-26ax y H-26eq.), 2.54 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.46 (ddd, *J* = 13.3, 4.4, 1.5 Hz, 1H, H-24eq.), 2.28 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.23 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetilo), 1.86 (dd, *J* = 9.0, 6.9 Hz, 1H, H-17), 1.05 (d, *J* = 6.9 Hz,

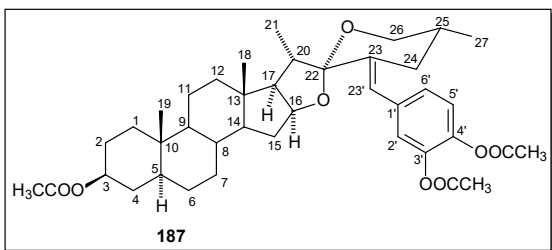
3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.78 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27), 0.68 (td, $J = 11.9, 4.1$ Hz, 1H, H-9). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 40.9 C-13, 56.2 C-14, 31.6 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 14.7 C-21, 109.9 C-22, 140.1 C-23, 33.4 C-24, 33.2 C-25, 66.0 C-26, 17.0 C-27, 116.7 C-23', 131.4 C-1', 146.1 C-2', 122.8 C-3', 121.0 C-4', 147.9 C-5', 123.5 C-6', 21.4, 21.1, 20.8 CH_3 acetilo, 170.7, 169.2, 168.9 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{O}_8$ 663.3807 (MH^+) calculado 663.3897.



3,6'-Diacetato de (22R,25R)-16 β :22-epoxy-22,2'-espiro-[7'-acetoxi-cromeno]-5 α -coleston-3 β ,26-diol (186). Rendimiento 40.9 mg (7%). P.f. 178.7 – 180.3 $^{\circ}\text{C}$ (sólido amorfo recristalizado de acetato de etilo/metanol). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-8'), 6.82 (dd, $J =$

8.6, 2.5 Hz, 1H, H-7'), 6.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 6.41 (s, 1H, H-4'), 4.75 – 4.65 (m, 2H, H-3, H-16), 3.61 (dd, $J = 10.9, 4.7$ Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, 1H, H-26b), 2.54 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.37 (dd, $J = 14.1, 6.8$ Hz, 1H, H-24a), 2.26 (s, 3H, CH_3 acetilo), 2.10 (dd, $J = 9.3, 7.6$ Hz, 1H, H-17), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.70 (td, $J = 12.0, 11.6, 4.2$ Hz, 1H, H-9). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 36.6 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 34.8 C-8, 54.1 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.0 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.5 C-15, 82.7 C-16, 60.5 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 40.3 C-20, 14.7 C-21, 113.6 C-22, 132.0 C-23, 35.1 C-24, 35.7 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 124.9 C-4', 118.6 C-5', 144.3 C-6', 121.2 C-7', 116.0 C-8', 148.9 C-9', 121.3 C-10', 21.5, 21.1 CH_3 acetilo, 170.7, 169.9 C=O acetilo.

La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (668.1 mg, 1 mmol) y 3,4-diacetoxibenzaldehído (**179**) (666.6 mg, 3 mmol) (tiempo de reacción 2 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (30 g). El crudo se fijó con 5 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo 8/1 para generar 443.6 mg (45%) de:

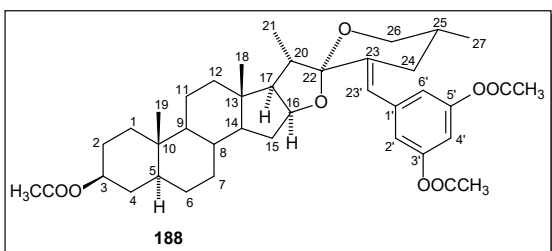


Triacetato de [23(23')E,25R]-23(23')-3',4'-dihidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (187).

P.f. 198.7 – 200.3 °C (*sólido amorfo recristalizado de acetato de etilo/metanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.15 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-5'),

7.10 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.05 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-2'), 6.49 (s, 1H, H-23'), 4.68 (td, $J = 11.3, 5.7$ Hz, 1H, H-3), 4.42 (dt, $J = 9.0, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.62 – 3.48 (m, 2H, H-26ax. y H-26eq.), 2.77 (dd, $J = 13.4, 4.1$ Hz, 1H, H-24eq.), 2.54 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.29 (d, $J = 1.6$ Hz, 6H, 2 x CH_3 acetilo), 2.09 (ddd, $J = 13.5, 11.7, 1.9$ Hz, 1H, H-24ax.), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.07 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.81 (t, $J = 3.3$ Hz, 6H, H-18 y H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 35.0 C-8, 54.1 C-9, 35.5 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 40.8 C-13, 56.1 C-14, 31.5 C-15, 80.4 C-16, 61.5 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 37.2 C-20, 14.8 C-21, 110.2 C-22, 138.3 C-23, 32.8 C-24, 33.1 C-25, 66.0 C-26, 17.1 C-27, 121.2 C-23', 135.9 C-1', 124.1 C-2', 141.6 C-3', 140.7 C-4', 123.0 C-5', 127.2 C-6', 21.4, 20.7, 20.6 CH_3 acetilo, 170.7, 168.4, 168.3 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{O}_8$ 663.3866 (MH^+) calculado 663.3897.

La reacción con acetato de tigogenina (**64a**) (458.7 mg, 1 mmol) y 3,5-diacetoxibenzaldehído (**180**) (444.4 mg, 2 mmol) (tiempo de reacción 1 h) se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (30 g). El crudo se fijó con 3.6 g de sílica y se eluyó con mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo 15/1 para generar 478.4 mg (72%) de:



Triacetato de [23(23')E,25R]-23(23')-3',5'-dihidroxibenciliden-5α-espirostan-3β-ol (188).

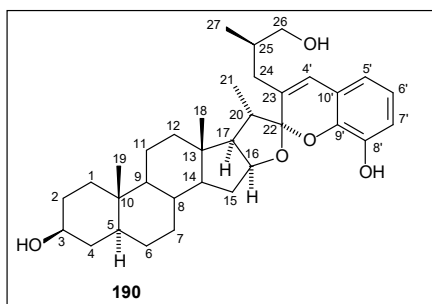
P.f. 192.3 – 193.4°C (*recristalizado de CH_2Cl_2 /metanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.84 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.79 (d,

$J = 2.1$ Hz, 1H, H-4'), 6.49 (s, 1H, H-23'), 4.67 (td, $J = 11.3, 5.7$ Hz, 1H, H-3), 4.41 (dt, $J = 8.9, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.65 – 3.39 (m, 2H, H-26ax. y H-26eq.), 2.73 (dd, $J = 13.1, 3.9$ Hz, 1H, H-24eq.), 2.52 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.28 (s, 6H, 2 x CH_3 acetilo), 2.09 (ddd, $J = 13.3, 11.6, 1.9$ Hz, 1H, H-24ax.), 2.01 (s, 3H, CH_3 acetilo), 1.06 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.83 – 0.77 (m, 6H, H-18 y H-27), 0.68 (td, $J = 11.9, 4.1$ Hz, 1H, H-9). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2,

73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.2 C-12, 40.8 C-13, 56.1 C-14, 31.5 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 37.3 C-20, 14.7 C-21, 110.2 C-22, 139.0 C-23, 32.9 C-24, 33.1 C-25, 66.0 C-26, 17.1 C-27, 121.2 C-23', 139.2 C-1', 119.7 C-2', 150.7 C-3', 113.5 C-4', 150.7 C-5', 119.7 C-6', 21.4, 21.1, 21.1 CH₃ acetilo, 170.7, 169.0, 169.0 C=O acetilo. HRMS (APCI) Observado C₄₀H₅₅O₈ 663.3810 (MH⁺) calculado 663.3897.

6.2. Desprotección y reordenamientos catalizados por HCl de los diacetoxi-bencilidenespirostanos.

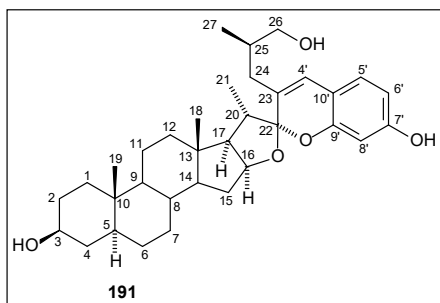
Método general de desprotección de los 23E-bencilidenespirostanos diacetoxilados. A una disolución de diacetoxi-bencilidenespirostano (100 mg, 0.15 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) y metanol (4 mL) se le agregaron 0.1 mL de HCl concentrado (37%) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la materia prima se consumió por completo (96 horas, CCD hexano/acetona, 2/1). Transcurrido este tiempo, la mezcla se vertió sobre hielo y se agitó hasta que el hielo se fundió. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (30 mL) y la fase orgánica se lavó con agua (5 x 20 mL), disolución saturada de NaCl (1 x 20 mL), se secó (Na₂SO₄ anh.) y se evaporó. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel (10 g) y se eluyó con sistema de disolventes hexano/acetato de etilo, 2/1 para generar el correspondiente producto desacetilado.



La reacción con acetato de 2',3'-diacetoxi-bencilidentigogenina (**181**) (100 mg, 0.15 mmol) generó 61.0 mg (76%) de: **(22R,25R)-16β:22-epoxy-22,2'-espiro-[8'-hidroxi-cromeno]-5α-colestan-3β,26-diol (190)**. P.f. 150.6 – 152.4°C (*Sólido amorfo recristalizado de CH₂Cl₂/metanol*).

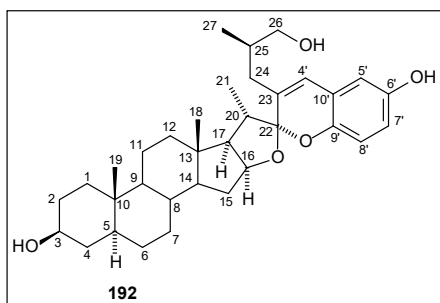
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.82 – 6.75 (m, 2H, H-6' y H-7'), 6.62 (dd, *J* = 6.2, 2.8 Hz, 1H, H-5'), 6.47 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-4'), 5.29 (s, 1H, OH fenol), 4.72 (dt, *J* = 9.2, 7.2 Hz, 1H, H-16), 3.66 – 3.53 (m, 2H, H-3 y H-26a), 3.46 (dd, *J* = 10.9, 5.1 Hz, 1H, H-26b), 2.59 (p, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-20), 2.40 (dd, *J* = 13.9, 6.3 Hz, 1H, H-24a), 2.13 – 2.03 (m, 2H, H-17 y H-24b), 1.04 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 1.00 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-27), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.68 (ddd, *J* = 12.2, 10.4, 4.3 Hz, 1H, H-9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 36.9 C-1, 31.4 C-2, 71.2 C-3, 38.1 C-4, 44.8 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 34.8 C-8, 54.3 C-9, 35.7 C-10, 21.1 C-11,

40.1 C- 12, 41.2 C-13, 56.1 C-14, 31.6 C-15, 83.0 C-16, 60.4 C-17, 16.7 C-18, 12.3 C-19, 40.4 C-20, 14.7 C-21, 114.4 C-22, 131.1 C-23, 35.3 C-24, 35.6 C-25, 67.1 C-26, 16.9 C-27, 125.4 C-4', 117.7 C-5', 121.2 C-6', 114.6 C-7', 143.7 C-8', 137.9 C-9', 121.0 C-10'. HRMS (APCI) Observado $C_{34}H_{49}O_5$ 537.3452 (MH^+) calculado 537.3580.



La reacción con acetato de 2',4'-diacetoxi-benciliden tigogenina (**183**) (100 mg, 0.15 mmol) generó 61.0 mg (76%) de: **(22R,25R)-16 β :22-epoxy-22,2'-espiro-[7'-hidroxi-cromeno]-5 α -colestano-3 β ,26-diol (191)**. P.f. 229.5 – 231.4 °C (*Sólido amorfo recristalizado de acetato de etilo/metanol*). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ

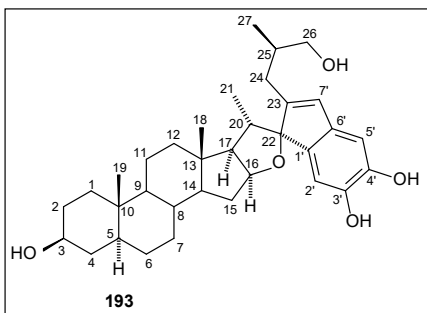
(ppm): 6.79 – 6.75 (m, 1H, H-5'), 6.32 – 6.26 (m, 3H, H-6', H-8' y H-4'), 4.61 (dt, $J = 9.1, 7.0$ Hz, 1H, H-16), 3.45 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H, H-3, H-26a y CD_3OD), 3.38 (dd, $J = 10.9, 4.8$ Hz, 1H, H-26b), 2.43 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.22 (h, $J = 5.6, 5.1$ Hz, 1H, H-24a), 2.00 (dd, $J = 9.2, 7.5$ Hz, 1H, H-17), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-27), 0.79 (s, 3H, H-18), 0.74 (s, 3H, H-19), 0.64 – 0.54 (m, 1H, H-9). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ (ppm): 36.8 C-1, 30.9 C-2, 70.7 C-3, 37.6 C-4, 44.7 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 34.7 C-8, 54.2 C-9, 35.4 C-10, 20.9 C-11, 40.0 C- 12, 40.9 C-13, 55.9 C-14, 31.3 C-15, 82.3 C-16, 60.4 C-17, 16.5 C-18, 12.1 C-19, 39.8 C-20, 14.4 C-21, 113.7 C-22, 126.9 C-23, 34.9 C-24, 35.0 C-25, 66.6 C-26, 16.8 C-27, 125.0 C-4', 126.6 C-5', 108.2 C-6', 157.3 C-7', 102.6 C-8', 152.4 C-9', 113.5 C-10'. HRMS (APCI) Observado $C_{34}H_{49}O_5$ 537.3527 (MH^+) calculado 537.3580.



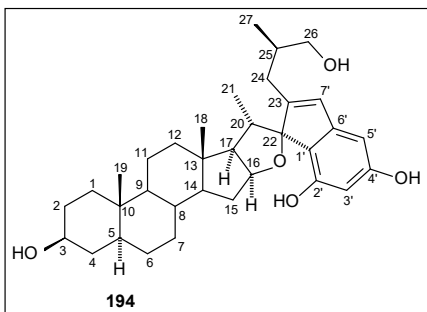
La reacción con acetato de 2',5'-diacetoxi-benciliden tigogenina (**185**) (100 mg, 0.15 mmol) generó 70.6 mg (88%) de: **(22R,25R)-16 β :22-epoxy-22,2'-espiro-[6'-hidroxi-cromeno]-5 α -colestano-3 β ,26-diol (192)**. P.f. 257.0 – 257.9 °C (*Sólido amorfo recristalizado de acetato de etilo/metanol*). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.72

(d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-8'), 6.58 (dd, $J = 8.6, 2.9$ Hz, 1H, H-7'), 6.47 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, H-5'), 6.37 (s, 1H, H-4'), 4.67 (dt, $J = 9.2, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.70 – 3.53 (m, 2H, H-3 y H-26a), 3.46 (dd, $J = 11.0, 5.1$ Hz, 1H, H-26b), 2.53 (p, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-20), 2.35 (dd, $J = 14.3, 7.2$ Hz, 1H, H-24a), 2.13 – 2.01 (m, 2H, H-24b y H-17), 1.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.81

(s, 3H, H-19), 0.67 (ddd, $J = 15.1, 8.7, 4.4$ Hz, 1H, H-9). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 36.9 C-1, 31.4 C-2, 71.2 C-3, 38.1 C-4, 44.8 C-5, 28.5 C-6, 32.3 C-7, 34.9 C-8, 54.3 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.1 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 31.5 C-15, 82.5 C-16, 60.7 C-17, 16.8 C-18, 12.3 C-19, 39.9 C-20, 14.7 C-21, 113.2 C-22, 131.9 C-23, 35.2 C-24, 35.6 C-25, 67.0 C-26, 17.1 C-27, 125.3 C-4', 112.3 C-5', 149.8 C-6', 115.3 C-7', 116.1 C-8', 145.1 C-9', 121.5 C-10'. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_5$ 537.3550 (MH^+) calculado 537.3580.



La reacción con acetato de 3',4'-diacetoxibencilidentigogenina (**187**) (100 mg, 0.15 mmol) generó 31.8 mg (40%) de: **(22R,25R)-3',4'-hidroxi-indeno[9',8':22,23]-5 α -furostan-3 β ,26-diol (193)**. P.f. 214.9 – 216.3 °C (*Sólido amorfo recristalizado de CH_2Cl_2 /etanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 6.92 (s, 1H, H-2'), 6.61 (s, 1H, H-5'), 6.26 (s, 1H, H-7'), 4.98 (td, $J = 9.3, 8.2, 4.2$ Hz, 1H, H-16), 3.60 – 3.48 (m, 2H, H-3 y H-26a), 3.44 (dd, $J = 10.8, 6.0$ Hz, 1H, H-26b), 2.59 (p, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-20), 2.39 (ddd, $J = 15.0, 5.3, 1.6$ Hz, 1H, H-24a), 2.24 (dd, $J = 9.3, 8.0$ Hz, 1H, H-17), 1.03 (s, 3H, H-18), 1.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H-27), 0.91 (s, 3H, H-19), 0.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21). RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 38.2 C-1, 33.5 C-2, 71.8 C-3, 38.9 C-4, 46.2 C-5, 29.9 C-6, 32.2 C-7, 36.4 C-8, 55.9 C-9, 36.8 C-10, 22.3 C-11, 41.6 C-12, 42.7 C-13, 57.9 C-14, 33.5 C-15, 85.2 C-16, 64.2 C-17, 17.6 C-18, 12.8 C-19, 37.3 C-20, 15.5 C-21, 102.8 C-22, 148.0 C-23, 31.4 C-24, 36.0 C-25, 68.3 C-26, 17.6 C-27, 129.1 C-7', 137.9 C-1', 114.1 C-2', 145.9 C-3', 143.4 C-4', 109.3 C-5', 136.5 C-6'. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_5$ 537.3521 (MH^+) calculado 537.3580.



La reacción con acetato de 3',4'-diacetoxibencilidentigogenina (**188**) (100 mg, 0.15 mmol) generó 31.8 mg (40%) de: **(22R,25R)-2',4'-hidroxi-indeno[9',8':22,23]-5 α -furostan-3 β ,26-diol (194)**. P.f. 192.2 – 194.3 °C (*Sólido amorfo recristalizado de CH_2Cl_2 /etanol*). RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 6.23 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-7'), 6.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, 5'), 6.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-3'), 5.21 (dt, $J = 9.3, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.61 – 3.48 (m, 2H, H-3 y H-26a), 3.44 (dd, $J = 10.8, 6.0$ Hz, 1H, H-26b), 2.60 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-20), 2.48 – 2.38 (m, 1H, H-17 y H-24a), 1.03 (s, 3H, H-18), 1.01 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-27), 0.90 (s, 4H, H-19), 0.69 (d, $J =$

6.8 Hz, 3H, H-21). RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 38.2 C-1, 32.2 C-2, 71.8 C-3, 38.9 C-4, 46.2 C-5, 29.9 C-6, 33.6 C-7, 36.4 C-8, 55.9 C-9, 36.8 C-10, 22.3 C-11, 41.7 C-12, 42.8 C-13, 57.8 C-14, 33.8 C-15, 87.1 C-16, 66.1 C-17, 17.9 C-18, 12.8 C-19, 37.9 C-20, 15.7 C-21, 103.2 C-22, 152.2 C-23, 31.7 C-24, 36.1 C-25, 68.2 C-26, 17.6 C-27, 128.5 C-7', 121.5 C-1', 160.0 C-2', 100.9 C-3', 154.3 C-4', 101.8 C-5', 147.9 C-6'. HRMS (APCI) Observado $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_5$ 537.3465 (MH^+) calculado 537.3580.

Capítulo 7. Propiedades de algunos de los compuestos obtenidos.

Actividad biológica y aplicaciones de los derivados de sapogeninas esteroidales obtenidos.

7.1. Actividad antitumoral de los 23E-bencilidenespirostanos.

Como se mencionó al principio de este documento, la actividad citotóxica de las sapogeninas esteroidales se encuentra bien documentada, además de que los esteroides con actividad citotóxica han recibido considerable atención durante más de 30 años. En general, se analiza biológicamente un gran número de esteroides naturales para evaluar su actividad antiproliferativa y/o citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer en experimentos *in vitro*. Así mismo, la investigación dirigida a identificar potenciales agentes antitumorales incluye la síntesis de esteroides citotóxicos no naturales mediante la introducción de modificaciones estructurales en materias primas con actividad conocida, así como el diseño y síntesis de nuevas moléculas.

Se ha descrito que compuestos derivados de sapogeninas esteroidales con modificaciones en la cadena lateral, mostraron actividad citotóxica contra un amplio espectro de líneas celulares de cáncer (**Figura 31**). Entre estos compuestos se encuentra la oxima de la 23-acetildiosgenina (**195**) que presentó actividad contra las líneas celulares de carcinoma cervical HeLa (IC_{50} 10.9 μ M) y CaSki (IC_{50} 10.51 μ M).¹⁰⁹ Por otro lado, se ha descrito que la familia de compuestos 23-etiliden-26-hidroxi-22-oxo-colestanos derivados de sapogeninas esteroidales (**196**), exhibió actividad citotóxica contra células de leucemia linfoblástica T (CEM, IC_{50} 5,9-40,9 μ M).¹¹⁰

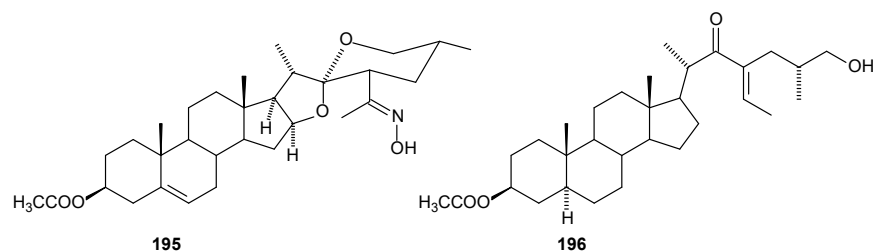


Figura 31. Derivados de sapogeninas esteroidales con actividad antitumoral.

La evidencia reunida de actividades anticancerígenas permite asociar la citotoxicidad con la presencia de ciertas subestructuras. Fuchs y colaboradores han sugerido que la formación de iones oxocarbenio, generados por la apertura de los fragmentos espirocetálicos, pueden actuar como agentes alquilantes de biomoléculas nucleófilas y que de esto deriva la citotoxicidad observada en las cefalostatinas y ritterazinas.^{16,111} Aunque esta hipótesis aún no está confirmada, el gran

número de espirocetales esteroidales citotóxicos, así como la relación entre la citotoxicidad y formación de iones de oxocarbenio sugieren que esta hipótesis puede estar bien orientada.

Como se ha demostrado, la presencia del fragmento bencilideno en la cadena lateral espirocetálica de los compuestos 23*E*-bencilidenespirostanos, produce cambios drásticos en la reactividad de este fragmento. De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que las sapogeninas esteroidales de origen natural tienen actividad citotóxica, se decidió evaluar la actividad de los 23*E*-bencilidenespirostanos **119a-e** obtenidos en este trabajo (Capítulo 3, **Figura 32**). Esto en una colaboración con el *Laboratorio de Moduladores del Crecimiento* de la Universidad Palacký en Olomouc, República Checa, a cargo del Profr. Miroslav Strnad y con ayuda de la Dra. Lucie Rárová.

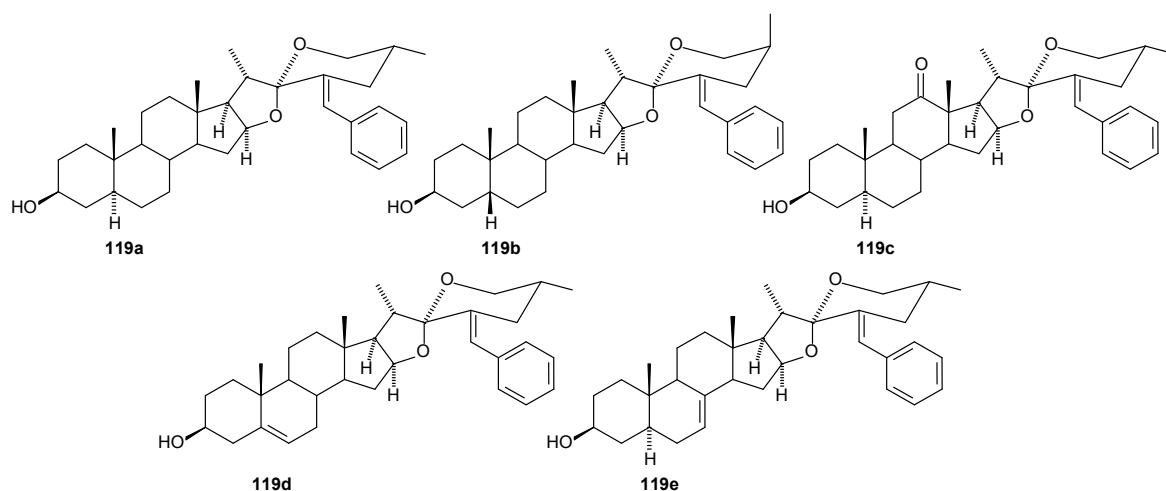


Figura 32. 23*E*-bencilidenespirostanos evaluados.

Las actividades antiproliferativas *in vitro* de los compuestos analizados se probaron en líneas celulares de cáncer de diversos orígenes histopatológicos, incluida la leucemia linfoblástica T CEM, el adenocarcinoma de mama MCF7 y carcinoma cervical HeLa. Los resultados se compararon con la citotoxicidad hacia los fibroblastos BJ humanos normales. Estas líneas celulares se expusieron a seis diluciones en serie, por triplicado, de cada sustancia evaluada durante 72 horas. Luego se midió el porcentaje de células supervivientes y se calcularon los valores de IC₅₀ (concentraciones inhibitorias del 50%). Los resultados de los ensayos de Calceína AM se presentan en la **Tabla 31**. Todos los compuestos probados mostraron una actividad citotóxica moderada hacia todas las líneas celulares, incluidos los fibroblastos humanos normales. La más activa de las cinco sustancias

fue **119c** (la IC₅₀ más baja fue para las células MCF7 de 19.9 ± 0.1 μM) y ninguno de los bencilidenespirostanos fue selectivo para alguna línea celular.

Tabla 31. Valores de IC₅₀ (μM) obtenidos a partir de los ensayos de Calceína AM utilizando tres líneas celulares de cáncer (CEM, MCF7 y HeLa) y fibroblastos humanos normales (BJ).

Compuesto	IC50 (μM)			
	CEM	MCF7	HeLa	BJ
119a	28.8 ± 2.4	33.0 ± 4.2	36.9 ± 3.1	41.9 ± 1.4
119b	31.5 ± 5.1	44.7 ± 1.6	42.6 ± 2.5	42.9 ± 0.1
119c	23.2 ± 0.4	19.9 ± 0.1	35.7 ± 3.5	45.3 ± 2.3
119d	28.0 ± 1.3	40.3 ± 3.3	41.0 ± 3.5	44.1 ± 1.2
119e	28.9 ± 2.8	36.6 ± 4.7	39.2 ± 7.1	41.6 ± 1.5

7.2. Actividad antioxidante de los hidroxí-espirocromenos y dihidroxí-espiroindenos derivados de sapogeninas esteroidales.

Debido a la similitud estructural presente entre los hidroxí-espirocromenos derivados de sapogeninas esteroidales (**130-131**) (Capítulo 4) con algunas sustancias de las cuales se conoce su actividad antioxidante como el α-tocoferol (**90**) y el Trolox (**92**) (**Figura 33**), se decidió realizar un ensayo para evaluar la posible actividad antioxidante de estas sustancias, utilizando el método de DPPH^{*}, en una colaboración con el laboratorio del Dr. José Pedraza Chaverri con ayuda del Dr. Omar Noel Medina Campos de la Facultad de Química de la UNAM.

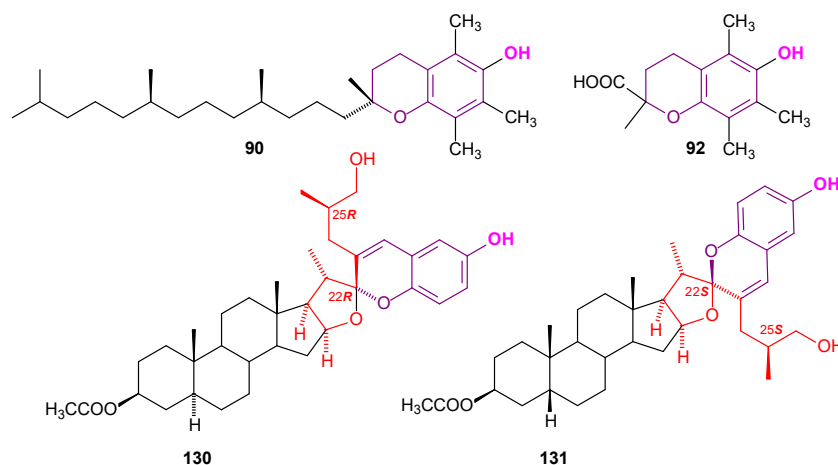


Figura 33. Similitud estructural de los hidroxí-espirocromenos con otras moléculas antioxidantes.

El ensayo de actividad antioxidante de las sapogeninas esteroidales **64a** y **64b** mostraron que, como se esperaba, ni la cadena lateral espirocetálica ni el esqueleto del esteroide de estos compuestos tienen la capacidad de captación de radicales. Los compuestos **127a/b** y **128a/b**, productos de la condensación aldólica entre las sapogeninas esteroidales y el salicilaldehído, que tienen cadenas laterales de espirocromeno y que están estrechamente relacionados con el núcleo farmacofórico presente en las sustancias **90** y **92**, pero carecen del grupo hidroxilo fenólico, no mostraron actividad en este ensayo. En contraste, los compuestos **130** y **131** que poseen un grupo hidroxilo fenólico unido a la posición C-6' de la cadena lateral de espirocromeno, mostraron actividad como atrapadores de radicales libres.

La evaluación de la capacidad de atrapamiento de DPPH[•] mostró que ambos compuestos fueron capaces de capturar este radical (**Figura 34**, **Tabla 32**) y se encontró que la capacidad de eliminación porcentual es mayor con el aumento de las concentraciones de estos compuestos. Se observó además que en cualquier concentración dada (4-289 μ M) los compuestos **130** y **131** tienen una capacidad antioxidante significativa, pero inferior a las del ácido ascórbico y el Trolox (**92**) (4-50 μ M y 8-70 μ M, respectivamente) (**Figura 10**). La actividad de captación del radical DPPH[•] expresada como valores de IC₅₀ de los compuestos ensayados se presenta en la **Tabla 32**.

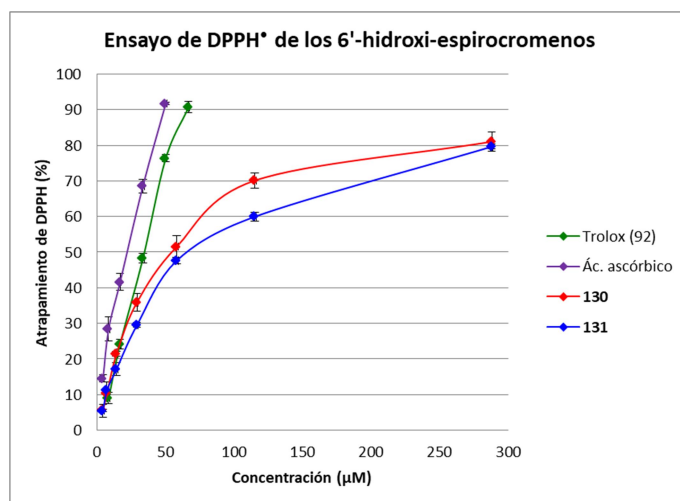


Figura 34. Comparación de la actividad antioxidante del Trolox (**92**), ácido ascórbico y los derivados **130** y **131** usando el método de DPPH[•].

Tabla 32. IC₅₀ (Concentración requerida para el 50% de inhibición) de los compuestos 6'-hidroxi-espirocromenos derivados de sapogeninas esteroidales.

Muestra	IC ₅₀ (μM)
Ácido ascórbico	20.05 ± 1.26
Trolox (92)	27.32 ± 0.72
130	68.81 ± 2.00 ^{a, b, c}
131	48.49 ± 2.64 ^{a, b}

Los datos se expresan como media±EEM. Las determinaciones se hicieron por triplicado. ^ap < 0.005 vs ácido ascórbico, ^bp < 0.005 vs 21, ^cp < 0.005 vs 36.

Aunque ambos 6'-hidroxi-espirocromenos **130** y **131** (**Figura 33**) poseen un grupo hidroxilo en la misma posición de sus cadenas laterales, sus valores de IC₅₀ son estadísticamente diferentes (p < 0,005). Eso sugiere que las configuraciones en C-22 y C-25 pueden ejercer una influencia significativa en la capacidad de eliminación de los radicales libres.

Al conocer que los 6'-hidroxi-espirocromenos sí tienen actividad significativa como atrapadores de radicales libres, se decidió evaluar también la actividad antioxidante de los espirocromenoles monohidroxilados y de los dihidroxi-espiroindenoles obtenidos de la reacción de desprotección en medio ácido de los bencilidenespirostanos dihidroxilados (Capítulo 6, **Figura 35**). Si bien es cierto que la mayoría de estos compuestos no comparte una similitud estructural con el grupo farmacofórico del tocoferol, si presentan cadenas laterales con un **anillo aromático conjugado con un doble enlace exocíclico** y **grupos fenólicos libres**. Además, el patrón de sustitución de los grupos hidroxilo en el anillo aromático de estas sustancias son de tipo catecol (**190** y **193**), quinoide (**192**) o resorcinol (**191** y **194**), que son subestructuras de las cuales se sabe que presentan una actividad antioxidante. Por lo tanto, se pudo asumir que estas sustancias tendrían la capacidad de capturar radicales libres.

Como primer acercamiento en la evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres de estos derivados, se llevó a cabo un ensayo de DPPH• para determinar el atrapamiento máximo de cada sustancia a concentraciones elevadas (310 μM para los compuestos **190**, **192** y **193**; 357 μM para **191** y **194**) (**Figura 36**). De los compuestos más activos se llevó a cabo la determinación de la IC₅₀ y los resultados se presentan en la **Tabla 33**.

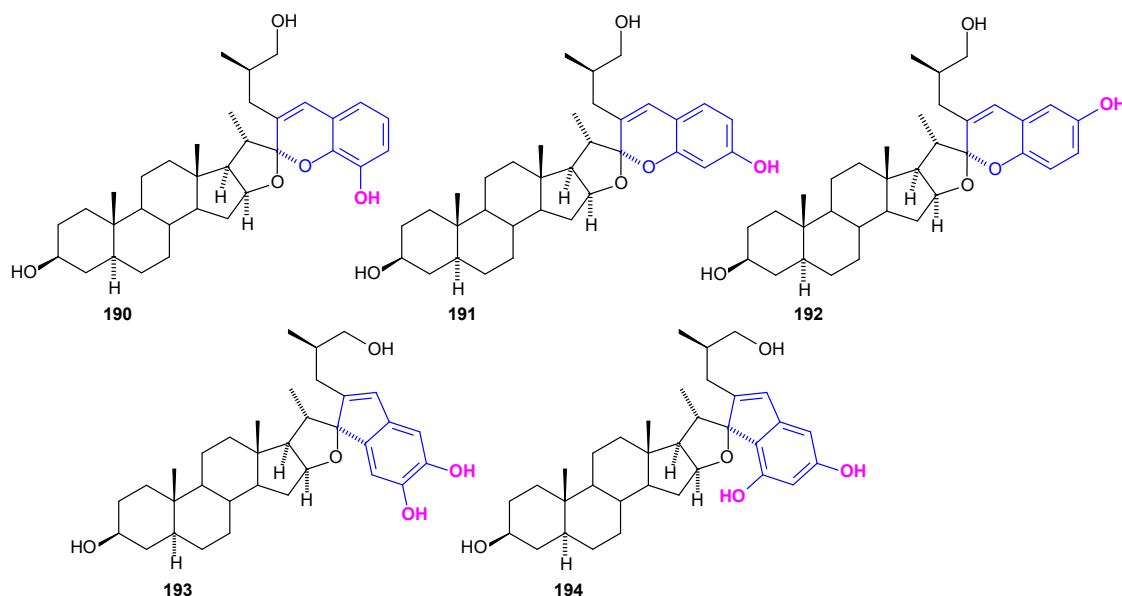


Figura 35. Espirocromenos y espiroindenos hidroxilados a los que se les evaluó su capacidad antioxidante.

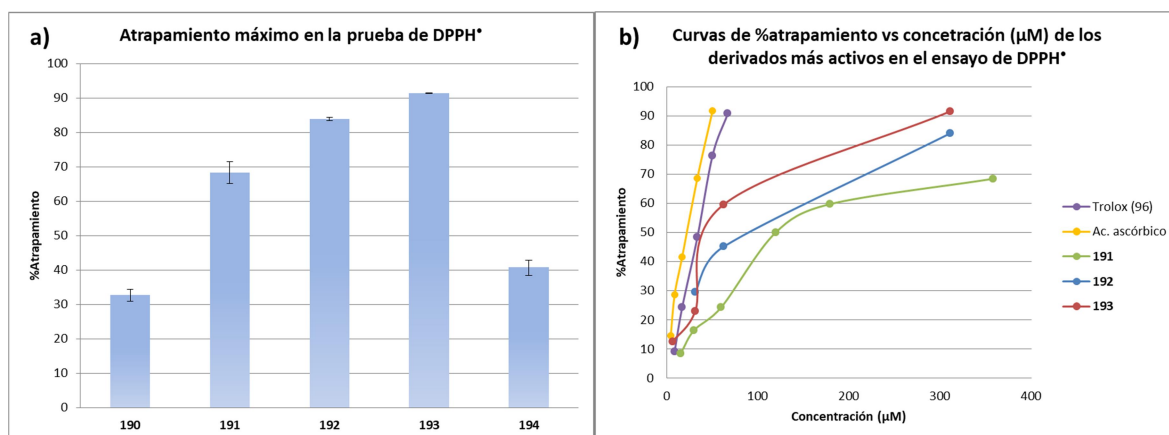


Figura 36. a) Atrapamiento máximo en el ensayo de DPPH de los compuestos hidroxiespirocromenos y dihidroxiespiroindenos derivados de sapogeninas esteroidales. b) Comparación de la actividad antioxidante del Trolox (92), ácido ascórbico y los derivados 191-193 que presentaron un atrapamiento mayor al 50% en el ensayo de DPPH*.

El compuesto 7'-hidroxiespirocromenol **191** que tiene una subestructura de tipo resorcinol y solo un grupo hidroxilo libre, mostró un atrapamiento máximo del 68% con una IC_{50} bastante elevada (141.05 μM), en comparación con los otros compuestos probados. En cambio, el 6'-hidroxiespirocromenol **192** presentó una actividad muy similar a la del derivado acetilado **130** pues

presenta exactamente la misma subestructura de tipo quinoide en la cadena lateral. Sin embargo, el compuesto más activo de todos los derivados obtenidos en este trabajo fue el 3',4'-dihidroxi-espiroindenol **193** (34.74 μM) que tiene dos grupos fenólicos libres en la cadena lateral y presentó una actividad muy cercana a la del Trolox (27.32 μM) en este ensayo.

Tabla 33. IC_{50} de los hidrox-espirocromenoles y dihidrox-espiroindenoles derivados de sapogeninas esteroidales en el ensayo de DPPH $^{\bullet}$.

Muestra	IC_{50} (μM)
191 (resorcinol)	141.05 \pm 10.91
192 (quinoide)	74.71 \pm 3.88
193 (catecol)	34.74 \pm 2.30

Por otra parte y con la intención de determinar la actividad de los compuestos espirocromenoles y espiroindenoles hidroxilados sobre especies reactivas del oxígeno (RO's), se llevaron a cabo los estudios de atrapamiento de los radicales hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y peróxido (H_2O_2). Los derivados evaluados únicamente mostraron actividad en el atrapamiento de H_2O_2 y la actividad máxima de estos compuestos no fue mayor al 50%, como se muestra en la **Figura 37**. Se observa que nuevamente el compuesto más activo fue el derivado **193**, lo que parece indicar que las subestructuras de tipo catecol y que tienen todos los fenoles libres son las que presentan la mejor actividad.

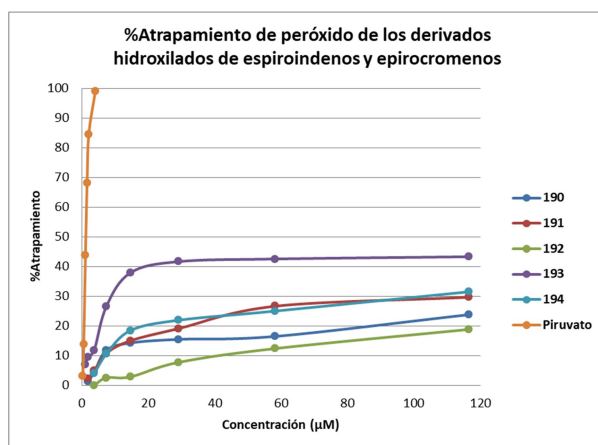


Figura 37. Atrapamiento de H_2O_2 de los compuestos hidrox-espirocromenoles y dihidrox-espiroindenoles derivados de sapogeninas esteroidales.

7.3. Actividad antitumoral y antioxidante de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol.

Tomando en cuenta que los bencilidenespirostanos tienen actividad citotóxica y debido a lo novedosos que pueden resultar estructuralmente los dímeros híbridos sapogenina-estradiol, se evaluó la actividad antitumoral de los dímeros de tipo-bencilidenespirostando (**Figura 38**).

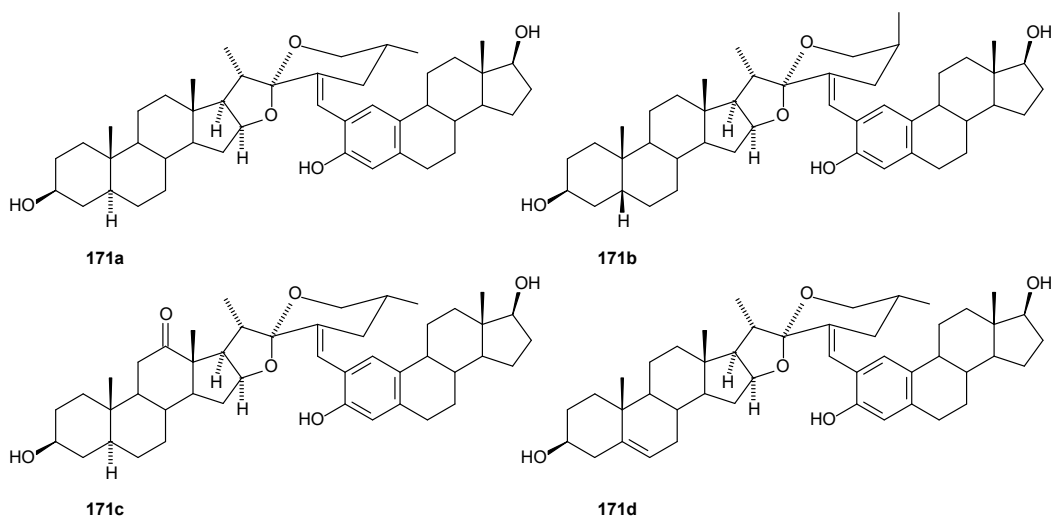


Figura 38. Dímeros híbridos evaluados.

Todos los dímeros evaluados en las líneas celulares de cáncer CEM, MCF7 y Hela fueron bastante activos e incluso mejores que los bencilidenespirostanos aunque, también presentaron actividad citotóxica contra los fibroblastos humanos normales (BJ) (**Tabla 34**).

Nuevamente el compuesto más activo es el que presenta una función oxigenada en la posición C-12, lo que podría indicar la importancia de este grupo funcional en dicha posición para la actividad citotóxica. A partir de estos resultados preliminares se logró encontrar una molécula *líder*, que permite dirigir el camino de nuevos derivados para mejorar su actividad biológica.

Tabla 34. Valores de IC₅₀ (μM) obtenidos a partir de los ensayos de Calceína AM utilizando tres líneas celulares de cáncer (CEM, MCF7 y HeLa) y fibroblastos humanos normales (BJ), de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol evaluados.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)			
	CEM	MCF7	HeLa	BJ
171a	22.9 ± 9.6	18.4 ± 1.8	15.8 ± 5.4	17.0 ± 1.1
171b	28.2 ± 1.4	42.4 ± 1.3	12.1 ± 2.0	>50
171c	4.9 ± 0.5	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.4	1.8 ± 0.5
171d	10.6 ± 3.0	19.5 ± 4.2	12.3 ± 2.0	16.6 ± 0.7

Por otra parte, se llevaron a cabo pruebas de actividad antioxidante de los dímeros híbridos obtenidos. Como se sabe, el estradiol tiene una actividad antioxidante que está íntimamente relacionada al grupo fenol del anillo A del esteroide y debido a que en los dímeros sapogenina-estradiol ese fragmento no se encuentra alterado, se puede suponer que estos nuevos derivados obtenidos deberían conservar dicha propiedad.

Se realizaron los ensayos de DPPH, ORAC (capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno) y FRAP (potencia antioxidante reductora férrica) a los dímeros híbridos y los resultados se encuentran colectados en la **Tabla 35**. Se puede notar que todos los compuestos evaluados mostraron ligera actividad en todos los experimentos. Se realizaron también las pruebas RO's de estos dímeros y se determinó que eran reactivos únicamente en el ensayo de atrapamiento de radicales hidroxilo ([•]OH) en un rango de concentraciones de 215 – 4292 μM (**Figura 39, Tabla 36**). Todos los compuestos analizados mostraron un comportamiento muy similar en todas las concentraciones evaluadas, lo que podría indicar claramente que la actividad antioxidante es consecuencia de la presencia del fragmento de estradiol en la cadena lateral, que es común para todas las sustancias probadas.

Tabla 35. Resultados de los ensayos de actividad antioxidante de los dímeros híbridos a una concentración 350 μM . Se agrega también los resultados de 2-formilestradiol (**168**) con fines comparativos.

Compuesto	Ensayo de actividad antioxidante		
	DPPH (% atrapamiento)	ORAC (Eq. μM de Trolox/g)	FRAP (Eq. μM de Trolox/g)
171a	18.90 ± 1.22	22.84 ± 2.37	0.0205 ± 0.0015
171b	19.06 ± 0.65	35.25 ± 2.07	0.0189 ± 0.0012
171c	49.20 ± 2.71	18.40 ± 1.34	0.0201 ± 0.0031
171d	17.65 ± 1.06	22.09 ± 2.32	0.0188 ± 0.0023
2-formilestradiol (168)	3.58 ± 0.34	1070.51 ± 98.29	0.0174 ± 0.0017

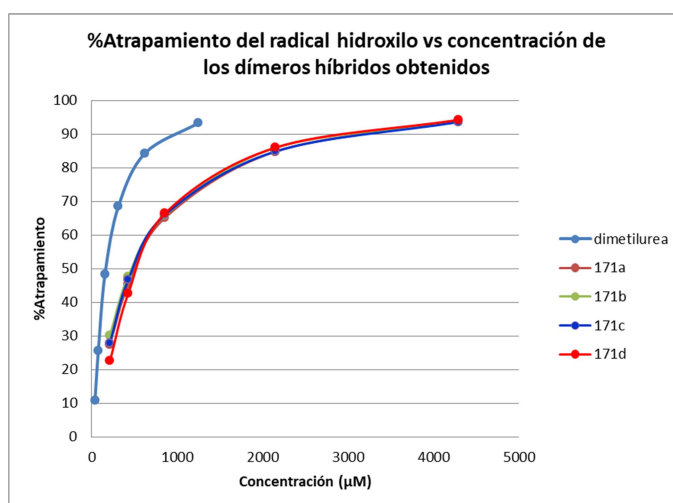


Figura 39. Atrapamiento de $\cdot\text{OH}$ de los dímeros híbridos sapogenina-estradiol (**171**) obtenidos.

Tabla 36. IC_{50} de los dímeros híbridos derivados de sapogeninas esteroidales en el ensayo de atrapamiento del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

Muestra	IC_{50} (μM)
171a	524.06 ± 33.30
171b	473.59 ± 62.51
171c	506.51 ± 34.52
171d	568.73 ± 75.63
dimetilurea	174.41 ± 4.21

7.4. Solvatomorfismo conformacional del acetato de 3'-acetoxi-bencilidentigogenina.

En un intento de obtener una muestra analítica por recristalización en CH_2Cl_2 /metanol del compuesto 3'-acetoxi-bencilidentigogenina (**138**), se aisló un material cristalino que fue identificado por difracción de Rayos X como un solvato de metanol en el que el disolvente está atrapado formando cadenas, en un material altamente organizado. Los intentos sucesivos de producir hidratos o solvatos de etanol al intentar la cristalización en diferentes mezclas de disolventes no tuvieron éxito, pero mostraron la tendencia de este compuesto a producir solvatos con una variedad de disolventes y debido a esto se decidió llevar a cabo un análisis más profundo de dicha propiedad en una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Braulio Rodríguez Molina, del Instituto de Química de la UNAM, con ayuda del M. en C. Abraham Colín. (Figura 40 y 41).

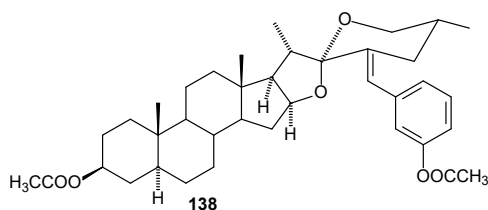


Figura 40. 3'-acetoxi-bencilidentigogenina.

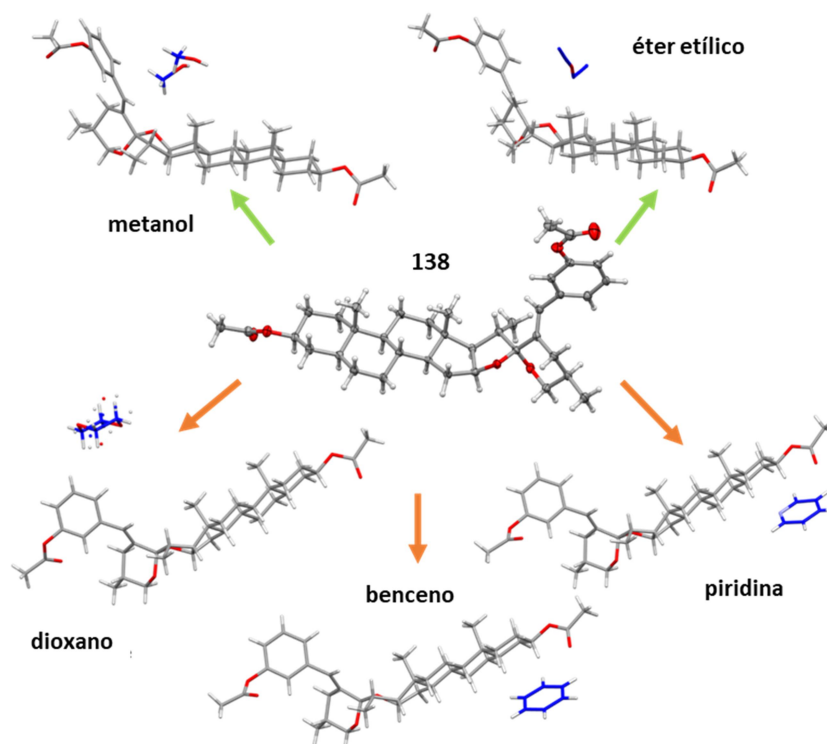


Figura 41. Complejos de inclusión de la 3'-acetoxi-bencilidentigogenina (**138**) observados.

El compuesto **138** cristaliza ocluyendo moléculas dentro de la red cristalina, dando lugar a seis matrices de cristales que contienen metanol, éter etílico, dioxano, benceno, piridina y dimetilsulfóxido (DMSO). Curiosamente, todos los solvatos mostraron diferencias conformacionales, principalmente reflejadas en la posición relativa del fragmento bencilideno flexible. Cuando estas diferencias son pequeñas, algunos de los solvatos mostraron isoestructuralidad.

Al cristalizar el compuesto **138** con los sistemas de disolventes éter etílico/hexano ó $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, se generaron los solvatomorfos **138-MeOH (Figura 42)** y **138-éter (Figura 43)** respectivamente, en los cuales el disolvente se encuentra formando cadenas unidas a través de enlaces de hidrógeno, dentro del canal generado por las moléculas de esteroide en una matriz dimérica. La interacción entre la molécula huésped y el esteroide se lleva a cabo principalmente con los metilos C-18 y C-19 y con el anillo aromático del fragmento bencilideno. En los estudios de TGA y DSC, se observa una pérdida de masa cercana a los 100 °C, lo que indica un reordenamiento de la red cristalina que finalmente funde entre los 160 – 165 °C para ambos sólidos cristalinos. En el solvato de éter etílico **138-éter** las moléculas huésped estaban muy desordenadas y, por lo tanto, no fue posible refinar todas las posiciones

Experimentos de cristalización adicionales para el acetoxi-bencilidenespiroostano **138** generaron tres solvatos más que pertenecen a otro grupo isoestructural, la Forma **138-bn** con benceno (**Figura 44**), la Forma **138-dx** con dioxano (**Figura 45**) y la Forma **138-py (Figura 46)** con piridina. En dichos solvatos, la posición de los disolventes atrapados se ubica en una cavidad generada por los acetatos de C-3 y del fragmento aromático, en contraste con los solvatos anteriores **138-MeOH** y **138-éter**, donde el metanol o el éter etílico estaban ubicados dentro de una cavidad formada por los anillos B y C del espiroostano. En los estudios calorimétricos, se observa la pérdida de disolvente a una temperatura inferior al punto de fusión que indica el reacomodo de la red cristalina que finalmente funde a una temperatura entre los 158 y 162 °C. (**Figura 41**).

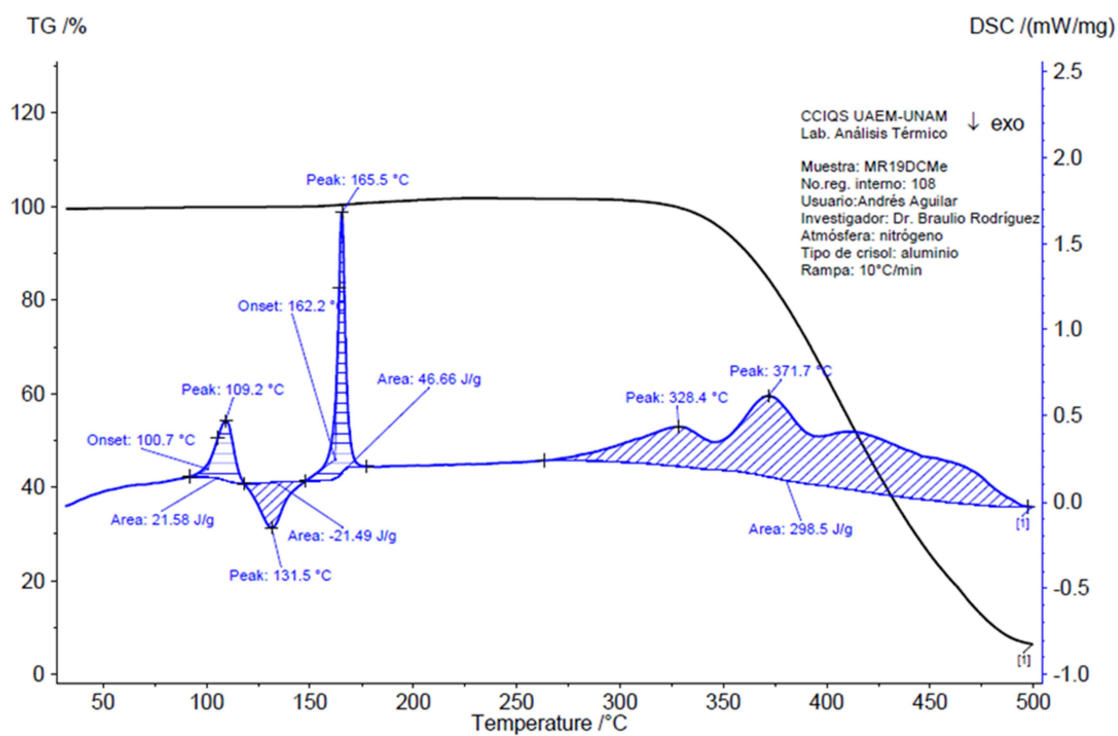
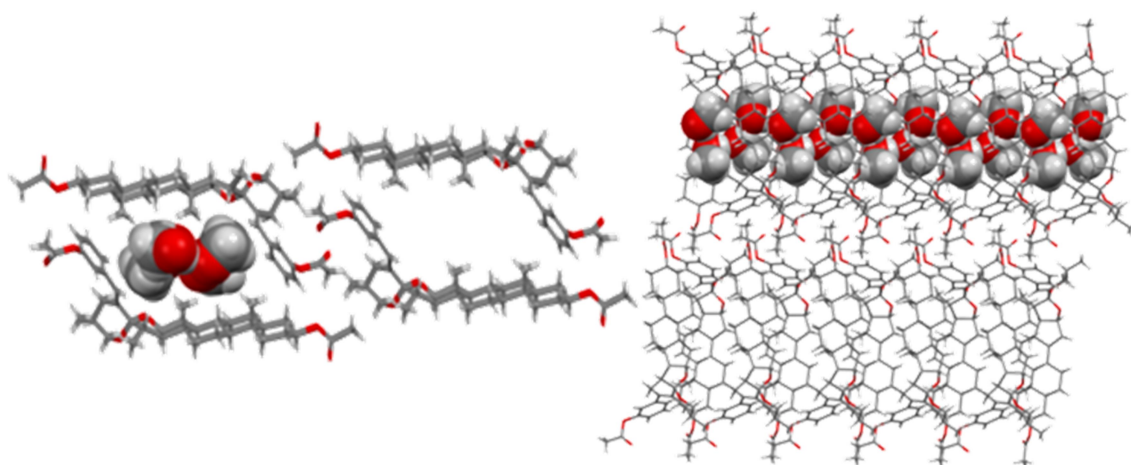


Figura 42. Dos perspectivas de la red cristalina en donde se observa el complejo de inclusión y análisis calorimétricos del solvatomorfo **138-MeOH**, obtenido por cristalización con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$.

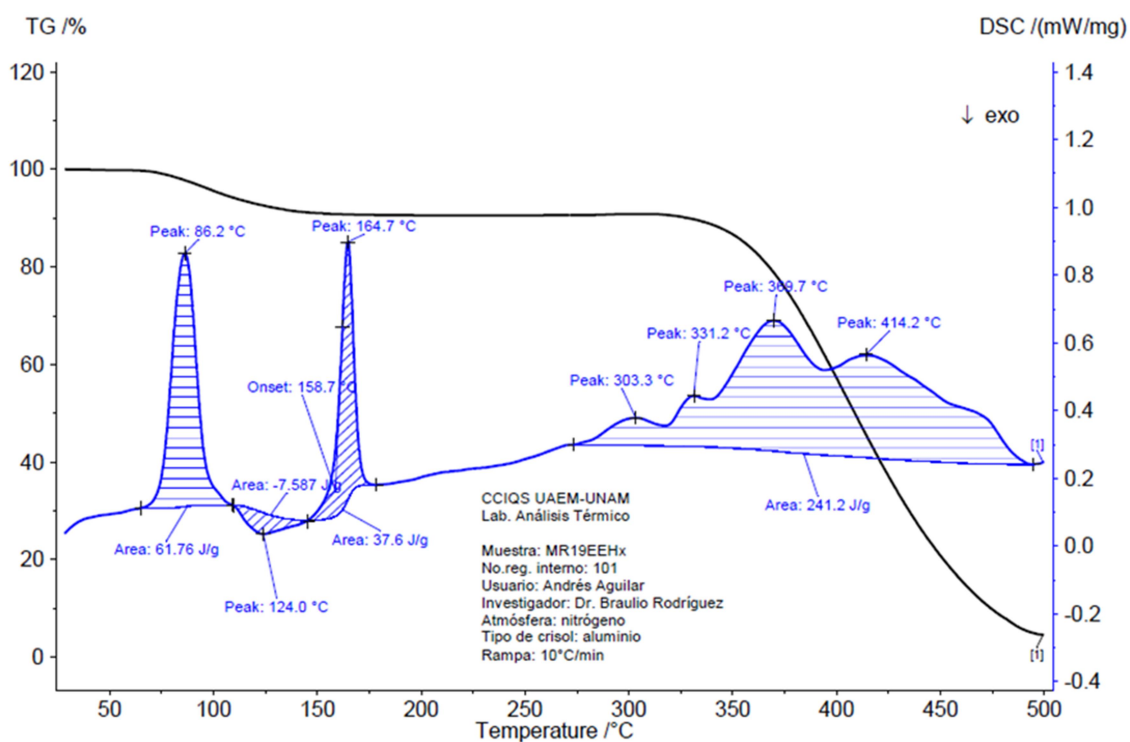
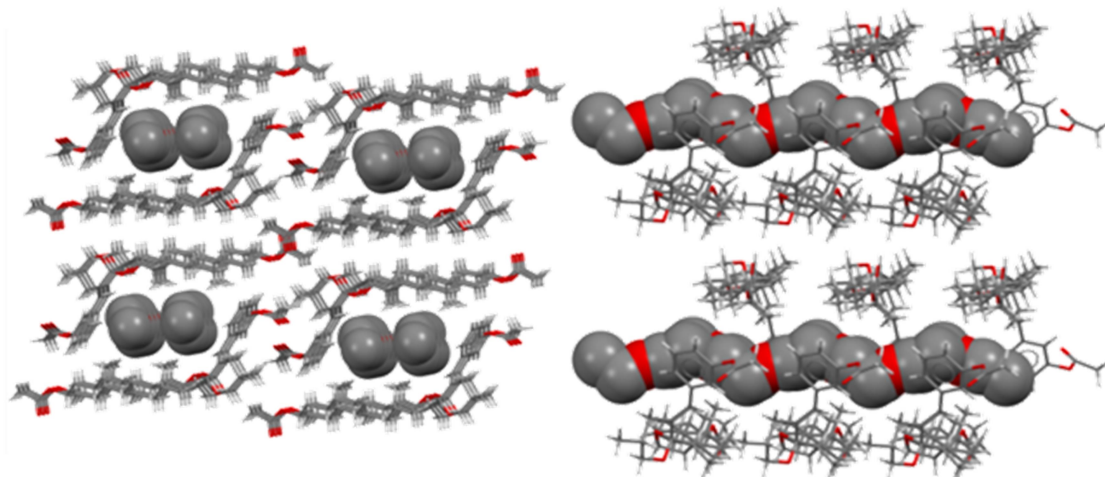


Figura 43. Dos perspectivas de la red cristalina en donde se observa el complejo de inclusión y análisis calorimétricos del solvatomorfo **138-éter**, obtenido por cristalización con éter etílico/hexano.

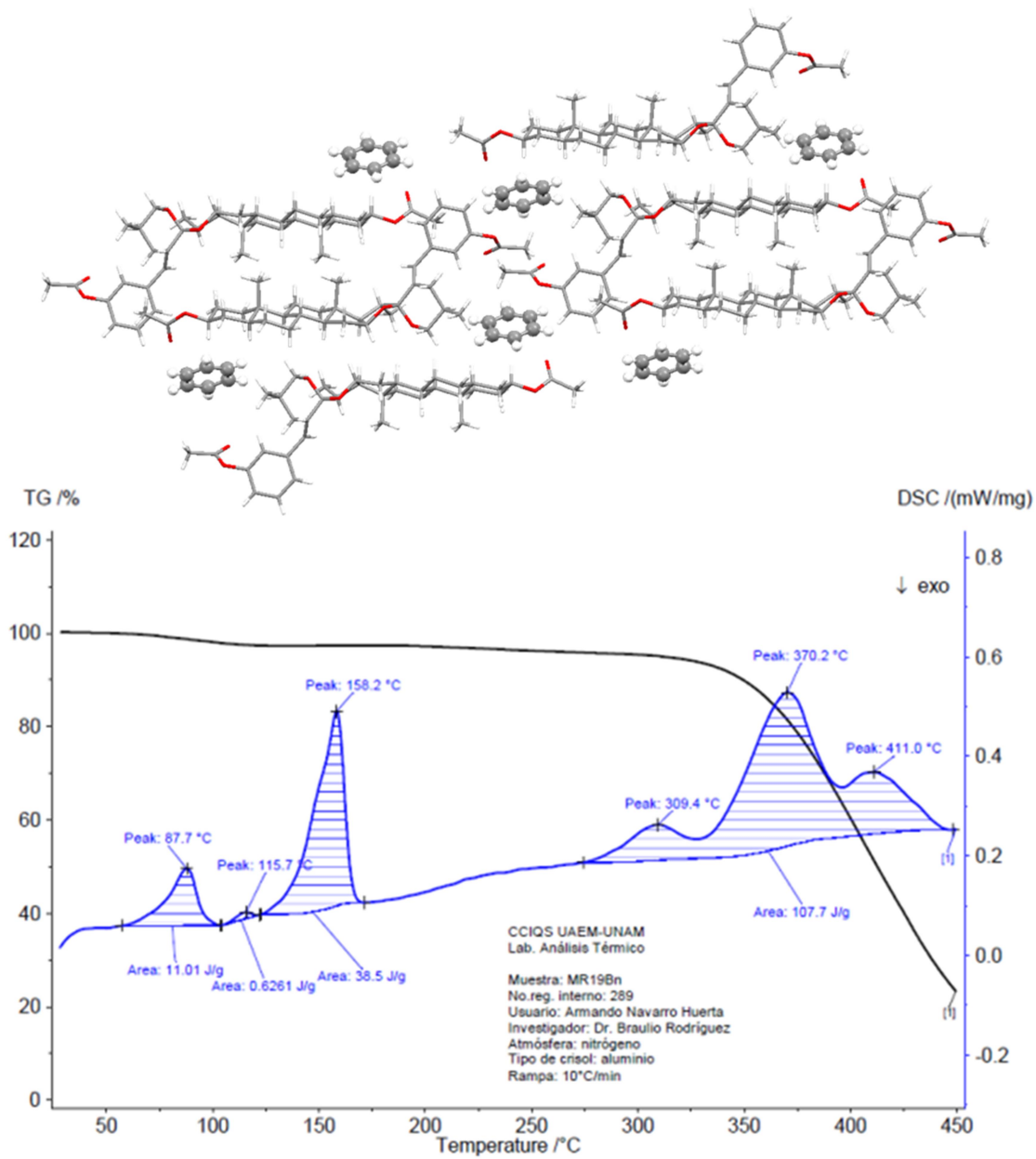


Figura 44. Red cristalina y análisis calorimétricos del solvatomorfo **138-bn**, obtenido por cristalización con benceno.

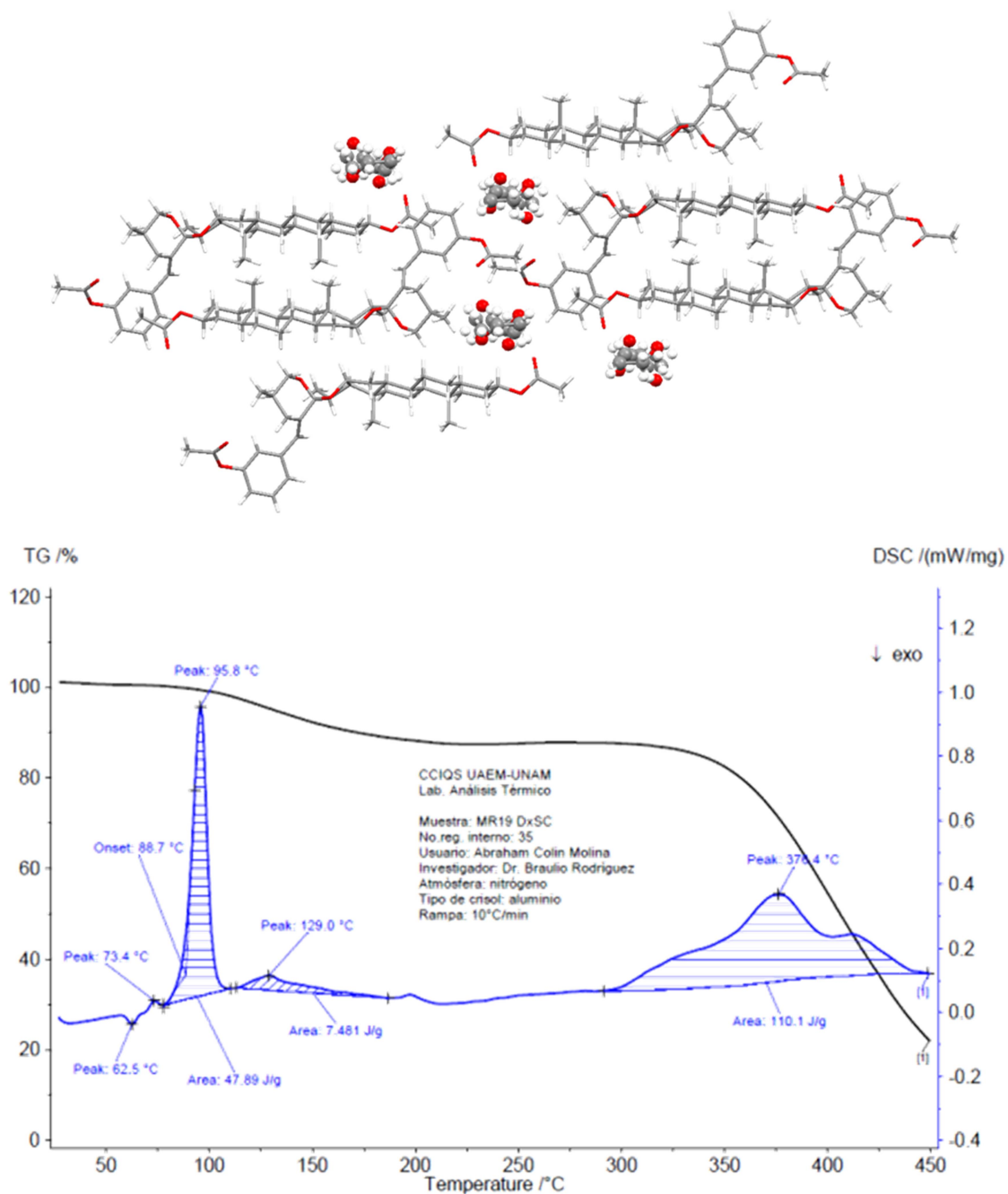


Figura 45. Red cristalina y análisis calorimétricos del solvatomorfo **138-dx**, obtenido por cristalización con dioxano/agua a 50 °C.

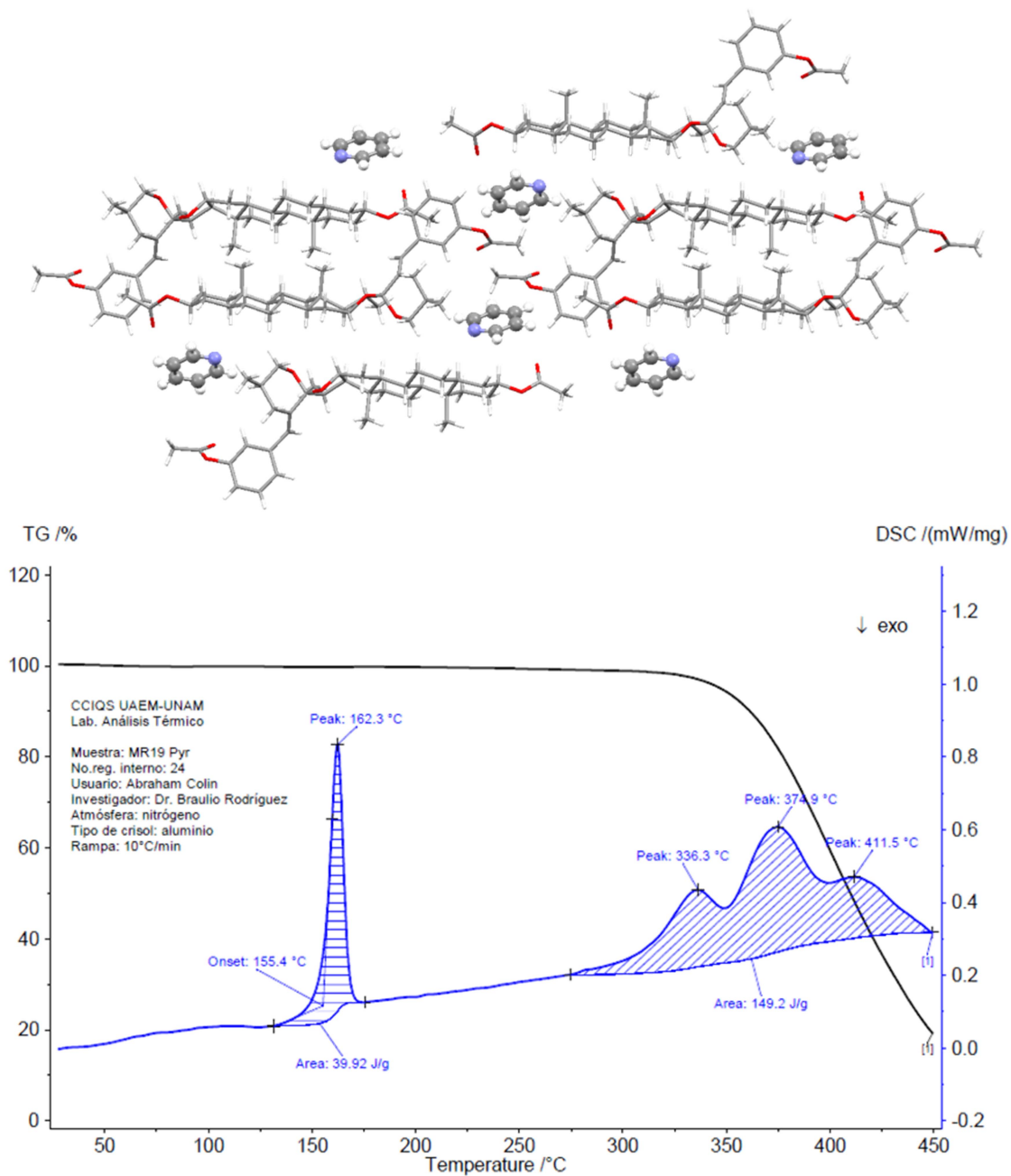


Figura 46. Red cristalina y análisis calorimétricos del solvatomorfo **138-py**, obtenido por cristalización con piridina/agua a 50 °C.

Un solvatomorfo muy distinto se obtuvo al recrystalizar de DMSO (**138-DMSO**) y en esta red cristalina se observa que las moléculas del esteroide están apiladas por la misma cara, a diferencia de las formas anteriores. La cavidad en la que se encuentra la cadena de disolvente flanquea los extremos del bencilidenespiroetano **138** dónde el DMSO interactúa con los grupos acetato del anillo aromático y de C-3. Sorprendentemente, los análisis calorimétricos señalaron que también existe una pérdida de disolvente alrededor de los 120 °C y la nueva forma cristalina presenta un punto de fusión que coincide con los puntos de fusión observados en las formas anteriores (160 - 162 °C) (**Figura 47**).

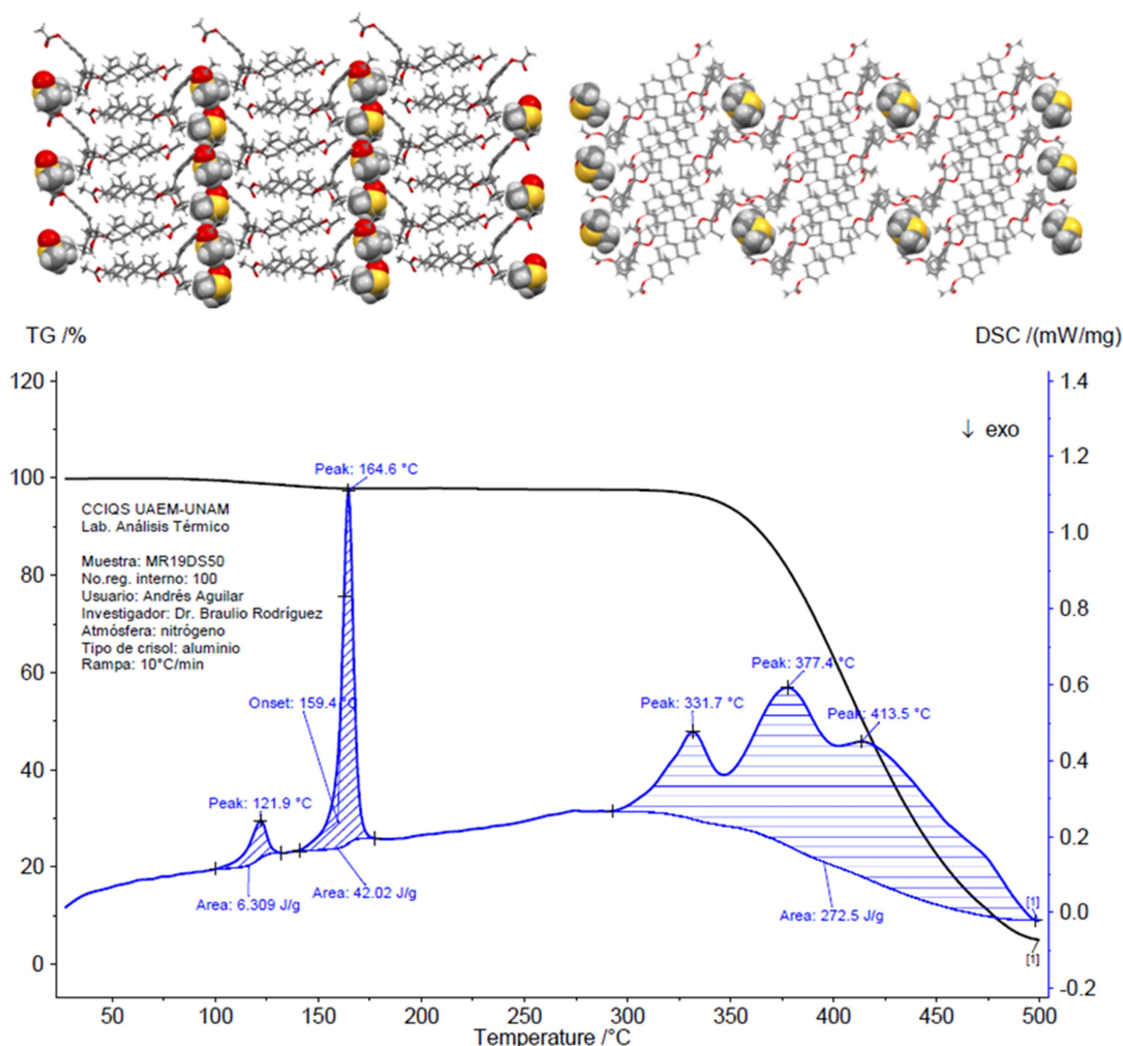


Figura 47. Dos perspectivas de la red cristalina en donde se observa el complejo de inclusión y análisis calorimétricos del solvato **138-DMSO** obtenido por cristalización con DMSO a 50 °C.

Se obtuvo una forma cristalina con la cavidad vacía y más estrecha cuando se recrystalizó de piridina a 50 °C ó de DMF a 50 °C (**Figura 48**) y se encontró que el punto de fusión de esta estructura cristalina (164 – 171 °C), era muy similar a los puntos de fusión de las otras Formas cristalinas descritas tras la pérdida de disolvente, que funden en un rango entre los 158 – 165 °C.

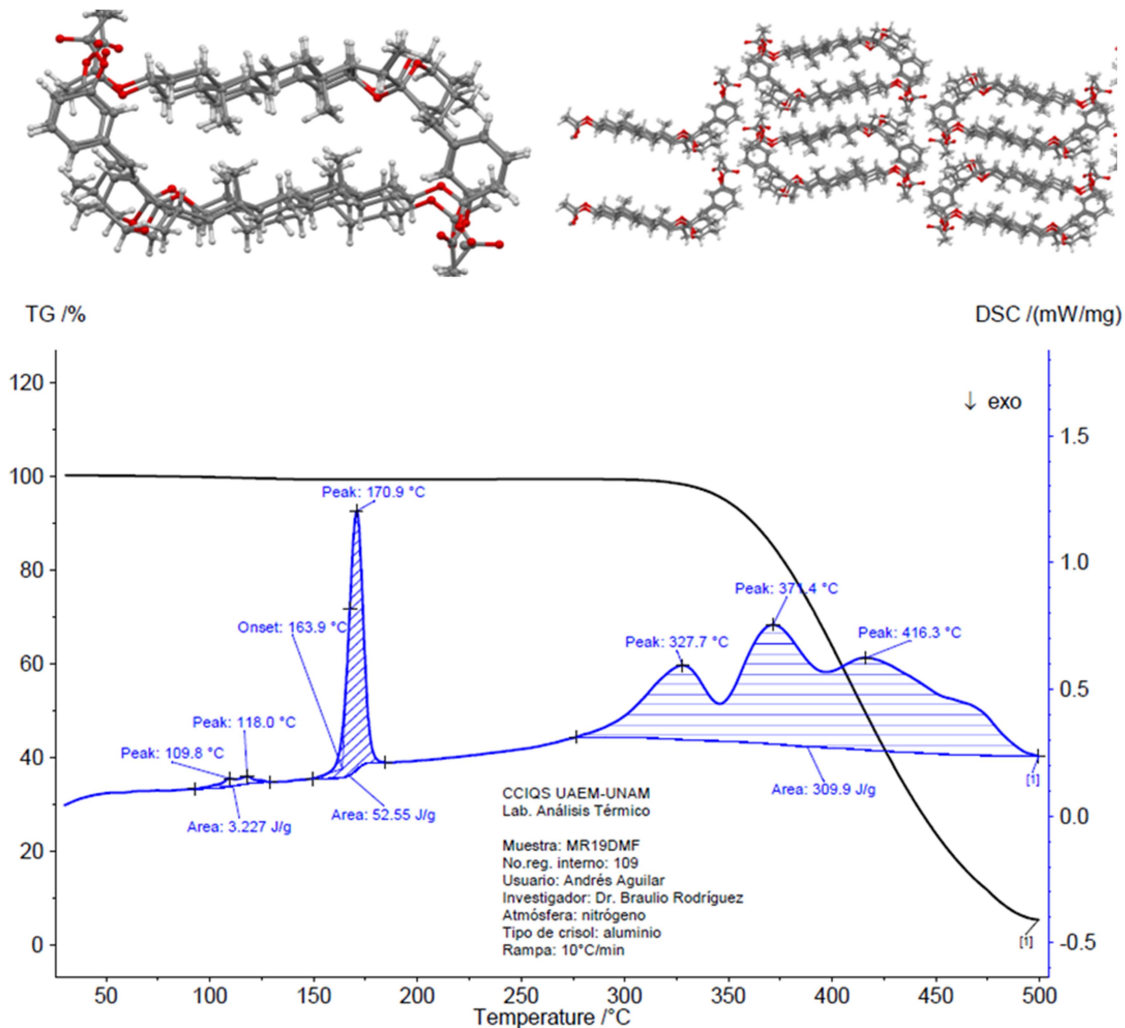


Figura 48. Red cristalina y análisis calorimétricos de la forma libre de disolventes **138-SD**.

La coincidencia en los puntos de fusión de las muestras secas, indica que cada solvatomorfo, tras presentar la pérdida de disolvente, sufría un reacomodo de las moléculas para llegar a la Forma **138-SD**. Por lo anterior, se decidió calentar las muestras de los solvatos **138-MeOH** (metanol) y **138-éter** (éter etílico) a 130 °C y después comparar los difractogramas de DRX de polvos de las muestras tratadas térmicamente (TT) con el de la forma libre de disolventes **138-SD** (**Figura 49**). Como se observa, existe un ajuste perfecto entre la forma cristalina sin disolvente y las muestras tratadas térmicamente antes mencionadas.

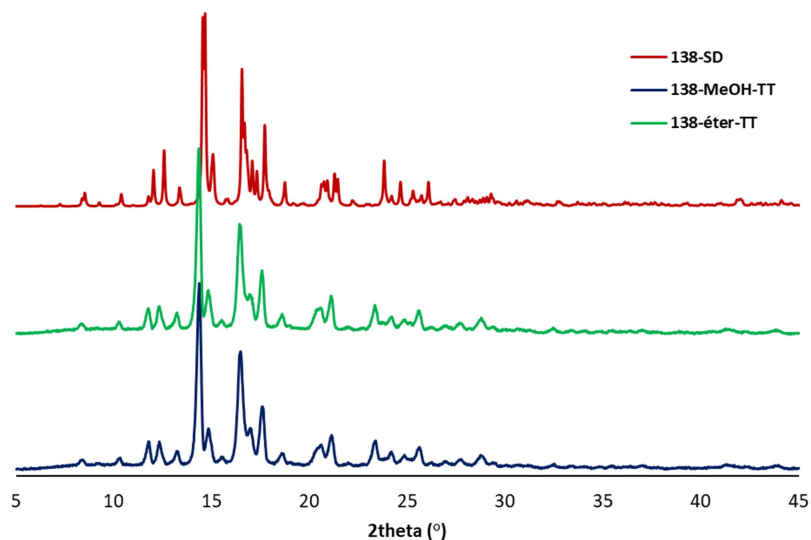


Figura 49. Comparación de DRX de polvos entre la forma libre de disolventes **138-SD** y las muestras con tratamiento térmico **138-MeOH-TT** y **138-éter-TT** en las que se observa una completa coincidencia.

Un análisis similar comparando los difractogramas de las muestras isoestructurales **138-bn** (benceno), **138-py** (piridina) y **138-dx** (dioxano) tratadas térmicamente a 130 °C, con la Forma **138-SD**, mostró que las redes cristalinas evolucionaban hacia esta forma libre de disolventes (**Figura 50**).

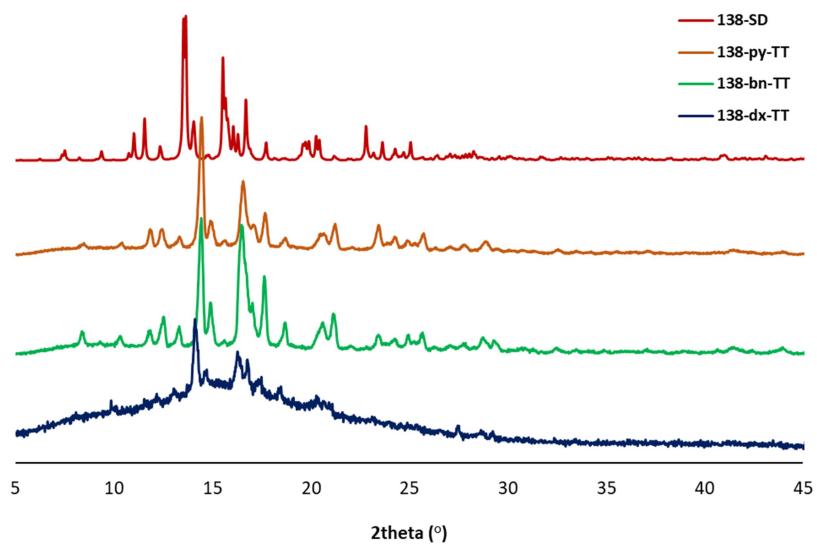


Figura 50. Comparación de DRX de polvos entre la forma libre de disolventes **138-SD** y las muestras con tratamiento térmico **138-py-TT**, **138-bn-TT** y **138-dx-TT**.

Independientemente de la conformación inicial y la posición del disolvente, cuando cinco de los seis cristales se trataron térmicamente, se transforman en la Forma **138-SD** libre de disolventes, que también se obtuvo de manera independiente por cristalización del espiroetano **138** en DMF. Solo en el caso del solvato de DMSO, la estructura tratada térmicamente dio lugar a la Forma **138-S-DMSO-TT** que es otra forma libre de disolvente diferente a la estructura cristalina **138-SD** (Figura 51).

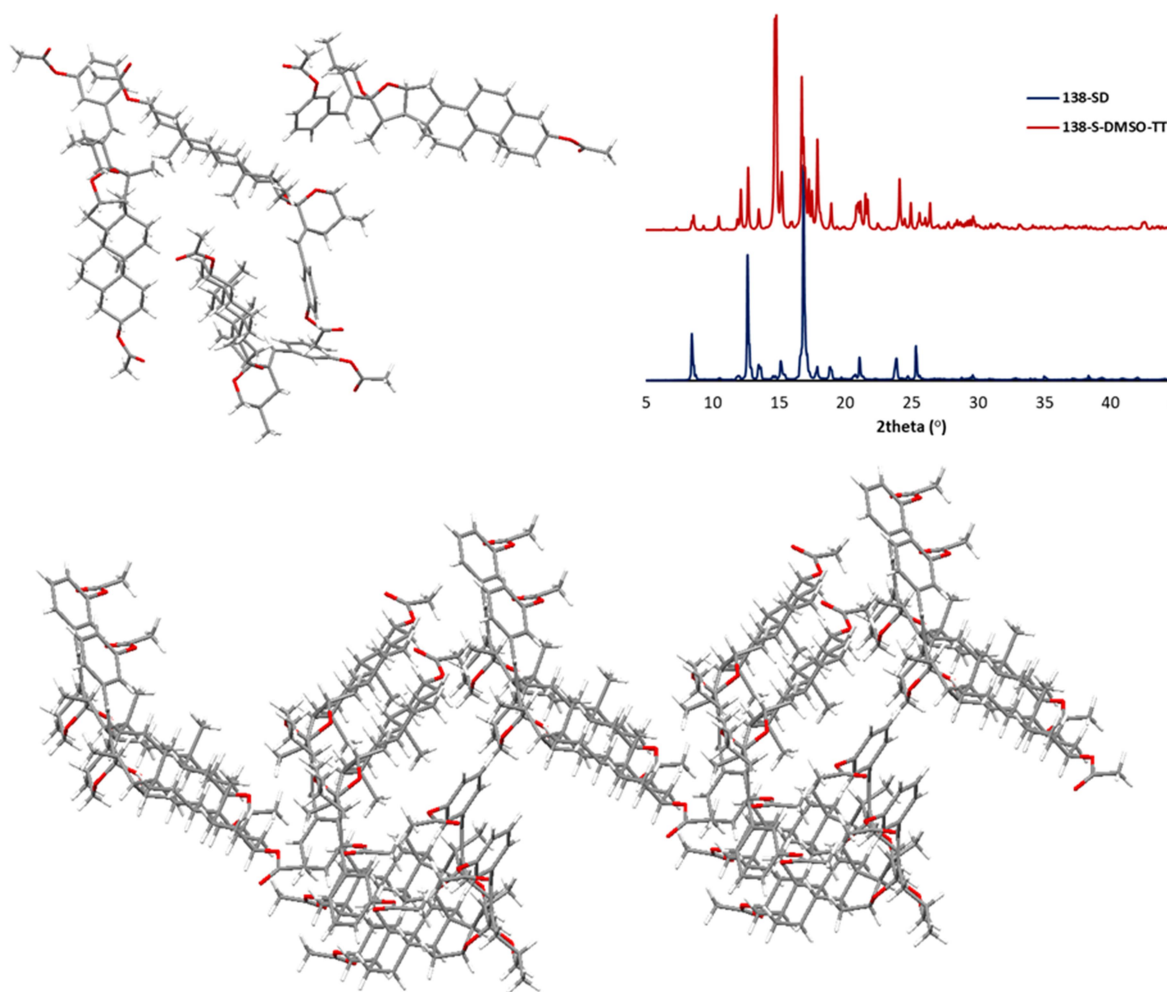


Figura 51. Red cristalina del solvatomorfo libre de disolvente **138-S-DMSO-TT** y comparación de difractogramas de DRX de polvos con la Forma **138-SD**.

Conclusiones

Se demostró que la presencia del fragmento bencilideno en C-23 produce cambios drásticos en el perfil de reactividad de la agrupación espirocetálica, comparada con la de las sapogeninas esteroidales no funcionalizadas y la configuración de la posición C-25 en los 23E-bencilidenespirostanos tiene un rol determinante en las transformaciones de la cadena lateral de estos compuestos. Estos resultados ayudan a entender la reactividad de los 23E-bencilidenespirostanos que pueden ser empleados como intermedios sintéticos en la preparación de esteroides potencialmente bioactivos. Además que se demostró que los bencilidenespirostanos presentan actividad antitumoral moderada contra algunas líneas celulares de cáncer en ensayos *in vitro*, siendo el compuesto más activo el derivado de la hecogenina (**119c**) que tiene un grupo carbonilo en C-12.

Se generó una nueva familia de derivados esteroidales con un fragmento espiro[furan-indeno] unido a la cadena lateral que es producto de un reordenamiento de la cadena lateral de los 23E-bencilidenespirostanos catalizado por medio ácido y se encontró que el mejor catalizador para esta transformación fue el HClO₄.

También se encontró que el tratamiento de 23E-bencilidenespirostanos con BF₃•Et₂O y Ac₂O genera la apertura oxidativa del anillo F y con esto se producen los bencilidenfurostenos correspondientes con buenos rendimientos. Sin embargo, se observa que la ausencia de un ácido prótico en el medio de reacción, conduce a la formación de los dienos en lugar de los espiro[furanos]indenos, por lo que se puede asumir que los bencilidenfurostenos no están implicados en el mecanismo de formación del fragmento de espiroindeno

Por otra parte, a través de la doble condensación aldólica entre los acetatos de sapogeninas esteroidales y aldehído tereftálico, se obtuvieron los dímeros simétricos de sapogeninas esteroidales unidas por un fragmento 1,4-dimetilidenbenceno. Tras la saponificación de estos compuestos utilizando MeONa en CH₂Cl₂/MeOH, se generaron los derivados dímeros simétricos 1,4-dimetilidenbencen-espirostanos. Estos derivados fueron enviados a pruebas de actividad biológica como antitumorales, pero debido a su pobre solubilidad, no fue posible evaluar su actividad.

Se llevó a cabo un estudio de reactividad frente a las reducciones con NaBH_3CN en ácido acético e hidrogenación catalítica de los 1,4-dimetilidenbencen-espirostanos de las series 25R y 25S. La reducción con hidruro generó los dímeros simétricos 1,4-dimetilidenbencen-furostanos (**123a/b**) y 1,4-dimetilbencil-espirostanos (**124a/b**), así como un dímero no simétrico con un fragmento bencilspirostánico y otro bencilidenfurostánico (**125a/b**). La hidrogenación catalítica del dímero de la serie 25R generó en un muy buen rendimiento el dimetilbencil-espiroetano **123a**. En cambio, la hidrogenación catalítica del dímero simétrico de la sarsapogenina no generó el derivado dimetilbencil-espiroetano, debido a los problemas de solubilidad del sustrato y de la reactividad particular de la serie 25S.

La condensación aldólica entre sapogeninas esteroidales y 2-hidroxibenzaldehído generó una nueva familia de esteroides con una cadena lateral constituida por una unidad espiroacetálica unida a un fragmento de 2H-cromeno, que fueron denominados espirocromenos. Una extensión a esta metodología utilizando 2,5-dihidroxibenzaldehído produjo los derivados 6'-hidroxi-espirocromenos que demostraron actividad significativa como atrapadores de radicales libres en el ensayo de DPPH[•]. El hecho de que los compuestos activos se pueden obtener fácilmente en un solo paso y a partir de productos naturales fácilmente disponibles, abre el camino para la producción de nuevos antioxidantes esteroidales.

Mediante la reacción de condensación aldólica del acetato de tigogenina y los acetatos de benzaldehídos monohidroxilados, se sintetizaron los derivados 2', 3' y 4'-acetoxibencilidentigogenina en buenos rendimientos y la síntesis de estos derivados se extendió a otras sapogeninas esteroidales. Se observó que la presencia de un grupo acetoxilo en el anillo aromático de estos compuestos, no afecta el perfil de reactividad del fragmento bencilideno.

Los compuestos bencilideno monoacetoxilados derivados de la tigogenina, mostraron facilidad para cristalizar y las estructuras propuestas se pudieron corroborar por difracción de Rayos X de monocristal. De estas cristalizaciones se observó que el compuesto 3'-acetoxibencilidentigogenina tiene la capacidad de formar complejos de inclusión con distintos disolventes.

Utilizando al diacetato de 2-formilestradiol como materia prima, se obtuvieron los dímeros híbridos bencilidenespirostanos y espirocromeno derivados de sapogeninas esteroidales a través de la condensación aldólica catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, con rendimientos moderados. Estos dímeros se saponificaron para obtener los correspondientes compuestos hidroxilados, que se obtuvieron con buenos rendimientos y demostraron tener una muy importante actividad antitumoral y antioxidante. En particular, el compuesto **171c** que presenta una función oxigenada en C-12, demostró ser muy potente contra líneas celulares de cáncer.

Se sintetizaron los compuestos diacetoxi-bencilidenespirostanos que presentaron en el fragmento bencilideno subestructuras de tipo: quinoide, catecol o resorcinol, a través de la condensación del acetato de tigogenina y diacetatos de benzaldehídos dihidroxilados. A través de una reacción de trasesterificación de Fischer de estos espirostanos, se obtuvieron los derivados hidroxiespirocromenoles y dihidroxiespiroindenoles que tuvieron una significativa actividad antioxidante. De estos compuestos, el 3'4'-dihidroxi-espiroindenol **193** fue el derivado que presentó la mayor actividad antioxidante y tiene una subestructura de catecol con dos hidroxilos fenólicos libres en la cadena lateral.

Los esteroides naturales que contienen un sustituyente oxigenado en el anillo C, como la cefalostatina-1, la ritterazina-F, la porrigenina C y los hippuristanoles se encuentran entre los esteroides más citotóxicos en comparación con los compuestos que tienen un anillo C sin una función oxigenada. Esto sugiere que en los productos naturales, la presencia de un sustituyente oxigenado en el anillo C puede conducir a una mayor citotoxicidad. Del mismo modo, los compuestos más activos encontrados en este trabajo son aquellos que presentan un grupo carbonilo en la posición C-12 en el anillo C.

Referencias bibliográficas

1. Dewick, P.M. Medicinal Natural Products, 2ª Edición, Ed. John Wiley & Sons Ltd. Inglaterra, **2002**, 232-241.
2. Ikan, R. Selected Topics in the Chemistry of Natural Products, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore, **2008**, 80-84.
3. Lednicer, D. Steroid Chemistry at a Glance, Ed. John Wiley & Sons Ltd. Reino Unido, **2011**, 2-9.
4. Kasal, A. Structure and Nomenclature of Steroids, en: Makin, H.L.J.; Gower, D.B. Steroid Analysis, 2ª Edición, Springer, Londres, **2010**, 1-24.
5. Moss, G.P. Nomenclature of steroids (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry). *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1783-1822.
6. Bruice, P.Y. Organic Chemistry, 4ª Edición, Ed. Prentice Hall, New Jersey, **2004**, 1023-1027.
7. Furhrop, H.-J., Endisch, C. Molecular and Supramolecular Chemistry of Natural Products and Their Model Compounds, Ed. Marcel Dekker, Inc. Estados Unidos, **2000**, 129-156.
8. Kuklinski, C. Farmacognosia. Ed. Ediciones Omega, Barcelona, **2003**, 147-152.
9. Hostettmann, K. et., al. Saponins. Ed. Cambridge University Press, New York, **1995**, 1-5.
10. Bruneton, J. Farmacognosia. 2ª Edición. Ed. Technique et Documentation-Lavoisier, España, **2001**, 664-681.
11. Anaya-Lang, A. L. Ecología Química. Ed. Plaza y Valdés, México, **2003**, 53-59.
12. Marcano D., et., al. Fitoquímica Orgánica. 2ª Edición. Ed. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Venezuela, **2002**, 361-364.
13. Lew. M.; Liu, H.W.; Comprehensive Natural Products II, Vol. 1. Ed. Elsevier, Reino Unido, **2010**, 771-772.
14. Perron F.; Albizati K.F. Chemistry of Spiroketals. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1617-1661.
15. Marker, R.E; Wagner, R.B; Ulshafer, P.R; Wittbecker E.L.; Goldsmith, D.P.J; Ruof, C.H. Steroidal Sapogenins. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 2167-2230.
16. Iglesias-Arteaga M.A.; Morzycki J.W. Cephalostatins and Ritterazines, en: Knölker H.J. editor The Alkaloids: Chemistry and Biology. Vol. 72, Amsterdam, Elsevier, **2013**, 153-279.
17. Romero-Ávila, M.; de Dios-Bravo, G.; Méndez-Stivalet, J.M.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis and biological activity of furostanic analogues of brassinosteroids bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety. *Steroids* **2007**, *72*, 955-959.
18. Thakur, M.; Melzig, M.F.; Fuchs, H.; Weng, A. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Biol. Targets Ther.* **2011**, *1*, 19-29.
19. Agrawal P.K.; Jain, D.C.; Gupta, R.K.; Thakur, R.S. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. Review Article. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2479-2496.
20. Saijo, R.; Fuke, C.; Murakami, K.; Nohara, T.; Tomimatsu, T. Two steroidal glycosides, aculeatiside A and B from *Solanum aculeatissimum*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 733-736.
21. Ozipek, M.; Saracoglu, I.; Ogihara, Y.; Calis, I. Nautigenin-type steroidal saponins from *Veronica fushii* and *V. muldtfida*. *Z. Naturforsch C.* **2002**, *57*, 603-608.
22. Raju, B.R.; Saikia, A.K. Asymmetric synthesis of naturally occurring spiroketals. *Molecules* **2008**, *13*, 1942-2038.
23. Mead, K.T.; Brewer, B.N. Strategies in Spiroketal Synthesis Revisited: Recent Applications and Advances. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 227-256.
24. Perron F.; Albizati K.F. Chemistry of Spiroketals. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1617-1661.

25. Fieser, L.F.; Jacobsen, R.P. Sarsasapogenin. I. An Investigation of the Side Chain. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 28-33.
26. Fieser, L.F.; Fieser, M. Steroids. Ed. Reinhold Publishing Corporation, New York, **1959**, 810-846.
27. Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M.A. Utilidad sintética de las sapogeninas espiroestánicas, en: Delgado-Lamas, G.; Romo-de Vivar, A. Editores, Temas Selectos de Química de Productos Naturales. México, Instituto de Química UNAM, **2015**, 493-519.
28. Marker, R.E.; Rohrmann, E. The Structure of the Side Chain of Sarsasapogenin. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 846-851.
29. Iglesias-Arteaga, M.A.; Pérez-Gil, R., Coll-Manchado, F.; Aspectos de interés sobre la cadena lateral de las sapogeninas esteroidales. *CENIC Ciencias Químicas* **1997**, *28*, 67-72.
30. Jastrzebska, I. Chemistry of Steroidal Sapogenins - New Advances in a Classical Field. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 353-372.
31. Woodward, R.B.; Sondheimer, F.; Mazur, Y. The Mechanism of the isomerization of steroidal sapogenins at C-25. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6693-6694.
32. Djerassi, C.; Halpern, O.; Pettit, G.R.; Reaction of the Steroidal Sapogenin Spiroketal System with Ethanedithiol. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 1-6.
33. Seo, S.; Uomori, A.; Takeda, K. Direct Observation of the Reverse 1,5-Hydride Shift: The Mechanism of Acid-Catalyzed Isomerization at C-25 of Spirostanols. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3823-3827.
34. Macías-Alonso, M.; Morzycki, J.W.; Iglesias-Arteaga, M.A.; Studies on the BF₃•Et₂O catalyzed Baeyer-Villiger reaction of spiroketalic steroid ketones. *Steroids* **2011**, *76*, 317-323.
35. Ruiz-Pérez, K.M.; Romero-Ávila, M.; Flores-Pérez, B.; Flores-Álamo, M.; Moreno-Esparza, R.; Iglesias-Arteaga, M.A. Revisiting 23-iodospirostanes. New facts and full characterization. *Steroids* **2009**, *74*, 996-1002.
36. Fernández-Huerta, M.A.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S. Side-chain opening of steroidal sapogenins to form 22-oxocholestanic skeletons. An approach to analogues of the aglycone of the potent anticancer agent OSW-1. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, *53*, 126-130.
37. University Park, Pennsylvania, USA; Laboratorio Syntex, México. "Marker Degradation": Creation of the Mexican Steroid Hormone Industry 1938-1945. *American Chemical Society. Estados Unidos*, **1999**, 1-4.
38. Marker, R.; Rohrmann, E. Sterols. LXXXVIII. Pregnanediols from Sarsasapogenin. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 518-520.
39. Marker, R.E.; Tsukamoto, T.; Turner, D.L. Sterols. C. Diosgenin. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 2525-2532.
40. Kim, S.; Sutton, S.C.; Guo, C.; LaCour, T.G.; Fuchs, P.L.; Synthesis of the North 1 Unit of the Cephalostatin Family from Hecogenin Acetate. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2056-2070.
41. Fortner, K.C.; Kato, D.; Tanaka, Y.; Shair, M.D. Enantioselective Synthesis of (+)-Cephalostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 275-280.
42. Hunt, K.W.; Grieco, P.A. Baeyer-Villiger Oxidation Promoted by Reaction of Peracids with Cyclic Oxocarbenium Ions Generated in Situ from Internal Hemiketals. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1717-1719.
43. Shi, Y.; Jia, L.; Xiao, Q.; Lan, Q.; Tang, X.; Wang, D.; Li, M.; Ji, Y.; Zhou, T.; Tian, W. A practical synthesis of cephalostatin 1. *Chem. Asian. J.* **2011**, *6*, 786-90.

44. Vargas-Romero, K.; Alberto, O.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M.A. Baeyer-Villiger reaction of steroid sapogenins by $\text{CF}_3\text{COOH-H}_2\text{O}_2$. A shortcut to pregnan-3 β ,16 β ,20-triol 3-monoacetates. *Steroids* **2017**, *128*, 1-5.
45. Marker, R.E.; Rohrmann, E. Sarsasapogenin Derivatives. Bromo compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 1921-1922.
46. Marker, E.R.; Turner, D.L.; Shabica, A.C. Bromosarsasapogenin and bromodiosgenin. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1032-1034.
47. Djerassi, C.; Martinez, H.; Rosenkranz, G. Experiments in the hecogenin series (Part 1). *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 303-308.
48. Wall, M. E.; Jones, H.W.; Side Chain Bromination Isomers of Diosgenin and Tigogenin. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3222-3227.
49. Callow R.K.; James, V.H.; Page, J.E.; Kennard, O.; Paton, P.N.; Riva di Sanseverino, L. The structure of the steroidal bromosapogenins. *J. Chem. Soc. (C)* **1966**, *3*, 288-297.
50. Anulewicz-Ostrowska, R.; Jastrzębska, I.; Morzycki, J.W.; Wójcik, J. An Assisted Solvolysis of 23-Spirostanyl Bromides and Tosylates. A New Rearrangement of Spirostanes to the Bisfuran Systems. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6916-6924.
51. Jastrzębska, I.; Dobrogowska, A.; Lutostańska, E.; Morzycki, J.W. On reactions of spirostane sapogenins with benzeneseleninic anhydride. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5024-5029.
52. Iglesias-Arteaga, M.A.; Arcos-Ramos, R.O.; One-step axial acetoxilation at C-23. A new method for the functionalization of the side chain of steroid sapogenins. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8029-8031.
53. Iglesias-Arteaga, M.A.; Velázquez-Huerta, G.A.; Méndez-Stivalet, J.M.; Galano, A.; Álvarez-Idaboy, J.R. The Baeyer-Villiger reactions of 23-oxosapogenins. *Arkivok* **2005**, *vi*, 109-126.
54. Iglesias-Arteaga, M.A.; Pérez-Martínez, C.; Coll-Manchado, F. Spirostanic analogues of castasterone. *Steroids* **2002**, *67*, 159-163.
55. Ruíz-Pérez, K.M.; Romero-Ávila, M.; Tinajero-Delgado, V.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M.A. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -induced stereoselective aldol reaction with benzaldehyde, and steroid sapogenins and its application to a convenient synthesis of dinorcholanic lactones. *Steroids* **2012**, *77*, 819-828.
56. Ramos-Enríquez, M.A.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M.A. An alternative reduction course of the spiroketal side chain of steroid sapogenins induced by the presence of a 23E-benzylidene moiety. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4401-4405.
57. LaCour, T.G.; Fuchs, P.L. Concurrent Ring Opening and Halogenation of Spiroketal. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4655-4658.
58. Instituto de Química Orgánica de Shanghai, Academia China de Ciencias (2015). *26-halogenated steroid compound as well as synthesis method and application thereof*. CN104530179A.
59. Viñas-Bravo O.; Martínez-Pascual, R.; Vega-Baez, J.L.; Gómez-Calvario, V. Sandoval-Ramírez, J.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; López-De Rosas A.; Martínez-Montiel, M.; Reyes, M.; Ruiz, J.A. Rapid conversion of spirostans into furostan skeletons at room temperature. *Steroids* **2012**, *77*, 59-66.
60. Jiang, X-L.; Shi, Y.; Tian, W-S.; Constructing 24(23 \rightarrow 22)-abeo-Cholestane from Tigogenin in a 20(22 \rightarrow 23)-abeo-Way via a $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ -mediated Favorskii Rearrangement. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4402-4406.
61. Pettit, G.R.; Bowyer, W.J.; Aluminum Chloride-Catalyzed Opening of the Steroidal Sapogenin Spiroketal System. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 84-86.

62. Faul, W.H.; Failli, A.; Djerassi, C. Side-chain transformations and deuterium labeling in the steroidal sapogenin series. *J. Org. Chem.* 1970, *35*, 2571-2585.
63. Lee, S.; LaCour, T.G.; Lantrip, D.; Fuchs, P.L. Redox Refunctionalization of Steroid Spiroketal. Structure Correction of Ritterazine M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 313-316.
64. Bäsler, S.; Brunck, A.; Jautelat, R.; Winterfeldt, E. Synthesis of cytostatic tetradecacyclic pyrazines and novel reduction-oxidation sequence for spiroketal opening in sapogenins. *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 1854-1880.
65. Chen, Y.; Tang, Y.M.; Yu, S.L.; Han, Y.W.; Kou, J.P.; Liu, B.L.; Yu, B.Y. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chin. J. Nat. Med.* **2015**, *13*, 578-587.
66. Corbiere, C.; Liagre, B.; Bianchi, A.; Bordji, K.; Dauça, M.; Netter, P.; Beneytout, J.L.; Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* **2003**, *22*, 899-905.
67. Jesus, M.; Martins, A.P.; Gallardo, E.; Silvestre, S. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, *2016*, ID: 4156293.
68. Mooradian, A.S. Antioxidant properties of Steroids. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.* **1992**, *45*, 509-511.
69. Ruiz-Larrea, M.B.; Martín, C.; Martínez, R.; Navarro, R.; Lacort, M.; Miller, J.M. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *105*, 179-188.
70. Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* **1987**, *1*, 358-364.
71. Finkel, T.; Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **2000**, *408*, 239-247.
72. Hybertson, B.M.; Gao, B.; Bose, S.K.; McCord, J.M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med.* **2011**, *32*, 234-246.
73. Castro I.A.; Rogero M.M.; Junqueira R.M.; Carrapeiro M.M. Free radical scavenger and antioxidant capacity correlation of α -tocopherol and Trolox measured by three *in vitro* methodologies. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2006**, *57*, 75-82.
74. Jialal, I.; Grundy, S.M. Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 899-906.
75. Martin, H-D.; Kock, S.; Scherrers, R.; Lutter, K.; Wagener, T.; Hundsdörfer, C.; Frixel, S.; Schaper, K.; Ernst, H.; Schrader, W.; Görner, H.; Stahl, W. 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a Natural Carotenoid with Superior Antioxidant and Photoprotective Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 400-403.
76. Gülçin, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov. Food Sci. & Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 210-218.
77. Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N.A.; Campos, O.N.M.; Pedraza-Chaverri, J. Mechanism of the OH radical scavenging activity of nordihydroguaiaretic acid: a combined theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114*, 6625-6635.
78. Ruiz-Larrea, M.B.; Leal, A.M.; Liza, M.; Lacort, M.; Groot, H. Antioxidant effects of estradiol and 2-hydroxyestradiol on iron-induced liver peroxidation of rat liver microsomes. *Steroids* **1994**, *59*, 383-388.
79. Ayres, S.; Tang, M.; Subbiah, M.T.; Estradiol-17 β as an antioxidant: Some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J. Lab. Clin. Med.* **1996**, *4*, 367-375.

80. Miller, C.P.; Jirkovsky, I.; Hayhurst, D.A.; Adelmant, S.J. In vitro antioxidant effects of estrogens with a hindered 3-OH function on the copper-induced oxidation of low density lipoprotein. *Steroids* **1996**, *61*, 305-308.
81. Antolovich M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **2002**, *127*, 183-198.
82. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
83. Castro, I.A.; Rogero, M.M.;Junqueira, R.M.; Carrapeiro, M.M. Free radical scavenger and antioxidant capacity correlation of α -tocopherol and Trolox measured by three *in vitro* methodologies, *Int. J. Food. Sci. Nutr.* **2006**, *57*, 75-82.
84. Sarker, S.; Nahar, L. Steroid Dimers. Chemistry and Applications in Drug Design and Delivery. Ed. John Wiley & Sons, Ltd. Reino Unido. **2012**, 379-404.
85. Li, Y.; Ray-Dias, J. Dimeric and Oligomeric Steroids. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 283-304.
86. Nahar, L.; Sarker, S.D.; Turner, A.B. A Review on Synthetic and Natural Steroid Dimers: 1997-2006. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1349-1370.
87. Pettit, G.R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Herald, D.L.; Arm, C.; Dufresne, C.; Christie, N.D.; Schmidt, J.M.; Doubek, J.L.; Krupa, T.S. Isolation and Structure of the Powerful Cell Growth Inhibitor Cephalostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2006-2007.
88. Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S.L. Molecular Umbrellas. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1573-1574.
89. Janout, V.; M.; Regen. Bioconjugate-Based Molecular Umbrellas. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 183-192.
90. Marcelis A.T.M.; Koudijs, A.; Sudhölter, E.J.R. Odd-even effects in the thermotropic and optical properties of three series of chiral twin liquid crystals. *Liquid Crystals* **1995**, *18*, 843-850.
91. Imrie, C.T.; Henderson P.A.; Yeap, G-Y. Liquid crystal oligomers: going beyond dimers. *Liquid Crystals* **2009**, *36*, 755-777.
92. Aher, N.G.; Pore V.S. Design, synthesis, and micellar properties of bile acid dimers and oligomers linked with a 1,2,3-triazole ring. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 12927–12934.
93. Guthrie, J.P.; Cossar, J.; Dawson, B.A. A water soluble dimeric steroid with catalytic properties. Rate enhancements from hydrophobic binding. *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 2456–69.
94. Alarcón-Manjarrez, C.; Arcos-Ramos, R.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis, NMR and crystal characterization of dimeric terephthalates derived from epimeric 4,5-seco-cholest-3-yn-5-ols. *Steroids* **2016**, *109*, 66-72.
95. Mayorquín-Torres, M.C.; Colin-Molina, A. Pérez-Estrada, S.; Galano, A.; Rodríguez-Molina, B.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis, Characterization, and Solid State Dynamic Studies of a Hydrogen Bond-Hindered Steroidal Molecular Rotor with a Flexible Axis. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 3768–3779.
96. Brittain, H.G. Polymorphism and solvatomorphism 2004. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* **2005**, *32*, 263-83.
97. Brittain, H.G. Polymorphism and Solvatomorphism 2010. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *102*, 464-484.
98. Brittain, H.G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. 2a. Edición. Ed. Informa Healthcare. New York, 2009. Pp 233-276, 318-342.
99. Brits, M.; Liebenberg, W.; De Villiers, M.M. Characterization of Polymorph Transformations That Decrease the Stability of Tablets Containing the WHO Essential Drug Mebendazole. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1138–1151.

100. Barros-de-Araujo, G.L.; Pitaluga-Jr, A.; Gutierrez-Antonio, S.; De Oliveira-Paiva-Santos, C.; Do Rosário-Matos, J. Polimorfismo na produção de medicamentos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2012**, *33*, 27-36.
101. Griesser, U.J. The importance of Solvates. En Hilfiker, R. Editor. *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry*. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. **2006**. 211-230.
102. Bingham, A.L.; Hughes, D.S.; Hursthouse, M.B.; Lancaster, R.W.; Tavener, S.; Threlfall, T.L. Over one hundred solvates of sulfathiazole. *Chem. Commun.*, **2001**, 603-604.
103. Drebuschak, T.N. Mikhailenko, M.A.; Boldyreva, E.V.; Shakhtshneide, T.P. Tetragonal polymorph of the 1:1 adduct of sulfathiazole with pyridine. *Acta Cryst.* **2006**, *E62*, o2669-o2671.
104. Farrell, D.M.M.; Glidewell, C. Low, J.N.; Skakle, J.M.S.; Zakaria, C.M. Polymorphs and pseudopolymorphs of N,N'-dithiobisphthalimide. *Acta Cryst.* **2002**; *B58*, 289-299.
105. Suitmezian, V.; Jeß, I.; Näther, C. Investigations on the polymorphism and pseudopolymorphism of triamcinolone diacetate. *Int. J. Pharm.* **2006**, *323*, 101-109.
106. Aguilar-Valdez, N.; Maldonado-Domínguez, M.; Arcos-Ramos, R.; Romero-Ávila, M.; Santillan, R.; Farfán, N. Synthesis of steroidal molecular compasses: exploration of the controlled assembly of solid organic materials. *Cryst. Eng. Comm.* **2017**, *19*, 1771-1777.
107. Lugemwa, F.N.; Shaikh, K.; Hochstedt, E. Facile and efficient acetylation of primary alcohols and phenols with acetic anhydride catalyzed by dried sodium bicarbonate. *Catalysts* **2013**, *3*, 954-965.
108. Akselsen, Ø.W.; Hansen, T.V. *ortho*-Formylation of estrogens. Synthesis of the anti-cancer agent 2-methoxyestradiol. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7738-7742.
109. Sánchez-Sánchez, L.; Hernández-Linares, M.G.; Escobar, M.L.; López-Muñoz, H.; Zenteno, E.; Fernández-Herrera, M.A.; Guerrero-Luna, G.; Carrasco-Carballo, A.; Sandoval-Ramírez, J. Antiproliferative, cytotoxic, and apoptotic activity of steroidal oximes in cervicouterine cell lines. *Molecules* **2016**, *21*, 1533-1549.
110. Pérez-Díaz, J.O.H.; Rárová, L.; Muñoz-Ocampo, J.P.; Magaña-Vergara, N.E.; Farfán, N.; Strnad, M.; Santillan, R.; Synthesis and biological activity of 23-ethylidene-26-hydroxy-22-oxocholestane derivatives from spirostane sapogenins, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 67-78.
111. Guo, C.; LaCour, T.G.; Fuchs, P.L. On the relationship of OSW-1 to the cephalostatins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 419-424.

ANEXO 1



Synthesis of novel steroids bearing a spirochromene side chain by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ catalyzed aldol condensation of spirostane sapogenins and salicylaldehyde



Manuel A. Ramos-Enríquez, Martin A. Iglesias-Arteaga*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2014
Revised 9 April 2014
Accepted 14 April 2014
Available online 23 April 2014

Dedicated to the memory of Professor Alan R. Katritzky

Keywords:

Steroid sapogenins
Aldol condensation
Spirochromene
NMR

ABSTRACT

Treatment of a CH_2Cl_2 solution of sarsasapogenin acetate with salicylaldehyde and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ afforded a mixture of two C-22 epimeric steroids bearing a spirochromene moiety in the side chain. The elucidation of the structures of the new compounds were carried out employing a combination of 1D and 2D NMR techniques that includes ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY and NOESY.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Steroid sapogenins have focused intensive interest for nearly a century. In addition to the intrinsic biological activity,¹ several members of this family have served as starting materials for the synthesis of a variety of bioactive compounds that include sexual and adrenocortical hormones,² plant growth promoting substances,³ and more recently cephalostatins and ritterazines⁴ amongst many others.⁵

Most of the synthetic protocols for the preparation of bioactive steroid starting from steroid sapogenins involve the modification or degradation of the spiroketal side chain. The considerable attention devoted to the development of new methods for the transformation on this fragment has provided a wide variety of new reactions.⁶ In particular, we have recently reported that treatment of steroid sapogenins with benzaldehyde and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in CH_2Cl_2 led to 23E-benzylidenspirostanes in good yields (Scheme 1).^{6g}

Following our proposed mechanism for the above mentioned reaction,^{6g} we envisaged that the same procedure, when conducted with salicylaldehyde, may yield steroids bearing a spirochromene moiety in the side chain (Schemes 2 and 3), due to cyclization with the phenolic hydroxyl coming from salicylaldehyde, rather than

with the hydroxyl attached to C-26. Herein we report on the synthesis and NMR characterization of steroids bearing a spirochromene moiety attached to the position C-22.

Results and discussion

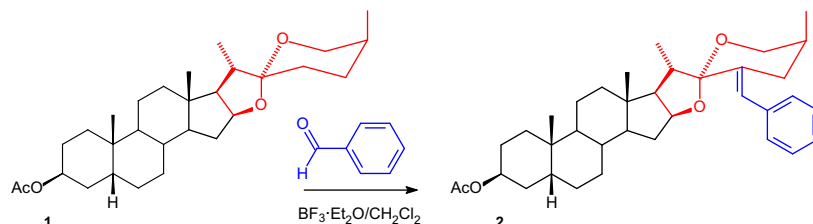
Treatment of a CH_2Cl_2 solution of sarsasapogenin acetate (**1b**) with two equivalents of salicylaldehyde and an excess of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ for 48 h afforded a mixture of spirochromenes **3a** and **3b** (Scheme 2) together with minor amounts of unidentified side products and the unchanged starting material. Chromatographic separation afforded the analytical samples of the spirochromenes **3a** and **3b**.

Mass spectra of compounds **3a** and **3b** showed the molecular ion at 562 m/z which is in good agreement with the formula $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{O}_5$, that corroborates the introduction of the salicylaldehyde fragment. Assignments of the NMR signals and elucidation of the structures of the hitherto unknown compounds were carried out employing a combination of 1D and 2D NMR techniques that includes ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, and NOESY.

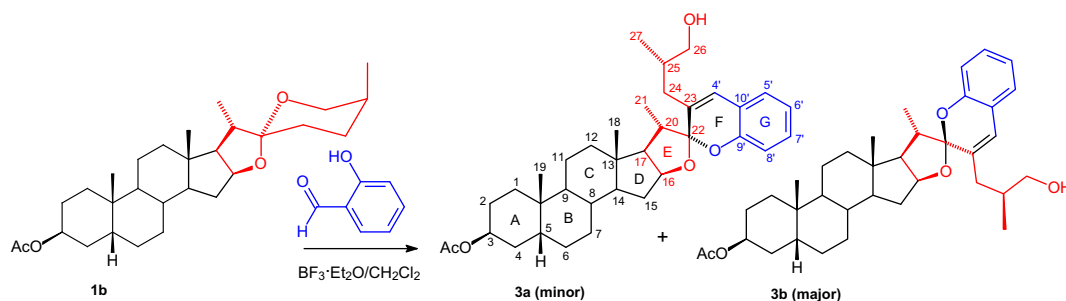
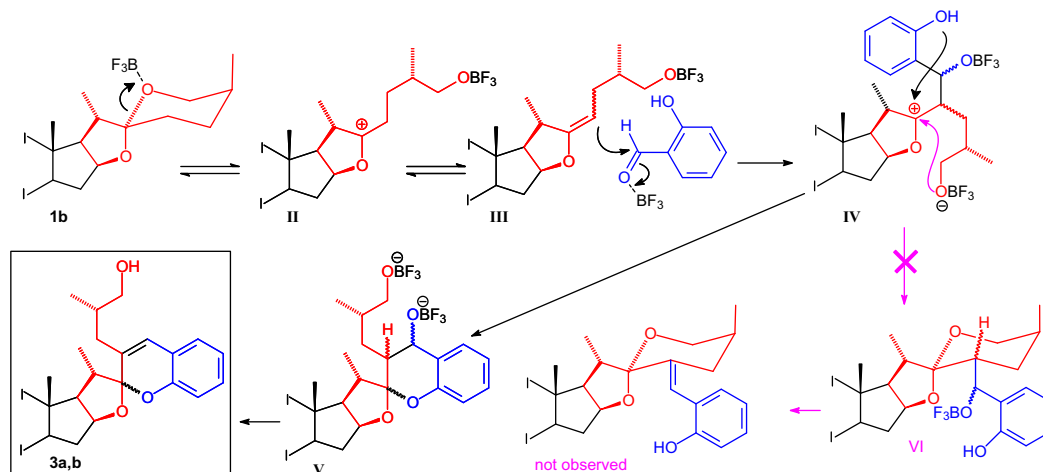
(22R,25S)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 β -cholestan-3 β ,26-diol 3-monoacetate (**3a**) yield 9.67% (light yellow syrup). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 7.19–7.07 (m, 1H, H-7'), 7.02 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H, H-5'), 6.87 (ddd, $J = 7.4, 6.2, 1.3$ Hz, 2H, H-6' and H-8'), 6.47 (s, 1H, H-4), 5.07 (p, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-3a), 4.73 (ddd,

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56223803.

E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).



Scheme 1. Synthesis of 23E-benzylidenespirostanes.

Scheme 2. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ catalyzed reaction of steroid sapogenins with salicylaldehyde.

Scheme 3. Plausible reaction mechanism.

$J = 11.0, 8.1, 5.0 \text{ Hz}$, 1H, H-16a), 3.62 (dd, $J = 11.0, 4.6 \text{ Hz}$, 1H, H-26a), 3.45 (dd, $J = 10.9, 4.9 \text{ Hz}$, 1H, H-26b), 2.54 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 1H, H-20), 2.36 (dd, $J = 14.0, 6.8 \text{ Hz}$, 1H, H-24a), 2.15–2.07 (m, 2H, H-17 and H-24b), 2.04 (s, 3H, CH_3 acetyl), 1.03 (d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, H-21), 0.99 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (100.52 MHz) δ (ppm) 30.6 C-1, 24.9 C-2, 70.6 C-3, 31.6 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 39.9 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.2 C-13, 56.1 C-14, 29.7 C-15, 82.6 C-16, 60.6 C-17, 16.7 C-18, 23.8 C-19, 40.3 C-20, 14.7 C-21, 113.5 C-22, 130.9 C-23, 35.1 C-24, 35.7 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.4 C-4', 126.0 C-5', 120.9 C-6', 128.4 C-7', 115.5 C-8', 151.3 C-9', 120.8 C-10', 21.5 CH_3 acetyl, 170.7 C=O acetyl. MS (70 eV) m/z (%) 562 (5.4) M^+ , 284 (10.6), 269 (24.7), 255 (14.9), 243 (21.7), 220 (14.4), 219 (100), 202 (10.5), 201 (63.5), 173 (10.4), 161 (14.7), 160 (16.9), 159 (29.2), 147 (15.1), 145 (13.9), 133 (12.3), 131 (14.8), 122 (14.3), 121 (15.1), 119 (11.4), 107 (27.8), 105 (16.6), 95 (14.3), 93 (21.1), 91 (15.7), 81 (17.5), 79 (15.4), 67 (11.9), 55 (11.1).

(22S,25S)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 β -cholestan-3 β ,26-diol 3-monoacetate (**3b**) yield 31.62% (light yellow syrup).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 7.16–7.09 (m, 1H, H-7'), 7.06 (dd, $J = 7.7, 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H-5'), 6.92–6.87 (m, 2H H-6' and H-8'), 6.48 (s, 1H, H-4'), 5.13–5.01 (m, 1H, H-3a), 4.68 (ddd, $J = 11.0, 8.1, 5.0 \text{ Hz}$, 1H, H-16a), 3.57 (dd, $J = 10.7, 5.9 \text{ Hz}$, 1H, H-26a), 3.51 (dd, $J = 10.7, 5.2 \text{ Hz}$, 1H, H-26b), 2.57 (p, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, H-20), 2.35 (ddd, $J = 14.7, 7.7, 1.1 \text{ Hz}$, 1H, H-24a), 2.18–2.10 (m, 1H, H-24b), 2.05 (s, 3H, CH_3 acetyl), 1.06 (d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, H-21), 0.99 (d, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H-27) 0.99 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (100.52 MHz) δ (ppm) 30.6 C-1, 24.9 C-2, 70.6 C-3, 31.6 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 39.9 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 30.7 C-15, 82.4 C-16, 60.8 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 39.4 C-20, 14.8 C-21, 112.8 C-22, 130.8 C-23, 36.8 C-24, 35.1 C-25, 67.5 C-26, 17.4 C-27, 125.8 C-4', 126.1 C-5', 121.1 C-6', 128.4 C-7', 115.8 C-8', 151.2 C-9', 121.2 C-10', 21.5 CH_3 acetyl, 170.7 C=O acetyl. MS (70 eV) m/z (%) 562 (5.5) M^+ , 284 (10.4), 269 (25.6), 255 (12.7), 243 (22.9), 220 (14.3), 219 (100), 202 (10.6), 201 (65.4), 173 (10.4), 161 (14.3), 160 (17.3), 159 (30.1), 147 (14.9), 145 (13.9), 133 (12.0), 131 (14.6), 122 (14.4), 121 (14.7), 119 (11.3), 107 (26.9), 105 (16.2), 95 (13.9), 93 (20.7), 91 (15.0), 81 (17.1), 67 (11.5), 55 (10.0).

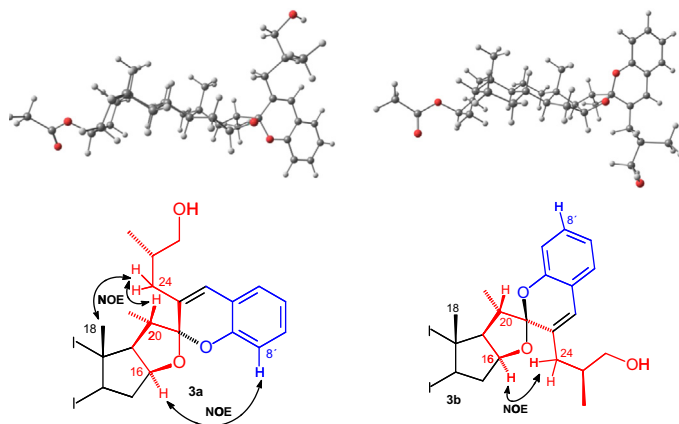


Figure 1. PM3 optimized models and observed NOE effects in the C-22-epimeric spirochromenes **3a** and **3b**.

The ^1H spectra of the new compounds are characterized by the presence of the signals of the aromatic protons, as well as new singlet at corresponding to the proton attached to C-4' (6.87 ppm, for **3a** and 6.48 ppm for **3b**) which corroborated the introduction of a benzylidene fragment. The ABX appearances of the signals of the diastereotopic protons attached to C-26 [3.62 (dd, $J = 11.0, 4.6$ Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, $J = 10.9, 4.9$ Hz, 1H, H-26b) for **3a**] and [3.57 (dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, 1H, H-26a), 3.51 (dd, $J = 10.7, 5.2$ Hz, 1H, H-26b) for **3b**] suggest a linear assembly for the fragment C-24 to C-26.

The ^{13}C spectra of the obtained compounds show eight olefinic signals (six coming for the aromatic ring and two from the new double bond introduced between carbons C-23 and C-4') that provided evidence on the incorporation of the benzylidene fragment, leaving the spirochromene structure as the unique possibility. The presence of the signal corresponding to the spiroketal at C-22 (113.5 ppm for **3a**, 112.8 ppm for **3b**) also corroborated the proposed structure.

In compound **3a** the strong H-24 \leftrightarrow H-18 and H-24 \leftrightarrow H-20 NOE effects that were observed indicate spatial proximity between those nuclei, only possible in the isomer that bears the C-22–O–C-9' bridge in the α -side of the tetrahydrofuran ring E. Additionally, observation of H-8' \leftrightarrow H-16 α NOE effect corroborated the configuration assigned to the spiro center at C-22. Similarly, the β -orientation of the C-22–O–C-9' bridge in compound **3b** was inferred from the observed H-16 \leftrightarrow H-24 NOE effect that indicates spatial proximity between those nuclei. **Figure 1** shows the PM3 optimized models of the two possible C-22-epimers of compound **3a**.

A plausible reaction mechanism comprises the coordination of BF_3 to the oxygen at position C-26 to produce the carbocation **II** that loses a proton from C-23 leading to the enol ether **III**, accepted as the intermediate involved in the reactions of functionalization of steroid sapogenins at position C-23.⁶ BF_3 catalyzed addition of the enol ether **II** to salicylaldehyde leads to the carbocation **IV** which undergoes benzannulation followed by a final elimination step to produce the observed spirochromenes **3a** and **3b** (**Scheme 3**).

Conclusion

Although the obtained yields are rather low, this new reaction allows the preparation of a hitherto unknown family of steroids bearing a side chain constituted by a spiroketal unit fused to a 2H-chromene moiety. These new compounds may retain or combine the biological activity associated to the spiroketal grouping and the 2H-chromene moiety. Further studies directed to improve the yield, as well as to extend this new reaction to the synthesis of other spirochromenes starting from naturally occurring or synthetic spiroketals are on development.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Project DGAPA-IN211714) and the Faculty of Chemistry (PAPIIT-5000-9063). Thanks are due to CONACYT-México for the scholarship granted to M.A.R-E. We want to express our gratitude to Minerva Monroy-Barreto (USAI-UNAM) for recording NMR spectra and to Dr. Carlos Cobas from Mestrelab[®] for assistance with the MestreNova NMR processing program.

References and notes

- Selected references: (a) Carotenuto, A.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; Carnuccio, R.; D'Acquisto, F. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3401–3406; (b) Carotenuto, A.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; De Feo, V.; Carnuccio, R.; D'Acquisto, F. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1003–1007; (c) Corbiere, C.; Liagre, B.; Bianchi, A.; Bordji, K.; Dauca, M.; Netter, P.; Beneytout, J. L. *Int. J. Oncol.* **2003**, *22*, 899–905; (d) Corbiere, C.; Liagre, B.; Terro, F.; Beneytout, J. L. *Cell Res.* **2004**, *14*, 188–196; (e) Raju, J.; Patlolla, J. M. R.; Swamym, M. V.; Rao, C. V. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, *13*, 1392–1398; (f) Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; Tagliatalata-Scafati, O. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4904–4908.
- Lednicer, D. *Strategies for Organic Drug Synthesis*, 2nd ed.; John Wiley & Sons Inc: Hoboken, New Jersey, 2009. Chapters 4 and 5, and references therein.
- (a) Iglesias-Arteaga, M. A.; Pérez, R.; Pérez, C. S.; Coll, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 261–266; (b) Iglesias-Arteaga, M. A.; Pérez, R.; Pérez, C. S.; Coll, F. *Steroids* **2002**, *67*, 159–163; (c) Romero-Ávila, M.; de Dios-Bravo, G.; Mendez-Stivalet, J. M.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. *Steroids* **2005**, *72*, 955–959; (d) Rosado-Abón, A.; de Dios-Bravo, G.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *134*, 45–50.
- For reviews see: (a) Atta-ur-Rahmann; Choudhary, M. I. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 191–203; (b) Moser, B. R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 487–491; (c) Lee, S.; LaCour, T. G.; Fuchs, P. L. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2275–2314; (d) Iglesias-Arteaga, M. A.; Morzycki, J. W. *Cephalostatins and Ritterazines*. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Knölker, H. J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2013; Vol. 72, pp 153–279.
- (a) Ravindar, K.; Reddy, M. S.; Lindqvist, L.; Pelletier, J.; Deslongchamps, P. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4420–4423; (b) Ravindar, K.; Reddy, M. S.; Lindqvist, L.; Pelletier, J.; Deslongchamps, P. *J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1269–1284; (c) Jiang, B.; Shi, H.; Tian, W.; Zhou, W. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 469–476; (d) Xu, Q.-H.; Peng, X.-W.; Tian, W.-S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9375–9377; (e) Lee, E.; Liu, Y. T.; Solomon, P. H.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1634–1635.
- For recent review see: (a) Jastrzębska, I. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 353–372; Selected references (b) LaCour, T. G.; Tong, Z.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1815–1818; (c) Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; del Río, R. E.; Hernández-Linares, G.; Suárez-Rojas, A.; Rincón, S.; Farfán, N.; Santillán, R. L. *Steroids* **2003**, *68*, 199–204; (d) Jastrzębska, I.; Morzycki, J. W.; Trochimowicz, U. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1929–1932; (e) Jastrzębska, I.; Morzycki, J. W. *Polish J. Chem.* **2005**, *79*, 1245–1248; (f) Iglesias-Arteaga, M. A.; Arcos-Ramos, R. O. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8029–8031; (g) Iglesias-Arteaga, M. A.; Arcos-Ramos, R. O. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7485–7488; (h) Ruiz-Pérez, K. M.; Romero-Ávila, M.; Tinajero-Delgado, V.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M. A. *Steroids* **2012**, *77*, 819–828.



Synthesis and radical scavenger properties of novel spirochromenes derived from steroid sapogenins



Manuel A. Ramos-Enríquez, Omar N. Medina-Campos, José Pedraza-Chaverri, Martín A. Iglesias-Arteaga*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2015

Received in revised form 10 March 2015

Accepted 20 March 2015

Available online 28 March 2015

Keywords:

Steroid sapogenins

Spirochromenes

Radical scavengers

Antioxidant activity

DPPH test

ABSTRACT

Tandem aldol condensation between steroid sapogenins and hydroxylated benzaldehydes afforded steroidal spirochromenes. Compounds that bear a phenolic hydroxyl group at position C-6', obtained by a reaction with 2,5-dihydroxybenzaldehyde, showed approximately 80% of maximal radical scavenging activity in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) assay at 288 nM. In contrast, the starting steroid sapogenins and the spirochromenes without a phenolic group in the side chain proved to be inactive.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Steroids play a paramount role in life processes. The wide variety of naturally occurring members of this family includes sex and adrenocortical hormones [1], cytotoxic compounds [2–4], ecdysteroids [5] and plant growth promoting substances [6–8] amongst many others. In addition, a large battery of synthetic steroidal drugs has been developed for the treatment of different diseases [9]. However, in spite of the vast number of biologically active steroids that has been described, to the best of our knowledge, a limited number of steroids has been reported to exert a significant antioxidative activity [10–17].

Oxidative stress is associated to a wide variety of health disorders [18–20]. Consequently, the experimental and theoretical study of naturally occurring and synthetic compounds with antioxidant activity has concentrated an increased attention in the past years [21–27]. The protective effect against oxidative stress exerted by naturally occurring antioxidants like α -tocopherol (**1**) (also referred as vitamin E) and the phenolic carotenoid 3,3'-dihydroxyisorenieratene (**2**), as well as the effect of Trolox (**3**), a water soluble synthetic analogue of vitamin E (Fig. 1), are well documented [24,25] and the role of the phenolic hydroxyl groups present in these compounds and other phenolic antioxidants, such as resveratrol and nordihydroguaiaretic acid, is well understood [23,26,27].

In connection with our project on the study of reactivity of the spiroketal side chain of steroidal sapogenins [28–31], we have recently described that the reaction of sarsapogenin acetate (**4**) and salicylaldehyde produces the unreported diastereomeric steroidal spirochromenes **22R-5** and **22S-5** (Scheme 1) [32]. Considering the structural similarity between the pharmacophoric cores of compounds **1–3**, and the spirochromene moiety present in our recently reported spirochromenes **22R-5** and **22S-5**, we have decided to embark in additional synthetic efforts to generate new members of this novel family of compounds that may show antioxidant activity.

Herein we report the synthesis and characterization of two novel steroidal spirochromenes bearing a phenolic hydroxyl group at position C-6'. The hereto unreported compounds, that showed interesting properties as radical scavengers in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) test [33], can be easily obtained by tandem aldol condensation-spiroketalization between steroid sapogenins and 2,5-dihydroxybenzaldehyde. In addition, steroidal spirochromenes without the phenolic hydroxyl group were prepared in order to be employed as references in the radical scavenging activity test.

2. Experimental

Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM[®]SIL G/UV254 plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vanillin in 50% HClO₄ and heated until color developed. Melting points were measured on a

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56223803.

E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).

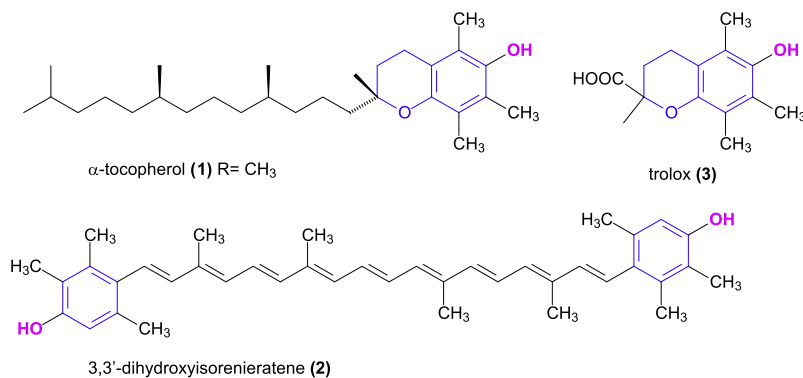
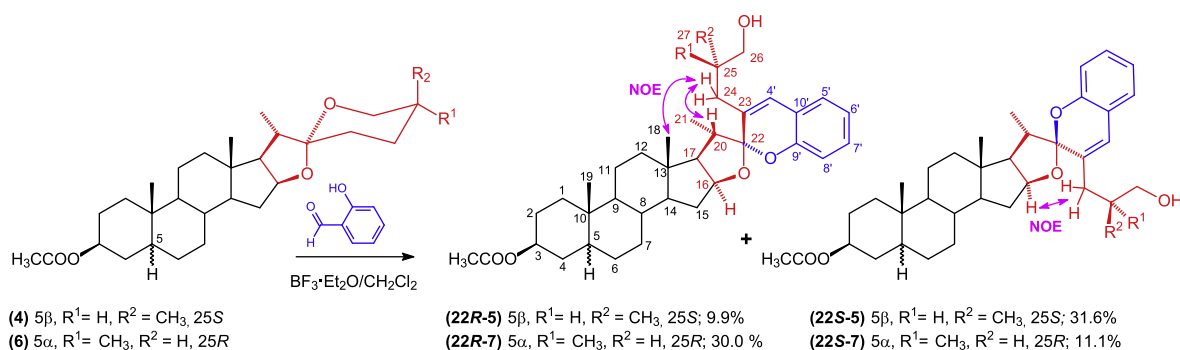


Fig. 1. Some antioxidants.



Scheme 1. Aldol reaction between steroids sapogenins and salicylaldehyde.

Melt-Temp II apparatus. Mass spectra were registered in a Thermo-Electron spectrometer model DFS (Double Focus Sector). NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution in a Varian INOVA 400 spectrometer using the solvent signal 7.26 ppm for ¹H and 77.00 ppm for ¹³C as references. All 2D NMR spectra were recorded using the standard pulse sequences and parameters recommended by the manufacturer and were processed employing the MestreNova NMR processing program [See <http://mestrelab.com/>]. NMR signals assignments were carried out with the aid of a combination of 1D and 2D NMR techniques that included ¹H, ¹³C, ¹H–¹H COSY, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC).

General procedure for the preparation of spirochromenes

BF₃·Et₂O (6 mL) was added to a solution of the steroid sapogenin (1 mmol) and the aldehyde (2 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL). And the mixture was stirred at room temperature until the starting material was consumed (~24 h). The reaction mixture was carefully poured into ice and extracted with ethyl acetate (2 × 30 mL). The organic layer was washed with water (10 × 15 mL) and a saturated solution of NaCl (1 × 15 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained oil was purified in a chromatographic column packed with silica gel to afford the desired spirochromenes.

Reaction of sarsasapogenin acetate (4) (458 mg, 1 mmol) with salicylaldehyde (244 mg, 2 mmol) afforded (22R,25S)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 β -cholestan-3 β ,26-diol 3-monoacetate (22R-5). Yield 54.5 mg, (9.7%) (light yellow syrup). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.19–7.07 (m, 1H, H-7'), 7.02 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-5'), 6.87 (ddd, *J* = 7.4, 6.2, 1.3 Hz, 2H, H-6' and H-8'), 6.47 (s, 1H, H-4'), 5.07 (p, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-3 α), 4.73 (ddd, *J* = 11.0, 8.1, 5.0 Hz, 1H, H-16 α), 3.62 (dd, *J* = 11.0, 4.6 Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, *J* = 10.9, 4.9 Hz, 1H, H-26b), 2.54 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-20 β), 2.36 (dd, *J* = 14.0, 6.8 Hz, 1H, H-24a), 2.15–2.07 (m,

2H, H-17 and H-24b) 2.04 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.03 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (100.52 MHz) δ (ppm): 30.6 C-1, 24.9 C-2, 70.6 C-3, 31.6 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 39.9 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.2 C-13, 56.1 C-14, 29.7 C-15, 82.6 C-16, 60.6 C-17, 16.7 C-18, 23.8 C-19, 40.3 C-20, 14.7 C-21, 113.5 C-22, 130.9 C-23, 35.1 C-24, 35.7 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.4 C-4', 126.0 C-5', 120.9 C-6', 128.4 C-7', 115.5 C-8', 151.3 C-9', 120.8 C-10', 21.5 CH₃ acetyl, 170.7 C=O acetyl. MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 562(5.4) M⁺, 284(10.6), 269(24.7), 255(14.9), 243(21.7), 220(14.4), 219(100), 202(10.5), 201(63.5), 173(10.4), 161(14.7), 160(16.9), 159(29.2), 147(15.1), 145(13.9), 133(12.3), 131(14.8), 122(14.3), 121(15.1), 119(11.4), 107(27.8), 105(16.6), 95(14.3), 93(21.1), 91(15.7), 81(17.5), 79(15.4), 67(11.9), 55(11.1). and

(22S,25S)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 β -cholestan-3 β ,26-diol 3-monoacetate (22S-5). Yield 178.1 mg (31.6%) (light yellow syrup). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.16–7.09 (m, 1H, H-7'), 7.06 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H-5'), 6.92–6.87 (m, 2H H-6' and H-8'), 6.48 (s, 1H, H-4'), 5.13–5.01 (m, 1H, H-3 α), 4.68 (ddd, *J* = 11.0, 8.1, 5.0 Hz, 1H, H-16 α), 3.57 (dd, *J* = 10.7, 5.9 Hz, 1H, H-26a), 3.51 (dd, *J* = 10.7, 5.2 Hz, 1H, H-26b), 2.57 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20 β), 2.35 (ddd, *J* = 14.7, 7.7, 1.1 Hz, 1H, H-24a), 2.18–2.10 (m, 1H, H-24b), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, H-27) 0.99 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (100.52 MHz) δ (ppm): 30.6 C-1, 24.9 C-2, 70.6 C-3, 31.6 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 39.9 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 30.7 C-15, 82.4 C-16, 60.8 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 39.4 C-20, 14.8 C-21, 112.8 C-22, 130.8 C-23, 36.8 C-24, 35.1 C-25, 67.5 C-26, 17.4 C-27, 125.8 C-4', 126.1 C-5', 121.1 C-6', 128.4 C-7', 115.8 C-8', 151.2 C-9', 121.2 C-10', 21.5 CH₃ acetyl, 170.7 C=O acetyl. MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 562(5.5) M⁺, 284(10.4),

269(25.6), 255(12.7), 243(22.9), 220(14.3), 219(100), 202(10.6), 201(65.4), 173(10.4), 161(14.3), 160(17.3), 159(30.1), 147(14.9), 145(13.9), 133(12.0), 131(14.6), 122(14.4), 121(14.7), 119(11.3), 107(26.9), 105(16.2), 95(13.9), 93(20.7), 91(15.0), 81(17.1), 67(11.5), 55(10.0).

Reaction of tigogenin acetate (**6**) (458 mg, 1 mmol) with salicylaldehyde (244 mg, 2 mmol) afforded (22*R*,25*R*)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 α -cholestan-3 β ,26-diol 3-monoacetate (**22*R*-7**). Yield 168.8 mg (30.0%) (light yellow syrup) ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.11 (ddd, *J* = 8.0, 7.3, 1.7 Hz, 1H, H-7'), 7.02 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H-5'), 6.87 (dd, *J* = 7.5, 6.8 Hz, 2H, H-6' and H-8'), 6.47 (s, 1H, H-4'), 4.83–4.60 (m, 2H, H-3 α and H-16 α), 3.63 (dd, *J* = 10.9, 4.6 Hz, 1H, H-26a), 3.45 (dd, *J* = 10.9, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.53 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20 β), 2.36 (dd, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H, H-24a), 2.14–2.06 (m, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.02 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 1.00 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-27), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.70 (ddd, *J* = 12.2, 10.4, 4.3 Hz, 1H, H-9 α). ¹³C NMR (100.52 MHz) δ (ppm): 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 35.8 C-8, 54.1 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.6 C-15, 82.6 C-16, 60.5 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 40.3 C-20, 14.7 C-21, 113.6 C-22, 130.9 C-23, 35.1 C-24, 34.8 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.4 C-4', 126.0 C-5', 120.9 C-6', 128.4 C-7', 115.4 C-8', 151.4 C-9', 120.8 C-10', 21.5 CH₃ acetyl, 170.7 C=O acetyl. MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 563(6.8) M⁺ + 1, 269(23.3), 243(24.6), 220(14.0), 219(100.0), 201(60.1), 161(11.7), 159(24.3), 147(10.6), 145(10.2), 131(1.2), 122(19.9), 121(11.8), 107(24.1), 105(12.1), 95(11.3), 93(16.1), 91(11.2), 81(14.9), 79(10.8).

and

(22*S*,25*R*)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 α -cholestan-3 β ,26-diol 3-monoacetate (**22*S*-7**). Yield 62.6 mg (11.1%) (light yellow syrup) ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.12 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H-7'), 7.05 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H-5'), 6.91–6.85 (m, 2H, H-6' and H-8'), 6.48 (s, 1H, H-4'), 4.68 (m, 2H, H-3 α and H-16 α), 3.58 (dd, *J* = 10.7, 5.9 Hz, 1H, H-26a), 3.51 (dd, *J* = 10.6, 5.2 Hz, 1H, H-26b), 2.56 (p, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-20 β), 2.34 (dd, *J* = 14.5, 7.6 Hz, 1H, H-24a), 2.19–2.09 (m, 1H, H-24b), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.99 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.70 (ddd, *J* = 11.7, 11.7, 4.3 Hz, 1H, H-9 α). ¹³C NMR (100.52 MHz) δ (ppm): 36.8 C-1, 27.4 C-2, 73.7 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 34.8 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.0 C-13, 56.0 C-14, 31.5 C-15, 82.4 C-16, 60.7 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 39.5 C-20, 14.8 C-21, 112.8 C-22, 130.8 C-23, 36.8 C-24, 35.1 C-25, 67.5 C-26, 17.4 C-27, 125.9 C-4', 126.1 C-5', 121.1 C-6', 128.4 C-7', 115.8 C-8', 151.2 C-9', 121.2 C-10', 21.5 CH₃ acetyl, 170.8 C=O acetyl. MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 562 (M⁺, 13), 456(21), 329(10), 315(13), 269(29), 255(11), 243(24), 220(15), 219(100), 202(11), 201(68), 161(13), 160(13), 147(11), 122(12), 107(15).

Reaction of sarsasapogenin acetate (**4**) (458 mg, 1 mmol) with 2,5-dihydroxybenzaldehyde (276 mg, 2 mmol) afforded (22*S*,25*S*)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 β -cholestan-3 β ,6',26-triol 3-monoacetate (**22*S*-8**). Yield 312.2 mg (53.9%). Mp. 204.1–205.4 °C (amorphous solid). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-8'), 6.57 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 1H, H-7'), 6.43 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-5'), 6.36 (s, 1H, H-4'), 5.11–5.03 (m, 1H, H-3 α), 4.62 (dt, *J* = 9.3, 6.7 Hz, 1H, H-16 α), 3.57 (dd, *J* = 10.7, 5.7 Hz, 1H, H-26a), 3.49 (dd, *J* = 10.7, 5.2 Hz, 1H, H-26b), 2.54 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20 β), 2.30 (dd, *J* = 14.7, 8.1 Hz, 1H, H-24a), 2.21–2.10 (m, 1H, H-24b), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.87 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (100.52 MHz) δ (ppm): 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.8 C-3, 31.5 C-4, 37.2 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.0 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 30.7 C-15, 82.4 C-16, 60.7

C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 39.1 C-20, 14.7 C-21, 112.4 C-22, 131.5 C-23, 37.1 C-24, 34.9 C-25, 67.3 C-26, 17.6 C-27, 125.9 C-4', 112.4 C-5', 144.7 C-6', 115.4 C-7', 116.4 C-8', 150.3 C-9', 121.8 C-10', 21.5 CH₃ acetyl, 170.9 C=O acetyl. MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 579(MH⁺, 11), 578 (M⁺, 28), 456(16), 455(42), 269 (22), 259(44), 255(13), 236(14), 235(100), 234(60), 218(13), 217(87), 216(59), 215(11), 204(32), 201(15), 188(16), 177(12), 176(72), 175(25), 161(15), 147(21), 121(12), 107(16), 105(11), 93(13).

Reaction of tigogenin acetate (**6**) (1.832 g, 4 mmol) with 2,5-dihydroxybenzaldehyde (1.104 g, 8 mmol) afforded (22*R*,25*R*)-16 β :22-epoxy-22,2'-spiro-[chromene]-5 α -cholestan-3 β ,6',26-triol 3-monoacetate (**22*R*-9**). Yield 945.5 mg (40.8%). Mp. 162.1–163.8 °C (amorphous solid). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-8'), 6.57 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 1H, H-7'), 6.45 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-5'), 6.35 (s, 1H, H-4'), 4.78–4.61 (m, 2H, H-3 α and H-16 α), 3.61 (dd, *J* = 11.0, 4.7 Hz, 1H, H-26a), 3.46 (dd, *J* = 10.9, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.53 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-20 β), 2.35 (dd, *J* = 14.4, 7.2 Hz, 1H, H-24a), 2.09 (dd, *J* = 14.9, 6.5 Hz, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.02 (d, *J* = 13.4 Hz, 3H, H-21), 1.00 (d, *J* = 12.9 Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19). ¹³C NMR (100.52 MHz) δ (ppm): 36.6 C-1, 27.4 C-2, 82.4 C-3, 33.9 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.1 C-7, 34.8 C-8, 54.1 C-9, 35.4 C-10, 21.0 C-11, 40.0 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.5 C-15, 82.4 C-16, 60.7 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 39.8 C-20, 14.7 C-21, 113.1 C-22, 131.6 C-23, 35.1 C-24, 35.6 C-25, 66.9 C-26, 17.2 C-27, 125.4 C-4', 112.3 C-5', 144.8 C-6', 115.3 C-7', 116.1 C-8', 150.1 C-9', 121.4 C-10', 21.4 CH₃ acetyl, 170.9 C=O acetyl. MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 579(MH⁺, 12), 578 (M⁺, 29), 456(15), 455(44), 269(22), 259(46), 236(14), 235(100), 234(68), 219(13), 217(94), 216(70), 215(11), 204(40), 203(10), 201(17), 199(10), 189(11), 188(19), 187(14), 177(14), 176(87), 175(31), 161(19), 147(24), 133(10), 122(13), 121(14), 119(10), 107(21), 95(11), 93(17), 91(11), 81(13).

3. Radical scavenging test

DPPH is a stable deep purple free radical with an absorption peak at 517 nm, which disappears in the presence of a radical scavenger and when its free electron becomes paired. The degree of decolorization can be taken as a measure of the antioxidant capacity of a sample [33–36]. The DPPH method may be utilized in aqueous and nonpolar organic solvents and can be used to examine both hydrophilic and lipophilic antioxidants [36]. The scavenging effects of samples with DPPH[•] were determined spectrophotometrically according to the method of Sreejayan and Rao [37]. Briefly, 0.05 ml of the compounds being tested were dissolved in ethanol, the compounds were added at different concentrations (7–288 μ M) to an ethanolic solution of 100 μ M DPPH (2.95 ml). The mixture was vortexed for 30 s and kept at room temperature for 20 min in the dark, absorbance was then measured at 517 nm. Instead of the compounds, an equal amount of ethanol was added to the control. The ethanolic solution of the radical DPPH[•] was prepared daily and protected from light. Ascorbic acid and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid Trolox (**3**) were used as standards in a range of 4–70 μ M. The percentage of radical scavenging effect was calculated using the following Eq. (1).

$$\text{Scavenging capacity (\%)} = 1 - ((A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sample blank}}) / A_{\text{Control}}) \times 100. \quad (1)$$

where A_{Control} was the absorbance of the control (DPPH solution without sample), A_{Sample} the absorbance of the test sample (DPPH plus test sample), and the $A_{\text{Sample blank}}$ the absorbance of the sample only (sample without DPPH solution).

The IC₅₀ value, which is the concentration of the test compound able to quench 50% of the free radicals, was calculated through linear interpolation on a dose-response curve.

4. Results and discussion

4.1. Synthesis

As we recently described [32], treatment of sarsasapogenin acetate (**4a**) with salicylaldehyde and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in methylene chloride afforded the epimeric spirochromenes **22R-5** and **22S-5** after 24 h of reaction. An extension of this methodology to tigogenin acetate (**6**) produced the diastereomeric spirochromenes **22R-7** and **22S-7** (Scheme 1).

A plausible reaction mechanism should comprise, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed F-ring opening to produce the enol ether **III** which undergoes aldol condensation with the aldehyde to produce the intermediate **IV**. Ring closure through the phenolic hydroxyl group placed at position C-2' of the aromatic ring, followed by elimination produces the observed spirochromenes, (Scheme 2).

The configuration at C-22 in the obtained compounds can be easily corroborated with the aid of NOESY experiments. While in the **22R** derivatives the strong H-18 \leftrightarrow H-24 and H-20 \leftrightarrow H-24 NOE correlations indicate that the aliphatic fragment that includes atoms C-23 to C-27 is placed in the β -side of the E-ring, in the **22S** epimers, the observed H-16 \leftrightarrow H-24 NOE correlation indicates that the aliphatic fragment has the α -orientation (Scheme 1).

Surprisingly, the distribution of the products in each reaction shows a clear dependence with the configuration at C-25. Meanwhile sarsasapogenin acetate (**4**) belonging to the 25S series gives rise to the 22S spirochromene as the major product, in the case of the 25R-sapogenin **6**, the predominating compound is the 22R epimer (Scheme 1).

Interestingly, the reactions of the acetylated sapogenins **4** (**25S**) and **5** (**25R**) with 2,5-dihydroxybenzaldehyde in the same conditions described above, produced only one epimer, in each reaction with opposite configuration at C-22 (Scheme 3). The configuration at C-22, in both compounds, was corroborated in NOESY experiments as described in Scheme 1.

The results of the above described reactions clearly show that while the reaction of the 25S sapogenin **6**, produces the 22S diastereomers as major compounds, in the same reaction with tigogenin acetate (**6**), that belongs to the 25R series, the production of 22R diastereomer is favored.

Although there is clear evidence on the influence of the configuration at C-25 in the distribution of the C-22 diastereomers, so far,

this fact has no certain explanation. It seems logic that the configuration at C-25 should exert a significant influence in the diastereoselectivity of the aldol reaction leading to the intermediate **IV** that bears two new chiral centers. The configuration of those new chiral centers should determine the preferred direction of the ring closure and consequently the 22R/22S diastereomeric relation. Further studies directed to understand the effect of the configuration at C-25 in the course of the tandem aldolic condensation–spiroketalization process are on development.

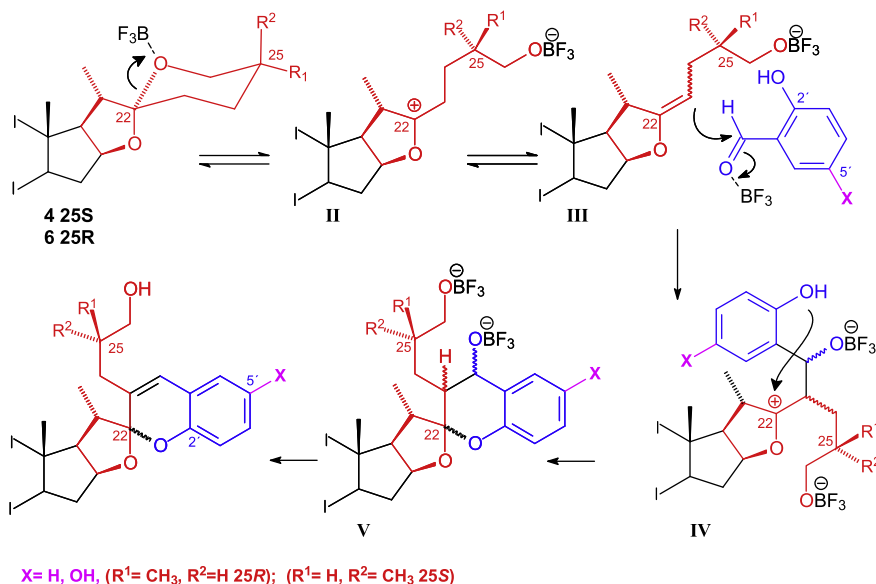
4.2. Antioxidant activity

The antioxidant activity test of both starting steroid sapogenins **4** and **6** showed that, as expected, neither the spiroketal side chain nor the steroid skeleton of these compounds have radical scavenging capacity. Condensation of **4** or **6** with salicylaldehyde led to the inactive compounds **22R-5**, **22S-5**, **22R-7** and **22S-7** that bear spirochromene side chains that are closely related with the pharmacophoric core present in tocopherol (1) and Trolox (3) but lacks the phenolic hydroxyl group. In contrast, compounds 22S-8 and 22R-9 that bear a phenolic hydroxyl group attached to position C-6' of the spirochromene side chain, and were obtained by condensation with 2,5-dihydroxybenzaldehyde, showed significant activity as radical scavengers.

The assessment of DPPH scavenging capacity showed that both **22S-8** and **22R-9** were able to scavenge this radical (Fig. 2, Table 1). The dependence of the extent of DPPH scavenging by the tested compounds was linear (data not shown). The scavenging capacity (%) was found to increase with increasing concentrations of these compounds in the DPPH assay. It was observed that at any given concentration (4–289 μM) **22S-8** and **22R-9** had significant antioxidant capacity, but lower than those of ascorbic acid and Trolox (**3**) (4–50 μM and 8–70 μM , respectively) (Fig. 2). DPPH radical scavenging activity expressed as IC_{50} values of tested compounds is presented on Table 1.

The DPPH method is based on the reduction of alcoholic DPPH solution in presence of a hydrogen donating antioxidant leading to the formation of a non-radical form of DPPH; this modification is visually noticeable as a discoloration from purple to yellow [38–44].

In the present study, Trolox (**3**) was dissolved in ethanol, since it can be used as the antioxidant standard to report the relative radical scavenging capacities of both hydrophilic and lipophilic



Scheme 2. Plausible reaction mechanism.

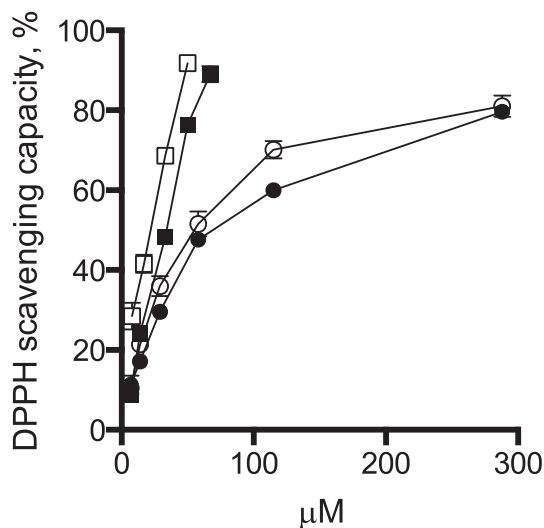
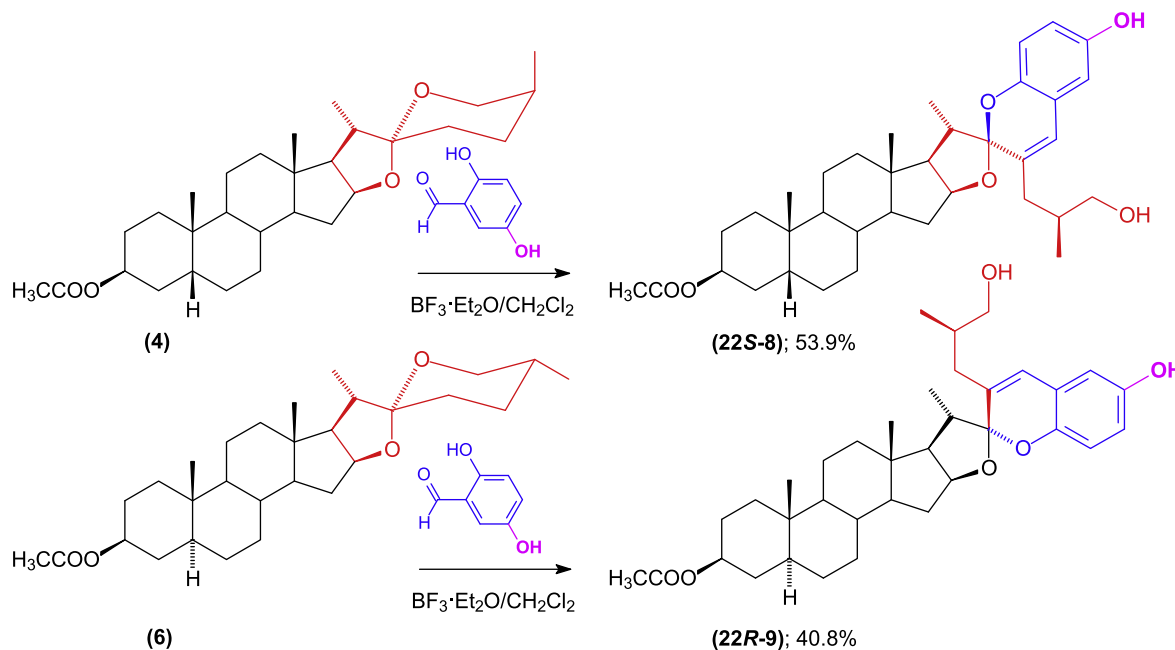


Fig. 2. Comparison of the antioxidant capacity of ascorbic acid (□), Trolox (**3**) (■), **22S-8** (●) and **22R-9** (○), and using the DPPH method. Symbols represent mean \pm SEM of the three assays in triplicate. In the majority of the cases, the SEM value is lower than the size of the symbols.

antioxidants, which makes it possible to directly compare the DPPH scavenging capacities of these antioxidants [45]. It has been observed that DPPH scavenging activity of phenolics is positively correlated with the number of hydroxyl groups [46]. IC_{50} values

Table 1
Concentration required to reach 50% inhibition.

Sample	IC_{50} (μ M)
Ascorbic acid	20.05 \pm 1.26
Trolox (3)	27.32 \pm 0.72
22S-8	68.81 \pm 2.00 ^{a,b,c}
22R-9	48.49 \pm 2.64 ^{a,b}

Data are expressed as mean \pm SEM. Determinations were made in triplicate.

^a $p < 0.005$ vs ascorbic acid.

^b $p < 0.005$ vs Trolox (**3**).

^c $p < 0.005$ vs **22R-9**.

of ascorbic acid, Trolox (**3**), **22S-8** and **22R-9** were: 20.05 \pm 1.26, 27.32 \pm 0.72, 68.81 \pm 2.00 and 48.49 \pm 2.64 μ M respectively, which correlates with the number of hydroxyl groups of each compound. Interestingly, although both **22S-8** and **22R-9** possess one hydroxyl group attached to position C-6', their IC_{50} values are statistically different ($p < 0.005$). That suggests that the configurations at C-22 and or C-25 may exert a significant influence in the scavenging capacity.

5. Conclusion

Tandem aldol condensation between steroid sapogenins and 2,5-dihydroxybenzaldehyde produced 6'-hydroxy spirochromenes that showed significant activity as radical scavengers. The fact that the active compounds can be easily obtained in a single step from these readily available natural products, paves the way for the production of new steroidal antioxidants. Preparation of additional members of this new family of compounds as well as studies of their chemical reactivity and radical scavenging properties are on development.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support provided by Direccin General de Asuntos del Personal Acadmico (Projects DGAPA-IN211714 and IN210713) and the Faculty of Chemistry (PAIP-5000-9063 and 5000-9105). Thanks are due to CONACYT-Mxico for the scholarship granted to M.A.R-E. We want to express our gratitude to Minerva Monroy-Barreto and Georgina Duarte Lisci (USAI-UNAM) for recording NMR and MS spectra. We thank Dr. Carlos Cobas from Mestrelab[®] for assistance with the MestreNova NMR processing program.

References

- [1] Fieser L, Fieser M. Steroids. New York: Reinhold; 1959. and references therein.
- [2] Lee S, LaCour TG, Fuchs PL. Chemistry of trisdecacyclic pyrazine antineoplastics: the cephalostatins and ritterazines. Chem Rev 2009;109:2275–314.
- [3] Gyszkiewicz-Wojtkielewicz A, Jastrzbska I, Morzycki JW, Romanowska DB. Approaches towards the synthesis of cephalostatins, ritterazines and saponins

- from ornithogalum saundersiae – new natural products with cytostatic activity. *Curr Org Chem* 2003;7:1257–77.
- [4] Iglesias-Arteaga MA, Morzycki JW. Cephalostatins and ritterazines. In: Knölker HJ, editor. *The alkaloids: chemistry and biology*. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 153–279.
- [5] Koolman J, editor. *Ecdysone*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1989.
- [6] Cluter HG, Yokota T, Adam G, editors. *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. Washington, DC: A.C.S. Symp; American Chemical Society; 1991.
- [7] Khripach VA, Zhabinskii VN, de Groot AE. *Brassinosteroids a new class of plant hormones*. San Diego: Academic Press; 1999.
- [8] Rosado-Abón A, de Dios-Bravo G, Rodríguez-Sotres R, Iglesias-Arteaga MA. Synthesis and plant growth promoting activity of dinorcholanic lactones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 2013;134:45–50.
- [9] Lednicer D. *Strategies for organic drug synthesis and design*. 2nd ed. Hoboken: Wiley; 2009.
- [10] Mooradian AS. Antioxidant properties of Steroids. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 1992;45:509–11.
- [11] Thibodeau PA, Kachadourian R, Lemaya R, Bisson M, Dayb BJ, Paquette B. *In vitro* pro- and antioxidant properties of estrogens. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 2002;81:227–36.
- [12] Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Liza M, Lacort M, de Groot H. Antioxidant effects of estradiol and 2-hydroxyestradiol on iron-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Steroids* 1994;59:383–8.
- [13] Miller CP, Jirkovsky I, Hayhurst DA, Adelmant SJ. *In vitro* antioxidant effects of estrogens with a hindered 3-OH function on the copper-induced oxidation of low density lipoprotein. *Steroids* 1996;61:305–8.
- [14] Pellissier M-A, Trap C, Malewiak M-I, Morfin R. Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7-hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids* 2004;69:137–44.
- [15] Mohamed NR, Abdelhalim MM, Khadrawy YA, Elmegeed GA, Abdel-Salam OME. One-pot three-component synthesis of novel heterocyclic steroids as a central antioxidant and anti-inflammatory agents. *Steroids* 2012;77:1469–76.
- [16] Morozkina SN, Chentsova AS, Selivanov SI, Shavva AG. Synthesis and investigation of biological properties of modified 6-oxa-estra-1,3,5(10),8(9)-tetraenes. *Steroids* 2014;88:90–4.
- [17] Lone IH, Khan KZ, Fozdar BI, Hussain F. Synthesis antimicrobial and antioxidant studies of new oximes of steroidal chalcones. *Steroids* 2013;78:945–50.
- [18] Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 2011;32:234–46.
- [19] Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007;401:1–11.
- [20] Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK. Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 1995;147:77–81.
- [21] Guzmán-Beltrán S, Pedraza-Chaverri J, Gonzalez-Reyes S, Hernández-Sánchez F, Juárez-Figueroa UE, Gonzalez Y, Bobadilla K, Torres M. Nordihydroguaiaretic acid attenuates the oxidative stress-induced decrease of CD33 expression in human monocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2013.
- [22] Guzmán-Beltrán S, Espada S, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A. Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* 2008;447:167–71.
- [23] Galano A, Macías-Ruvalcaba NA, Campos ONM, Pedraza-Chaverri J. Mechanism of the OH radical scavenging activity of nordihydroguaiaretic acid: a combined theoretical and experimental study. *J Phys Chem B* 2010;114:6625–35.
- [24] Castro IA, Rogero MM, Junqueira RM, Carrapeiro MM. Free radical scavenger and antioxidant capacity correlation of α -tocopherol and Trolox measured by three *in vitro* methodologies. *Int J Food Sci Nutr* 2006;57:75–82.
- [25] Martin H-D, Kock S, Scherrers R, Lutter K, Wagener T, Hundsdoerfer C, Frixel S, Schaper K, Ernst H, Schrader W, Görner H, Stahl W. 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a natural carotenoid with superior antioxidant and photoprotective properties. *Angew Chem Int Ed* 2009;48:400–3.
- [26] Bowry VR, Ingold KU. The unexpected role of vitamin E (α -tocopherol) in the peroxidation of human low-density lipoprotein. *Acc Chem Res* 1999;32:27–34.
- [27] Caruso F, Tanski J, Villegas-Estrada A, Rossi M. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. *J Agric Food Chem* 2004;52:7279–85.
- [28] Iglesias-Arteaga MA, Arcos-Ramos RO. One-step axial acetoxylation at C-23. A new method for the functionalization of the side chain of steroid sapogenins. *Tetrahedron Lett* 2006;47:8029–31.
- [29] Iglesias-Arteaga MA, Arcos-Ramos RO, Mendez-Stivalet JM. The unexpected course of the reaction of steroid sapogenins with diacetoxyiodobenzene and BF₃·Et₂O in formic acid. *Tetrahedron Lett* 2007;48:7485–8.
- [30] Lopez Y, Ruiz-Perez KM, Yezpe R, Santillan R, Flores-Alamo M, Iglesias-Arteaga MA. Mechanistic insights and new products of the reaction of steroid sapogenins with NaNO₂ and BF₃·Et₂O in acetic acid. *Steroids* 2008;73:657–68.
- [31] Ruiz-Pérez KM, Romero-Ávila M, Tinajero-Delgado V, Flores-Álamo M, Iglesias-Arteaga MA. BF₃·Et₂O-induced stereoselective aldol reaction with benzaldehyde, and steroid sapogenins and its application to a convenient synthesis of dinorcholanic lactones. *Steroids* 2012;77:819–28.
- [32] Ramos-Enrriquez MA, Iglesias-Arteaga MA. Synthesis of novel steroids bearing a spirochromene side chain by BF₃·Et₂O catalyzed aldol condensation of spirostane sapogenins and salicylaldehyde. *Tetrahedron Lett* 2014;55:3325–7.
- [33] Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199–200.
- [34] Jasprica I, Bojic M, Mornar A, Besic E, Bucan K, Medic-Saric M. Evaluation of antioxidative activity of Croatian propolis samples using DPPH and ABTS + stable free radical assays. *Molecules* 2007;12:1006–21.
- [35] Kedare SB, Singh RP. Genesis and the development of DPPH method as an antioxidant assay. *Int J Food Sci Tech* 2011;48:412–22.
- [36] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005;53:4290–302.
- [37] Sreejayan N, Rao MN. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* 1996;46(2):169–71.
- [38] Shon M-Y, Kim T-H, Sung N-J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chem* 2003;82:593–7.
- [39] Yu LL. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J Agric Food Chem* 2001;49:3452–6.
- [40] Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841–56.
- [41] Zhou KQ, Yin JJ, Yu LL. Phenolic acid, tocopherol and carotenoid compositions, and antioxidant functions of hard red winter wheat bran. *J Agric Food Chem* 2005;53:3916–22.
- [42] Parry J, Su L, Luther M, Zhou KQ, Yurawecz MP, Whittaker P, Yu LL. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *J Agric Food Chem* 2005;53:566–73.
- [43] Jin J, Li Z, Zhang F. Scavenging function of mulberry vinegar extractives for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *J Northwest Sci-Tech Univ Agric Forest* 2006;34:135–7.
- [44] Ozcelik O, Lee JH, Min DB. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* 2003;68:487–90.
- [45] Cheng Z, Moore J, Yu L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *J Agric Food Chem* 2006;54:7429–36.
- [46] Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 2003;41:753–8.



An unexpected $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed rearrangement of 23E-benzylidenespirostanes to spiro[furan-indenes]



Manuel A. Ramos Enríquez, Marcos Flores-Álamo, Martín A. Iglesias-Arteaga*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2016

Revised 8 April 2016

Accepted 11 April 2016

Available online 13 April 2016

Keywords:

23E-Benzylidenespirostanes

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed rearrangement

NMR

X-ray diffraction

Spiro[furan-indene] steroids

ABSTRACT

Treatment of 23E-benzylidenespirostanes with $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in 2/1 acetic acid/ CH_2Cl_2 led to novel steroids bearing a spiro[furan-indene] moiety in the side chain. When steroid sapogenins were treated with benzaldehyde and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in the same mixture of solvents, similar compounds were obtained. The structures of the novel spirocyclic steroids were confirmed by NMR and X-ray diffraction.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Steroid sapogenins have served as starting materials in the synthesis of a wide variety of bioactive steroids that include adrenocortical hormones,¹ plant grow promoting substances,² cephalostatins and ritterazines,³ and antioxidants,⁴ among many others.⁵ Since the preparation of bioactive steroids starting from this family of compounds implies the modification or cleavage of the spiroketal side chain, considerable attention has been devoted to the development of new methods for the transformation on this fragment.⁶ In particular we have recently described that treatment of acetylated steroid sapogenins with benzaldehyde and a large excess of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in CH_2Cl_2 produced good yields of 23E-benzylidenespirostanes. (Scheme 1).^{6g}

A study to produce a more environment friendly procedure led us to change the conditions of the aldol condensation in a way that the amount of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ can be reduced. During the course of this study, we found that the simple change of solvent from CH_2Cl_2 to 2/1 acetic acid/ CH_2Cl_2 allowed the reduction in the amount of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ necessary to produce the above mentioned aldol condensation and also promoted an unexpected rearrangement that produces hereto unknown spirocyclic steroids bearing a spiro[furan-indene] moiety in the side chain.

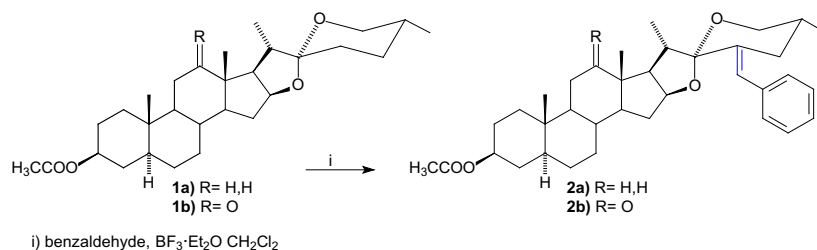
Results and discussion

When a solution of 1 mmol of tigogenin acetate (**1a**) in 2/1 acetic acid/ CH_2Cl_2 mixture (9 mL) was treated with benzaldehyde (2 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.6 mL) the expected 23E-benzylidenespirostane **2a** was produced in 41.5% yield after 4.5 h. Surprisingly during the same treatment of **1b**, the expected 23E-benzylidenespirostane **2b** was slowly produced together with a more polar compound that arose after 24 h (TLC). Consumption of the starting material **1b** was achieved only after 50 h and no trace of the expected 23E-benzylidenespirostane **2b** was observed in TLC after that time. Chromatographic separation of the reaction mixture afforded the unexpected compound **3b** in 50.9% (Scheme 2 Eq. 1, Table 1 entry 2). The same reaction with tigogenin acetate (**1a**) afforded the corresponding compound **3a** in only 19.7% after 63 h (Scheme 2 Eq. 1, Table 1 entry 1). Additionally, when solutions of our previously reported 23E-benzylidenespirostanes **2a** and **2b**^{6g} (1 mmol) in 2/1 acetic acid/ CH_2Cl_2 mixture (9 mL) were treated with $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.6 mL), compounds **3a** and **3b** were produced in almost similar yields as described above (Scheme 2 Eq. 2; Table 1, entries 3 and 4).

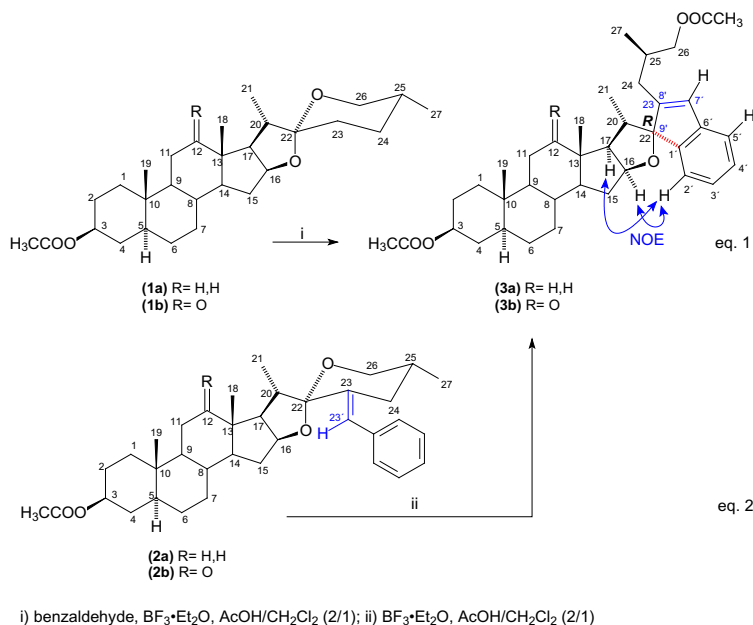
The hereto unknown compounds **3a** and **3b** bear an indene moiety fused to the furostane side chain through positions C-22 (spiro) and C-23 (olefinic). Assignments of the NMR signals and elucidation of the structures of the new spirocyclic compounds were carried out employing a combination of 1D and 2D NMR techniques that included ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC, NOESY, and COSY. The observed H-6' ↔ H-16 and H-6' ↔ H-17 NOE effects indicate that the bond

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56223899x44417.

E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).



Scheme 1. Synthesis of 23E-benzylidenespirostanes.

Scheme 2. Synthesis of the spiro[furan-indenes] **3a** and **3b**.Table 1
Synthesis of the spiro[furan-indenes] **3a** and **3b**

Entry	Starting material	Product	Time (h)	Yield (%)
1	1a	3a	63	19.7
2	1b	3b	50	50.9
3	2a	3a	48	13.2
4	2b	3b	48	40.4

between C-22 and the phenyl ring is oriented to the α -side of the steroid nucleus, which results in the 22R configuration (see Scheme 2). X-ray diffraction of compound **3b** corroborated the proposed structures (Fig. 1).⁷

(22R,25R)Indene[9',8':22,23]- β -5 α -furostan-3 β ,26-diol diacetate (**3a**) Mp. 194.5–196.7 °C (from $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35–7.29 (m, 1H, H-2'), 7.16 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.12–7.09 (m, 1H, H-5'), 7.05 (td, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H, H-4'), 6.36 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-7'), 4.99 (dt, $J = 9.2, 7.0$ Hz, 1H, H-16 α), 4.70 (tt, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H-3 α), 4.09–3.92 (m, 2H, H-26), 2.58–2.52 (m, 1H, H-20 β), 2.49 (ddd, $J = 15.3, 5.2, 1.8$ Hz, 1H, H-24a), 2.31 (ddt, $J = 13.2, 6.5, 1.7$ Hz, 1H, H-125), 2.20 (dd, $J = 9.3, 7.8$ Hz, 1H, H-17 α), 2.07 (s, 3H, CH_3 acetyl), 2.05 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH_3 acetyl), 0.99 (s, 3H, H-18), 0.98 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27), 0.87 (s, 3H, H-19), 0.72 (td, $J = 11.8, 10.4, 3.1, 1\text{H}$, H-9 α), 0.55 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.7 C-1, 27.5 C-2, 73.7 C-3, 34.0 C-4, 44.7 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.3

C-12, 41.6 C-13, 56.7 C-14, 32.5 C-15, 84.3 C-16, 63.2 C-17, 16.9 C-18, 12.3 C-19, 36.2 C-20, 15.3 C-21, 101.2 C-22, 148.5 C-23, 31.0 C-24, 31.4 C-25, 69.6 C-26, 17.1 C-27, 128.5 C-7', 142.8 C-1', 124.0 C-2', 127.9 C-3', 124.6 C-4', 120.6 C-5', 145.5 C-6', 21.5, 21.0 $2 \times \text{CH}_3$ acetyl, 170.7, 171.2 $2 \times \text{C}=\text{O}$ acetyl.

(22R,25R)Indene[9',8':22,23]- β -26-diacetoxy-5 α -furostan-12-one (**3b**) Mp. 249.0–249.3 °C (from acetone/hexane). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.33 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-2'), 7.18 (td, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.13–7.09 (m, 1H, H-5'), 7.07 (td, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H, H-4'), 6.38 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-7'), 4.92 (td, $J = 8.4, 7.3, 4.2$ Hz, 1H, H-16 α), 4.77–4.56 (m, 1H, H-3 α), 4.15–3.87 (m, 2H, H-26), 3.04 (dd, $J = 9.4, 8.1$ Hz, 1H, H-17 α), 2.44 (1H, m, H-24a), 2.39 (m, 1H, H-20 β), 2.30 (m, 1H, H-25), 2.07 (s, 3H, CH_3 acetyl), 2.03 (s, 3H, CH_3 acetyl), 2.01 (m, 1H, H-24b), 1.26 (s, 3H, H-18), 0.98 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H-27), 0.95 (s, 3H, H-19), 1.19 (m, 1H, H-9 α), 0.64 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 36.2 C-1, 27.2 C-2, 73.1 C-3, 33.8 C-4, 44.5 C-5, 28.1 C-6, 32.5 C-7, 34.2 C-8, 55.5 C-9, 36.1 C-10, 37.7 C-11, 213.0 C-12, 55.8 C-13, 56.0 C-14, 32.0 C-15, 82.5 C-16, 53.9 C-17, 16.5 C-18, 11.9 C-19, 36.7 C-20, 14.0 C-21, 101.2 C-22, 147.9 C-23, 30.9 C-24, 31.3 C-25, 69.5 C-26, 17.0 C-27, 128.8 C-7', 142.6 C-1', 124.0 C-2', 128.1 C-3', 124.7 C-4', 120.6 C-5', 145.1 C-6', 21.4, 21.0 $2 \times \text{CH}_3$ acetyl, 170.6, 171.1 $2 \times \text{C}=\text{O}$ acetyl.

In a rational reaction pathway, activation of acetic acid by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ leads to acetylation of the hydroxyl group attached to C-26, that results on the F-ring opening and concomitant generation of the carbocation **I**. Resonance weakens the C-23–C-23' double

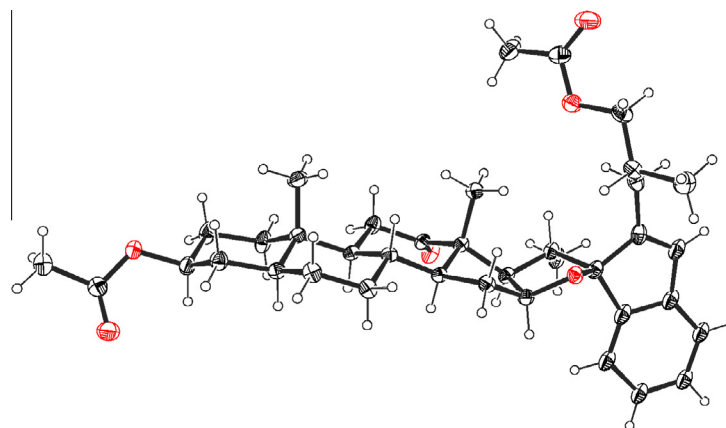
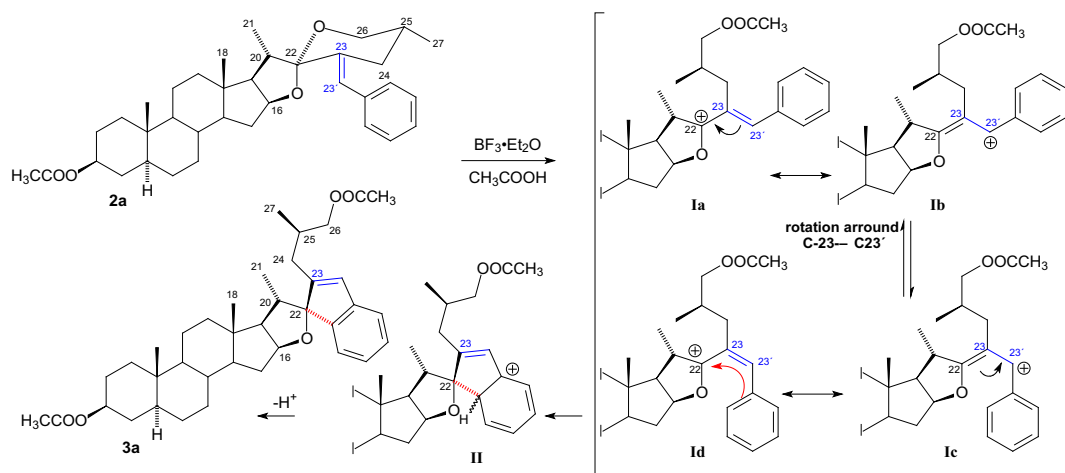


Figure 1. X-ray structure of compound **3b** with the thermal ellipsoids drawn at 30% probability.



Scheme 3. Plausible reaction mechanism.

bond and permits rotation, placing the phenyl ring near to the carbocation at C-22 and allowing the internal S_EAr that locks the indene moiety through the spiro carbon at C-22 (Scheme 3).

Production of the spiro[furan-indene] steroids **3a** and **3b** directly from the corresponding steroid sapogenins **1a** and **1b** can be rationalized in terms of a tandem process that includes our previously reported aldol condensation of steroid sapogenins with benzaldehyde to produce 23*E*-benzylidenespirostanes^{6g} followed by the described rearrangement.

Although experimental results clearly indicate that the presence of a carbonyl function at C-12 plays a determinant role in the yield of the reaction, no explanation for this effect appears convincing. Further studies are directed at clarifying the effect of the C-12 carbonyl function on the reaction rate, improving overall reaction yields, and extending the synthetic applications of this new reaction to other spiroketalic compounds.

Conclusions

Treatment of 23*E*-benzylidenespirostanes with $BF_3 \cdot Et_2O$ in 2/1 acetic acid/ CH_2Cl_2 triggers a rearrangement that produces novel steroids bearing a spiro[furan-indene] moiety in the side chain. When steroid sapogenins were treated with benzaldehyde and $BF_3 \cdot Et_2O$ in the same mixture of solvents, similar compounds were obtained through a tandem process that includes our previously reported aldol condensation of steroid sapogenins with benzalde-

hyde to produce 23*E*-benzylidenespirostanes^{6g} followed by the described rearrangement.

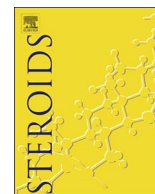
Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Project DGAPA-IN211714) and the Faculty of Chemistry (PAIP-5000-9063). Thanks are due to CONACYT-México for the scholarship granted to M.A.R.-E. We want to express our gratitude to Minerva Monroy-Barreto (USAI-UNAM) for recording NMR spectra. We thank Dr. Carlos Cobas from Mestrelab[®] for assistance with the MestreNova NMR processing program.

References and notes

- Lednicer, D. *Strategies for Organic Drug Synthesis*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, 2009. Chapters 4 and 5, and references therein.
- (a) Iglesias-Arteaga, M. A.; Pérez, R.; Pérez, C. S.; Coll, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 261–266; (b) Iglesias-Arteaga, M. A.; Pérez, R.; Pérez, C. S.; Coll, F. *Steroids* **2002**, 67, 159–163; (c) Romero-Ávila, M.; de Dios-Bravo, G.; Mendez-Stivalet, J. M.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. *Steroids* **2005**, 72, 955–959; (d) Rosado-Abón, A.; de Dios-Bravo, G.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, 134, 45–50.
- For reviews see (a) Lee, S.; LaCour, T. G.; Fuchs, P. L. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2275–2314; (b) Iglesias-Arteaga, M. A.; Morzycki, J. W. *Cephalostatins and Ritterazines In The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Knölker, H. J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2013; Vol. 72, pp 153–279.

4. Ramos-Enríquez, M. A.; Medina-Campos, O. N.; Pedraza-Chaverri, J.; Iglesias-Arteaga, M. A. *Steroids* **2015**, *98*, 132–137.
5. (a) Ravindar, K.; Reddy, M. S.; Lindqvist, L.; Pelletier, J.; Deslongchamps, P. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4420–4423; (b) Ravindar, K.; Reddy, M. S.; Lindqvist, L.; Pelletier, J.; Deslongchamps, P. *J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1269–1284; (c) Jiang, B.; Shi, H.; Tian, W.; Zhou, W. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 469–476; (d) Xu, Q.-H.; Peng, X.-W.; Tian, W.-S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9375–9377; (e) Lee, E.; Liu, Y. T.; Solomon, P. H.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1634–1635.
6. For recent review see Jastrzębska, I. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 353–372; Selected references (a) LaCour, T. G.; Tong, Z.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1815–1818; (b) Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; del Río, R. E.; Hernandez-Linares, G.; Suárez-Rojas, A.; Rincón, S.; Farfán, N.; Santillán, R. L. *Steroids* **2003**, *68*, 199–204; (c) Jastrzębska, I.; Morzycki, J. W.; Trochimowicz, U. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1929–1932; (d) Jastrzębska, I.; Morzycki, J. W. *Polish J. Chem.* **2005**, *79*, 1245–1248; (e) Iglesias-Arteaga, M. A.; Arcos-Ramos, R. O. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8029–8031; (f) Iglesias-Arteaga, M. A.; Arcos-Ramos, R. O. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7485–7488; (g) Ruiz-Pérez, K. M.; Romero-Ávila, M.; Tinajero-Delgado, V.; Flores-Álamo, M.; Iglesias-Arteaga, M. A. *Steroids* **2012**, *77*, 819–828.
7. Crystallographic data have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center as supplementary material number CCDC 1459086. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK. E-mail:deposit@ccdc.cam.ac.uk.



Synthesis of novel hybrid steroid dimers by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of 2-formyl-estradiol diacetate and steroid sapogenins



Manuel A. Ramos-Enríquez, Martín A. Iglesias-Arteaga*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Steroid sapogenins
2-Formyl-estradiol diacetate
 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation
Steroid dimers
NMR

ABSTRACT

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of steroid sapogenins with 2-formyl-estradiol diacetate afforded two novel classes of steroid dimers in which an estrogenic core is attached to the spirostane side chain of a steroid sapogenin through an exocyclic double bond in position C-23, or through a spiro centre in C-22.

1. Introduction

Steroid dimers have evolved from simple curiosities isolated from the nature [1a] or side products of some reactions, [1b] to a developing field in which synthetic compounds designed to develop or explore physical, biological or chemical properties are constantly added to an increasing number of naturally occurring dimers that also exhibit interesting properties [2].

As result of our ongoing program on the exploration of the reactivity of spirostane steroid sapogenins we recently reported that treatment of the acetylated tigogenin acetate (**1**) with benzaldehyde and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ led to *E*-23(23′)-benzylidenespirostanes in good yield (Scheme 1 equation 1) [3a]. Additionally, when benzaldehyde was replaced by salicylaldehyde or 2,5-dihydroxybenzaldehyde the corresponding steroid spirochromenes **3a** and **3b** were respectively produced (Scheme 1, equation 2) [3c]. Similar results were obtained with other steroid sapogenins that were submitted to such reaction conditions [3a,c,d].

While spirochromenes as **3b**, bearing an extra hydroxyl group in the aromatic ring, exhibited interesting properties as radical scavengers [3c], the saponification of the *E*-23(23′)-benzylidenespirostanes yielded *E*-23(23′)-benzylidenespirostanols that showed moderate cytotoxicity against different lines of cancer cells [3d].

As a part of our recently initiated program for the synthesis and study of the properties of steroid dimers [4], we envisaged similar $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensations of acetylated steroid sapogenins with 2-formyl-estradiol diacetate (**4**) as alternatives for the development of novel hybrid steroids dimers in which an estrogenic core, coming from the animal kingdom, is attached to the side chain of naturally occurring steroid sapogenins isolated from plants which have

been reported to exert antiproliferative activity against cancer cells [5] or beneficial effects on some metabolic[6] or cardiac diseases [7]. Here in we report on the synthesis and characterization of steroid hybrid dimers derived from the $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of tigogenin and sarsasapogenin acetates (**1a** and **1b**) with 2-formyl-estradiol diacetate (**4**)

2. Experimental

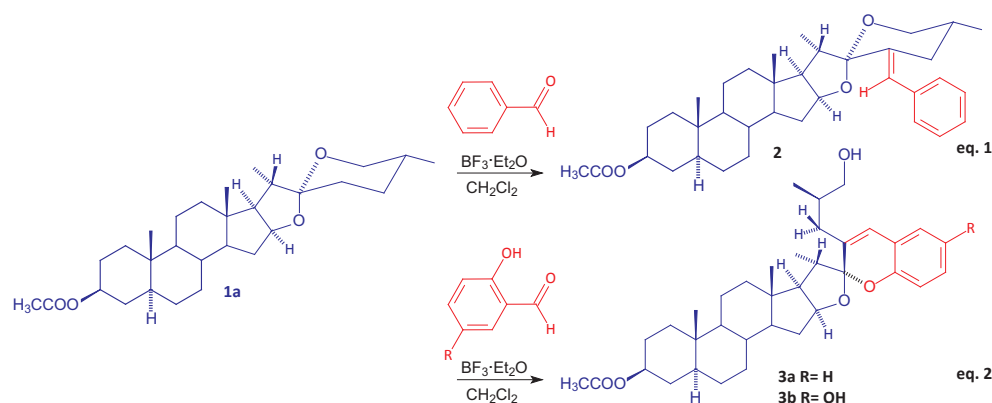
General: Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM® SIL G/UV254 plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vanillin in 50% HClO_4 and heated until color developed. Melting points were measured on a Melt-Temp II apparatus. NMR spectra were recorded in CDCl_3 solutions in a Varian INOVA 400 spectrometer (400 MHz and 100.53 MHz for ^1H and ^{13}C) using the solvent signals as references. All 2D NMR spectra were recorded using the standard pulse sequences and parameters recommended by the manufacturer and were processed employing the MestreNova NMR processing program [see <http://mestrelab.com/>]. HRMS (ESI) were recorded in an Agilent spectrometer.

2.1. Synthetic procedure

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3 mL) was added to a solution of the acetylated steroid sapogenin **1a** or **1b** (229.3 mg, 0.5 mmol) and 2-formyl-estradiol diacetate (**4**) (288.4 mg, 0.75 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 6 h (CCD hexane:AcOEt, 8:1 eluted twice). The reaction mixture was carefully poured into ice and diluted with ethyl acetate (50 mL). The organic layer was washed with water

* Corresponding author.

E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).



Scheme 1. Synthesis of benzylidenespirosterane **2** and spirochromenes **3a** and **3b**.

(8 × 25 mL) and a saturated solution of NaCl (1 × 25 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained oily mixture of compounds was separated in a chromatographic column packed with silica gel (30 g) and eluted with hexane:AcOEt 15:1 mixture to afford the desired dimers.

2.2. From tigogenin acetate (1a)

Dimer 5a: Yield 161 mg (39%) Amorphous solid, Mp. 171.2–172.1 °C (from hexane/ethyl ether). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.11 (s, 1H, H-1'), 6.75 (s, 1H, H-4'), 6.30 (s, 1H, H-23'), 4.67 (m, 2H, H-3 and H-17'), 4.42 (dt, J = 9.0, 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.53 (m, 2H, H-26), 2.91–2.80 (m, 2H, H-6'), 2.56 (p, J = 6.6 Hz, 1H, H-20), 2.49 (ddd, J = 13.4, 4.5, 1.5 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.22 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.06 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.83 (s, 3H, H-18'), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.77 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H-27). ¹³C NMR (100.53 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.5 C-6, 32.2 C-7, 35.0 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 40.8 C-13, 56.1 C-14, 31.6 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.2 C-19, 36.9 C-20, 14.7 C-21, 110.2 C-22, 138.6 C-23, 33.5 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.1 C-27, 117.8 C-23', 127.6 C-1', 137.7 C-2', 146.4 C-3', 121.8 C-4', 137.0 C-5', 29.2 C-6', 27.0 C-7', 38.2 C-8', 44.0 C-9', 127.1 C-10', 26.0 C-11', 36.8 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.6 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 20.9, 21.2 3 × CH₃ acetyl, 170.7, 169.4, 171.2 3 × C=O acetyl. HRMS (ESI) Observed 825.5304 C₅₂H₇₃O₈ (MH⁺) requires 825.5305.

Dimer 6a: Yield 32 mg, (8.1%). Amorphous solid, Mp. 185.9–187.6 °C (from CH₂Cl₂/methanol). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 6.93 (s, 1H, H-1'), 6.60 (s, 1H, H-4'), 6.43 (s, 1H, H-23'), 4.77–4.59 (m, 3H, H-3, H-16 and H-17') 3.62 (dd, J = 11.0, 4.6 Hz, 1H, H-26a), 3.43 (dd, J = 11.0, 4.9 Hz, 1H, H-26b), 2.80 (dd, J = 8.6, 4.2 Hz, 2H, H-6'), 2.52 (p, J = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.33 (dd, J = 14.1, 7.2 Hz, 1H, H-24), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.01 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3H H-21), 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 3H, H-18'). ¹³C NMR (100.53 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7 C-1, 27.4 C-2, 73.6 C-3, 34.0 C-4, 44.6 C-5, 28.4 C-6, 32.2 C-7, 35.8 C-8, 54.2 C-9, 35.6 C-10, 21.0 C-11, 40.1 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.6 C-15, 82.4 C-16, 60.6 C-17, 16.7 C-18, 12.2 C-19, 40.1 C-20, 14.7 C-21, 113.5 C-22, 130.0 C-23, 35.1 C-24, 34.8 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 125.7 C-23', 122.9 C-1', 118.5 C-2', 149.2 C-3', 115.3 C-4', 132.8 C-5', 29.6 C-6', 26.3 C-7, 38.4 C-8', 43.7 C-9', 137.4 C-10', 27.2 C-11', 36.9 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.7 C-17', 12.0 C-18', 21.4, 21.2 × CH₃ acetyl, 170.7, 171.2 2 × C=O acetyl. HRMS (ESI) Observed 783.5197 C₅₀H₇₁O₇ (MH⁺) requires 783.5200.

2.3. From sarsasapogenin acetate (1b)

Dimer 5b Yield 91.4 mg (44.3%). Amorphous solid, Mp.

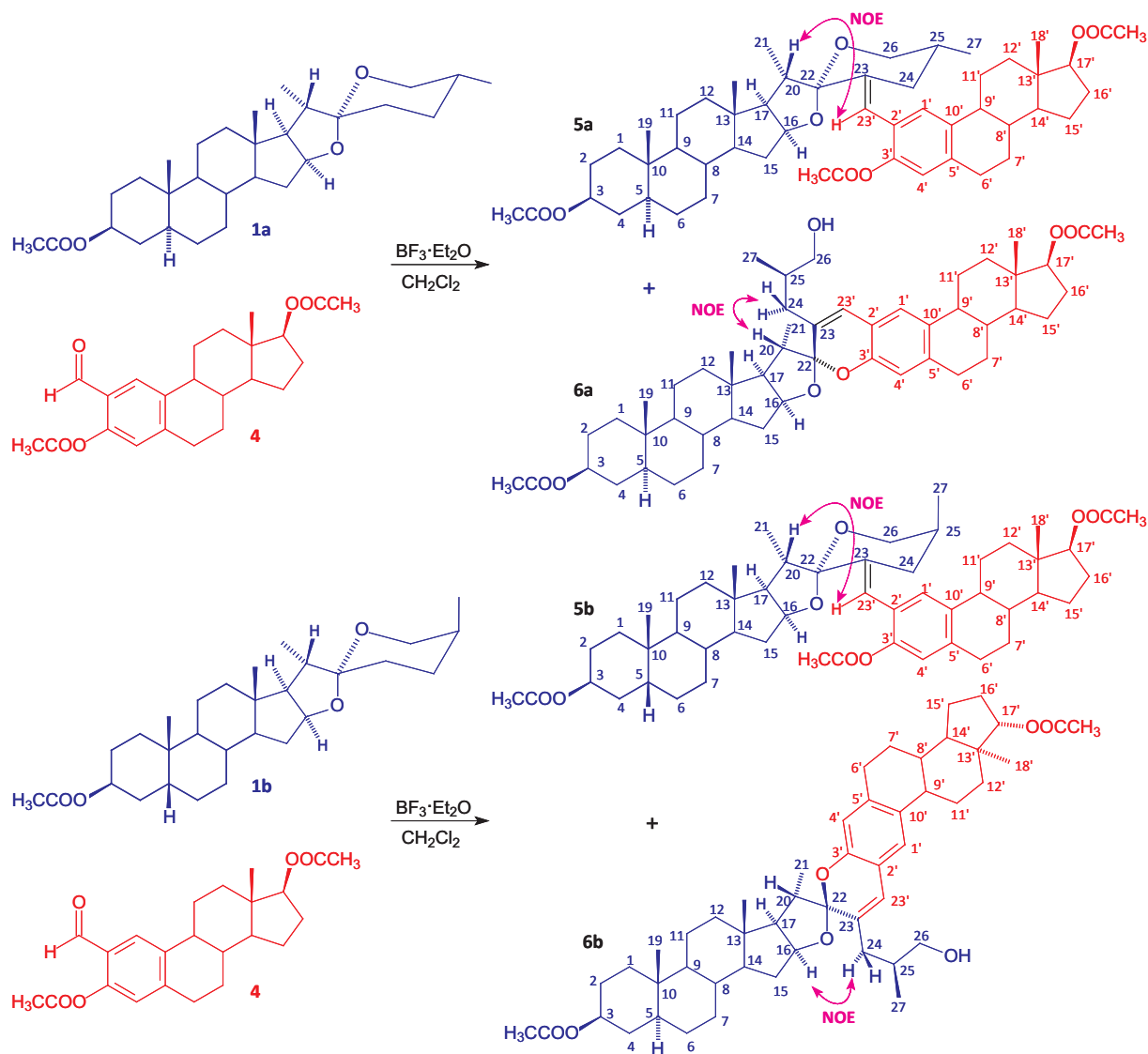
163.8–166.6 °C (from acetone/methanol). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.11 (s, 1H, H-1'), 6.74 (s, 1H, H-4'), 6.45 (s, 1H, H-23'), 5.07 (m, 1H, H-3), 4.68 (dd, J = 9.2, 7.6 Hz, 1H, H-17'), 4.45 (dt, J = 9.0, 7.0 Hz, 1H, H-16), 4.05 (dd, J = 10.9, 3.6 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.30 (dt, J = 11.0, 1.7 Hz, 1H, H-26 eq.), 2.84 (m, 2H, H-6'), 2.59 (ddd, J = 13.7, 5.3, 1.9 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.50 (dq, J = 6.7 Hz, 1H, H-20), 2.22 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.08 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H-21), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.94 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H-27), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-18'). ¹³C NMR (100.53 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 31.6 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.4 C-7, 35.3 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.3 C-12, 41.0 C-13, 56.3 C-14, 30.7 C-15, 80.9 C-16, 61.8 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 38.6 C-20, 14.6 C-21, 111.0 C-22, 137.5 C-23, 31.3 C-24, 30.3 C-25, 65.0 C-26, 17.6 C-27, 119.9 C-23', 127.5 C-1', 137.6 C-2', 146.4 C-3', 121.7 C-4', 136.9 C-5', 29.2 C-6', 27.0 C-7', 38.2 C-8', 44.0 C-9', 127.1 C-10', 26.1 C-11', 36.8 C-12', 42.8 C-13', 49.8 C-14', 23.2 C-15', 27.5 C-16', 82.6 C-17', 12.1 C-18', 21.5, 20.8, 21.2 3 × CH₃ acetyl, 170.7, 169.3, 171.2 3 × C=O acetyl. HRMS (EI) Observed 824.5240 C₅₂H₇₂O₈ (M⁺) requires 824.5227.

Dimer 6b Yield 11.3 mg (6.0%). Amorphous solid, Mp. 231.7–233.4 °C (from CH₂Cl₂/methanol). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 6.97 (s, 1H, H-1'), 6.63 (s, 1H, H-4'), 6.45 (s, 1H, H-23'), 5.07 (m, 1H, H-3), 4.66 (m, 2H, H-16, H-17'), 3.57 (dd, J = 10.6, 5.9 Hz, 1H, H-26a), 3.51 (dd, J = 10.7, 5.0 Hz, 1H, H-26b), 2.81 (m, 2H, H-6'), 2.54 (p, J = 7.0 Hz, 1H, H-20), 2.17 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.05 (s, 6H, 2 × CH₃ acetyl), 1.05 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.97 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-18'). ¹³C NMR (100.53 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6 C-1, 25.0 C-2, 70.7 C-3, 31.6 C-4, 37.3 C-5, 26.4 C-6, 26.3 C-7, 35.2 C-8, 40.0 C-9, 35.0 C-10, 20.9 C-11, 40.4 C-12, 41.1 C-13, 56.2 C-14, 30.7 C-15, 82.8 C-16, 60.9 C-17, 16.6 C-18, 23.8 C-19, 39.3 C-20, 14.7 C-21, 112.7 C-22, 129.9 C-23, 37.3 C-24, 35.0 C-25, 67.6 C-26, 17.6 C-27, 126.2 C-23', 123.1 C-1', 118.9 C-2', 149.1 C-3', 115.6 C-4', 133.0 C-5', 29.7 C-6', 27.2 C-7', 38.5 C-8', 43.7 C-9', 137.4 C-10', 26.5 C-11', 36.9 C-12', 42.9 C-13', 49.8 C-14', 23.3 C-15', 27.6 C-16', 82.3 C-17', 12.0 C-18', 21.2, 21.5 2 × CH₃ acetyl, 170.8, 171.3 2 × C=O acetyl. HRMS (EI) Observed 782.5127 C₅₀H₇₀O₇ (M⁺) requires 782.5122.

3. Results and discussion

When a solution of tigogenin acetate (**1a**) and 2-formyl-estradiol diacetate (**4**) [8] in dry CH₂Cl₂ was treated with BF₃·Et₂O for 6 h, a mixture of the dimeric steroids **5a** and **6a** and several inseparable minor side products was produced. Chromatography separation afforded **5a** and **6a** in 39% and 8.1% yields, respectively. Similar treatment of sarsasapogenin acetate (**1b**) led to the corresponding dimers **5b** (44.3%) and **6b** (6.0%) (Scheme 2).

Characterization and assignments of NMR signals were carried out with the aid of a combination of 1D and 2D NMR techniques that



Scheme 2. Synthesis of dimeric steroids 5a,b and 6a,b. Selected NOE correlations.

Table 1
Selected ^1H signals of the obtained steroid dimers (δ ppm).

	Dimer 5a	Dimer 5b	Dimer 6a	Dimer 6b
<i>Sapogenin core</i>				
H-3	4.67(m) ^o	5.07(m)	4.68 (m) [♦]	5.07(s)
H-16	4.42 (dt)	4.45(dt)	4.68 (m) [♦]	4.66(m)■
H-18	0.80 (s)	0.81(s)	0.88 (s)	0.88(s)
H-19	0.84 (s)	0.98(s)	0.83 (s)	0.98(d)
H-20	2.56 (dq)	2.50(dq)	2.52 (dq)	2.54(dq)
H-21	1.06 (d)	1.08(d)	1.01 (d)	1.05(d)
H-24	2.49 (ddd) eq.	2.59(ddd) eq	2.33 (dd)	2.30(m)
H-26	3.53 (m)	4.05(dd), 3.30(ddd)	3.62 (d), 3.43 (dd)	3.57(dd), 3.51(dd)
H-27	0.77 (d)	0.94(d)	0.98 (d)	0.97(d)
H-23'	6.30 (s)	6.45(s)	6.43 (s)	6.45(s)
<i>Estradiol core</i>				
H-1'	7.11 (s)	7.11(s)	6.93(s)	6.97(s)
H-4'	6.75 (s)	6.74(s)	6.60 (s)	6.63(s)
H-6'	2.84(m)	2.84(m)	2.80 (m)	2.81(m)
H-17'	4.67(m)*	4.68(dd)	4.68 (m) [♦]	4.66(m)■
H-18'	0.83 (s)	0.83(s)	0.80 (s)	0.80(s)

* , ♦ , ■ Overlapped.

included ^1H , ^{13}C , COSY, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC). The most salient ^1H and ^{13}C signals are collected in Tables 1 and 2. The *E* geometry of the exocyclic 23–23' double bond in dimers 5a,b as well as the configuration of the C-22 chiral spirocenter in compounds 6a,b were verified by observation of NOE correlations (See Scheme 2).

Interestingly the obtained spirochromenes 6a (from tigogenin acetate 1a) and 6b (from sarsasapogenin acetate 1b) have the opposite configuration at C-22 as we recently described for non dimeric spirochromenes derived from the same steroid sapogenins [3c].

Our previously proposed mechanism for the production of benzyldenespirostanes [3a] also applies for the generation of dimers 5a and 5b. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed deacetylation of the phenolic hydroxyl in 4 explains the occurrence of the dimeric spirochromenes 6a and 6b that may be generated through the mechanism that produced our previously reported spirochromenes 3a,b [3c].

4. Conclusion

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of acetylated steroid sapogenins with 2-formyl-estradiol diacetate (4) afforded two novel classes of steroid dimers in which an estrogenic core is attached to the

Table 2
Selected ^{13}C signals of the obtained steroid dimers (δ ppm).

	Dimer 5a	Dimer 5b	Dimer 6a	Dimer 6b
	<i>Sapogenin core</i>			
C-3	73.6	70.7	73.6	70.7
C-16	80.5	80.9	82.4	82.8
C-17	61.6	61.8	60.6	60.9
C-18	16.6	16.6	16.7	16.6
C-19	12.2	23.8	12.2	23.8
C-21	14.7	14.6	14.7	14.7
C-22	110.2	111.0	113.5	112.7
C-23	138.6	137.5	130.0	129.9
C-26	66.1	65.0	66.9	67.6
C-27	17.1	17.6	17.1	17.6
C-23'	117.8	119.9	125.7	126.2
	<i>Estradiol core</i>			
C-1'	127.6	127.5	122.9	123.1
C-2'	137.7	137.6	118.5	118.9
C-3'	146.4	146.4	149.2	149.1
C-4'	121.8	121.7	115.3	115.6
C-5'	137.0	136.9	132.8	133.0
C-6'	29.2	29.2	29.6	29.7
C-10'	127.1	127.1	137.4	137.4
C-17'	82.6	82.6	82.7	82.3
C-18'	12.0	12.1	12.0	12.0

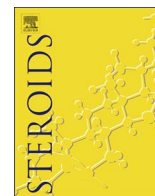
spirostane side chain of a steroid sapogenin through an exocyclic double bond in position C-23 (**5a** and **5b**), or through a spirochromene moiety in C-22 (**6a** and **6b**). This application of our recently reported reactions paves the way to the synthesis novel hybrid steroid dimers constructed by two bioactive cores, coming from the vegetal and animal kingdoms. Further experiments to improve the yields and to extend this reaction to the synthesis of additional dimers for biological studies are on development.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support provided by *Dirección General de Asuntos del Personal Académico* (Project DGAPA-IN212417) and the Faculty of Chemistry (PAIP-5000-9063). Thanks are due to CONACyT-México for the scholarship granted to M.A.R.E.

References

- (a) J. Banerji, A. Chatterjee, Y. Itoh, T. Kikuchi, New steroid alkaloids from *Chonemorpha macrophylla* G. Don (*Chonemorpha fragrans* Moon Alston), *Indian J. Chem.* 11 (1973) 1056–1057;
(b) E. Mosettig, I. Scheer, Steroids with an aromatic B-ring, *J. Org. Chem.* 17 (1952) 764–769.
- (a) Y.X. Li, J.R. Dias, Dimeric and Oligomeric Steroids, *Chem. Rev.* 97 (1997) 283–304;
(b) L. Nahar, S.D. Sarker, A.B. Turner, A review on synthetic and natural steroid dimers: 1997–2006, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 1349–1370;
(c) L. Nahar, S.D. Sarker, Steroid Dimers, Chemistry and Applications in Drug Design and Delivery, John Wiley & Sons Ltd, UK, 2012;
(d) M.A. Iglesias-Arteaga, J.W. Morzycki, Cephalostatins and Ritterazines, in: H.J. Knölker (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Elsevier, Amsterdam, 2013, pp. 153–279.
- (a) K.M. Ruíz-Pérez, M. Romero-Ávila, V. Tinajero-Delgado, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, BF₃·Et₂O-induced stereoselective aldol reaction with benzaldehyde, and steroid sapogenins and its application to a convenient synthesis of dinorcholanic lactones, *Steroids* 77 (2012) 819–828;
(b) M.A. Ramos-Enrriquez, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, An alternative reduction course of the spiroketal side chain of steroid sapogenins induced by the presence of a 23E-benzylidene moiety, *Tetrahedron Lett.* 54 (2013) 4401–4405;
(c) M.A. Ramos-Enrriquez, O.N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and radical scavenger properties of novel spirochromenes derived from steroid sapogenins, *Steroids* 98 (2015) 132–137;
(d) M.A. Ramos-Enrriquez, K. Vargas-Romero, R. Rárová, M. Strnad, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and in vitro anticancer activity of 23(23'E)-benzylidenespirostanols derived from steroid sapogenins, *Steroids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.017>.
- (a) C. Alarcón-Manjarrez, R. Arcos-Ramos, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis, NMR and crystal characterization of dimeric terephthalates derived from epimeric 4,5-seco-cholest-3-yn-5-ols, *Steroids* 109 (2016) 66–72.
- (a) E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, O. Tagliatalata-Scafati, Sapogenins of *Allium porrum* L, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4904–4908;
(b) A. Carotenuto, E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, V. De Feo, R. Carnuccio, F. D'Acquisto, Porrigensins A and B, novel cytotoxic and antiproliferative sapogenins isolated from *Allium porrum*, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 1003–1007;
(c) A. Carotenuto, E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, R. Carnuccio, F. D'Acquisto, 12-Keto-porrigenin and the unique 2,3-seco-porrigenin, new antiproliferative sapogenins from *Allium porrum*, *Tetrahedron* 53 (1997) 3401–3406;
(d) C. Corbiere, B. Liagre, F. Terro, J.L. Beneytout, Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells, *Cell Res.* 14 (2004) 188–196;
(e) C. Corbiere, B. Liagre, A. Bianchi, K. Bordji, M. Dauca, P. Netter, J.L. Beneytout, Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells, *Int. J. Oncol.* 22 (2003) 899–905;
(f) J. Raju, J.M.R. Patlolla, M.V. Swamy, C.V. Rao, Diosgenin, a steroid saponin of *trigonella foenugraecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 Rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004) 1392–1398;
(g) B. Liagre, P. Vergne-Salle, C. Corbiere, J.L. Charissoux, J.L. Beneytout, Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synovial cells with cyclooxygenase-2 overexpression, *Arthritis. Res. Ther.* 6 (2004) R373–R383;
(h) S. Moalic, B. Liagre, C. Corbiere, A. Bianchi, M. Dauca, K. Bordji, J.L. Beneytout, A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells, *FEBS Lett.* 506 (2001) 225–230.
- (a) M.A. McAnuff, F.O. Omoruyi, E.Y. Morrison, H.N. Asemota, Changes in some liver enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract from bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) or commercial diosgenin, *West Indian Med. J.* 54 (2005) 97–101;
(b) R.E. Temel, J.M. Brown, Y. Ma, W. Tang, L.L. Rudel, Y.A. Ioannou, J.P. Davies, L. Yu, Diosgenin stimulation of fecal cholesterol excretion in mice is not NPC1L1 dependent, *J. Lipid. Res.* 50 (2009) 915–923;
(c) T. Uemura, S. Hirai, N. Mizoguchi, T. Goto, J.Y. Lee, K. Taketani, Y. Nakano, J. Shono, S. Hoshino, N. Tsuge, T. Narukami, N. Takahashi, T. Kawada, Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 1596–1608.
- (a) H.T. Zhou, X.F. Yu, G.M. Zhou, Diosgenin inhibits angiotensin II-induced extracellular matrix remodeling in cardiac fibroblasts through regulating the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway, *Mol. Med. Rep.* 15 (2017) 2823–2828;
(b) J. Manivannan, J. Shanthakumar, T. Silambarasan, E. Balamurugan, B. Raja, Diosgenin, a steroidal saponin, prevents hypertension, cardiac remodeling and oxidative stress in adenine induced chronic renal failure rats, *RSC Adv.* 5 (2015) 19337–19344.
- Formyl-estradiol diacetate (**4**) was obtained following a two-step sequence that comprised i) formylation of estradiol as described in: Ø.W. Akselsen, T.V. Hansen, ortho-Formylation of estrogens. Synthesis of the anti-cancer agent -methoxyestradiol, *Tetrahedron* 67 (011) 7738–774 and ii) acetylation as described in: A.P. Prakasham, K. Shanker, A.S. Negi, A simple and convenient synthesis of -methoxyestradiol from estrone *Steroids* 77 (01) 467–470.



Synthesis and *in vitro* anticancer activity of 23(23')E-benzylidenespirostanols derived from steroid sapogenins



Manuel A. Ramos-Enríquez^a, Katherine Vargas-Romero^a, Lucie Rárová^b, Miroslav Strnad^c,
Martín A. Iglesias-Arteaga^{a,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

^b Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

^c Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University & Institute of Experimental Botany ASCR, Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Aldol condensation
Benzylidenespirostanols
Cytotoxicity
Cancer cell lines
Fibroblasts

ABSTRACT

Benzylidenespirostanols were prepared by two-step synthesis including $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of several acetylated steroid sapogenins with benzaldehyde followed by saponification. The obtained compounds showed moderate cytotoxicity against three cancer cell lines (*T*-lymphoblastic leukemia cell line CEM, breast carcinoma cell line MCF7 and cervical carcinoma cell line HeLa) and normal human fibroblasts (BJ). The most active of the five tested substances was **3c** (lowest IC_{50} for MCF7 cells $19.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$) without any selectivity towards human cancer and normal cells, respectively.

1. Introduction

Cytotoxic steroids have been the focus of intensive research for more than 30 years. In the main, a large number of naturally occurring steroids is biologically tested to assess their antiproliferative and/or cytotoxic activity against different cancer cell lines *in vitro*. The already large number of naturally occurring cytotoxic steroids is thus continuously increasing. The diversity of these compounds is vast and includes polyhydroxy sterols [1], saponins [2], monomeric spiroketals like steroid sapogenins (SS) [3] and hippuristanols [4] as well as the dimmeric spiroketals, cephalostatins and ritterazines [5] among many others.

The comprehensive research directed to identifying potential anti-tumor agents includes the synthesis of non-natural cytotoxic steroids by introduction of structural modifications into bioactive natural compounds and *de novo* design and synthesis of new steroid candidate molecules. Both approaches have produced a plethora of synthetic cytotoxic steroids [6].

Previous studies reported that side chain modified steroid sapogenins (SS) showed cytotoxic activity against a wide spectrum of cancer cell lines [7]. Sandoval *et al.* found that while diosgenin exhibited cytotoxic activity against cervical carcinoma cell line HeLa (IC_{50} 36.17 μM) and CaSki (IC_{50} 31.35 μM), the oxime of 23-acetyldiosgenin showed an increased activity against HeLa (IC_{50} 10.9 μM) and CaSki

(IC_{50} 10.51 μM) [7a]. On the other hand Santillan *et al.* described a set of transformations on the SS side chain that resulted in the synthesis of a family of 23-ethylidene-26-hydroxy-22-oxo-cholestanes that exhibited cytotoxic activity against CEM cells (IC_{50} 5.9–40.9 μM) [7b].

Due to the vast structural diversity of cytotoxic steroids, finding accurate SAR is a complicated, if not impossible, task. Nevertheless, the gathered evidence of anticancer activities allows the association of the cytotoxicity with the presence of certain substructures. Fuchs *et al.* suggested that oxocarbenium ions, formed as a result of the cleavage of spiroketal moieties, may act as alkylating agents of nucleophilic biomolecules and that this underlies the cytotoxicity observed in cephalostatins and ritterazines [8]. Although this hypothesis is yet not confirmed, the large number of cytotoxic steroid spiroketals, as well as the inverse relationship between the cytotoxicity and the enthalpy of oxocarbenium ion formation [8b] suggest that this putative explanation may be, at least, well oriented.

23E-Benzylidene spirostanes, a new family of steroid spiroketals derived from the $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ catalyzed aldol condensation of SS and benzaldehyde, that we recently described [9a] exhibit a reactivity profile that differ from that of the parent SS and leads to different mode of cleavage of the spiroketal moiety [9b,c]. Bearing in mind that the native steroid sapogenins demonstrated cytotoxicity and that the presence of the 23E-benzylidene moiety in the spiroketal side chain produces drastic changes in the reactivity of this fragment, we decided to

* Corresponding author at: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico.
E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.017>

Received 19 June 2017; Received in revised form 22 August 2017; Accepted 30 August 2017

Available online 05 September 2017

0039-128X/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

explore the cytotoxicity of some members of this new derivatives of SS. In this paper, we describe the synthesis and cytotoxic activity against human cancer cells and normal fibroblasts of 23E-benzylidenespirostanols derived from various steroid sapogenins.

2. Experimental

Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM® SIL G/UV254 plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vanillin in 50% HClO₄ and heated until color developed. Melting points were measured on a Melt-Temp II instrument. Mass spectra were obtained from a Thermo-Electron spectrometer model DFS (Double Focus Sector). NMR spectra were recorded in CDCl₃ or DMSO-d₆ solutions on a Varian INOVA 400 spectrometer using the solvent signals as reference. NMR signal assignments were carried out with the aid of a combination of 1D and 2D NMR techniques that included ¹H, ¹³C, COSY, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC). Compounds **2a–2d** were obtained as previously described [9a].

[23(23'E,25R)-23(23')-benzylidenespirost-7-en-3β-ol acetate (**2e**). Freshly distilled BF₃·Et₂O (40.56 ml) was added to solution of the steroid sapogenin **2e** (3.10 g, 6.8 mmol) and benzaldehyde (1.43 g, 13.5 mmol) in dry CH₂Cl₂ (200 ml) and the mixture was stirred under argon at room temperature for 4 h. The reaction mixture was washed with water (10 × 75 ml), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated to produce a syrupy residue. The obtained oil was leached with hot methanol and the solid precipitate was washed with methanol to obtain the desired product. Yield: 1.73 g, 47%. Mp 177.9–179.7 °C (from acetone) ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm 7.33 (dd, *J* = 8.6, 6.7 Hz, 2H, H-meta), 7.25–7.19 (m, 3H, H-ortho H-para), 6.57 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-23'), 5.15 (dd, *J* = 4.7, 2.3 Hz, 1H, H-7), 4.70 (tt, *J* = 11.3, 4.6 Hz, 1H, H-3α), 4.52 (m, 1H, H-16 α), 3.65–3.51 (m, 2H, H-26 ax. and H-26 eq.), 2.79 (ddd, *J* = 13.4, 4.2, 1.6 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.58 (p, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-20β), 2.10 (m, 1H, H-24 ax.), 1.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27), 0.72 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR(CDCl₃, 100.53 MHz) δ ppm: δ 36.8 C-1; 27.4 C-2; 73.3 C-3, 33.8 C-4, 40.1 C-5, 29.4 C-6, 117.9 C-7, 138.4 C-8, 48.9 C-9, 34.3 C-10, 21.4 C-11, 39.6 C-12, 41.6 C-13, 54.8 C-14, 31.0 C-15, 80.2 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 13.0 C-19, 37.7 C-20, 14.8 C-21, 110.6 C-22; 137.1 C-23, 32.9 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 170.7 C=O acetyl, 21.4 CH₃ acetyl, 137.1 ipso, 129.1 ortho, 128.1 meta, 126.5 para, 122.9 C-23'. ESIMS *m/z*: 545 M⁺ + 1 (2.5), 454 (26.8), 440 (13.6), 99 (13.9), 85 (100.0), 69 (15.0), 55 (10.8).

2.1. General procedure for the saponification of benzylidene spirostanes

KOH (600 mg) was added to a solution of the benzylidene spirostane **2a–e** (200 mg) in methanol (10 mL) and dioxane (5 mL) and the mixture was stirred until the starting material was consumed (TLC). The volatile solvent was evaporated under reduced pressure and ethyl acetate (50 mL) was added. The organic phase was washed with H₂O (6 × 25 mL) and brine (2 × 25 mL), dried (anhydrous Na₂SO₄) and evaporated. The produced solid was purified in a chromatographic column packed with silica gel (10 g) employing hexane/ethyl acetate (6/1 for **3a**, **3b** and **3d**; 4/1 for **3d**; 3/2 for **3c**) as eluent, to afford the desired compound.

[23(23'E,25R)-23(23')-Benzylidene-5α-spirostan-3β-ol (**3a**) Yield 183.9 mg (99%). Mp 200.8–201.8 °C (from ethyl acetate). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.33 (dd, *J* = 8.2, 7.0 Hz, 2H, H-meta), 7.26–7.20 (m, 3H, H-ortho and H-para), 6.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-23'), 4.43 (dt, *J* = 9.0, 7.1 Hz, 1H, H-16 α), 3.66–3.47 (m, 3H, H-3 α, H-26 ax. and H-26 eq.), 2.78 (ddd, *J* = 13.3, 4.4, 1.5 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.60 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20β), 2.10 (ddd, *J* = 13.5, 11.7, 1.9 Hz, 1H, H-24 ax.), 2.00 (ddd, *J* = 12.2, 7.5, 5.2 Hz, 1H, H-15β), 1.89 (dd, *J* = 9.0, 7.1 Hz, 1H, H-17 α), 1.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.84 (s,

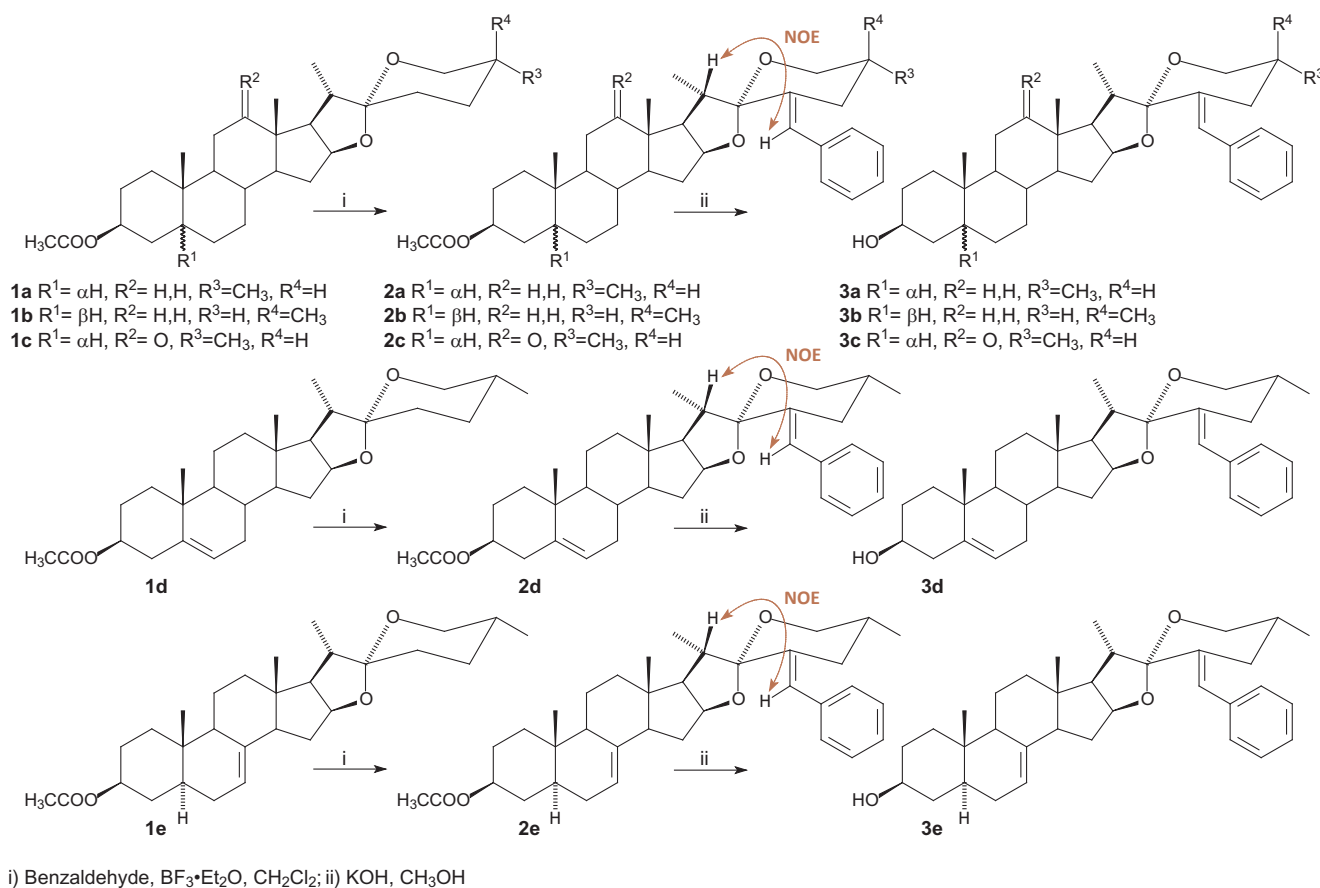
3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27), 0.67 (ddd, *J* = 12.2, 10.3, 4.1 Hz, 1H, H-9 α). ¹³C NMR(CDCl₃, 100.52 MHz) δ ppm: δ 36.9 C-1; 31.5 C-2; 71.3 C-3, 38.2 C-4, 44.8 C-5, 28.6 C-6, 32.3 C-7, 35.0 C-8, 54.4 C-9, 35.6 C-10, 21.1 C-11, 40.3 C-12, 40.8 C-13, 56.3 C-14, 31.6 C-15, 80.5 C-16, 61.6 C-17, 16.6 C-18, 12.4 C-19, 37.3 C-20, 14.8 C-21, 110.6 C-22; 137.1 C-23, 32.8 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 137.1 ipso, 129.1 ortho, 128.1 meta, 126.6 para, 122.9 C-23'. ESIMS *m/z*: 505 M⁺ + 1 (9.3), 454 (42.8), 440 (22.3), 99 (14.3), 98 (11.5), 85 (100), 69 (15.9), 55 (12.1).

[23(23'E,25S)-23(23')-Benzylidene-5β-spirostan-3β-ol (**3b**) Yield 153.8 mg (83%). Mp 129.6–130.8 °C (from CH₂Cl₂/acetone) ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.36–7.29 (m, 2H, H-meta), 7.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, H-ortho and H-para), 6.72 (s, 1H, H-23'), 4.47 (dt, *J* = 8.9, 7.1 Hz, 1H, H-16 α), 4.15–4.09 (m, 1H, H-3 α), 4.05 (dd, *J* = 11.0, 4.2 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.32 (dt, *J* = 11.2, 1.7 Hz, 1H, H-26 eq.), 2.72 (ddd, *J* = 13.7, 5.8, 1.7 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.49 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20β), 2.29 (dd, *J* = 13.7, 5.2 Hz, 1H, H-24 ax.), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR(CDCl₃, 100.52 MHz) δ ppm: δ 29.9 C-1; 27.8 C-2; 67.1 C-3, 33.5 C-4, 36.5 C-5, 26.5 C-6, 26.5 C-7, 35.2 C-8, 39.8 C-9, 35.3 C-10, 20.9 C-11, 40.4 C-12, 40.9 C-13, 56.4 C-14, 31.6 C-15, 81.0 C-16, 61.8 C-17, 16.7 C-18, 23.9 C-19, 39.7 C-20, 14.7 C-21, 111.5 C-22; 136.7 C-23*, 30.8 C-24, 30.3 C-25, 65.1 C-26, 18.3 C-27, 137.2 ipso*, 129.0 ortho, 128.0 meta, 126.5 para, 125.0 C-23'. ESIMS *m/z*: 505 M⁺ + 1 (7.9), 454 (36.7), 440 (18.8), 99 (14.5), 98 (10.1), 85 (100), 69 (15.7), 55 (12.4). * interchangeable.

[23(23'E,25R)-23(23')-Benzylidene-3β-hydroxy-5α-spirostan-12-one (**3c**) Yield 135.4 mg (73%). Mp 126.2–127.1 °C (from CH₂Cl₂/MeOH). ¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-meta), 7.26–7.15 (m, 3H, H-ortho and H-para), 6.55 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-23'), 4.38 (dt, *J* = 8.9, 6.8 Hz, 1H, H-16 α), 3.69–3.51 (m, 1H, H-3 α), 2.79 (dd, *J* = 13.4, 3.7 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.67 (dd, *J* = 9.1, 7.0 Hz, 1H, H-17 α), 2.51–2.37 (m, 1H, H-20 β), 2.25 (dd, *J* = 14.4, 5.0 Hz, 1H, H-11 eq.), 2.12–2.05 (m, 1H, H-24 ax.), 1.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 1.11 (s, 3H, H-18), 0.91 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-27). ¹³C NMR(CDCl₃, 100.52 MHz) δ ppm: δ 36.5 C-1; 31.2 C-2; 70.9 C-3, 37.8 C-4, 44.6 C-5, 28.3 C-6, 31.0 C-7, 34.2 C-8, 55.5 C-9, 36.1 C-10, 37.8 C-11, 213.4 C-12, 55.3 C-13, 55.7 C-14, 31.6 C-15, 78.8 C-16, 52.9 C-17, 16.2 C-18, 12.0 C-19, 37.8 C-20, 13.6 C-21, 110.6 C-22; 137.0 C-23, 32.9 C-24, 33.0 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 137.0 ipso, 129.0 ortho, 128.0 meta, 126.6 para, 123.0 C-23'. ESIMS *m/z*: 541 M⁺Na (< 1), 454 (36.1), 440 (18.3), 99 (14.0), 85 (100.0), 69 (14.8), 55 (11.2).

[23(23'E,25R)-23(23')-Benzylidene-5α-spiro-5-en-3β-ol (**3d**) Yield 171.8 mg (91%). Mp 148.3–150.6 °C (from CH₂Cl₂/MeOH). ¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.36–7.30 (m, 2H, H-meta), 7.25–7.20 (m, 3H, H-ortho and H-para), 6.58 (s, 1H, H-23'), 5.35 (m, 1H, H-6), 4.46 (dt, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 1H, H-16 β), 3.68–3.44 (m, 3H, H-3, H-26 ax and H-26 eq.), 2.78 (dd, *J* = 13.3, 3.5 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.60 (p, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-20β), 2.10 (ddd, *J* = 13.5, 11.8, 2.0 Hz, 1H, H-24 ax.), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-21), 1.03 (s, 3H, H-19), 0.86 (s, 3H, H-18), 0.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-27). ¹³C NMR(CDCl₃, 100.52 MHz) δ ppm: δ 37.2 C-1; 31.6 C-2; 71.7 C-3, 42.3 C-4, 140.8 C-5, 121.4 C-6, 32.1 C-7, 31.4 C-8, 50.1 C-9, 36.7 C-10, 20.9 C-11, 40.0 C-12, 40.5 C-13, 56.5 C-14, 31.7 C-15, 80.4 C-16, 61.5 C-17, 16.5 C-18, 19.4 C-19, 37.3 C-20, 14.9 C-21, 110.6 C-22; 137.1 C-23, 32.9 C-24, 33.1 C-25, 66.1 C-26, 17.2 C-27, 137.1 ipso, 129.1 ortho, 128.1 meta, 126.5 para, 122.9 C-23'. ESIMS *m/z*: 541 M⁺K (< 1), 454 (39.8), 440 (25.9), 99 (15.1), 98 (17.0), 97 (13.7), 95 (10.6), 85 (100.0), 69 (15.7), 55 (12.1).

[23(23'E,25R)-23(23')-Benzylidene-5α-spiro-7-en-3β-ol (**3e**) Yield 124.4 mg (67%). Mp 156.1–158.3 (from CH₂Cl₂/hexane). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-meta), 7.25–7.20 (m, 3H, H-ortho and H-para), 6.57 (s, 1H, H-23'), 5.16 (m, 1H, H-7), 4.52 (m, 1H, H-16 β), 3.68–3.43 (m, 2H, H-26 ax. and H-26 eq.), 2.79 (m, 1H, H-24 eq.), 2.58 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-20 β), 1.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-



Scheme 1. Synthesis of benzylidene spirostanols 3a-e.

27), 0.72 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR(CDCl₃, 100.52 MHz) δ ppm: δ 37.1 C-1; 31.4 C-2; 71.0 C-3; 37.9 C-4; 40.3 C-5; 29.6 C-6; 118.0 C-7; 138.5 C-8; 49.1 C-9; 34.3 C-10; 21.5 C-11; 39.6 C-12; 41.6 C-13; 54.9 C-14; 31.0 C-15; 80.2 C-16; 61.5 C-17; 16.4 C-18; 13.1 C-19; 37.8 C-20; 14.8 C-21; 110.6 C-22; 137.1 C-23*, 32.9 C-24; 33.1 C-25; 66.1 C-26; 17.2 C-27; 137.0 ipso*, 129.1 ortho, 128.1 meta, 126.5 para, 122.9 C-23'. ESIMS m/z : 541 M⁺K (< 1), 454 (46.7), 440 (25.8), 99 (14.0), 85 (100), 69 (15.5), 55 (11.3). * interchangeable.

3. Biological tests

3.1. Cell culture

Stock solutions (10 mmol/L) of the tested compounds were prepared by dissolving an appropriate quantity of each substance in dimethylsulfoxide (DMSO). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin and streptomycin were purchased from Sigma Aldrich (MO, USA). Calcein AM was obtained from Molecular Probes (ThermoFisher, MA, USA). The screening cell lines (*T*-lymphoblastic leukemia cell line CEM, breast carcinoma cell line MCF7, cervical carcinoma cell line HeLa and human fibroblasts BJ) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). CEM cell line was cultured in RPMI 1640 medium with 20% fetal bovine serum and all other cells were cultured in DMEM medium (Sigma Aldrich, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine (2 mmol/L), penicillin and streptomycin (1%). The cell lines were maintained under standard cell culture conditions at 37 °C and 5% CO₂ in a humid environment. Cells were subcultured twice or three times a week using the standard trypsinization procedure.

3.2. Calcein AM assay

Suspensions of tested cell lines (ca. 1.0 × 10⁵ cells/mL) were placed in 96-well microtiter plates and after 24 h of stabilization (time zero) the tested compounds were added (in three 20 μ L aliquots) in serially diluted concentrations in dimethylsulfoxide (DMSO). Control cultures were treated with DMSO alone, and the final concentration of DMSO in the incubation mixtures never exceeded 0.6%. The test compounds were typically evaluated at six 3-fold dilutions and the highest final concentration was generally 50 μ M. After 72 h incubation, Calcein AM solution (100 μ L, Molecular Probes, ThermoFisher, MA, USA) was added, and incubation was continued for another hour. The fluorescence of viable cells was then quantified using a Fluoroskan Ascent instrument (Labsystems, Finland). The percentage of surviving cells in each well was calculated by dividing the intensity of the fluorescence signals from the exposed wells by the intensity of signals from control wells and multiplying by 100. These ratios were then used to construct dose-response curves from which IC₅₀ values, the concentrations of the respective compounds that were lethal to 50% of the tumor cells, were calculated. All the experiments were repeated three times in triplicates.

4. Results and discussion

In a previous communication we described that treatment of the native steroid saponin with BF₃·Et₂O and benzaldehyde in CH₂Cl₂ afforded good yields of the acetylated benzylidenespirostanols **2a-d** [9a]. When this methodology was applied to Δ^7 -tigogenin acetate (**1e**), a new acetylated 23E-benzylidenespirostane **2e** was obtained in a moderate yield. As previously reported for **2a-d** [9a], the observation of the H-20 \leftrightarrow H-23' NOE effect allows the easy verification of the *E* configuration of the benzylidene in compound **2e**. Saponification of

Table 1

IC₅₀ (μM) values obtained from Calcein AM assays using three cancer cell lines (CEM, MCF7 and HeLa) and normal human fibroblasts (BJ) treated with tested substances for 72 h.

Compound	IC ₅₀ (μM)			
	CEM	MCF7	HeLa	BJ
3a	26.8 ± 2.4	33.0 ± 4.2	36.9 ± 3.1	41.9 ± 1.4
3b	31.5 ± 5.1	44.7 ± 1.6	42.6 ± 2.5	42.9 ± 0.1
3c	23.2 ± 0.4	19.9 ± 0.1	35.7 ± 3.5	45.3 ± 2.3
3d	28.0 ± 1.3	40.3 ± 3.3	41.0 ± 3.5	44.1 ± 1.2
3e	28.9 ± 2.8	36.6 ± 4.7	39.2 ± 7.1	41.6 ± 1.5

2a–e with KOH in methanol led to the desired **23E**-benzylidenespirostanols **3a–e** in good to excellent yields (Scheme 1).

4.1. Antiproliferative activities *in vitro*

The *in vitro* antiproliferative activities of the studied compounds were tested in cancer cell lines of various histopathological origins, including *T*-lymphoblastic leukaemia CEM, breast adenocarcinoma MCF7, and cervical carcinoma HeLa lines. The results were compared with the cytotoxicity towards normal human BJ fibroblasts. The cells of all of these lines were exposed to six serial 3-fold dilutions of each drug for 72 h, proportions of surviving cells were then estimated and IC₅₀ values (50% inhibitory concentrations) calculated. The results from Calcein AM assays are presented in Table 1. All tested compounds showed moderate cytotoxic activity towards all cell lines including normal human fibroblasts. The most active of the five substances was **3c** (lowest IC₅₀ for MCF7 cells 19.9 ± 0.1 μM). None of the benzylidenespirostanols was selective for any cell line.

Although these results are preliminary and the differences are small, a tendency can be seen. Naturally occurring steroids bearing an oxygenated substituent in ring C like cephalostatine-1, ritterazine-F [5b], porrigenin C [3e] and hippuristanols [4e] are among the most cytotoxic steroids and compared with the partner bearing a non-oxygenated ring C, they showed increased cytotoxicity. This suggests that in the natural products the presence of an oxygenated substituent in ring C can lead to enhanced cytotoxicity. Interestingly the most active of the studied compounds was **3c** that bears a carbonyl group at position C-12 on ring C. Additionally, the obtained results suggest that compounds bearing a *trans*-fused AB ring system with a saturated B ring (**3a** and **3c**) exhibit higher activity than those with a *cis*-fused AB core (**3b**) or an unsaturated B ring (**3d** and **3e**).

5. Conclusions

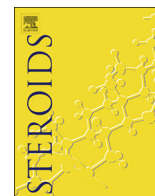
We found that benzylidenespirostanols readily obtained from steroid saponin by condensation of spirostanes and benzaldehyde followed by saponification, exhibit moderate cytotoxicity towards three different human cancer cell lines and normal human fibroblasts. Further experiments to explore the effects of the modification of the benzylidene moiety on cytotoxicity are in progress.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Project DGAPA-IN212417), the Faculty of Chemistry-UNAM (PAIP-5000-9063) and grants 14-27669P and 17-14007S (LR and MS). Thanks are due to CONACyT-México for the scholarship granted to M.A.R.-E. We thank O. Hustáková for the excellent technical assistance.

References

- [1] (a) B. Jiang, H.P. Shi, W.S. Tian, W.S. Zhou, The convergent synthesis of novel cytotoxic certonardosterol D2 from diosgenin, *Tetrahedron* 64 (2008) 469–476; (b) A. Aiello, E. Fattorusso, M. Menna, Steroids from sponges: Recent reports, *Steroids* 64 (1999) 687–714; (c) Q. Wu, K. Huang, Protective effect of ebselen on cytotoxicity induced by cholestane-3 beta, 5 alpha, 6 beta-triol in ECV-304 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 350–359.
- [2] (a) S. Kubo, Y. Mimaki, M. Terao, Y. Sashida, T. Nikaïdo, T. Ohmoto, Acylated cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*, *Phytochemistry* 31 (1992) 3969–3973; (b) C.T. Yen, C.L. Lee, F.R. Chang, T.L. Hwang, H.F. Yen, C.J. Chen, S.L. Chen, Y.C. Wu, Indiosides G-K: steroidal glycosides with cytotoxic and anti-inflammatory activities from *Solanum violaceum*, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 636–643; (c) I. Podolak, A. Galanty, D. Sobolewska, Saponins as cytotoxic agents: a review, *Phytochem. Rev.* 9 (2005) 425–474.
- [3] (a) E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, O. Tagliatalata-Scafati, Saponin of *Allium porrum* L., *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4904–4908; (b) A. Carotenuto, E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, V. De Feo, R. Carnuccio, F. D'Acquisto, Porrigenins A and B, Novel cytotoxic and antiproliferative saponins isolated from *Allium porrum*, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 1003–1007; (c) A. Carotenuto, E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, R. Carnuccio, F. D'Acquisto, 12-Keto-porrigenin and the unique 2,3-seco-porrigenin, new antiproliferative saponins from *Allium porrum*, *Tetrahedron* 53 (1997) 3401–3406; (d) E. Fattorusso, V. Lanzotti, O. Tagliatalata-Scafati, M. Di Rosa, A. Ianaro, Cytotoxic Saponins from Bulbs of *Allium porrum*, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3455–3462; (e) C. Corbiere, B. Liagre, A. Bianchi, K. Bordji, M. Dauca, P. Netter, J.L. Beneytout, Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells, *Int. J. Oncol.* 22 (2003) 899–905; (f) J. Raju, J.M.R. Patlolla, M.V. Swamy, C.V. Rao, Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004) 1392–1398; (g) B. Liagre, P. Vergne-Salle, C. Corbiere, J.L. Charissoux, J.L. Beneytout, Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synovialocytes with cyclooxygenase-2 overexpression, *Arthritis. Res. Ther.* 6 (2004) R373–R383.
- [4] (a) C.B. Rao, K.V. Ramana, D.V. Rao, E. Fahy, D.J. Faulkner, Metabolites of the gorgonian *Isis hippuris* from India, *J. Nat. Prod.* 51 (1988) 954–958; (b) N. González, M.A. Barral, J. Rodríguez, C. Jiménez, New cytotoxic steroids from the gorgonian *Isis hippuris*. Structure-activity studies, *Tetrahedron* 57 (2001) 3487–3497; (c) J.H. Sheu, C.H. Chao, G.H. Wang, K.C. Hung, C.Y. Duh, M.Y. Chiang, Y.C. Wu, C.C. Wu, The first A-nor-hippuristanol and two novel 4,5-secosuberstanols from the gorgonian *Isis hippuris*, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 6413–6416; (d) C.H. Chao, L.F. Huang, Y.L. Yang, J.H. Su, G.H. Wang, M.Y. Chiang, Y.C. Wu, C.F. Dai, J.H. Sheu, Polyoxygenated steroids from the gorgonian *Isis hippuris*, *J. Nat. Prod.* 68 (2005) 880–885; (e) R. Somaiah, K. Ravindar, R. Cencic, J. Pelletier, P. Deslongchamps, Synthesis of the antiproliferative agent hippuristanol and its analogues from hydrocortisone via Hg(II)-catalyzed spiroketalization: structure-activity relationship, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 2511–2523.
- [5] (a) S. Lee, T.G. LaCour, P.L. Fuchs, Chemistry of trisdecacyclic pyrazine antineoplastics: the cephalostatins and ritterazines, *Chem. Rev.* 109 (2009) 2275–2314; (b) M.A. Iglesias-Arteaga, J.W. Morzycki, Cephalostatins and ritterazines, in: H.J. Knölker (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Elsevier, Amsterdam, 2013, pp. 153–279; (c) G.R. Pettit, Y. Kamano, C. Dufresne, M. Inoue, N.D. Christie, J.M. Schmidt, D.L. Doubek, Isolation and structure of the unusual Indian Ocean Cephalodiscusgilchristi components, cephalostatins 5 and 6, *Can. J. Chem.* 67 (1989) 1509–1513.
- [6] (a) J.F.S. Carvalho, M.M. Cruz-Silva, J.N. Moreira, S. Simões, M.L. Sá e Melo, Sterols as Anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 7632–7638; (b) J.A.R. Salvador, J.F.S. Carvalho, M.A.C. Neves, S.M. Silvestre, A.J. Leitao, M.C.M. Silva, M.L. Sá e Melo, Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds, *Nat. Prod. Rep.* 30 (2013) 324–374.
- [7] (a) L. Sánchez-Sánchez, M.G. Hernández-Linares, M.L. Escobar, H. López-Muñoz, E. Zenteno, M.A. Fernández-Herrera, G. Guerrero-Luna, A. Carrasco-Carballo, J. Sandoval-Ramírez, Antiproliferative, cytotoxic, and apoptotic activity of steroidal oximes in cerviouterine cell lines, *Molecules* 21 (2016) 1533–1549; (b) J.O.H. Pérez-Díaz, L. Rárová, J.P. Muñoz-Ocampo, N.E. Magaña-Vergara, N. Farfán, M. Strnad, R. Santillan, Synthesis and biological activity of 23-ethylidene-26-hydroxy-22-oxocholestane derivatives from spirostanic saponins, *Eur. J. Med. Chem.* 51 (2012) 67–78.
- [8] (a) C. Guo, T.G. LaCour, P.L. Fuchs, On the relationship of OSW-1 to the cephalostatins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 419–424; (b) T.G. LaCour, Ph.D. Thesis, Purdue University, 2001.
- [9] (a) K.M. Ruiz-Pérez, M. Romero-Ávila, V. Tinajero-Delgado, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, BF3·Et2O-induced stereoselective aldol reaction with benzaldehyde, and steroid saponin and its application to a convenient synthesis of dinorcholanic lactones, *Steroids* 77 (2012) 819–828; (b) M.A. Ramos-Enríquez, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, An alternative reduction-course of the spiroketal side chain of steroid saponin induced by the presence of a 23E-benzylidene moiety, *Tetrahedron Lett.* 54 (2013) 4401–4405; (c) M.A. Ramos-Enríquez, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, An unexpected BF3·Et2O-catalyzed rearrangement of 23E-benzylidenespirostanes to spiro[furan-indenes], *Tetrahedron Lett.* 57 (2016) 2249–2252.



Synthesis of dimeric spirostanols linked through a 1,4-dimethylidenebenzene moiety by double BF₃·Et₂O-catalyzed aldol condensation of steroid sapogenins and terephthalaldehyde



Manuel A. Ramos-Enríquez^a, Lucie Rárová^b, Martín A. Iglesias-Arteaga^{a,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

^b Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Steroid sapogenins
BF₃·Et₂O catalyzed double aldol condensation
Dimeric 1,4-dimethylidenebenzene-linked spirostanols

ABSTRACT

BF₃·Et₂O-catalyzed double aldol condensation between acetylated steroid sapogenins and terephthalaldehyde led to acetylated dimeric spirostanols linked through a 1,4-dimethylidenebenzene moiety in moderate to good yields. The *E* configurations of the introduced double bonds were corroborated by NOE experiments. Saponification of the dimeric steroids led to the corresponding dimeric spirostanols.

1. Introduction

Spirostane sapogenins (SS) constitute an important family of naturally occurring steroids. Their utility as starting materials in the synthesis of bioactive steroids [1] as well as their intrinsic cytotoxicity against cancer cells [2] have kept this family of compounds in the center of the interest for more than 80 years. Since the synthesis of bioactive steroids starting from SS involves the cleavage or modification of the spiroketal side chain, the study of the reactivity of this fragment has received considerable attention [3].

In particular we have recently described that the BF₃·Et₂O-catalyzed aldol condensation between acetylated SS and benzaldehyde in CH₂Cl₂ produces good yields of 23*E*-benzylidenespirostanones [4]. Saponification of the acetate at position C-3 led to 23*E*-benzylidenespirostanols that showed cytotoxicity against different cancer cells (Scheme 1) [4b].

Steroid dimers have evolved from a few compounds that occurred as by-products of various reactions or were isolated from nature to a developing field in which the interesting chemical, biological and physical of the increasing number of members have fueled an intensive activity [5].

We have recently initiated a program on the synthesis of different classes of steroid dimers with the aim to explore and develop new properties in both, solid state and solution [6]. As a part of this program we decided to explore the BF₃·Et₂O-catalyzed double aldol condensation between SS and terephthalaldehyde as a way to produce dimers in which two cores of SS are connected by an 1,4-dimethylidenebenzene

moiety attached to position C-23 of each steroid core. Here in we report on the synthesis and characterization of four dimeric steroids derived from different steroid sapogenins.

2. Results and discussion

Treatment of solutions the acetylated steroid sapogenin **1a–d** and terephthalaldehyde in CH₂Cl₂, with BF₃·Et₂O afforded moderate to good yields of the corresponding dimeric steroids **3a–d**. The reaction mechanism is assumed to be the same described for the synthesis of 23*E*-benzylidenespirostanones [3a]. The *E*-configurations of the introduced double bonds were corroborated by the observed H-20 ↔ H-28 and H-20' ↔ H-28' NOE. Saponification of the obtained dimers with NaOCH₃ in methanol afforded the corresponding alcohols **4a–d** (Scheme 2).

Having in mind our precedent work in which we described the cytotoxicity of 23*E*-benzylidenespirostanols (**2a–d**) (Scheme 1) [4b] we decided to assess the cytotoxicity of the obtained dimeric steroids **4a–d** against the same panel of cancer cells. All attempts at dissolving the compounds in the solvents usually employed for such biological tests (EtOH, DMF, DMSO) were unsuccessful. The formation of gels or rapid precipitation of the dimeric steroids observed even in highly diluted solutions did not allow the desired evaluation

3. Conclusions

BF₃·Et₂O catalyzed double aldol condensation of acetylated steroid

* Corresponding author.

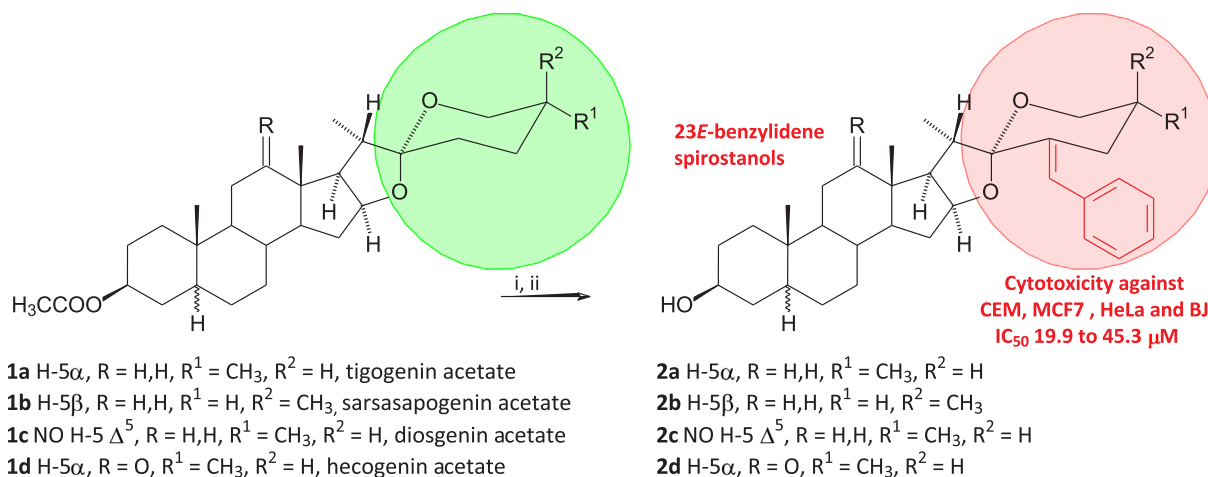
E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.08.005>

Received 16 June 2018; Received in revised form 26 July 2018; Accepted 14 August 2018

Available online 25 August 2018

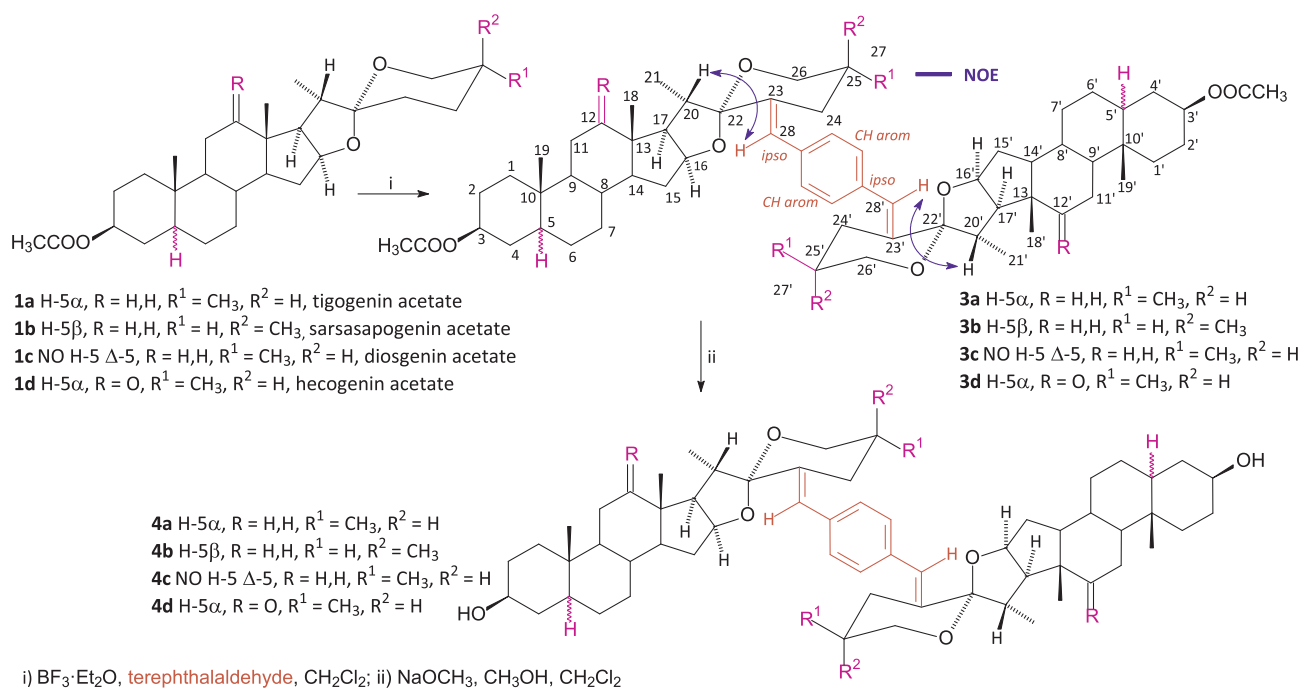
0039-128X/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.



i) Benzaldehyde, BF₃•Et₂O, CH₂Cl₂; iii) KOH, CH₃OH

Scheme 1. Synthesis of cytotoxic 23E-benzylidenespirostanols (6a-d)

Scheme 1. Synthesis of cytotoxic 23E-benzylidenespirostanols (6a-d).



Scheme 2. Synthesis of dimeric steroids.

sapogenins and terephthalaldehyde produced moderate to good yields acetylated dimeric spirostanols linked through an 1,4-dimethylidenebenzene moiety that were converted to the corresponding dimeric spirostanols by saponification. The obtained compounds show extremely poor solubility that does not allow the evaluation of their biological activity.

4. Experimental

Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM® SIL G/UV254 plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vanillin in 50% HClO₄ and heated until color developed. Melting points were measured on a Melt-Temp II instrument. Due to drastic differences in solubility, minor variations of the general synthetic procedures were needed and are described for some

compounds. NMR spectra were recorded in CDCl₃ on a Varian INOVA 400 spectrometer using the solvent signals as reference. NMR signal assignments were carried out with the aid of a combination of 1D and 2D NMR techniques that included ¹H, ¹³C, COSY, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC). HRMS spectra Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) were recorded in a Perkin-Elmer DSA-AxiON-2-TOF-MS spectrometer.

4.1. General procedure to the synthesis of symmetric dimers

BF₃•Et₂O (12 mL) was added to a solution of the acetylated sapogenin (2 mmol) and terephthalaldehyde (134.1 mg, 1 mmol) in CH₂Cl₂ (60 mL), and the mixture was stirred at room temperature until the

starting material was consumed (TLC). The reaction mixture was carefully poured into ice and extracted with ethyl acetate (180 mL). The organic layer was washed with water (8 × 70 mL) and saturated solution of NaCl (1 × 70 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained oily mixture was purified in a chromatographic column packed with silica gel to afford the desired dimer.

4.1.1. Dimer 3a (from tigogenin acetate)

Reaction time 4 h; purified in a chromatographic column packed with silica gel (30 g) employing hexane/ethyl acetate, 10/1 mixture as eluent. Yield: 841.6 mg (82.9%). Mp. 286.6–289.4 °C (from hexane/ethyl acetate). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.20 (s, 4H, H-phenyl), 6.54 (d, J = 1.9 Hz, 2H, H-28, H-28'), 4.68 (tt, J = 10.9, 4.8 Hz, 2H, H-3, H-3'), 4.43 (dt, J = 9.1, 7.1 Hz, 2H, H-16, H-16'), 3.56 (m, 4H H-26, H-26'), 2.82 (dd, J = 13.3, 3.7 Hz, 2H, H-24 eq.), 2.58 (p, J = 6.2 Hz, 2H), 2.11 (dd, J = 12.5, 12.5 Hz, 2H, H-24 ax.), 1.09 (d, J = 6.8 Hz, 6H, H-21, H-21'), 0.84 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.82 (s, 6H-18, H-18'), 0.80 (d, J = 6.7 Hz, 6H, H-27, H-27'), 0.68 (m, 2H, H-9, H-9'). ¹³C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 36.7 C-1 C-1', 27.4 C-2 C-2', 73.6 C-3 C-3', 34.0 C-4 C-4', 44.6 C-5 C-5', 28.5 C-6 C-6', 32.2 C-7 C-7', 35.0 C-8 C-8', 54.2 C-9 C-9', 35.6 C-10 C-10', 21.0 C-11 C-11', 40.2 C-12 C-12', 40.8 C-13 C-13', 56.2 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 80.4 C-16 C-16', 61.6 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 12.3 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.8 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 33.0 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.0 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 2 × ipso, 128.9 4 × ortho, 21.4 2 × CH₃ acetyl, 170.7 2 × C=O acetyl. HRMS (APCI) Observed 1015.7539 C₆₆H₉₅O₈ (MH⁺) requires 1015.7027.

4.1.2. Dimer 3b (from sarsapogenin acetate)

Reaction time 2 h; Workup 100 mL of CH₂Cl₂ were employed for extraction instead of ethyl acetate; purified in a chromatographic column packed with silica gel (30 g) employing hexane/acetone, 10/1 mixture as eluent until the less polar impurities were removed and then changed to CH₂Cl₂/ethyl acetate, 20/1. Yield: 702.1 mg (69%). Mp. 281.3 – 282.2 °C (from hexane/ethyl acetate). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.19 (s, 4H, H-phenyl), 6.69 (s, 2H, H-28 H-28'), 5.07 (m, 2H, H-5 H-5'), 4.46 (dt, J = 8.6, 6.9 Hz, 2H, H-16 H-16'), 4.04 (dd, J = 11.0, 4.2 Hz, 2H, H-26' ax. H-26 ax.), 3.31 (dt, J = 10.9, 1.8 Hz, 2H, H-26 H-26' eq.), 2.73 (ddd, J = 13.8, 5.6, 1.6 Hz, 2H, H-24 H-24' eq.), 2.48 (p, J = 6.9 Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.31 (dd, J = 13.7, 5.3 Hz, 2H, H-24 ax. H-24' ax.), 2.04 (s, 6H, 2 × CH₃ acetyl), 1.10 (d, J = 6.9 Hz, 6H H-27 H-27'), 0.99 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.99 (d, J = 7.0 Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.84 (s, 6H, H-18 H-18'). ¹³C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 30.6 C-1 C-1', 25.0 C-2 C-2', 70.7 C-3 C-3', 31.6 C-4 C-4', 37.3 C-5 C-5', 26.4 C-6 C-6', 26.4 C-7 C-7', 35.2 C-8 C-8', 40.0 C-9 C-9', 35.0 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 40.4 C-12 C-12', 40.9 C-13 C-13', 56.3 C-14 C-14', 30.7 C-15 C-15', 81.1 C-16 C-16', 61.8 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 23.8 C-19 C-19', 39.8 C-20 C-20', 18.3 C-21 C-21', 111.4 C-22 C-22', 136.8 C-23 C-23', 30.9 C-24 C-24', 30.3 C-25 C-25', 65.1 C-26 C-26', 14.7 C-27 C-27', 124.8 C-28 C-28', 135.4 2 × ipso, 128.8 4 × ortho, 21.5 2 × CH₃ acetyl, 170.7 2 × C=O acetyl.

4.1.3. Dimer 3c (from diosgenin acetate)

Reaction carried out with 3 mmol of diosgenin acetate and 1.5 of terephthalaldehyde; reaction time 4 h; purified in a chromatographic column packed with silica gel (45 g) employing hexane/ethyl acetate, 10/1 mixture as eluent. Yield: 991.6 mg (65%). Mp. 297.4–298.2 °C (from hexane/ethyl acetate). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.20 (s, 4H, H-phenyl), 6.55 (d, J = 1.7 Hz, 2H, H-28 H-28'), 5.37 (dd, J = 4.6, 2.7 Hz, 2H, H-6 H-6'), 4.60 (qd, J = 10.7, 5.2 Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.45 (dt, J = 8.9, 7.1 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.55 (m, 4H, H-26 H-26'), 2.82 (dd, J = 13.3, 3.9 Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.59 (p, J = 6.9 Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.12 (ddd, J = 13.4, 11.6, 1.9 Hz, 2H, H-24 H-24' eq.), 2.02 (s, 6H 2 × CH₃ acetyl), 1.10 (d, J = 6.9 Hz, 6H, H-21 H-21'), 1.04 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.98 (dd, J = 11.1, 5.4 Hz, 1H, H-9 H-9'), 0.85 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.81 (d, J = 6.6 Hz, 6H, H-27 H-27') ¹³C NMR (100.53

MHZ) δ ppm: 36.9 C-1 C-1', 27.7 C-2 C-2', 73.9 C-3 C-3', 38.1 C-4 C-4', 139.7 C-5 C-5', 122.3 C-6 C-6', 32.0 C-7 C-7', 31.3 C-8 C-8', 49.9 C-9 C-9', 36.7 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 39.9 C-12 C-12', 40.5 C-13 C-13', 56.4 C-14 C-14', 31.7 C-15 C-15', 80.4 C-16 C-16', 61.5 C-17 C-17', 16.5 C-18 C-18', 19.3 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.8 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 32.9 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.0 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 2 × ipso, 128.9 4 × ortho, 21.4 2 × CH₃ acetyl, 170.5 2 × C=O acetyl.

4.1.4. Dimer 3d (from hecogenin acetate)

Reaction time 4 h; purified in a chromatographic column packed with silica gel (30 g) employing hexane/ethyl acetate, 5/1 mixture as eluent. Yield: 532.1 mg (52%). Mp. 287.6–289.1 °C (from hexane/ethyl acetate). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.18 (s, 4H H-phenyl), 6.50 (d, J = 1.7 Hz, 2H, H-28 H-28'), 4.66 (tt, J = 10.9, 4.9 Hz, 2H, H-3 H-3'), 4.37 (dt, J = 8.9, 6.5 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.54 (m, 4H, H-26 H-26'), 2.81 (m, 2H, H-24 H-24' ax:), 2.65 (dd, J = 9.0, 7.0 Hz, 2H, H-17 H-17'), 2.44 (m, 2H, H-20 H-20'), 2.39 (m, H-11 H-11' eq.) 2.24 (dd, J = 14.4, 5.0 Hz, 2H, H-11 H-11' ax.), 2.00 (s, 6H, 2 × CH₃ acetyl) 1.18 (d, J = 6.8 Hz, 6H, H-21 H-21'), 1.09 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.91 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.79 (d, J = 6.5 Hz, 6H, H-27 H-27'). ¹³C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 36.0 C-1 C-1', 27.2 C-2 C-2', 73.1 C-3 C-3', 33.7 C-4 C-4', 44.4 C-5 C-5', 28.1 C-6 C-6', 31.4 C-7 C-7', 34.2 C-8 C-8', 55.3 C-9 C-9', 36.2 C-10 C-10', 37.7 C-11 C-11', 213.2 C-12 C-12', 55.3 C-13 C-13', 55.5 C-14 C-14', 31.0 C-15 C-15', 78.8 C-16 C-16', 52.9 C-17 C-17', 16.1 C-18 C-18', 11.8 C-19 C-19', 37.8 C-20 C-20', 13.6 C-21 C-21', 110.5 C-22 C-22', 137.1 C-23 C-23', 33.0 C-24 C-24', 33.0 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.3 2 × ipso, 128.9 4 × ortho, 21.3 2 × CH₃ acetyl, 170.5 2 × C=O acetyl.

4.2. General procedure to the saponification of symmetric dimers

NaOCH₃ (54 mg, 1 mmol, 5 eq.) was added to a solution of the symmetric dimer (0.1 mmol) in CH₂Cl₂ (9 mL) and methanol (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature until the starting material was consumed (TLC, hexane/ethyl acetate, 1/1). The volatile solvent was evaporated under reduced pressure and the solid residue was washed with water and dried in the filter to afford the desired compound.

4.2.1. Dimer 4a

Reaction time: 3.5 h; Yield: 93.3 mg (100%). Mp. 272.5–274.3 °C (amorphous solid, from CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.20 (s, 4H, H-phenyl), 6.55 (d, J = 1.8 Hz, 2H, H-28 H-28'), 4.43 (dt, J = 9.0, 7.1 Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.57 (m, 6H, H-3 H-3' and H-26 H-26'), 2.82 (dd, J = 13.5, 4.5 Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.58 (p, J = 6.9 Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.12 (ddd, J = 13.4, 11.6, 1.8 Hz, 2H, H-24 H-24' eq.), 2.00 (ddd, J = 12.2, 7.5, 5.2 Hz, 2H H-15, H-15'), 1.89 (dd, J = 8.9, 7.0 Hz, 2H, H-17 H-17'), 1.09 (d, J = 6.8 Hz, 6H, H-21 H-21'), 0.82 (s, 12H, H-18 H-18' and H-19 H-19'), 0.81 (d, J = 6.8 Hz, 6H, H-27 H-27'), 0.66 (td, J = 11.1, 10.4, 4.0 Hz, 2H, H-9 H-9'). ¹³C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 36.9 C-1 C-1', 31.5 C-2 C-2', 71.2 C-3 C-3', 38.2 C-4 C-4', 44.8 C-5 C-5', 28.6 C-6 C-6', 32.3 C-7 C-7', 35.0 C-8 C-8', 54.4 C-9 C-9', 35.6 C-10 C-10', 21.1 C-11 C-11', 40.3 C-12 C-12', 40.8 C-13 C-13', 56.3 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 80.5 C-16 C-16', 61.6 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 12.4 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.9 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 32.9 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 2 × ipso, 128.9 4 × ortho.

4.2.2. Dimer 4b

10 eq. of NaOCH₃ were used. Reaction time: 65 h; Yield: 83.0 mg (89.2%). Mp. 334.1–336.2 °C (amorphous solid, from CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.20 (s, 4H, H phenyl), 6.69 (s, 2H, H-28 H-28'), 4.46 (q, J = 7.7 Hz, 2H, H-16 H-16'), 4.11 (s, 2H, H-3 H-3'), 4.05 (dd, J = 11.2, 4.2 Hz, 2H, H-26 H-26' eq.), 3.32 (d, J = 11.0 Hz, 2H H-26 H-26' ax.), 2.74 (dd, J = 13.9, 5.6 Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.48 (p,

$J = 7.0$ Hz, 2H, H-20 H-20'), 2.31 (dd, $J = 13.8, 5.3$ Hz, 2H, H-24 H-24 eq.), 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-27 H-27'), 0.99 (m, H-19 H-19' and H-21 H-21'), 0.85 (s, 6H). ^{13}C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 29.9 C-1 C-1', 27.8 C-2 C-2', 67.1 C-3 C-3', 33.5 C-4 C-4', 36.5 C-5 C-5', 26.6 C-6 C-6', 26.6 C-7 C-7', 35.2 C-8 C-8', 39.9 C-9 C-9', 35.2 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 40.5 C-12 C-12', 41.0 C-13 C-13', 56.5 C-14 C-14', 31.6 C-15 C-15', 81.1 C-16 C-16', 61.8 C-17 C-17', 16.7 C-18 C-18', 23.9 C-19 C-19', 39.8 C-20 C-20', 18.4 C-21 C-21', 111.5 C-22 C-22', 136.8 C-23 C-23', 31.0 C-24 C-24', 30.3 C-25 C-25', 65.1 C-26 C-26', 14.7 C-27 C-27', 124.8 C-28 C-28', 135.5 $2 \times$ ipso, 128.8 $4 \times$ ortho.

4.2.3. Dimer 4c

Reaction time: 4.5 h; Yield: 85.0 mg (92%). Mp. 298.9 – 302.6 °C (amorphous solid, from CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.21 (s, 4H, H phenyl), 6.56 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H-28 H-28'), 5.35 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H-6 H-6'), 4.45 (dt, $J = 8.9, 7.1$ Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.54 (m, 6H, H-3 H-3' and, H-26 H-26' ax., H-26 H-26' eq.), 2.86 – 2.77 (m, 2H), 2.60 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-20 H-20'), 1.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-21 H-21'), 1.03 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.86 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-27 H-27'). ^{13}C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 37.2 C-1 C-1', 31.6 C-2 C-2', 71.7 C-3 C-3', 42.3 C-4 C-4', 140.8 C-5 C-5', 121.3 C-6 C-6', 32.1 C-7 C-7', 31.4 C-8 C-8', 50.1 C-9 C-9', 36.7 C-10 C-10', 20.9 C-11 C-11', 40.0 C-12 C-12', 40.5 C-13 C-13', 56.5 C-14 C-14', 31.7 C-15 C-15', 80.4 C-16 C-16', 61.5 C-17 C-17', 16.5 C-18 C-18', 19.4 C-19 C-19', 37.3 C-20 C-20', 14.8 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.2 C-23 C-23', 33.0 C-24 C-24', 33.1 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.6 C-28 C-28', 135.4 $2 \times$ ipso, 128.9 $4 \times$ ortho.

4.2.4. Dimer 4d

Reaction time: 3 h; Yield: 89.7 mg (94%). Mp. 279.8 – 281.1 °C (amorphous solid, from CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.19 (s, 4H, H phenyl), 6.52 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H-28 H-28'), 4.38 (dt, $J = 8.8, 6.7$ Hz, 2H, H-16 H-16'), 3.61 (dt, $J = 10.4, 4.9$ Hz, 2H, H-3 H-3'), 3.56 (m, 4H, H-26 H-26 eq and H-26 H-26' ax.), 2.82 (dd, $J = 13.3, 4.3$ Hz, 2H, H-24 H-24' ax.), 2.66 (dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 2H, H-17 H-17'), 2.45 (m, 4H, H-20 H-20'), 2.25 (dd, $J = 14.4, 5.0$ Hz, 2H, H-11 H-11' ax.), 1.19 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-21 H-21'), 1.10 (s, 6H, H-18 H-18'), 0.91 (s, 6H, H-19 H-19'), 0.80 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-27 H-27'). ^{13}C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 36.5 C-1 C-1', 31.2 C-2 C-2', 70.9 C-3 C-3', 37.9 C-4 C-4', 44.6 C-5 C-5', 28.3 C-6 C-6', 31.6 C-7 C-7', 34.3 C-8 C-8', 55.7 C-9 C-9', 36.1 C-10 C-10', 37.8 C-11 C-11', 213.5 C-12 C-12', 55.3 C-13 C-13', 55.5 C-14 C-14', 31.0 C-15 C-15', 78.8 C-16 C-16', 52.9 C-17 C-17', 16.2 C-18 C-18', 12.0 C-19 C-19', 37.8 C-20 C-20', 13.6 C-21 C-21', 110.6 C-22 C-22', 137.1 C-23 C-23', 32.9 C-24 C-24', 33.0 C-25 C-25', 66.1 C-26 C-26', 17.2 C-27 C-27', 122.7 C-28 C-28', 135.3 $2 \times$ ipso, 128.9 $4 \times$ ortho.

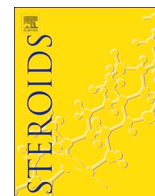
Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (Project

DGAPA- IN212417), the Faculty of Chemistry-UNAM (PAIP-5000-9063). Thanks are due to CONACyT-México for the scholarship granted to M.A.R.-E.

References

- [1] D. Lednicer, *Strategies for organic drug synthesis*, second ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009, Chapters 4 and 5, and references therein.
- [2] (a) E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, O. Tagliatalata-Scafati, Sapogenins of *Allium porrum* L, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4904–4908; (b) A. Carotenuto, E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, V. De Feo, R. Carnuccio, F. D'Acquisto, Porrigenins A and B, Novel Cytotoxic and Antiproliferative Sapogenins Isolated from *Allium porrum*, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 1003–1007; (c) A. Carotenuto, E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, R. Carnuccio, F. D'Acquisto, 12-Keto-porrigenin and the unique 2,3-seco-porrigenin, new antiproliferative sapogenins from *Allium porrum*, *Tetrahedron* 53 (1997) 3401–3406.
- [3] (a) For review see, I. Jastrzębska, *Chemistry of Steroidal Sapogenins – new advances in a classical field*, *Curr. Org. Chem.* 16 (2012) 353–372 Selected references; (b) T.G. LaCour, Z. Tong, P.L. Fuchs, *Consequences of Acid Catalysis in Concurrent Ring Opening and Halogenation of Spiroketal*, *Org. Lett.* 1 (1999) 1815–1818; (c) J. Sandoval-Ramírez, S. Meza-Reyes, R.E. del Río, G. Hernandez-Linares, A. Suárez-Rojas, S. Rincón, N. Farfán, R.L. Santillán, Regioselective cleavage of rings E and F in sarsasapogenin, *Steroids* 68 (2003) 199–204; (d) I. Jastrzębska, J.W. Morzycki, U. Trochimowicz, Lead tetraacetate-iodine oxidation of 23-spirostanols, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 1929–1932; (e) I. Jastrzębska, J.W. Morzycki, Unusual Baeyer-Villiger Oxidation of 23-Oxosarsasapogenin Acetate, *Polish J. Chem.* 79 (2005) 1245–1248; (f) M.A. Iglesias-Arteaga, R.O. Arcos-Ramos, One-step axial acetoxylation at C-23. A new method for the functionalization of the side chain of steroid sapogenins, *Tetrahedron Lett.* 47 (2006) 8029–8031; (g) M.A. Iglesias-Arteaga, R.O. Arcos-Ramos, J.M. Mendez-Stivalet, The unexpected course of the reaction of steroid sapogenins with diacetoxyiodobenzene and BF₃·Et₂O in formic acid, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 7485–7488; (h) M.A. Ramos-Enríguez, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis of novel steroids bearing a spirochromene side chain by BF₃·Et₂O catalyzed aldol condensation of spirostane sapogenins and salicylaldehyde, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 3325–3327; (i) M.A. Ramos-Enríguez, M. Flores-Alamo, M.A. Iglesias-Arteaga, An unexpected BF₃·Et₂O-catalyzed rearrangement of 23E-benzylidenespirostanols to spiro[furan-indenes], *Tetrahedron Lett.* 57 (2016) 2249–2252; (j) K. Vargas-Romero, O. Alberto, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, *Steroids* 128 (2017) 1–5.
- [4] (a) K.M. Ruíz-Pérez, M. Romero-Ávila, V. Tinajero-Delgado, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, BF₃·Et₂O-induced stereoselective aldol reaction with benzaldehyde, and steroid sapogenins and its application to a convenient synthesis of dinorcholanic lactones, *Steroids* 77 (2012) 819–828; (b) M.A. Ramos-Enríguez, K. Vargas-Romero, L. Rárová, M. Strnad, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and in vitro anticancer activity of 23(23) E-benzylidenespirostanols derived from steroid sapogenins, *Steroids* 128 (2017) 85–88.
- [5] L. Nahar, S.D. Sarker, *Steroid Dimers. Chemistry and Applications in Drug Design and Delivery*, first ed., John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 2012.
- [6] (a) C. Alarcón-Manjarrez, R. Arcos-Ramos, M. Flores Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis, NMR and crystal characterization of dimeric terephthalates derived from epimeric 4,5-seco-cholest-3-yn-5-ols, *Steroids* 106 (2016) 66–72; (b) M.A. Ramos-Enríguez, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis of novel hybrid steroid dimers by BF₃·Et₂O-catalyzed aldol condensation of 2-formyl-estradiol diacetate and steroid sapogenins, *Steroids* 128 (2017) 46–49; (c) R.M. Valdez-García, C. Alarcón-Manjarrez, R. Arcos-Ramos, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and characterization of dimeric steroids based on 5-oxo-4,5-seco-yne units linked by a diyne spacer, *Arkivoc vi* (2018) 13–22; (d) M.C. Mayorquín-Torres, A. Colin-Molina, S. Pérez-Estrada, A. Galano, B. Rodríguez-Molina, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis, characterization, and solid state dynamic studies of a hydrogen bond-hindered steroidal molecular rotor with a flexible axis, *J. Org. Chem* 83 (2018) 3768–3779.



Studies on the reactivity of 23E-benzylidene spirostanes

Manuel A. Ramos-Enríquez, Marcos Flores-Álamo, Martín A. Iglesias-Arteaga*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Benzylidene spirostanes
Catalytic hydrogenation
Epoxidation
Acid catalyzed rearrangements
NMR
X-ray Diffraction

ABSTRACT

A study of the reactivity of 25R and 25S 23E-benzylidene spirostanes that includes epoxidation, catalytic hydrogenation as well as Lewis or Brønsted acid-catalyzed rearrangements is described. Exhaustive NMR characterization of the obtained compounds is presented. Additionally the structures of some of the obtained compounds were confirmed by single crystal X-Ray Diffraction studies.

1. Introduction

Steroid saponogenins (SS) occupy a paramount place in the production of a wide variety of bioactive steroids as sexual and adrenocortical hormones [1], plant growth promoting substances [2], radical scavengers [3] and the highly cytotoxic hippuristanols [4], cephalostatins and ritterazines [5], amongst many others [6].

In general, the synthesis of such bioactive compounds starting from SS involves the modification or degradation of the spirostane side chain. Consequently, the development of new methods for the transformation of this fragment has received considerable attention [7].

In particular, we have recently reported that treatment of steroid saponogenins with benzaldehyde and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in CH_2Cl_2 leads to 23E-benzylidenespirostanes in good yields [7g]. Further studies revealed that 23E-benzylidene spirostanes **3a/b** show a reactivity profile that drastically differs from that of the parent spirostanes **1a/b**. While oxidation with CrO_3 in acetic acid led to dinorcholanic lactones **4a/b** [7g], reduction with NaBH_3CN followed an unexpected course that led to the benzyl spirostanes **6a/b** and the benzylfurostane **7a** in addition to the expected 23E-benzylidene furostanes **5a/b** [7h]. On the other hand treatment with $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in $\text{AcOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ produced low yields of the novel spiro[*furan*]indene **8a** [7j] (Scheme 1).

In addition, saponification of the acetate at position C-3 led to spirostanols that showed significant cytotoxicity against several cancer cells [8].

This prompted us to further explore the reactivity profile of this family of compounds in search of new derivatives that may show biological activity or be useful as starting materials for the synthesis of more complex bioactive steroids. Herein we report on the synthesis and

characterization of different highly functionalized steroids derived from 25R and 25S 23E-benzylidene spirostanes. Exhaustive NMR characterization of the obtained compounds is presented. Additionally, some of the obtained structures were confirmed with the aid of single crystal X-Ray Diffraction studies.

2. Results and discussion

2.1. Hydrogenation experiments

Catalytic hydrogenation of **3a** on Pd/C produced 98% of the single compound (**6a**) with an equatorial benzyl group attached C-23. Similar treatment of **3b** afforded 89% of a mixture of compounds that after separation were identified as **6b** bearing the benzyl group at C-23 in equatorial and its axial partner **9b** (Scheme 2).

The observed NOE effects allowed the determination of the configuration at C-23 in each compound (Scheme 2). Tables 1 and 2 show the ^1H and ^{13}C signals corresponding to the side chains of compounds **6a**, **6b** and **9b**. Single crystal X-ray Diffraction corroborated the proposed structures for compounds **6a**, **6b** and **9b** (Fig. 1, for discussion on X-ray Diffraction see Supporting Information).

The high diastereoselectivity observed in the hydrogenation of the 25R benzylidene spirostane **3a** can be attributed to the presence of the axial O-16 attached to C-22 that hinder the hydrogenation from the α -side, leaving hydrogenation from the β -side as the favored pathway. On the contrary, in the 25S series the axial O-16 attached to C-22 and the axial methyl group attached to C-25 hinders both α and β -sides and justifies the lack of diastereoselectivity.

* Corresponding author.

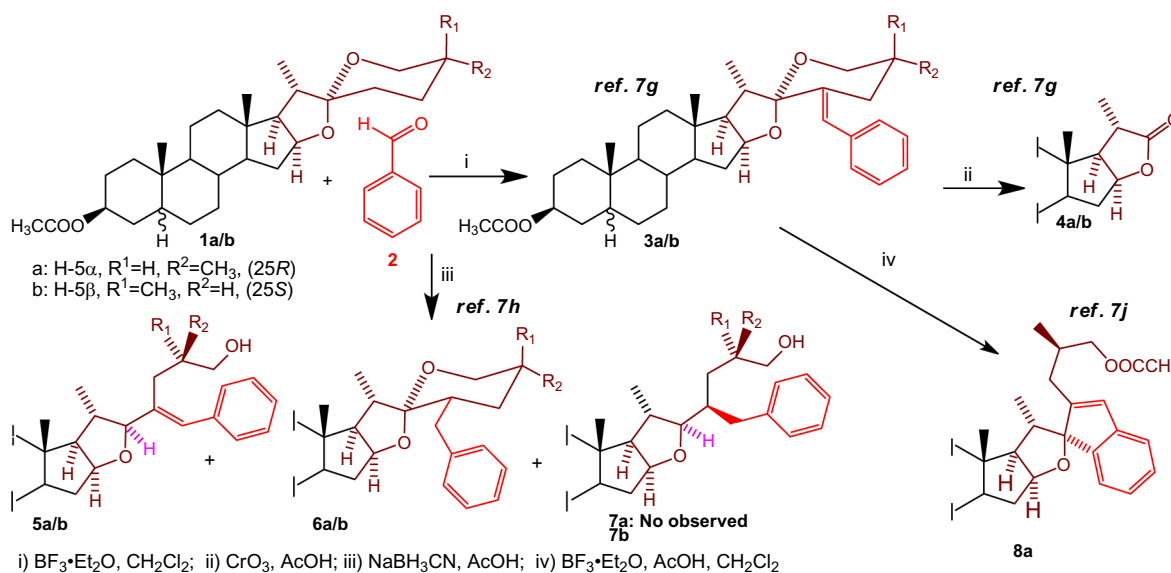
E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108462>

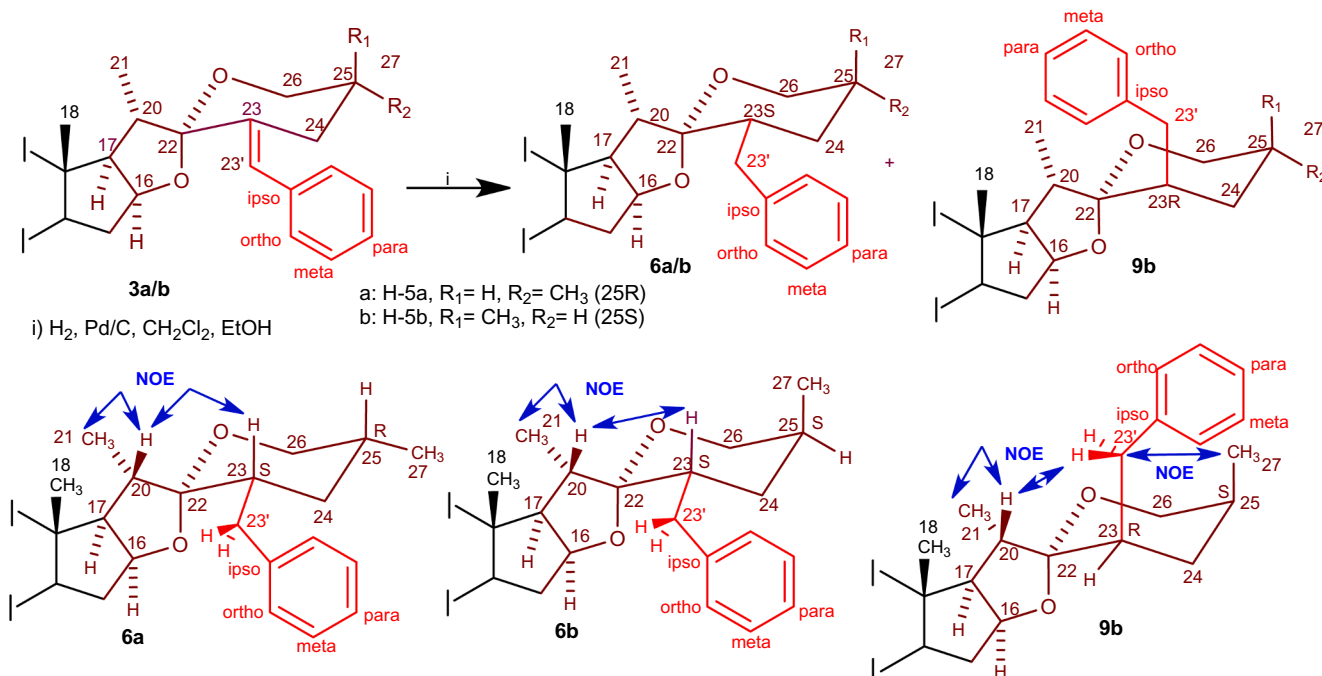
Received 29 May 2019; Received in revised form 8 July 2019; Accepted 16 July 2019

Available online 22 July 2019

0039-128X/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.



Scheme 1. Some reactions of 23E-benzylidene spirostanes.



Scheme 2. Results of the catalytic hydrogenation of 23E-benzylidene spirostanes.

2.2. Epoxidation experiments

Treatment of **3a** with *m*-CPBA in CH $_2$ Cl $_2$ for 24 h afforded 44% of a mixture of two compounds that after separation were identified as the diastereomeric epoxides **10a** and **11a**. Similar treatment of **3b** afforded 39% of the single epoxide **10b** in an extremely slow reaction (96 h). Extensive decomposition to mixtures of several minor unidentified compounds was observed in both reactions. The observed NOE effects allowed the determination of the orientation of the oxirane ring in each compound (Scheme 3). Tables 3 and 4 show the 1 H and 13 C signals corresponding to the side chains of the epoxides **10a**, **10b** and **11a**. Single crystal X-ray Diffraction confirmed the proposed structures for compounds **10a**, and **10b** (Fig. 2, for discussion on X-ray Diffraction see Supporting Information)

The observed reversed diastereoselectivity compared to that of the

hydrogenation can be explained as follows. While in the 25R series, coordination of *m*-CPBA to both O-16 and O-26 may direct the epoxidation to the α - and β -sides and justifies the lack of diastereoselectivity; in the 25S series the axial methyl group attached to C-25 hinders the coordination to O-26 leaving epoxidation through the α -side as the favored pathway.

3. Acid catalyzed rearrangements of 23E-benzylidene spirostanes

As previously described, treatment of tigogenin acetate (**1a**) with benzaldehyde and BF $_3$ ·Et $_2$ O in 2/1 acetic acid/CH $_2$ Cl $_2$ mixture or rearrangement of the 23E-benzylidene spirostane **3a** with BF $_3$ ·Et $_2$ O in 2/1 acetic acid/CH $_2$ Cl $_2$ afforded low yields of the spiro[furan]indene **8a** (Scheme 1) [7j]. This prompted us to find better conditions for the synthesis of this interesting new family of steroids.

Table 1
¹H NMR signals of the side chains of compounds **6a**, **6b** and **9**.

H	3a	6a	Δ _{86a-83a}	3b	6b	Δ _{86b-83b}	9b	Δ _{89b-83b}
H-16α	4.44	4.41	-0.03	4.47	4.43	-0.04	4.42	-0.05
H-18	0.83	0.81	-0.02	0.85	0.80	-0.05	0.73	-0.12
H-20	2.59	2.39	-0.20	2.50	2.33	-0.17	2.22	-0.28
H-21	1.10	1.11	0.01	1.11	1.03	-0.08	1.09	-0.02
H-23	-	1.89	-	-	2.12	-	2.02	-
H-23'a	6.57	2.97	-3.60	6.72	2.97	-3.75	2.97	-3.75
H-23'b	-	2.31	-4.26	-	2.33	-4.39	2.41	-4.31
H-26 ax.	3.55	3.30	-0.25	4.05	3.88	-0.17	3.86	-0.19
H-26 eq.	3.55	3.43	-0.12	3.32	3.26	-0.06	3.25	-0.07
H-27	0.80	0.71	-0.09	0.99	0.97	-0.02	0.92	-0.07
ortho	7.23	7.28	0.05	7.21	7.27	0.06	7.12	-0.09
meta	7.34	7.24	-0.10	7.32	7.13	-0.19	7.23	-0.09
para	7.23	7.24	0.01	7.21	7.18	-0.03	7.12	-0.09

The signals of the starting materials **3a** and **3b** are included for comparison purposes.

Table 2
¹³C NMR signals of the side chains of compounds **6a**, **6b** and **9**.

C	3a	6a	Δ _{86a-83a}	3b	6b	Δ _{86b-83b}	9b	Δ _{89b-83b}
16	80.4	80.8	+0.4	81.0	81.0	0.0	80.4	-0.6
17	61.6	61.6	0.0	61.8	61.5	-0.3	63.3	+1.5
18	16.7	16.7	0.0	16.7	16.7	0.0	16.5	-0.2
20	37.3	36.9	-0.4	39.8	37.3	-2.5	38.3	-1.5
21	14.8	14.4	-0.4	14.7	14.2	-0.5	16.5	+1.8
22	110.5	111.2	+0.7	111.4	111.8	+0.4	112.3	+0.9
23	137.1	40.3	-96.8	136.8	34.6	-102.2	42.4	-94.4
23'	122.8	37.2	-85.6	122.8	37.1	-85.7	37.7	-85.1
24	32.9	34.3	+1.4	30.9	31.8	+0.9	30.0	-0.9
25	33.1	30.7	-2.4	30.3	28.0	-2.3	28.5	-1.8
26	66.1	66.0	-0.1	65.1	64.3	-0.8	65.8	+0.7
27	17.2	16.9	-0.3	18.3	16.6	-1.7	20.3	+2.0
ipso	137.2	140.9	+3.7	137.2	140.9	+3.7	140.9	+3.7
ortho	129.1	129.1	0.0	129.1	129.0	-0.1	129.1	+0.0
meta	128.1	128.2	+0.1	128.0	128.2	+0.2	128.2	+0.2
para	126.5	125.8	-0.7	126.5	125.7	-0.8	125.8	-0.7

The signals of the starting materials **3a** and **3b** are included for comparison purposes.

In a first attempt, treatment of 23E-benzylidene spirostane **3a** with acetic anhydride and BF₃·Et₂O in CH₂Cl₂ led to 87% of the benzylidene furostene **12a** instead of the expected spiro[*furan*]indene **8a**. Similar treatment of **3b** produced **12b** in 81%. NOE correlations allowed the corroboration that the *E* configuration of the benzylidene moiety remained unchanged (Scheme 4).

Tables 5 and 6 show the ¹H and ¹³C signals corresponding to the side chains of the 23E-benzylidene furostenes **12a** or **12b**.

In a rational mechanism, activation of acetic anhydride by BF₃·Et₂O produces the acetylation of the hydroxyl group at C-26, leading to F-ring opening to produce the carbocation **II** that rapidly undergoes loss of H-20 to afford the diene **12a** (Scheme 5). A similar reaction pathway can be proposed for the production of **12b**.

Interestingly the absence of a protic acid drives the reaction course to the dienes **12a** and **12b** rather than to the desired spiro[*furan*]indenes **8a** and **8b**. This led us to explore reaction conditions in the presence of protic acids.

Table 7 shows the results of the evaluation of different acid catalysts in protic acid media for the synthesis of **8a** (Scheme 6). Treatment with HClO₄/AcOH significantly increased the yields compared with those previously achieved employing BF₃·Et₂O/AcOH [7]. Nevertheless the reaction is extremely slow and the better yields were achieved after 16 days.

Similar results were obtained when the mixture of sarsapogenin acetate (**1b**)/benzaldehyde or the 23E-benzylidene spirostane **3b** were treated with BF₃·Et₂O/AcOH or HClO₄/AcOH (Scheme 7, Table 8).

Tables 9 and 10 show the ¹H and ¹³C signals corresponding to the side chains of the spiro[*furan*]indenes **8a** and **8b**.

In a reasonable mechanism, activation of acetic acid by BF₃·Et₂O or HClO₄ produces the acetylation of the hydroxyl group at C-26, leading to F-ring opening to produce the carbocation **II** as depicted in Scheme 5. Resonance **II** ↔ **IIa** weakens the double bond between C-23 and C-23' allowing rotation that places the phenyl ring near to the carbocation at C-22 (**IIc**). Internal S_EAr locks the indene moiety through the spiro carbon at C-22 (Scheme 8). A similar reaction pathway can be claimed for the production of **8b**.

In a control experiment in which the diene **12a** was treated with HClO₄/AcOH, TLC showed conversion of the starting material **12a** into a complex mixture in which the spiro[*furan*]indene **8a** was not detected. This suggests that production of the diene **12a** and its re-protonation to the intermediate **II** are not involved in the pathways to the spiro[*furan*]indenes.

The different courses of the acid catalyzed rearrangements of 23E-benzylidene spirostanes to the dienes **12a/12b** or the spiro[*furan*]indenes **8a/b** are then triggered by the presence or absence of a protic acid.

Production of the spiro[*furan*]indenes **8a** and **8b** directly from the corresponding steroid sapogenins **1a** and **1b** can be rationalized in terms of a tandem process that includes our previously reported aldol condensation of steroid sapogenins with benzaldehyde to produce 23E-benzylidenespirostanes (Scheme 1) [7g], followed by the described rearrangement in protic acid medium (Schemes 6 and 7).

4. Conclusions

The benzylidene moiety attached to C-23 confers to the spiroketal fragment a reactivity profile that drastically differs from that of the naturally occurring SS. Consequently, 23E-benzylidene spirostanes pave the way to the synthesis of highly functionalized steroid derivatives that are inaccessible from the naturally occurring SS.

Both epoxidation and catalytic hydrogenation of benzylidene spirostanes are strongly influenced by the configuration at C-25. While hydrogenation in the 25R series exclusively produced the equatorial 23S diastereomer, in the 25S series a mixture of both the equatorial and 23S and axial 23R diastereomers was produced. On the contrary, epoxidation showed a reversed diastereoselectivity producing a mixture of the α- and β-epoxides in the 25R series and exclusively the α-epoxide in the 25S series.

Acid catalyzed rearrangement of 23E-benzylidene spirostanes follows different courses when conducted in protic or aprotic acidic media. While treatment with Ac₂O/BF₃·Et₂O in aprotic media leads to the rearrangement to 23E-furostandienes (Scheme 4), the presence of a protic acid (HClO₄/AcOH or BF₃·Et₂O/AcOH) drives the reaction pathway to spiro[*furan*]indenes (Schemes 6 and 7).

5. Experimental

23E-Benzylidene spirostanes **3a** and **3b** were obtained as previously described.[7 g] Reactions were monitored by TLC on Alugram® SIL G/UV254 plates from Macherey-Nagel. Chromatographic plates were sprayed with a 0.7% solution of vanillin in 2% ethanolic H₂SO₄ and heated until color developed. Melting points were measured on a Melt-Temp II apparatus. NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions in a Varian INOVA 400 spectrometer using the solvent signals 7.26 ppm for ¹H and 77.00 ppm for ¹³C as references. All NMR spectra were recorded using the standard pulse sequences and parameters recommended by the manufacturer and were processed employing MestreNova [See <http://mestrelab.com/>]. (For copies of the ¹H and ¹³C NMR spectra see supporting information file). HRMS (APCI) spectra were registered on a PERKIN ELMER Model: AxION-2 TOF MS spectrometer. X-ray measurements were performed with an Oxford Diffraction Atlas (Gemini) diffractometer. CCDC 939,828 (**6a**), CCDC 939,829 (**6b**), CCDC

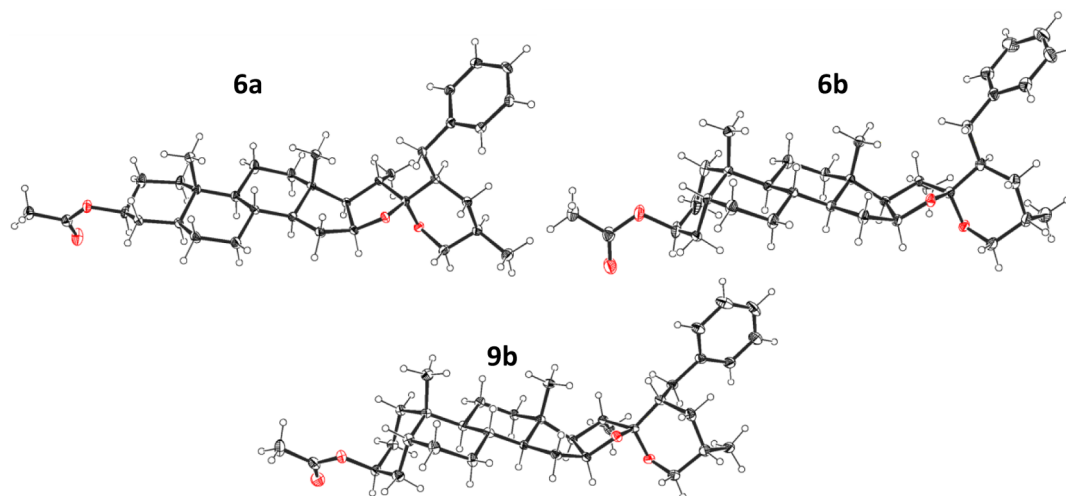


Fig. 1. Crystal structures of compounds **6a**, **6b** and **9b** with the thermal ellipsoids at 30% probability.

1,913,861 (**9b**) CCDC 1,913,860 (**10a**) and CCDC 1,913,862 (**10b**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. The data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/getstructures. For X-ray discussion and data of compounds **9b**, **10a** and **10c** see [supporting information file](#).

6. Procedures

6.1. Catalytic hydrogenation

General procedure for the catalytic reduction of 23E-benzylidene spirostanes. Palladium over carbon (Pd/C) (10% w/w) was added to a vacuum purged solution of 23E-benzylidene spirostane (0.5 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) and ethanol (18 mL). This mixture was purged again and stirred at room temperature under H_2 atmosphere until the starting material was consumed (24 h). The reaction mixture was filtered through celite, the pad was washed with CH_2Cl_2 and the filtrate was evaporated. The obtained solid was purified through a chromatographic column packed with silica gel (15 g) using mixture hexane/ethyl acetate (20/1) as eluent to afford the desired 23-benzyl-spirostanes.

The reaction of 23E-benzylidene tigogenin (**3a**) (273.4 mg, 0.5 mmol) with Pd/C (27.3 mg, 10% w/w) (24 h) afforded (**23S,25R**-

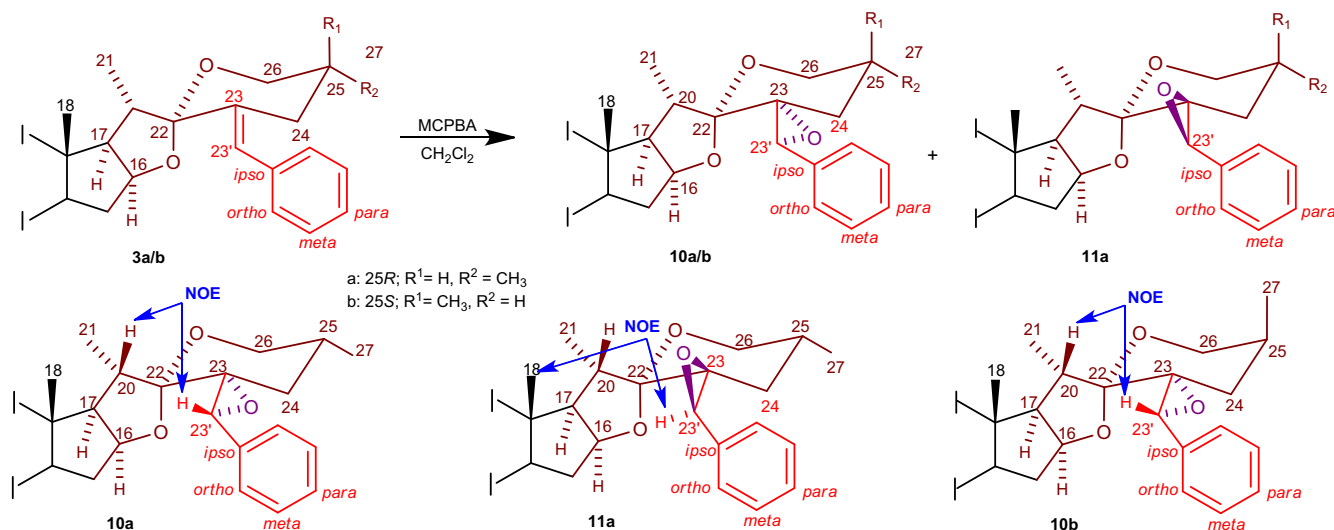
Table 3

^1H NMR signals of the side chains of compounds **10a**, **10b** and **11a**.

H	3a	10a	$\Delta\delta_{10a-3a}$	11a	$\Delta\delta_{11a-3a}$	3b	10b	$\Delta\delta_{10b-3b}$
H-16 α	4.44	4.48	+0.04	4.51	+0.07	4.47	4.49	+0.02
H-18	0.83	0.86	+0.03	0.89	+0.06	0.85	0.85	0.00
H-20	2.59	2.19	-0.40	2.11	-0.48	2.50	2.17	-0.33
H-21	1.10	1.12	+0.02	1.09	-0.01	1.11	1.17	+0.06
H-23'	6.57	4.10	-2.47	4.27	-2.30	6.72	4.14	-2.58
H-26 ax.	3.55	3.48	-0.07	3.43	-0.12	4.05	4.03	-0.02
H-26 eq.	3.55	3.46	-0.09	3.58	+0.03	3.32	3.26	-0.06
H-27	0.80	0.63	-0.17	0.72	-0.08	0.99	0.64	-0.35
ortho	7.23	7.32	+0.09	7.31	+0.08	7.21	7.31	0.10
meta	7.34	7.32	-0.02	7.31	-0.03	7.32	7.31	-0.01
para	7.23	7.32	+0.09	7.31	+0.08	7.21	7.31	+0.10

The signals of the starting materials **3a** and **3b** are included for comparison purposes.

23-benzyl-5 α -spirostan-3 β -ol acetate (6a). Yield: 268.7 mg (98%). Mp. 207.0–209.7 °C. (from acetone/ CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 7.28 (dd, $J = 8.4, 7.0$ Hz, 2H, H-ortho), 7.21–7.16 (m, 1H, H-para), 7.16–7.12 (m, 2H, H-meta), 4.68 (tt, $J = 11.5, 4.9$ Hz, 1H, H-3 α), 4.41 (dt, $J = 9.0, 7.1$ Hz, 1H, H-16 α), 3.43 (ddd, $J = 10.9, 4.6, 2.0$ Hz, 1H, H-26 eq.), 3.30 (dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1H, H-26 ax.), 2.97 (dd, $J = 13.8, 3.4$ Hz, 1H, H-23'a), 2.43–2.35 (m, 1H, H-20), 2.34–2.27 (m,



Scheme 3. Epoxidation of 23E-benzylidene spirostanes.

Table 4
¹³C NMR signals of the side chains of compounds **10a**, **10b** and **11a**.

C	3a	10a	$\Delta_{\delta 10a-83a}$	11a	$\Delta_{\delta 11a-83a}$	3b	10b	$\Delta_{\delta 10b-83b}$
16	80.4	81.2	+0.8	81.8	+1.4	81.0	81.2	+0.2
17	61.6	63.1	+1.5	62.3	+0.7	61.8	62.7	+0.9
18	16.7	16.4	-0.3	16.8	+0.1	16.7	16.4	-0.3
20	37.3	33.3	-4.0	35.8	-1.5	39.8	33.6	-6.2
21	14.8	16.7	+1.9	16.1	+1.3	14.7	16.2	+1.5
22	110.5	109.9	-0.6	109.6	-0.9	111.4	110.5	-0.9
23	137.1	62.5	-74.6	63.2	-73.9	136.8	61.0	-75.8
23'	122.8	61.2	-61.6	59.5	-63.3	122.8	62.1	-60.7
24	32.9	31.1	-1.8	33.1	+0.2	30.9	27.7	-3.2
25	33.1	30.9	-2.2	29.1	-4.0	30.3	30.1	-0.2
26	66.1	66.0	-0.1	66.0	-0.1	65.1	64.5	-0.6
27	17.2	16.7	-0.5	16.9	-0.3	18.3	17.1	-1.2
<i>ipso</i>	137.2	135.1	-2.1	135.4	-1.8	137.2	135.2	-2.0
<i>ortho</i>	129.1	126.3	-2.8	126.3	-2.8	129.1	126.8	-2.3
<i>meta</i>	128.1	128.0	-0.1	128.0	-0.1	128.0	127.8	-0.2
<i>para</i>	126.5	127.5	+1.0	127.4	+0.9	126.5	127.5	+1.0

The signals of the starting materials **3a** and **3b** are included for comparison purposes.

1H, H-23'b), 1.89 (m, 1H, H-23), 2.01 (s, CH₃ acetyl), 1.00 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-21), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.71 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.53 MHz) δ ppm: 36.7C-1, 27.4C-2, 73.6C-3, 34.0C-4, 44.6C-5, 28.5C-6, 32.2C-7, 34.9C-8, 54.2C-9, 35.6C-10, 21.0C-11, 40.1C-12, 41.0C-13, 56.1C-14, 31.6C-15, 80.8C-16, 61.6C-17, 16.7C-18, 12.3C-19, 36.9C-20, 14.4C-21, 111.2C-22, 40.3C-23, 34.3C-24, 30.7C-25, 66.0C-26, 16.9C-27, 21.4CH₃ acetyl, 170.6C = O acetyl, 37.2C-23', 140.9 *ipso*, 129.1 *ortho*, 128.2 *meta*, 125.8 *para*. HRMS (APCI) Observed C₃₆H₅₃O₄ 549.3945 (MH⁺) requires 549.3944.

The reaction with 23E-benzylidene sarsasapogenin (**3b**) (273.4 mg, 0.5 mmol) with Pd/C (27.3 mg, 10% w/w) (24 h) afforded 245.0 mg (89%) of a mixture of **6a** and **6b**. Analytical samples of each compound were obtained by separation in a chromatographic column as described in the general procedure

(23S,25S)-23-benzyl-5 β -spirostan-3 β -ol acetate (6b). Mp. 180.3–181.1 °C (from acetone/ CH₂Cl₂). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.27 (dd, $J = 10.0$, 4.7 Hz, 2H, H-*ortho*), 7.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-*para*), 7.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-*meta*), 5.07 (s, 1H, H-3 α), 4.43 (dd, $J = 15.9$, 7.2 Hz, 1H, H-16 α), 3.88 (dd, $J = 10.9$, 2.4 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.26 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H-26 eq.), 2.97 (dd, $J = 13.7$, 3.5 Hz 1H, H-23'a), 2.33 (m, 2H, H-20, H-23'b), 2.16–2.07 (m, 1H, H-23), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.03 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.97 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-27), 0.80 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.53 MHz) δ ppm: 30.6C-1, 25.0C-2, 70.7C-3, 30.7C-4, 37.3C-5, 26.4C-6, 26.5C-7, 35.2C-8, 40.0C-9, 35.0C-10, 20.9C-11, 40.3C-12, 41.1C-13, 56.3C-14, 31.6C-15, 81.0C-16, 61.5C-17, 16.7C-18, 23.9C-19, 37.3C-20, 14.2C-21, 111.8C-22, 34.6C-23*, 31.8C-24, 28.0C-25, 64.3C-26, 16.6C-27, 21.5CH₃ acetyl, 170.6C = O acetyl, 37.1C-23', 140.9 *ipso*, 129.0 *ortho*, 128.2 *meta*, 125.7 *para*. HRMS (APCI) Observed C₃₆H₅₃O₄ 549.3941 (MH⁺) requires 549.3944.

(23R,25S)-23-benzyl-5 β -spirostan-3 β -ol acetate (9b). Mp. 194.7–196.7 °C (from ethyl acetate/ CH₂Cl₂). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.23 (m, 2H *meta*), 7.12 (m, 3H *ortho* + *para*), 5.00 (q, $J = 2.9$ Hz,

1H, H-3 α), 4.42 (ddd, $J = 8.9$, 7.4, 6.1 Hz, 1H, H-16 α), 3.86 (dd, $J = 11.3$, 4.9 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.25 (dd, $J = 11.3$, 3.4 Hz, 1H, H-26 eq), 2.97 (dd, $J = 13.2$, 3.7 Hz, 1H, H-23'a), 2.49–2.32 (m, 1H, H-23'b), 2.22 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 1.97 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.09 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-21), 0.94–0.89 (m, 6H, H-19 + H-27), 0.73 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (100.53 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6C-1; 25.0C-2; 70.6C-3, 31.8C-4, 37.3C-5, 26.4C-6, 26.4C-7, 35.2C-8, 40.0C-9, 35.0C-10, 20.8C-11, 40.2C-12, 41.2C-13, 56.2C-14, 30.7C-15, 80.4C-16, 63.3C-17, 16.5C-18, 23.8C-19, 38.3C-20, 16.5C-21, 112.3C-22; 42.4C-23, 30.0C-24, 28.5C-25, 65.8C-26, 20.3C-27, 170.7C = O acetyl, 21.5CH₃ acetyl, 37.7C-23', 140.9 *ipso*, 129.1 *ortho*, 128.2 *meta*, 125.8 *para*. HRMS (APCI) Observed C₃₆H₅₃O₄ 549.3924 (MH⁺) requires 549.3944.

6.2. Epoxidation

General procedure for the epoxidation of 23E-benzylidene spirostanes. *m*-CPBA was added to a solution of the 23E-benzylidene spirostane in CH₂Cl₂ (15 mL) and the mixture was stirred at room temperature until the starting material was consumed. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (50 mL) and washed with solution at 5% of Na₂SO₃ (4 \times 30 mL), water (3 \times 15 mL), solution at 10% of NaHCO₃ (6 \times 15 mL), water (4 \times 15 mL) and saturated solution of NaCl (2 \times 15 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained solid was purified through a chromatographic column packed with silica gel (20 g) using CH₂Cl₂ as eluent to afford the desired 23-benzyl-23,23'-epoxy-spirostan.

The reaction of 23E-benzylidene tigogenin (**3a**) (273.4 mg, 0.5 mmol) with *m*-CPBA (216 mg, 1.25 mmol) (24 h) afforded 123.8 mg (44%) of a mixture of epimeric epoxides that were separated to afford analytical samples of **10a** and **11a**.

[23R,23'S,25R]-23,23'-epoxy-23-benzyl-5 α -spirostan-3 β -ol acetate (10a). Mp. 236.8–238.5 °C (from CH₂Cl₂/ethyl acetate). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.39–7.24 (m, 5H, H-Ar), 4.68 (tt, $J = 11.5$, 4.9 Hz, 1H, H-3 α), 4.48 (td, $J = 7.9$, 5.7 Hz, 1H, H-16 α), 4.10 (s, 1H, H-23'), 3.48 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-26 α), 3.46 (m, 1H, H-26 β), 2.19 (p, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-20 β), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.12 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 0.86 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.63 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.53 MHz) δ ppm: 36.8C-1, 27.5C-2, 73.6C-3, 34.0C-4, 44.7C-5, 28.5C-6, 32.1C-7, 35.2C-8, 54.3C-9, 35.6C-10, 20.9C-11, 40.0C-12, 41.3C-13, 56.4C-14, 31.9C-15, 81.2C-16, 63.1C-17, 16.4C-18, 12.3C-19, 33.3C-20, 16.7C-21, 109.9C-22, 62.5C-23, 31.1C-24, 30.9C-25, 66.0C-26, 16.7C-27, 21.5CH₃ acetyl, 170.7C = O acetyl, 61.2C-23', 135.1 *ipso*, 126.3 *ortho*, 128.0 *meta*, 127.5 *para*. HRMS (APCI) Observed C₃₆H₅₁O₅ 563.3703 (MH⁺) requires 563.3737.

[23S,23'R,25R]-23,23'-epoxy-23-benzyl-5 α -spirostan-3 β -ol acetate (11a). Mp. 199–200.3 °C (from CH₂Cl₂/acetone). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.40–7.21 (m, 5H H-Ar), 4.69 (tt, $J = 10.9$, 4.9 Hz, 1H, H-3 α), 4.51 (td, $J = 8.0$, 5.9 Hz, 1H, H-16 α), 4.27 (s, 1H, H-23'), 3.58 (ddd, $J = 11.0$, 4.5, 2.1 Hz, 1H, H-26 eq.), 3.43 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-26 ax.), 2.11 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-20 β), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.85 (s, 3H, H-19), 0.72 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27) ¹³C NMR (CDCl₃, 100.53 MHz) δ ppm: 36.7C-1, 27.5C-2, 73.6C-3, 34.0C-4, 44.6C-5,

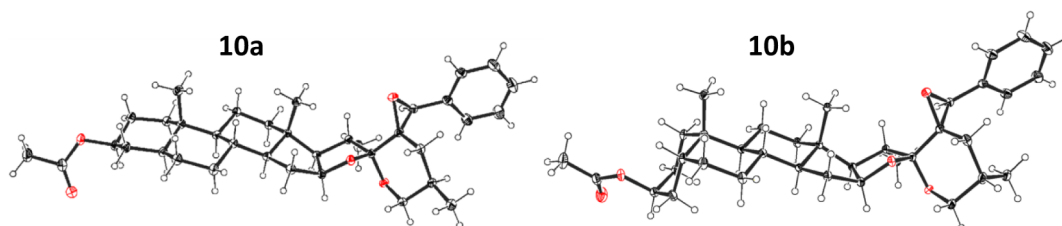


Fig. 2. Crystal structures of compounds **10a**, **10b** with the thermal ellipsoids at 50% probability.

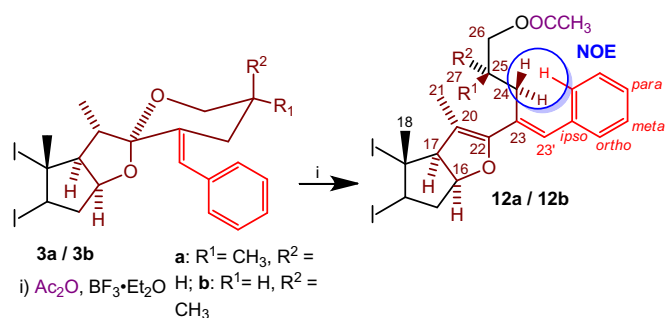
Scheme 4. BF₃·Et₂O catalyzed acetolysis of 23E-benzylidene spirostanes.

Table 5

¹H NMR signals of the side chains of compounds 12a and 12b.

H	3a	12a	Δ _{δ12a-3a}	3b	12b	Δ _{δ12b-3b}
H-16α	4.44	4.81	+0.37	4.47	4.81	+0.34
H-18	0.83	0.75	-0.08	0.85	0.76	-0.09
H-20	2.59	-	-	2.50	-	-
H-21	1.10 (d)	1.81 (s)	+0.71	1.11 (d)	1.82 (s)	+0.71
H-23'	6.57	6.68	+0.11	6.72	6.68	-0.04
H-24 Pro-R	2.10 (ax.)	2.32	+0.22	2.29 (ax.)	2.30	+0.01
H-24 Pro-S	2.78 (eq.)	2.51	-0.27	2.72 (eq.)	2.56	-0.16
H-26 Pro-S	3.55 (ax.)	3.85	+0.30	4.05 (ax.)	3.84	-0.21
H-26 Pro-R	3.55 (eq.)	-	+0.30	3.32 (eq.)	-	+0.52
H-27	0.80	0.86	+0.06	0.99	0.89	-0.10
ortho	7.23	7.32	+0.09	7.21	7.28	+0.07
meta	7.34	7.25	-0.09	7.32	7.28	-0.04
para	7.23	7.25	+0.02	7.21	7.28	+0.07

The signals of the starting materials 3a and 3b are included for comparison purposes.

Table 6

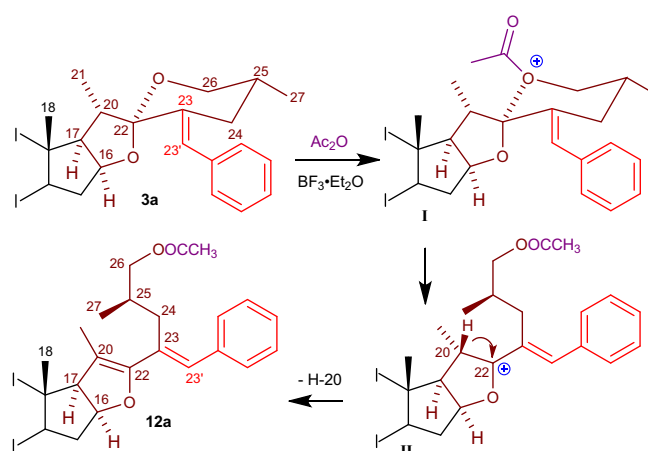
¹³C NMR signals of the side chains of compounds 12a and 12b.

C	3a	12a	Δ _{δ12a-3a}	3b	12b	Δ _{δ12b-3b}
16	80.4	84.3	+3.9	81.0	84.2	+3.2
17	61.6	65.3	+3.7	61.8	65.3	+3.5
18	16.7	14.2	-2.5	16.7	14.2	-2.5
20	37.3	107.7	+70.4	39.8	107.6	+67.8
21	14.8	13.1	-1.7	14.7	13.1	-1.6
22	110.5	151.8	+41.3	111.4	152.0	+40.6
23	137.1	132.1	-5.0	136.8	132.0	-4.8
23'	122.8	131.8	+9.0	122.8	131.8	+9.0
24	32.9	31.8	-1.1	30.9	31.7	+0.8
25	33.1	31.7	-1.4	30.3	31.7	+1.4
26	66.1	68.8	+2.7	65.1	68.6	+3.5
27	17.2	16.9	-0.3	18.3	16.9	-1.4
ipso	137.2	137.2	0.0	137.2	137.2	0.0
ortho	129.1	128.1	-1.0	129.1	128.8	-0.3
meta	128.1	128.9	+0.8	128.0	128.1	+0.1
para	126.5	126.7	+0.2	126.5	126.7	+0.2

The signals of the starting materials 3a and 3b are included for comparison purposes.

28.5C-6, 32.1C-7, 35.2C-8, 54.1C-9, 35.6C-10, 20.9C-11, 39.7C-12, 41.4C-13, 56.3C-14, 31.8C-15, 81.8C-16, 62.3C-17, 16.8C-18, 12.2C-19, 35.8C-20, 16.1C-21, 109.6C-22, 63.2C-23, 33.1C-24, 29.1C-25, 66.0C-26, 16.9C-27, 21.4CH₃ acetyl, 170.7C = O acetyl, 59.5C-23', 135.4 ipso, 126.3 ortho, 128.0 meta, 127.4 para. HRMS (APCI) Observed C₃₆H₅₁O₅ 563.3674 (MH⁺) requires 563.3737.

The reaction of 23E-benzylidene sarsasapogenin (3b) (273.4 mg, 0.5 mmol) with *m*-CPBA (216 mg, 1.25 mmol) (Reaction time 96 h) afforded: [23R,23'S,25S]-23,23'-epoxy-23-benzyl-5β-spirostan-3β-ol acetate (10b). Yield: 111.1 mg (39%). Mp. 279.4–280.4 °C (from CH₂Cl₂/ethyl acetate) ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.36–7.26 (m, 5H H-Ar), 5.07 (q, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-3α), 4.49 (ddd, *J* = 8.7, 7.6,



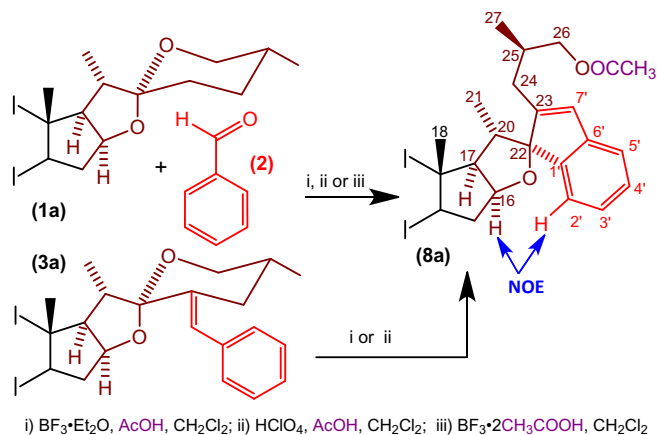
Scheme 5. Plausible reaction mechanism.

Table 7

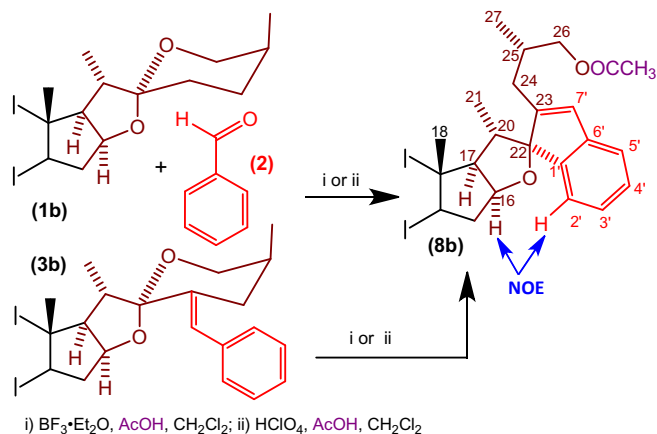
Optimization of the synthesis of spiro[furan]indene 8a.

Starting material	Conditions	Reaction time (h)*	yield%
1a	BF ₃ ·Et ₂ O/AcOH/CH ₂ Cl ₂	63	20
1a	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	384	56
1a	BF ₃ ·2CH ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	96	4
3a	BF ₃ ·Et ₂ O/AcOH/CH ₂ Cl ₂	48	13
3a	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	55	17
3a	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	192	26

* All reaction reactions were carried out at room temperature



Scheme 6. Acid catalyzed rearrangement of 23E-benzylidene spirostane 3a.



Scheme 7. Synthesis of spiro[furan]indene 8b.

Table 8
Optimization of the synthesis of spiro[*furan*]indene **8b**.

Starting material	Conditions	Reaction time (h)*	yield%
1b	BF ₃ ·Et ₂ O/AcOH/CH ₂ Cl ₂	30	11
1b	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	384	50
3b	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	24	0
3b	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	240	25
3b	HClO ₄ /AcOH/CH ₂ Cl ₂	384	46

* All reaction reactions were carried out at room temperature

Table 9
¹H NMR signals of the side chains of spiro[*furan*]indenes **8a** and **8b**.

H	3a	8a	Δ _δ 8a-83a	3b	8b	Δ _δ 8b-83b
H-16α	4.44	4.99	+0.55	4.47	5.00	+0.53
H-17	1.90	2.20	+0.30	1.88	2.21	+0.33
H-18	0.83	0.99	+0.16	0.85	0.99	+0.14
H-20	2.59	2.55	-0.04	2.50	2.53	+0.03
H-21	1.10	0.55	-0.55	1.11	0.55	-0.56
H-23' (7')	6.57	6.36	-0.21	6.72	6.36	-0.36
H-26 Pro-R	3.55 (ax.)	4.00	+0.45	4.05 (ax.)	4.05	0.00
H-26 Pro-S	3.55 (eq.)			3.32 (eq.)	3.96	+0.64
H-27	0.80	0.98	+0.18	0.99	1.03	+0.04
ortho (1')	7.23	-	-	7.21	-	-
ortho (5')	7.23	7.11	-0.12	7.21	7.10	-0.11
meta (2')	7.34	7.32	-0.02	7.32	7.32	0.00
meta (4')	7.34	7.05	-0.29	7.32	7.05	-0.27
para (3')	7.23	7.16	-0.07	7.21	7.16	-0.05

The signals of the starting materials **3a** and **3b** are included for comparison purposes.

Table 10
¹³C NMR signals of the side chains of spiro[*furan*]indenes **8a** and **8b**.

C	3a	8a	Δ _δ 8a-83a	3b	8b	Δ _δ 8b-83b
16	80.4	84.3	+3.9	81.0	84.3	+3.3
17	61.6	63.2	+1.6	61.8	63.3	+1.5
18	16.7	16.9	+0.2	16.7	17.0	+0.3
20	37.3	36.2	-1.1	39.8	36.2	-3.6
21	14.8	15.3	+0.5	14.7	15.3	+0.6
22	110.5	101.2	-9.3	111.4	101.0	-10.4
23	137.1	148.5	11.4	136.8	148.6	+11.8
23' (7')	122.8	128.5	+5.7	122.8	128.1	+5.3
24	32.9	31.0	-1.9	30.9	30.4	-0.5
25	33.1	31.4	-1.7	30.3	31.5	+1.2
26	66.1	69.6	+3.5	65.1	69.0	+3.9
27	17.2	17.1	-0.1	18.3	17.5	-0.8
ipso (6')	137.2	145.5	+8.3	137.2	145.3	+8.1
ortho (1')	129.1	142.8	13.7	129.1	142.8	+13.7
ortho (5')	129.1	120.6	-8.5	129.1	120.6	-8.5
meta (2')	128.1	124.0	-4.1	128.0	123.9	-4.1
meta (4')	128.1	124.6	-3.5	128.8	124.5	-4.3
para (3')	126.5	127.9	+1.4	126.5	127.9	+1.4

The signals of the starting materials **3a** and **3b** are included for comparison purposes.

6.0 Hz, 1H, H-16α), 4.14 (s, 1H, H-23'), 4.03 (dd, *J* = 11.0, 2.8 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.26 (dt, *J* = 11.2, 1.8 Hz, 1H, H-26 eq.), 2.32 (dd, *J* = 13.1, 5.0 Hz, 1H, H-24 ax.), 2.17 (p, *J* = 7.3, 6.8 Hz, 1H, H-20β), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.78 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H-17α), 1.22 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-24 eq.), 1.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.64 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-27). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.53 MHz) δ ppm: 30.7C-1, 24.9C-2, 70.7C-3, 31.8C-4, 37.2C-5, 26.4C-6, 26.4C-7, 35.3C-8, 40.0C-9, 35.0C-10, 20.8C-11, 40.2C-12, 41.3C-13, 56.5C-14, 30.6C-15, 81.2C-16, 62.7C-17, 16.4C-18, 23.9C-19, 33.6C-20, 16.2C-21, 110.5C-22, 61.0C-23, 27.7C-24, 30.1C-25, 64.5C-26, 17.1C-27, 21.5CH₃ acetyl, 170.7C = O acetyl, 62.1C-23', 135.2 ipso, 126.8 ortho, 127.8 meta, 127.5 para. HRMS (APCI) Observed C₃₆H₅₁O₅ 563.3773 (MH⁺) requires 563.3737.

6.3. Acid-catalyzed rearrangements of 23E-benzylidene-spirostanes

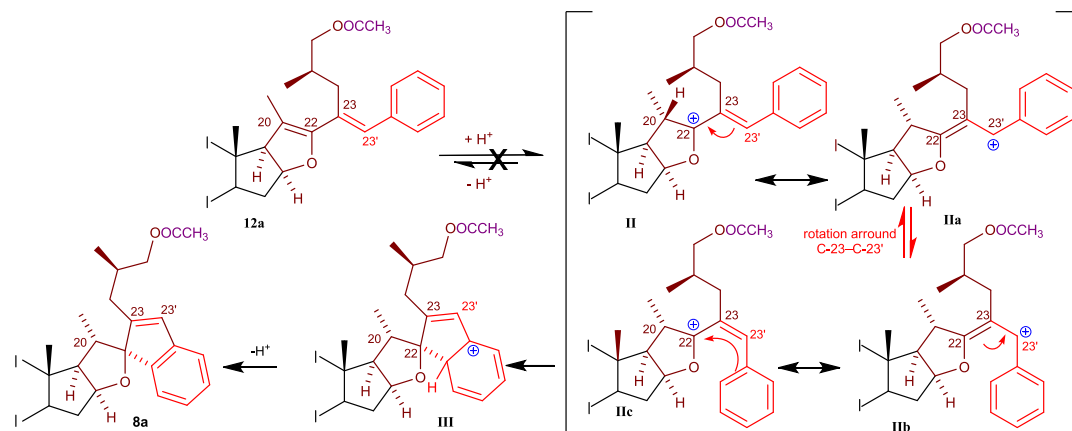
General procedure for the BF₃·Et₂O catalyzed acetolysis of 23E-benzylidene spirostanes-BF₃·Et₂O (0.3 mL) was added to a solution of benzylidene spirostane (273.4 mg, 0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (2.5 mL) and Ac₂O (3 mL) and the mixture was stirred at room temperature until the starting material was consumed (TLC, hexane/ethyl acetate 4/1, 30 min). The reaction mixture was carefully poured into water (40 mL) and extracted with ethyl acetate (2 × 30 mL). The organic layer was washed with water (7 × 25 mL), and a saturated solution of NaCl (1 × 30 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained solid was purified through a chromatographic column packed with silica gel (10 g) using mixture hexane/ethyl acetate (10/1) as eluent to afford the desired 23E-benzylidene furostene.

(25R,23E)-23-benzyliden-5α-furost-20(22)-en-3β,26-diol (12a). Yield 255.2 mg, (87%). Clear oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.32 (m, 2H, H-ortho), 7.25(m, 3H H-meta + H-para), 6.68 (s, 1H, H-23'), 4.81 (ddd, *J* = 10.2, 7.8, 5.6 Hz, 1H, H-16α), 4.69 (tt, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 1H, H-3α), 3.85 (dt, *J* = 7.7, 3.6 Hz, 2H, H-26), 2.58 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H-17), 2.51 (ddd, *J* = 14.2, 6.8, 1.3 Hz, 1H, H-24a), 2.32 (dd, *J* = 13.9, 8.0 Hz, 1H, H-24b), 2.20 (ddd, *J* = 12.3, 7.9, 5.9 Hz, 1H, H-15a), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.95 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.81 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, H-21), 0.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-19), 0.75 (s, 3H, H-18). 0.70 (td, *J* = 11.3, 4.2 Hz, 1H, H-9α). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.53 MHz) δ ppm: 36.7C-1, 27.4C-2, 73.6C-3, 34.0C-4, 44.6C-5, 28.5C-6, 32.2C-7, 34.9C-8, 54.2C-9, 35.6C-10, 21.13C-11, 39.7C-12, 44.2C-13, 54.9C-14, 34.2C-15, 84.3 C-16, 65.3 C-17, 14.2C-18, 12.9C-19, 107.7C-20, 13.1 C-21, 151.8 C-22, 132.1 C-23, 31.8 C-24, 31.7C-25, 68.8 C-26, 16.9C-27, 20.3 21.5 2 × CH₃ acetyl, 170.7 171.1 2 × C=O acetyl, 131.8 C-23', 137.2 ipso, 128.1 2 × ortho, 128.9 2 × meta, 126.7 para. HRMS (APCI) Observed C₃₈H₅₃O₅ 589.3896 (MH⁺) requires 589.3893.

(25R,23E)-23-benzyliden-5β-furost-20(22)-en-3β,26-diol (12b). Yield 239.2 mg, (81%) Clear oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.45–7.11 (m, 5H, H-phenyl), 6.68 (s, 1H, H-23'), 5.07 (m, 1H, H-3α), 4.81 (ddd, *J* = 10.3, 7.8, 5.6 Hz, 1H, H-16α), 3.84 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-26), 2.60 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H-15), 2.56 (m, 1H, H-24a), 2.30 (ddd, *J* = 13.8, 7.7, 1.1 Hz, 1H, H-24b), 2.21 (ddd, *J* = 12.4, 7.9, 5.9 Hz, 1H, H-15a), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.92 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.82 (s, 3H, H-21), 1.00 (s, 3H, H-19), 0.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-27), 0.76 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (100.53 MHz) δ ppm: 30.6C-1, 25.0C-2, 70.7C-3, 30.8C-4, 37.3C-5, 26.4C-6, 26.5C-7, 35.1C-8, 40.0C-9, 35.0C-10, 21.0C-11, 39.9C-12, 44.4C-13, 55.1C-14, 34.2C-15, 84.2C-16, 65.3C-17, 14.2C-18, 23.8C-19, 107.6C-20, 13.1C-21, 152.0C-22, 132.0C-23, 31.7C-24, 31.7C-25, 68.6C-26, 16.9C-27, 20.7 21.5 2 × CH₃ acetyl, 170.7 171.2 2 × C=O acetyl, 131.8C-23', 137.2 ipso, 128.8 2 × ortho, 128.1 2 × meta, 126.7 para. HRMS (APCI) Observed C₃₈H₅₃O₅ 589.3893 (MH⁺) requires 589.3893.

6.4. Synthesis of spiro[*furan*]indenes from steroid sapogenins

(22R,25R)Indene [9',8':22,23]-5α-furostan-3β,26-diol diacetate (8a) BF₃·Et₂O as catalyst. BF₃·Et₂O (0.6 mL) was added to a solution of tigogenin acetate (**1a**) (458.7 mg, 1 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) and acetic acid (6 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. Benzaldehyde (212.2 mg, 2 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (2 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 63 h. (TLC hexane/ethyl acetate, 8/1 × 2). The reaction mixture was carefully poured into water and extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic layers were washed with water (3 × 30 mL), 10% Na₂CO₃ solution (3 × 30 mL), water (4 × 30 mL) and saturated solution of NaCl (1 × 30 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained oil was purified through a chromatographic column packed with silica gel (25 g) using mixture hexane/acetone (99/1) as eluent to afford 116.0 mg, (20%) of the desired spiro[*furan*]indene **8a**. Mp. 194.5–196.7 °C (from CH₂Cl₂/MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ



Scheme 8. Reaction mechanism for rearrangement of 23E-benzylidene spirostanes to spiro[furan-indenes].

7.35–7.29 (m, 1H, H-2'), 7.16 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.12–7.09 (m, 1H, H-5'), 7.05 (td, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H, H-4'), 6.36 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-7'), 4.99 (dt, $J = 9.2, 7.0$ Hz, 1H, H-16 α), 4.70 (tt, $J = 11.3, 4.9$ Hz, 1H, H-3 α), 4.09–3.92 (m, 2H, H-26), 2.58–2.52 (m, 1H, H-20 β), 2.49 (ddd, $J = 15.3, 5.2, 1.8$ Hz, 1H, H-24a), 2.31 (ddt, $J = 13.2, 6.5, 1.7$ Hz, 1H, H-25), 2.20 (dd, $J = 9.3, 7.8$ Hz, 1H, H-17 α), 2.07 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.05 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-24b), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetyl), 0.99 (s, 3H, H-18), 0.98 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27), 0.87 (s, 3H, H-19), 0.72 (td, $J = 11.8, 10.4, 3.1$ Hz, H-9 α), 0.55 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-21). ¹³C NMR (100.53 MHz, CDCl₃) δ ppm: 36.7C-1, 27.5C-2, 73.7C-3, 34.0C-4, 44.7C-5, 28.5C-6, 32.2C-7, 35.0C-8, 54.2C-9, 35.6C-10, 21.1C-11, 40.3C-12, 41.6C-13, 56.7C-14, 32.5C-15, 84.3C-16, 63.2C-17, 16.9C-18, 12.3C-19, 36.2C-20, 15.3C-21, 101.2C-22, 148.5C-23, 31.0C-24, 31.4C-25, 69.6C-26, 17.1C-27, 128.5C-7', 142.8C-1', 124.0C-2', 127.9C-3', 124.6C-4', 120.6C-5', 145.5C-6', 21.5, 21.0 2 \times CH₃ acetyl, 170.7, 171.2 2 \times C=O acetyl. HRMS (APCI) Observed C₃₈H₅₃O₅ 589.3867 (MH⁺) requires 589.3893.

(22R,25S)Indene [9',8':22,23] -5 β -furostan-3 β ,26-diol diacetate (8b). BF₃·Et₂O as catalyst. Similar treatment of sarsapogenin acetate (1b) (458.7 mg, 1 mmol) for 30 h afforded 64.5 mg, (11%) of the desired spiro[furan]indene 8b (clear oil). ¹H NMR (CDCl₃ 400 MHz): δ (ppm) 7.32 (dd, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 1H, H-2'), 7.16 (td, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.10 (m, 1H, H-5'), 7.05 (td, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H, H-4'), 6.36 (s, 1H, H-7'), 5.09 (m, 1H, H-3 α), 5.00 (td, $J = 9.2, 8.2, 4.6$ Hz, 1H, H-16 α), 4.05 (dd, $J = 10.8, 5.1$ Hz, 1H, H-26a), 3.96 (dd, $J = 10.8, 6.3$ Hz, 1H, H-26b), 2.53 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-20b), 2.21 (m, 1H, H-17 α), 2.07 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.05 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.03 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27), 1.01 (s, 3H, H-19), 0.99 (s, 3H, H-18), 0.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-21). ¹³C NMR (100.53 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.6C-1, 25.0C-2, 70.6C-3, 30.7C-4, 37.3C-5, 26.4C-6, 26.4C-7, 35.2C-8, 40.0C-9, 35.0C-10, 21.0C-11, 40.5C-12, 41.7C-13, 56.8C-14, 32.5C-15, 84.3C-16, 63.3C-17, 17.0C-18, 23.8C-19, 36.2C-20, 15.3C-21, 101.0C-22, 148.6C-23, 30.4C-24, 31.5C-25, 69.0C-26, 17.5C-27, 128.1C-23', 142.8C-1', 123.9C-2', 127.9C-3', 124.5C-4', 120.6C-5', 145.3C-6', 21.5, 21.0 2 \times CH₃ acetyl, 170.7, 171.2 2 \times C=O acetyl. HRMS (APCI) Observed C₃₈H₅₃O₅ 589.3862 (MH⁺) requires 589.3893.

(22R,25R)Indene [9',8':22,23] -5 α -furostan-3 β ,26-diol diacetate (8a) BF₃·2CH₃COOH complex as catalyst. BF₃·2CH₃COOH complex (98%) (1 mL, 7.1 mmol of BF₃) was added to a solution of tigogenin acetate (1a) (229.3 mg, 1 mmol) and benzaldehyde (2) (106.1 mg, 1 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL). The mixture was flushed with argon and stirred at room temperature (96 h) (TLC hexane/ethyl acetate, 8/1 \times 2). The reaction mixture was carefully poured into water and diluted with ethyl acetate (50 mL). The organic layer was washed with water (10 \times 20 mL) and saturated solution of NaCl (1 \times 20 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained solid was purified through a chromatographic column packed with silica gel (12 g) using mixture

hexane/acetone (99/1) as eluent to afford 10.4 mg, (4%) of 8a identical as described above.

(22R,25R)Indene [9',8':22,23] -5 α -furostan-3 β ,26-diol diacetate (8a) HClO₄ as catalyst. HClO₄ (0.3 mL, 3.4 mmol) was added to a solution of tigogenin acetate (1a) (82.6 mg, 0.18 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) and acetic acid (1.1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. Benzaldehyde (2) (38.2 mg, 0.36 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (0.5 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature (384 h) (TLC hexane/ethyl acetate, 8/1 \times 2). The reaction mixture was carefully poured into water and extracted with ethyl acetate (3 \times 20 mL). The organic layer was washed with water (4 \times 15 mL), 10% Na₂CO₃ solution (1 \times 15 mL), water (4 \times 15 mL) and saturated solution of NaCl (1 \times 15 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained oil was purified through a chromatographic column packed with silica gel (10 g) using mixture hexane/acetone (99/1) as eluent to afford 59.0 mg (56%) of the desired spiro[furan]indene 8a identical as described above.

(22R,25S)Indene [9',8':22,23] -5 β -furostan-3 β ,26-diol diacetate (8b). HClO₄ as catalyst. Similar treatment of sarsapogenin acetate (1b) (82.6 mg, 0.18 mmol) afforded 53.1 mg (50%) of the spiro[furan]indene 8b identical as described above.

6.5. Synthesis of spiro[furan]indenes from 23E-benzylidene spirostanes

(22R,25R)Indene [9',8':22,23] -5 α -furostan-3 β ,26-diol diacetate (8a). BF₃·Et₂O as catalyst. BF₃·Et₂O (0.11 mL) was added to a solution of 23E-benzylidene tigogenin (3a) (100 mg, 0.18 mmol) in CH₂Cl₂ (0.9 mL) and acetic acid (1.1 mL), and was stirred at room temperature (48 h) (TLC hexane/ethyl acetate, 8/1 \times 2). The reaction mixture was carefully poured into water and extracted with ethyl acetate (3 \times 15 mL). The combined organic layers were washed with water (2 \times 15 mL), 10% Na₂CO₃ solution (2 \times 15 mL), water (4 \times 15 mL) and saturated solution of NaCl (1 \times 15 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained oil was purified through a chromatographic column packed with silica gel (10 g) using mixture hexane/acetone (99/1) as eluent to afford 14.0 mg (13%) of the desired spiro[furan]indene 8a identical as described above.

(22R,25S)Indene [9',8':22,23] -5 β -furostan-3 β ,26-diol diacetate (8b). BF₃·Et₂O as catalyst. Similar treatment of 23E-benzylidene sarsapogenin (3b) (100 mg, 0.18 mmol) for 240 h afforded 32.8 mg (25%) of the spiro[furan]indene 8b identical as described above.

(22R,25R)Indene [9',8':22,23] -5 α -furostan-3 β ,26-diol diacetate (8a) HClO₄ as catalyst. HClO₄ (0.3 mL, 3.4 mmol) was added to a solution of 23E-benzylidene tigogenin (3a) (100 mg, 0.18 mmol) in CH₂Cl₂ (0.9 mL) and acetic acid (1.1 mL), and the mixture was stirred at room temperature (TLC hexane/ethyl acetate, 8/1 \times 2). After the reaction was concluded, the mixture was carefully poured into water and

extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The organic layer was washed with water (4 × 15 mL), 10% Na₂CO₃ solution (1 × 15 mL), water (4 × 15 mL) and saturated solution of NaCl (1 × 15 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The obtained oil was purified through a chromatographic column packed with silica gel (10 g) using mixture hexane/acetone (99/1) as eluent to afford the desired spiro[furan]indene **8a** identical as described above. (Condition 1: Time 55 h, yield: 18.7 mg, 17%. Condition 2: Time 192 h, yield: 28.0 mg, 26%).

(22R,25S)Indene [9',8':22,23]-5β-furostan-3β,26-diol diacetate (**8b**). HClO₄ as catalyst. Similar treatment of 23E-benzylidene sarsapogenin (**3b**) (100 mg, 0.18 mmol) for **38a** afforded 49.0 mg (46%) of the desired spiro[furan]indene **8b** identical as described above.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (Project DGAPA-IN212417), the Faculty of Chemistry-UNAM (PAIP-5000-9063). Thanks are due to CONACyT-México for the scholarship granted to M.A.R.E.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108462>.

References

- M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez, C.S. Pérez, F. Coll, Spirostanic analogues of teasterone. Synthesis, characterisation and biological activity of laxogenin, (23S)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (2001) 261–266, <https://doi.org/10.1039/B007656M>.
- M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez, C.S. Pérez, F. Coll, Spirostanic analogues of teasterone. Synthesis, characterisation and biological activity of laxogenin, (23S)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (2001) 261–266, <https://doi.org/10.1039/B007656M>;
 - M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez, C.S. Pérez, F. Coll, Spirostanic analogues of castasterone, *Steroids* 67 (2002) 159–163, [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(01\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00150-7);
 - M. Romero-Ávila, G. de Dios-Bravo, J.M. Mendez-Stivalet, R. Rodríguez-Sotres, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and biological activity of furostanic analogues of brassinosteroids bearing the 5α-hydroxy-6-oxo moiety, *Steroids* 72 (2005) 955–959, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.08.007>;
 - A. Rosado-Abón, G. de Dios-Bravo, R. Rodríguez-Sotres, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and plant growth promoting activity of dinorcholanic lactones bearing the 5α-hydroxy-6-oxo moiety, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 134 (2013) 45–50, <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2012.10.007>.
- M.A. Ramos-Enríquez, O.N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and radical scavenger properties of novel spirochromenes derived from steroid sapogenins, *Steroids* 98 (2015) 132–137, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.013>.
- R. Somaiah, K. Ravindar, R. Cencic, J. Pelletier, P. Deslongchamps, Synthesis of the antiproliferative agent hippuristanol and its analogues from hydrocortisone via Hg(II)-catalyzed spiroketalization: structure-activity relationship, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 2511–2523, <https://doi.org/10.1021/jm401799j>.
- For reviews see, S. Lee, T.G. LaCour, P.L. Fuchs, Chemistry of Trisdecacyclic Pyrazine Antineoplastics: The Cephalostatins and Ritterazines, *Chem. Rev.* 109 (2009) 2275–2314, <https://doi.org/10.1021/cr800365m>;
 - M.A. Iglesias-Arteaga, J.W. Morzycki, Cephalostatins and Ritterazines, in: H.J. Knölker (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Elsevier, Amsterdam, 2013, pp. 153–279.
- Selected references, B. Jiang, H. Shi, W. Tian, W. Zhou, The convergent synthesis of novel cytotoxic certenardosterol D2 from diosgenin, *Tetrahedron* 64 (2008) 469–476, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.11.028>;
 - Q.-H. Xu, X.-W. Peng, W.-S. Tian, A new strategy for synthesizing the steroids with side chains from steroidal sapogenins: synthesis of the aglycone of OSW-1 by using the intact skeleton of diosgenin, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 9375–9377, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.09.227>;
 - E. Lee, Y.T. Liu, P.H. Solomon, K. Nakanishi, Stereospecific conversion of diosgenin to α-ecdysone, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 1634–1635, <https://doi.org/10.1021/ja00422a086>.
- For recent review see I. Jastrzębska, Chemistry of Steroidal Sapogenins – New Advances in a Classical Field, *Curr. Org. Chem.* 16(2012) 353–372. <https://doi.org/10.2174/138527212799499895>. Selected references, T.G. LaCour, Z. Tong, P.L. Fuchs, Consequences of Acid Catalysis in Concurrent Ring Opening and Halogenation of Spiroketal, *Org. Lett.* 1 (1999) 1815–1818, <https://doi.org/10.1021/ol991078r>;
 - J. Sandoval-Ramírez, S. Meza-Reyes, R.E. del Río, G. Hernandez-Linares, A. Suárez-Rojas, S. Rincón, N. Farfán, R.L. Santillán, Regioselective cleavage of rings E and F in sarsapogenin, *Steroids* 68 (2003) 199–204, [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(02\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(02)00170-8);
 - I. Jastrzębska, J.W. Morzycki, U. Trochimowicz, Lead tetraacetate–iodine oxidation of 23-spirostanols, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 1929–1932, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.12.146>;
 - I. Jastrzębska, J.W. Morzycki, Unusual Baeyer-Villiger Oxidation of 23-Oxosarsapogenin Acetate, *Polish J. Chem.* 79 (2005) 1245–1248, <https://doi.org/10.1002/chin.200547186>;
 - M.A. Iglesias-Arteaga, R.O. Arcos-Ramos, One-step axial acetoxylation at C-23 A new method for the functionalization of the side chain of steroid sapogenins, *Tetrahedron Lett.* 47 (2006) 8029–8031, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.09.078>;
 - M.A. Iglesias-Arteaga, R.O. Arcos-Ramos, J.M. Mendez-Stivalet, The unexpected course of the reaction of steroid sapogenins with diacetoxyiodobenzene and BF₃·Et₂O in formic acid, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 7485–7488, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.08.071>;
 - K.M. Ruiz-Pérez, M. Romero-Ávila, V. Tinajero-Delgado, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, BF₃·Et₂O-induced stereoselective aldol reaction with benzaldehyde, and steroid sapogenins and its application to a convenient synthesis of dinorcholanic lactones, *Steroids* 77 (2012) 819–828, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.02.016>;
 - M.A. Ramos-Enríquez, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, An alternative reduction course of the spiroketal side chain of steroid sapogenins induced by the presence of a 23E-benzylidene moiety, *Tetrahedron Lett.* 54 (2013) 4401–4405, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.06.011>;
 - M.A. Ramos-Enríquez, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis of novel steroids bearing a spirochromene side chain by BF₃·Et₂O catalyzed aldol condensation of spirostane sapogenins and salicylaldehyde, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 3325–3327, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.04.042>;
 - M.A. Ramos-Enríquez, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, An unexpected BF₃·Et₂O-catalyzed rearrangement of 23E-benzylidenespirostanols to spiro[furan]indenes], *Tetrahedron Lett.* 57 (2016) 2249–2252, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.04.032>;
 - K. Vargas-Romero, O. Alberto, M. Flores-Álamo, M.A. Iglesias-Arteaga, Baeyer-Villiger reaction of steroid sapogenins by CF₃COOH·H₂O. A short cut to pregnan-3β,16β,20-triol 3-monoacetates, *Steroids* 128 (2017) 1–5, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.10.001>.
- M.A. Ramos-Enríquez, K. Vargas-Romero, L. Rárová, M. Strnad, M.A. Iglesias-Arteaga, Synthesis and in vitro anticancer activity of 23(23'E)-benzylidenespirostanols derived from steroid sapogenins, *Steroids* 128 (2017) 85–88, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.017>.