

50  
2ej.

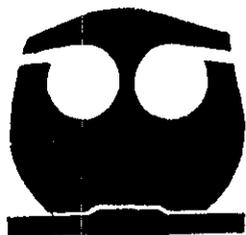


# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SEMISINTESIS DE 17- $\alpha$ -ACETOXI-16- $\beta$ -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20 DIONA, COMO UN INTERMEDIARIO EN LA PREPARACION DE ANTIANDROGENOS.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**MARIA DEL CARMEN HERNANDEZ ROJAS**



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

68783

1998.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE  
VOCAL  
SECRETARIO  
1er. SUPLENTE  
2do SUPLENTE

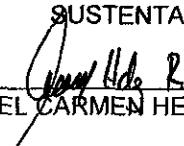
PROF. GRISELDA SILVA LEAL.  
PROF. EUGENE ATHANAS. BRATTOEF TITEFF.  
PROF. ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA.  
PROF. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ.  
PROF. JAVIER ALFREDO CARBALLO PEREA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA  
CONJUNTO "E"  
LABORATORIO 125.

ASESOR DEL TEMA.

  
DR. EUGENE A. BRATTOEF

SUSTENTANTE.

  
MARÍA DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS

# ÍNDICE

	Página
<b>1.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.-ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>3.-DISCUSIÓN</b>	<b>10</b>
3.1 Relación Estructura-Actividad	12
3.2 Ruta de Síntesis	
<b>4.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>17</b>
<b>5.-EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	<b>26</b>
<b>6.-CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>7.-ESPECTROS</b>	<b>28</b>
<b>8.-BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>38</b>

## AGRADECIMIENTOS

A la dirección general de asuntos del personal académico (DGAPA) por el apoyo económico proporcionado al proyecto IN 205295.

Al Dr. Eugene Brattoef por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

A Elena Ramírez por su valiosa asesoría en la realización del procedimiento experimental.

De manera especial al Sr. Sergio Villavicencio Luis por la ayuda que siempre me otorgó durante mis estudios.

Quiero agradecer a Angélica, Bibiana, Edahena, Haydeé, Iveth, Jacqueline, Lluvia, Óscar y Susana porque que siempre me regalaron un momento de su tiempo. A todos ellos gracias por su amistad y fidelidad.

## **DEDICATORIAS**

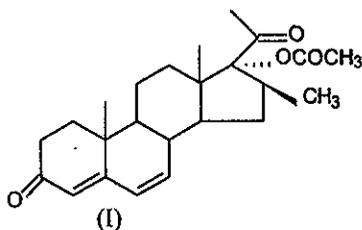
**A mi papá y mi mamá: Que siempre nos han querido, cuidado y ayudado en todo lo que hemos querido hacer , los quiero mucho.**

**A mis hermanas y hermanos: Para que siempre estemos juntos en los momentos más difíciles y en los más alegres.**

**A mis sobrinos: Para que se superen siempre en la vida y nos sigan alegrando la vida con sus bromas y travesuras.**

## INTRODUCCIÓN

Con el interés de aumentar la actividad de los compuestos antiandrogénicos y reducir sus efectos colaterales potenciales, ha existido en nuestro laboratorio una investigación considerable en la síntesis de antiandrógenos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es sintetizar a partir del acetato de 16-dehidropregnenolona (fig. XV, pág. 17) el compuesto 17- $\alpha$ -acetoxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (fig. I, pág. 1). Este compuesto es un intermediario en la preparación de nuevos antiandrógenos que inhiben a la 5 $\alpha$ -reductasa, la enzima responsable de la conversión de testosterona (fig VII, pág. 8) a dihidrotestosterona, DHT (fig. VIII, pág. 8).



Nuestro interés en el estudio de estos compuestos está fundamentalmente centrado en la síntesis parcial de nuevos esteroides, su caracterización espectroscópica y la determinación de sus propiedades farmacológicas.

Los antiandrógenos son compuestos que bloquean la síntesis o acción de los andrógenos, por lo que podrían resultar útiles para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna, carcinoma de próstata, acné, calvicie masculina, síndromes virilizantes en las mujeres y pubertad precoz en niños.<sup>7</sup>

La estrategia de usar antiandrógenos para el tratamiento de enfermedades dermatológicas inducidas por andrógenos es un concepto teórico. Se ha observado que este tipo de compuestos administrados por vía oral para el tratamiento del acné, tales como el acetato de ciproterona (fig. XI, pág. 9) y flutamida (fig. XII, pág. 9), tienen cierta eficacia, pero frecuentemente están asociados con significantes efectos colaterales. Por esta razón no es muy recomendable prescribir antiandrógenos particularmente a pacientes que presentan acné moderado. Así que la necesidad de nuevos fármacos efectivos que se administren tópicamente y cuyo efecto inhibitorio sea sólo en el sitio de aplicación y con ausencia total de algún efecto colateral sistémico está bien reconocida.<sup>13</sup>

Se sabe que los andrógenos tienen una importante actividad en el cáncer de próstata, por lo que abatir la función androgénica es la base de la terapia inicial para el cáncer prostático.<sup>5</sup>

En nuestro laboratorio se han determinado las características estructurales que debe poseer los compuestos esteroidales para presentar actividad antiandrogénica.<sup>6</sup>

-Estructura casi plana de la molécula.

-Presencia del grupo funcional  $1\alpha,2\alpha$ -ciclometileno en el anillo A o en su lugar una doble ligadura.

-Dobles enlaces en las posiciones C-4 y C-6 -Un grupo voluminoso en el C-16 y C-17.

Para lograr la obtención de compuesto I (pág. 1) se recurre a las siguientes modificaciones de la materia prima, el acetato de 16-dehidropregnenolona (fig. XV, pág. 20)

1.-Formación de un epóxido en los C-16 y C-17.

2.-Acetilación en C-3.

3.-Protección del carbonilo en C-20.

4.-Introducción de un grupo metilo en C-16.

5.-Desprotección del carbonilo en C-20.

6.-Oxidación del alcohol secundario en C-3.

7.-Formación de 2 dobles enlaces conjugados en C-4-C-6.

8.-Esterificación del alcohol en C-17.

## ANTECEDENTES

Los andrógenos son principalmente biosintetizados y secretados por el ovario, corteza suprarrenal y testículos a partir del colesterol. La biosíntesis de la testosterona (fig. VII, pág. 7) se presenta en el esquema 1 (pág. 7).<sup>7</sup> En tejido periférico también tiene lugar la síntesis de estrógenos y andrógenos para su propio uso. La concentración en estos tejidos es mucho más grande que en los testículos, debido a que estos últimos sintetizan y liberan andrógenos para el uso de otros tejidos. Consecuentemente la concentración sanguínea de testosterona (fig. VII, pág. 7) es un índice válido de formación de testosterona para los testículos, pero no para tejido periférico, cuya fuente es sólo una pequeña fracción (5%) de andrógenos activos en la sangre. Esta fracción resulta de alguna "fuga" de testosterona del tejido periférico.<sup>11</sup>

Después de la secreción por los testículos, ovarios y glándula suprarrenal, la testosterona (fig. VII, pág. 8) es metabolizada en el hígado, piel y glándula prostática, por las enzimas aromatasa y  $5\alpha$ -reductasa produciendo estradiol (fig. XIX, pág. 8) y DHT respectivamente (fig VIII, pág. 8). El metabolismo de la testosterona se presenta en el Esquema 2. (pág. 8)<sup>24</sup>

Ciertos tejidos sensibles a la acción de andrógenos incluyendo la próstata responden principalmente a la DHT, que al ser una molécula no polar atraviesa de forma espontánea la membrana plasmática de las células en dirección al citosol. Una vez en el citoplasma se fija al receptor proteico intracelular para andrógenos con una fuerza de unas 50 veces mayor que la testosterona (fig. VII, pág. 7). El complejo formado, dihidrotestosterona-receptor es más estable que el correspondiente a la testosterona; así se explica su mayor potencia androgénica.<sup>23</sup>

Los andrógenos poseen importantes efectos fisiológicos durante el periodo embrionario, virilizan el tracto urogenital del embrión masculino y su acción es capital para el desarrollo de su fenotipo.

En la pubertad son responsables de los caracteres sexuales secundarios masculinos como es el engrosamiento de la voz, crecimiento de vello en zonas determinadas, desarrollo de la masa muscular, crecimiento del pene y escroto. También ofrecen una disminución en importantes riesgos a la salud, los cuales se enuncian en la tabla I.<sup>9</sup> (pág. 6)

Los desórdenes androgénicos tienen muchos efectos físicos negativos, estos efectos pueden ser causados por un exceso de andrógenos (exógenos o endógenos) o por un órgano muy sensible a niveles normales de andrógenos.<sup>9</sup>

Los signos más aparentes del exceso de andrógenos son las manifestaciones externas, incluyendo piel grasosa, acné, hirsutismo, obesidad androide, virilización en la mujer, alopecia androgénica, disminución de la libido y en hombres se observan graves desviaciones en su conducta sexual.<sup>7</sup>

De igual importancia son los disturbios metabólicos potenciales asociados con hiperandrogenicidad particularmente en lípidos y carbohidratos. Estos cambios han estado casualmente asociados a cambios en la mortalidad y morbilidad cardiovascular por retención de agua junto con cloruro de sodio que eleva las concentraciones plasmáticas del colesterol-LDL y disminuyen las del colesterol-HDL. Un desfavorable perfil de lípidos y aumento en la incidencia de diabetes e hipertención son amenazas reales para la salud a largo plazo.<sup>9</sup>

De un interés especial es el papel de los andrógenos en el cáncer de próstata. El tejido prostático requiere de un soporte hormonal adecuado para la diferenciación, desarrollo normal de la glándula y para mantener su integridad estructural y funcional. De hecho la orquidectomía resulta en regresión prostática y la administración de andrógenos reactiva el crecimiento prostático con proliferación tanto de la estructura estromal como epitelial.

Se ha demostrado que los andrógenos promueven directamente la diferenciación epitelial pero no afectan substancialmente la proliferación epitelial de la glándula adulta. Por lo tanto el efecto de los esteroides sexuales en la promoción del crecimiento es en parte indirecta y mediada por otras sustancias como factores peptídicos de crecimiento. Estos factores actúan como reguladores locales de la replicación celular y diferenciación entre procesos parácrinos y autócrinos.<sup>2</sup>

Uno de los principales factores de crecimiento es el factor de crecimiento epidermal (EGF), que es sintetizado por células epiteliales y cuya liberación está controlada en particular por la DHT (fig. VIII, pág. 8). EGF puede ser considerado como un mediador de la acción androgénica en las células epiteliales.

EGF se une a su receptor específico, dicho receptor es una glicoproteína transmembranal compuesta de un dominio extracelular y un dominio intracelular con actividad de tirosincinasa. La unión de EGF activa al dominio tirosincinasa, el cual fosforila a varias proteínas celulares que regulan la síntesis de DNA y replicación celular en la próstata normal y en la hiperplasia prostática benigna (BPH).<sup>20</sup>

Los antiandrógenos son compuestos que bloquean la síntesis o acción de los andrógenos.

Los antagonistas androgénicos compiten por el receptor androgénico (AR) dentro del órgano blanco. Sin embargo el mecanismo molecular preciso de su antagonismo no está bien definido e incluso se ha observado una

diferencia en la interacción de los diferentes agonistas y antagonistas con su receptor.<sup>10</sup>

## COMPUESTOS ANDROGÉNICOS

El acetato de ciproterona (fig. XI, pág. 9) es un esteroide progestacional con inherente androgenicidad y antiandrogenicidad, que compite por el receptor androgénico (AR) en los tejidos blanco.<sup>27</sup>

La flutamida (fig. XII, pág. 9) es un antagonista androgénico puro, que al igual que el acetato de ciproterona, no afecta la producción o secreción de andrógenos, sino que compite directamente con la dihidrotestosterona por el sitio de unión al receptor androgénico (AR) sin estimularlo.<sup>5</sup>

Recientemente la atención se ha enfocado en los andrógenos producidos por la glándula suprarrenal que contabilizan el 40% de la DHT (fig. VIII, pág. 8) encontrada en la glándula prostática. La hipótesis de que los andrógenos residuales suprarrenales continúan estimulando el desarrollo de cáncer de próstata, ha sugerido la castración médica seguida de la adición de andrógenos antagonistas no esteroidales, tal como la flutamida para lograr un bloqueo total de andrógenos.<sup>2</sup>

La finasterida (fig. XIV, pág. 9) [17- $\beta$ -(N-ter-butylcarbamoyl)-4-aza-5- $\alpha$ -androst-1-en-3-ona], bajo el nombre comercial de Proscar, es el prototipo de los fármacos que actúan inhibiendo a la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.<sup>1</sup> Esta enzima es la responsable de la conversión de testosterona a DHT, por lo que es de esperarse que los niveles de testosterona aumenten.<sup>18</sup> Este fármaco es empleado en el tratamiento de hiperplasia prostática benigna.

La enzima 5 $\alpha$ -reductasa es una proteína de membrana que cataliza la reducción dependiente de NADPH del doble enlace  $\Delta^{4,5}$  en una variedad de substratos esteroidales. En el humano se ha demostrado la existencia de dos isoenzimas designadas tipo 1 y tipo 2. La enzima tipo 1 es expresada en bajos niveles en la próstata, posee un pH neutro óptimo y es poco sensible a la inhibición por parte de la finasterida. La enzima tipo 2 es expresada en altos niveles en la próstata, posee un pH ácido óptimo y es sensible a la finasterida.<sup>23</sup>

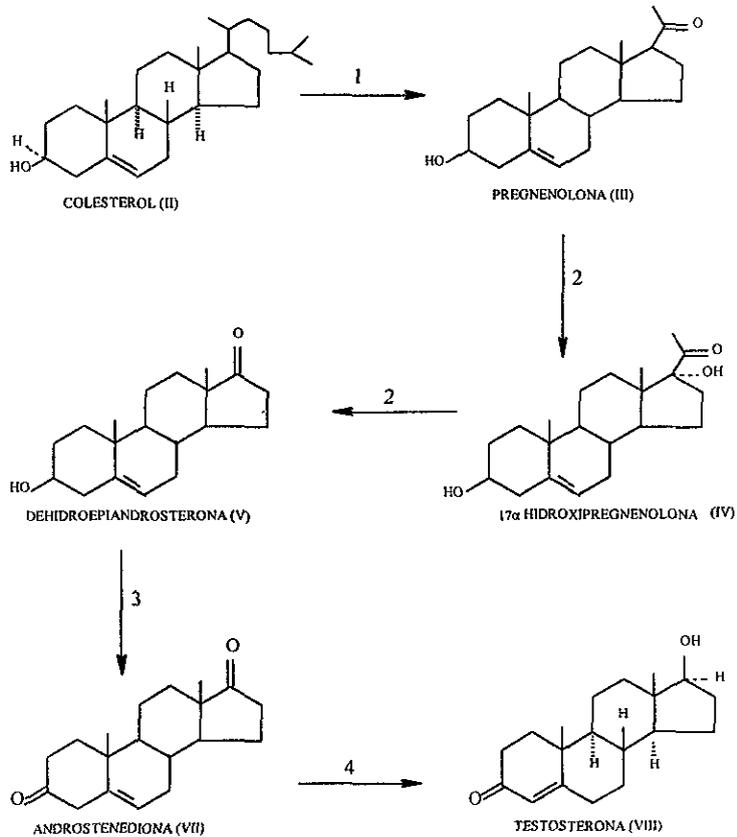
El mecanismo de acción de la finasterida (fig. XIV, pág.9) es inhibir a la isoenzima tipo 2, este proceso ocurre a través de la formación de un intermediario enzima-NADP-dihidrofinasterida, con la posterior liberación de la dihidrofinasterida.<sup>1</sup>

Mientras que los antiandrógenos son bien aceptados como agentes terapéuticos para enfermedades prostáticas, el uso de estos compuestos para

desórdenes cutáneos mediados por andrógenos, destacando por su incidencia el acné, no está bien definido debido a los efectos secundario severos que se presentan. Algunos estudios han demostrado que la aplicación de antiandrógenos vía tópica disminuyen el tamaño de la glándula sebácea. Sin embargo, también se deben de considerar otros factores que modulan el crecimiento de la glándula, como son: el factor de crecimiento epidérmal, glucocorticoides y glándula tiroides. Estos factores no son afectados por antiandrógenos y pueden contribuir a la permanencia de la función glandular.<sup>13</sup>

TABLA I RIESGOS DE SALUD REDUCIDOS POR LOS ANDRÓGENOS	
Cáncer de ovario	Cáncer de mama
Cáncer endometrial	Osteoporosis
Artritis reumatoide	Enfermedades inflamatorias pélvicas
Embarazos ectópicos	Dismenorrea
Menorragia	Endometriosis
Anemia por deficiencia de fierro	

**ESQUEMA 1**  
**BIOSÍNTESIS DE ANDRÓGENOS**



La reacción 1 es catalizada por el complejo que rompe la cadena lateral del colesterol (Citocromo

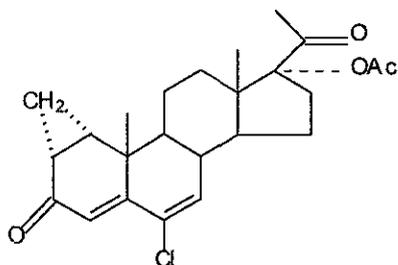
P<sub>450</sub>, C<sub>17</sub>)

La reacción 2 es catalizada por el citocromo P<sub>450</sub>, C<sub>17</sub>

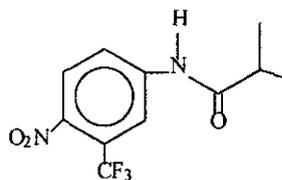
La reacción 3 es catalizada por la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

La reacción 4 es catalizada por la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

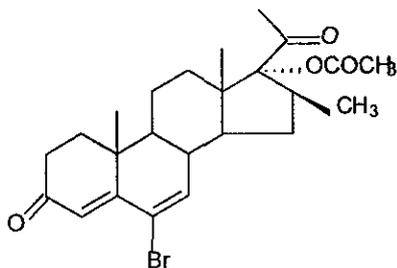
**ESQUEMA 3**  
**COMPUESTOS ANTIANDROGÉNICOS**



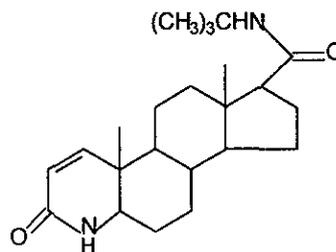
Acetato de Ciproterona  
(XI)



Flutamida  
(XII)



7 $\alpha$ -acetoxi-6-bromo-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona  
(XIII)



Finasterida  
(XIV)

## DISCUSIÓN

### RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

El compuesto objetivo sintetizado (fig. XXII, pág.11) posee algunas de las características previamente mencionadas (pág 2), para que una molécula posea actividad como antiandrógeno.

La reducción del doble enlace de la testosterona (fig. VII, pág. 8) en la posición  $\Delta^{4,5}$  en conjugación con el grupo carbonilo en C-3 es dependiente de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y NADPH, un ejemplo de ello es la conversión de testosterona a dihidrotestosterona<sup>23</sup> (fig VIII, pág. 8). En virtud de lo anterior, el compuesto XXI (pág. 11) posee las características estructurales antes mencionadas, por lo que también puede ser reducido por la misma enzima.

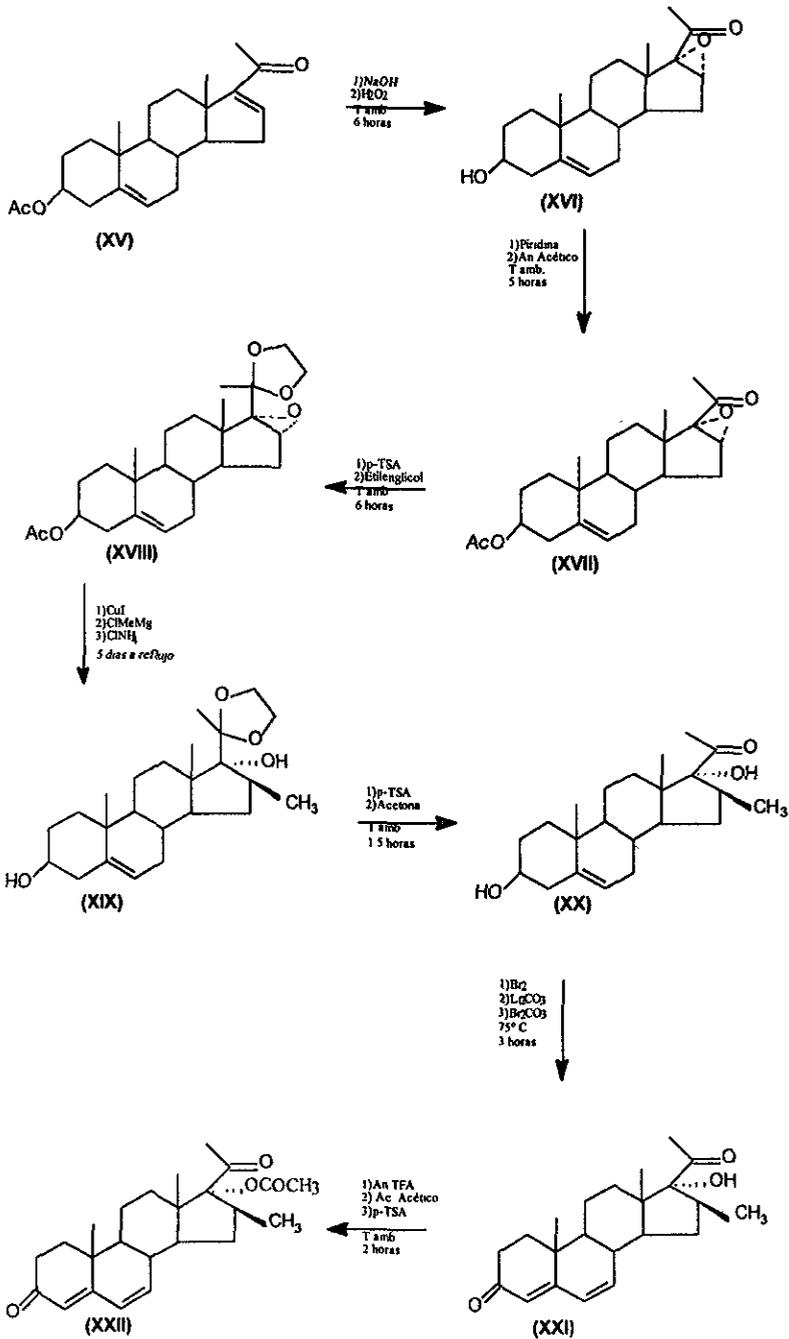
La introducción del grupo metilo en C-16 (compuesto XIX, pág. 11) nos hace pensar que los derivados alquilados son catabolizados lentamente por el hígado<sup>7</sup>, retardando así su inactivación catabólica y aumentando su acción biológica.

Para que una molécula posea actividad antiandrogénica se requiere de un grupo voluminoso en C-17.<sup>6</sup> Considerando lo anterior, se formó el éster acético en la misma posición (compuesto XXII, pág. 11).

Sin embargo se ha observado que a medida que aumenta la longitud de la cadena del ester, disminuye su acción biológica. Esto posiblemente se deba a que impide el acoplamiento de la molécula en cuestión con el sitio activo de la enzima.

Por otro lado, una esterificación del grupo hidroxilo en C-17 disminuye la polaridad de la molécula, retardando así su excreción<sup>24</sup> y facilitando la inmersión de la molécula en la membrana plasmática, que es de carácter lipofílico.

## RUTA DE SÍNTESIS



## RUTA DE SÍNTESIS

La materia prima, el acetato de 16-dehidropregnenolona, (fig. XV, pág. 11) presenta las siguientes características espectroscópicas: absorbe al UV a 240 nm, esto debido a la presencia de la cetona (C-20)  $\alpha,\beta$ -insaturada (C-16-C-17) (espectro N° 17, pág. 37).

En el espectro de IR (espectro N° 1, pág. 29), se observaron dos bandas en la zona del grupo carbonilo; en 1730 y 1662  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden al grupo carbonilo del acetilo en C-3 y a la cetona  $\alpha,\beta$  insaturada en C-20 respectivamente. También se observa en 1248  $\text{cm}^{-1}$  una banda intensa debido al flexionamiento del enlace C-O del éster en C-3. Se registran otras bandas en 2942 y 2864  $\text{cm}^{-1}$  características de la tensión en el enlace C-H de metilos y metilenos.

En lo concerniente al espectro de RMN (espectro N° 2, pág. 29), se observaron las siguientes señales: tres señales simples en 1.0, 1.2 y 2.1 ppm, que corresponden a los protones en C-19, C-18 y C-21, respectivamente, así como en 2.3 ppm, que corresponden al metilo del grupo acetilo en C-3. Se registra una señal múltiple en 4.3 ppm asignada al protón del carbono base del grupo acetoxi en C-3. Se presenta una señal doble en 5.4 ppm perteneciente al protón vinílico en C-6, esta multiplicidad resulta del acoplamiento con el protón en C-7. Finalmente se observa un multiplete en 6.8 ppm del protón vinílico en C-16.

Partiendo del acetato de 16-dehidropregnenolona, (fig. XV, pág. 11), se obtuvo el compuesto 16- $\alpha$ -17- $\alpha$ -epoxi-3- $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (fig. XVI, pág 11). Mediante una reacción de epoxidación, se efectuó una adición *syn* de un átomo de oxígeno al doble enlace, llevando a la formación del isómero  $\alpha$ .<sup>25</sup>

Para obtener el producto deseado se hizo reaccionar peróxido de hidrógeno en medio básico, la base facilita la formación del anión hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ), con una eliminación posterior del  $\text{OH}^-$  se genera el epóxido deseado. En este paso también se lleva a cabo una reacción concomitante, en donde el grupo acetilo en C-3 sufre una hidrólisis básica, resultando en la formación del grupo hidroxilo en la misma posición.

Las constantes espectroscópicas son las siguientes:

En el espectro de IR (espectro N° 3, pág. 30) se observa una señal intensa correspondiente al epóxido en 805  $\text{cm}^{-1}$  y desaparece la señal en 1730  $\text{cm}^{-1}$  del acetoxi en C-3. Las bandas observadas en 2934 y 2867  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los grupos metilo y metileno. La banda del grupo OH, resultado de la hidrólisis del grupo acetilo en C-3 se observa en 3462  $\text{cm}^{-1}$  La banda registrada en 1692  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la cetona en C-20.

En el espectro de RMN (espectro N° 4, pág. 30) desaparece la señal del protón vinílico que correspondía a la insaturación en C-16 y se aprecian las siguientes señales: una señal simple en 3.3 ppm asignada al protón del carbono base del epóxido en C-16, una señal simple en 3.6 ppm que corresponde al protón del carbono base del alcohol en C-3, además de las señales de los protones en 0.9, 0.95 y 1.9 ppm asignados a los metilos C-19, C-18 y C-21, respectivamente. En 5.3 se observa una señal doble del protón vinílico en C-6.

Debido a que la estrategia sintética involucra una reacción de Grignard, los dos siguientes pasos consisten en la protección del grupo hidroxilo en C-3 y del grupo carbonilo en C-20.

Para la primera reacción se empleó anhídrido acético y piridina como catalizador. El efecto catalítico de la piridina ocurre por una reacción inicial del anhídrido con ésta y una posterior sustitución por parte del alcohol esteroideal para formar el derivado XVII (pág 11).<sup>15</sup>

El espectro de IR (espectro N° 5, pág. 31) indica la presencia de las señales características del grupo funcional éster en  $1736\text{ cm}^{-1}$  asignada al grupo carbonilo en C-3 y en  $1244\text{ cm}^{-1}$  de la vibración del enlace C-O. Se observa una banda en  $1702\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la cetona en C-20.

En el espectro de RMN (espectro N° 6, pág. 31) registra una señal simple en 1.1 ppm correspondiente a los protones en C-18 y C-19. Se observa una señal simple en 2.1 ppm del metilo del acetilo en C-3. La señal aguda en 3.7 ppm se asignó al protón del carbono base del epóxido en C-16. La señal múltiple registrada en 4.8 ppm corresponde al protón del carbono base del grupo acetoxi en C-3. Se presenta una señal doble en 5.3 ppm que se asignó al protón en C-6.

Para lograr la síntesis de 3- $\beta$ -acetoxi-20-etilendioxi-16- $\alpha$ -epoxi-5-pregнено (fig XVIII, pág. 11), se hizo reaccionar la materia prima esteroideal con etilenglicol, tolueno, o-formiato de trimetilo y ácido p-toluensulfónico (p-TSA) como catalizador. El primer paso de esta reacción consistió en una protonación catalizada por el p-TSA al grupo carbonilo y el etilenglicol, un nucleófilo débil, ataca al carbonilo activado para formar un hemiacetal.

En el segundo paso el hemiacetal formado se convierte en el producto deseado al ser reemplazada una molécula de agua, que es captada por el o-formiato de trimetilo en este proceso reversible.<sup>16</sup>

El espectro de IR (espectro N° 7, pág. 32), como evidencia de la formación del dioxolano en C-20, refleja la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo cetónico en este carbono. Se observan únicamente las bandas características del grupo funcional éster sobre C-3 en  $1720\text{ cm}^{-1}$  y en  $1248\text{ cm}^{-1}$  asignadas al grupo carbonilo y al enlace C-O, respectivamente.

El espectro de RMN (espectro N° 8, pág. 32) muestra dos señales simples en 1.0 ppm y 1.1 ppm correspondiente a los protones en C-19 y C-18 respectivamente. Se observa una señal simple en 1.5 ppm asignando al metilo en C-20. Se registra una señal simple en 2.1 ppm perteneciente al metilo del grupo acetoxi sobre C-3. En 3.3 ppm se aprecia una señal simple correspondiente al protón del carbono base del epóxido en C-16. Como evidencia de la formación del grupo funcional etilendioxi deseado, se presenta una señal múltiple en 3.9 ppm asignado a los protones de los metilenos del dioxolano en C-20. En 4.6 ppm se registra una señal múltiple que pertenece al protón del carbono base del acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se observa una señal doble en 5.3 ppm que se asignó al protón en C-6.

La síntesis de 3- $\beta$ -17- $\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi-16- $\beta$ -metil-5-pregнено (fig. XIX, pág. 20) involucra dos reacciones. Una es la apertura del epóxido mediante una sustitución  $S_N^2$  sobre el C-16 y la segunda es la hidrólisis del acetoxi en C-3 <sup>16,17</sup> Lo anterior fue logrado al mezclar el derivado XVIII, (pág. 11) yoduro de cobre y cloruro de metilmagnesio disuelto en THF, este disolvente tiene pares de electrones libres (pero no grupos hidroxilo) que pueden ser compartidos con el magnesio, lo cual estabiliza al reactivo y facilita su disolución.

En la primera reacción se observa una ruptura nucleofílica del epóxido cuando se trata con el reactivo de Grignard, éste reacciona principalmente con el átomo de carbono menos sustituido, el C-16. El metilo nucleofílico del reactivo se une al C-16 y el magnesio o electrófilo se une al oxígeno para formar un alcóxido de magnesio en la posición 17.

En la segunda reacción, la adición de la parte orgánica del reactivo de Grignard al carbono carbonílico en C-3, conduce a un alcohol que reaccionará con una segunda molécula de Grignard y a la formación de un alcóxido de magnesio en C-3.

Para obtener el producto deseado se procede a la hidrólisis de ambos alcóxidos, tratando de evitar la formación del compuesto 3- $\beta$ -hidroxi-16- $\beta$ -metil-20-etilendioxi-5,16-pregnadien-20-ona, un alqueno formado por la deshidratación del alcohol en C-17. <sup>19</sup>

El espectro de IR (espectro N° 9, pág. 33) muestra la presencia de una banda ancha en  $3501\text{ cm}^{-1}$ , asignada al hidroxilo en C-17, generado por la apertura del epóxido. La banda que se observa en  $3408\text{ cm}^{-1}$  corresponde al OH resultado de la hidrólisis del grupo acetilo en C-3 y por lo tanto se aprecia la desaparición de señales en la zona del grupo carbonilo.

El espectro de RMN (espectro N° 10, pág. 33) presenta dos señales simples en 0.87 ppm y 0.98 ppm correspondientes a los protones en C-19 y C-18 respectivamente. Se observa una señal doble en 1.17 ppm, como evidencia de la introducción del grupo metilo en C-16, esta multiplicidad resulta del acoplamiento de este metilo con el protón en C-16. La señal simple

observada en 1.37 ppm corresponde al metilo del dioxolano sobre C-20. Se presenta en 3.5 ppm una señal múltiple debido al acoplamiento del protón base del carbono del alcohol en C-3 con los protones en C-2 y C-4. La señal múltiple registrada en 4.0 ppm pertenece a los metilenos del grupo etilendioxi sobre C-20. En la zona de protones vinílicos se observa una señal doble en 5.4 ppm perteneciente al protón vinílico en C-6.

El siguiente paso de la síntesis consistió en la desprotección del grupo carbonilo en C-20 mediante la hidrólisis del dioxolano, para generar el compuesto XX (pág.11). Los cetales resultan fácilmente eliminados a temperatura ambiente con ácido p-toluensulfónico como catalizador y acetona como disolvente y reactivo, a través de un mecanismo de transceñilación para la regeneración del grupo carbonilo.<sup>25</sup>

El espectro de IR (espectro N° 11, pág. 34) exhibe una banda intensa en la zona de alcoholes en  $3366\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al traslapamiento de las señales de los grupos hidroxilo en C-3 y C-17. Se observa una señal intensa en  $1692\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo de la cetona en C-20 que se regeneró por la hidrólisis del dioxolano.

El espectro de RMN (espectro N° 12, pág. 34) muestra la ausencia de la señal múltiple en 4.0 ppm que pertenecía a los metilenos del dioxolano hidrolizado. Aparece en 0.7 y 0.9 ppm dos señales simples asignadas a los metilos en C-19 y C-18 respectivamente. Aparece una señal doble en 1.0 ppm que corresponde al metilo en C-16. En 2.1 ppm se presenta una señal simple perteneciente al metilo C-21. En 3.3 ppm se registra una señal múltiple que se asignó al protón del carbono base del alcohol en C-3. Se observa en 5.2 ppm una señal doble en 5.2 ppm característica para el protón vinílico en C-6.

Para lograr la formación del sistema 4,6-dien-3-ona en el compuesto XXI, (pág. 11) se empleó la técnica oxidativa de bromación-dehidrobromación de Shapiro<sup>21</sup>. Se empleó como agente oxidante bromuro disuelto en dioxano, en presencia de bromuro de litio y carbonato de litio, para sustraer el protón alílico en C-4, obteniéndose como producto el sistema deseado.

La formación del cromóforo en 4,6-dien-3-ona se elucidó por la presencia de un máximo de absorción en 284 nm, en el espectro de UV (espectro N° 18, pág. 37).

El espectro de IR (espectro N° 13, pág. 35) presenta una señal en la zona de alcoholes en  $3446\text{ cm}^{-1}$  asignada al hidroxilo en C-17. Se observa la existencia de dos señales en la zona de carbonilos, una de ellas en  $1702\text{ cm}^{-1}$  asignada a la cetona  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$  insaturada en C-3 y la segunda en  $1682\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo de la cetona en C-20

El espectro de RMN (espectro N° 14, pág. 35) mostró dos señales simples en 1.0 y 1.1 ppm que fueron asignados a los metilos C-19 y C-18

respectivamente, así como una señal doble en 1.2 ppm correspondiente al protones en C-16. La señal intensa observada en 2.1 ppm se asignó al metilo C-20. Se aprecian dos señales simples en 5.7 y 6.1 ppm asignadas al protón vinílico en C-6 y al traslapamiento del protón vinílico en C-4 y C-7 respectivamente. Las señales observadas en 3.5 y 5.4 ppm son restos de materia prima contaminante.

Para lograr la obtención del compuesto XXII (pág 11), se realiza una esterificación del alcohol en la posición 17, que resulta ser poco reactivo debido al impedimento estérico que presenta.<sup>8</sup>

Primeramente se mezcló ácido acético con anhídrido trifluoracético, que es un excelente catalizador debido al papel del grupo trifluoracetilo para aumentar la reactividad del ácido carboxílico frente a la esterificación.<sup>4,21</sup>. La reacción implica la formación inicial del anhídrido mixto que reaccionará posteriormente con el alcohol en C-17, obteniéndose así el producto deseado.

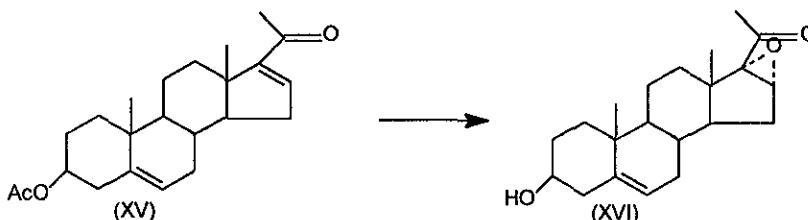
El último compuesto sintetizado muestra un máximo de absorción en 287 nm en el espectro de U.V, debido a la presencia del sistema 4,6-dien-3-ona (espectro N° 19, pág. 37).

El espectro de IR (espectro N° 15, pág. 36) presenta señales características de los grupos carbonilo; en  $1664\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la cetona  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$  insaturada, otra señal aparece en  $1730\text{ cm}^{-1}$  como evidencia de la esterificación del hidroxilo en C-17, así como también la señal intensa en  $1254\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-O del éster.

El Espectro de RMN (espectro N° 16, pág. 36) muestra dos señales simples en 0.78 y 1.1 ppm asignadas a los protones en C-19 y C-18 respectivamente. Se observa una señal doble en 1.2 ppm que corresponde al metilo en C-16, la multiplicidad se debe al acoplamiento con el protón en C-16. Se aprecia una señal simple en 1.9 ppm asignada al metilo C-20. Se registra una señal simple en 2.1 ppm, la cual se asignó a el grupo metilo del acetoxi en C-17. La señal simple que se presenta en 5.6 ppm se asignó al protón vinílico en C-6 y la señal simple en 6.1 ppm corresponde al traslapamiento de las señales de los protones vinílicos en C-4 y C-7.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Síntesis de 16- $\alpha$ -17- $\alpha$ -epoxi-3- $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona.



Se disolvió en 40 mL de metanol caliente 1 g de acetato de 16-dehidropregnenolona (fig. XV, pág. 11). Posteriormente se adicionó 2 mL de una solución 4N de NaOH. Se agitó durante 10 minutos, concluido este tiempo se agregó 4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %. La mezcla de reacción permaneció en agitación continua durante 6 horas a temperatura ambiente. La transformación de la materia prima se detectó por cromatografía en capa fina(c.c.f.).

Concluido el tiempo de la reacción se eliminó el metanol a presión reducida, se disminuyó la temperatura a 4°C, por último se filtró al vacío y se lavó con H<sub>2</sub>O hasta pH neutro.

p.f.182-185 °C.

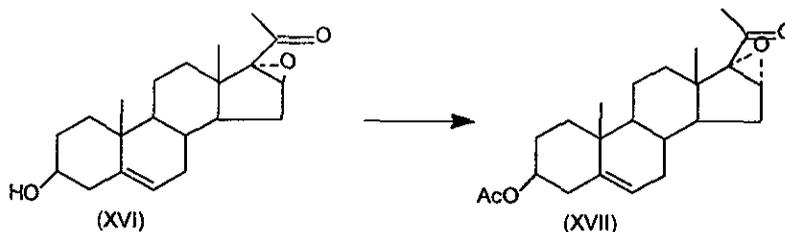
Peso molecular 330 g/mol

Rendimiento:(0.91 g) que corresponde al 99% del rendimiento teórico.

## CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

IR max (KBr) 3462, 2934, 2867, 1692 y 850 cm<sup>-1</sup>. RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta$ =0.9(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-19)  $\delta$ =0.95(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-18)  $\delta$ =1.9(3H, s, CH<sub>3</sub> en C-20)  $\delta$ =3.3(1H, s, protón base del epóxido en C-16)  $\delta$ =3.6(1H, s, base de OH en C-3)  $\delta$ =5.3(1H, d, protón vinílico en C-6).

## Síntesis de 3- $\beta$ -acetoxi-16- $\alpha$ -17- $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona.



Se disolvió 1 g de 16- $\alpha$ -17- $\alpha$ -epoxi-3- $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (fig. XVI, pág. 11) en 5 mL de piridina. Luego de la disolución total, se agregó 10 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 5 horas a temperatura ambiente. La transformación de la materia prima se detectó por cromatoplaca. Posteriormente, se vertió poco a poco la mezcla de reacción sobre un vaso de precipitados de 100 mL con hielo, se mantuvo la agitación 10 minutos y se filtró al vacío. El precipitado obtenido se lavó con H<sub>2</sub>O hasta que ya no se percibía el olor característico de la piridina.

p.f. 157-159 °C

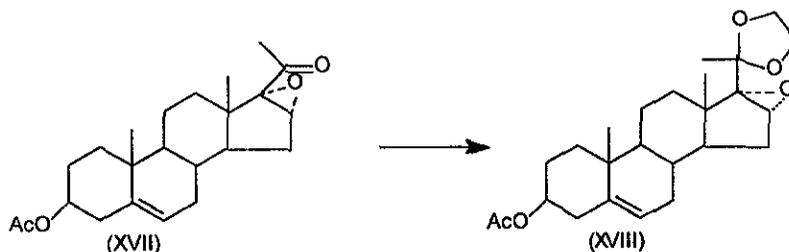
Peso molecular 372 g/mol

Rendimiento: (1.1 g) que corresponde al 99.5 % del rendimiento teórico.

### CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

IR max (Kbr) 2936, 2856, 1736, 1702, 1244 cm<sup>-1</sup>. RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, TMS)  
 $\delta$ =1.1(6H,s;CH<sub>3</sub>,C-18,C-19)  $\delta$ =2.1(6H, s,CH<sub>3</sub> del acetilo en C-3)  $\delta$ =3.7(1H,s, protón base del epóxido en C-16)  $\delta$ =4.8 (1H, m, protón base del acetilo en C-3)  $\delta$ =5.3 ( 1H, d, protón vinílico en C-6).

## Síntesis de 3-β-acetoxi-20-etilendioxi-16-α-epoxi-5-pregнено.



Se disolvieron en 5 mL de tolueno 1 g de 3-β-acetoxi-16-α-17-α-epoxi-5-pregnen-20-ona (fig. XVII, pág. 11) y 30 mg de ácido p-toluensulfónico, previamente secado durante una hora a 40°C. Posteriormente se agregó en condiciones anhidras 3 mL de etilenglicol y la cantidad necesaria para formar una sola fase (de 3 a 4 mL) de o-formiato de trimetilo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La transformación de la materia prima se detectó por c.c.f.

Concluido el tiempo de la reacción se adicionaron 40 mg de acetato de sodio y se agitó durante 5 minutos más.

La mezcla de reacción se trasladó a un embudo de separación. Se adicionó 50 mL de cloroformo, después se efectuaron cuatro lavados con 100 mL de H<sub>2</sub>O cada uno. Se verificó que el pH de la última porción acuosa fuera neutro. Finalmente, de la fase clorofórmica se eliminaron las trazas de agua con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida.

p.f. 192-194 °C

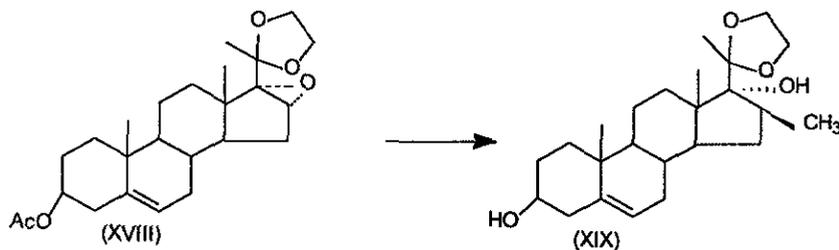
Peso molecular 416 g/mol

Rendimiento: (0.83 g) que corresponde al 75 % del rendimiento teórico.

### CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA.

IR max (KBr) 2942, 2884, 1720, 1248, 1466 cm<sup>-1</sup>. RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, TMS) δ=1.0(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-19) δ=1.1(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-18) δ=1.5(3H, s, CH<sub>3</sub> en C-20) δ=2.1(3H, s, CH<sub>3</sub> del acetilo en C-3) δ=3.3(1H, s, protón base del epóxido en C-16) δ=3.9 (4H, m, metilenos del dioxolano en C-20) δ=4.6 (1H, m, protón base del acetilo en C-3) δ=5.3 (1H, d, protón vinílico en C-6).

## Síntesis de 3-β-17-α-dihidroxi-20-etilendioxi-16-β-metil-pregнено.



Se mezcló 1 g de 3-β-acetoxi-20-etilendioxi-16-α-epoxi-5-pregнено (fig. XVIII, pág 11), 400 mg de yoduro de cobre (I) y 11 mL de una solución 3M de cloruro de metilmagnesio disuelto en tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 5 días bajo atmósfera de nitrógeno. Concluido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió poco a poco en un embudo de separación que contenía hielo y 10 mL de una solución saturada de cloruro de amonio. Se realizaron tres extracciones, utilizando en cada una de ellas 200 mL de cloroformo. La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro. A esta fase se le eliminaron las trazas de agua con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por recristalización de metanol.

p.f. 164-168 °C

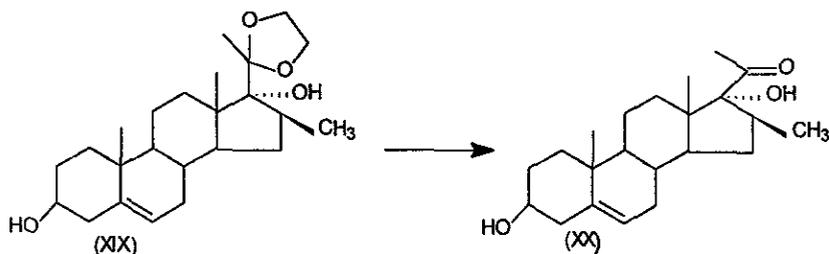
Peso molecular 390 g/mol

Rendimiento: (0.56 g) que corresponde al 60 % del rendimiento teórico.

### CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA.

IR max (KBr) 3501, 3408, 2956, 1666, 1463, 1376  $\text{cm}^{-1}$ . RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta=0.87$  (3H, s, CH<sub>3</sub>, C-19)  $\delta=0.98$  (3H, s, CH<sub>3</sub>, C-18)  $\delta=1.17$  (3H, d, CH<sub>3</sub> en C-16)  $\delta=1.37$  (3H, s, CH<sub>3</sub> en C-20)  $\delta=3.5$  (1H, m, protón base del OH en C-3)  $\delta=4.0$  (4H, m, metilenos del etilendioxi en C<sub>20</sub>)  $\delta=5.4$  (1H, d, protón vinílico en C-6).

## Síntesis de 3- $\beta$ ,17 $\alpha$ - dihidroxi-16- $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona.



Se disolvieron 1 g de 3- $\beta$ -17- $\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi-16- $\beta$ -metilpregneno (fig. XIX, pág. 11) y 500 mg de ácido p-toluensulfónico en 40 mL de acetona. Se mantuvo la agitación durante una hora y media a temperatura ambiente. La transformación de la materia prima se detectó por c.c.f. Después se adicionó agua a la mezcla de reacción y se evaporó completamente la acetona. Posteriormente se disminuyó la temperatura a 4°C, se filtró al vacío y se lavó con agua hasta pH neutro.

p.f 228-230 °C

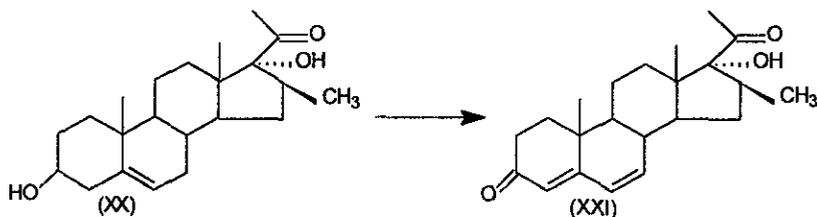
Peso molecular 346 g/mol

Rendimiento:(0.84 g) que corresponde al 95 % del rendimiento teórico.

### CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA.

IR max (KBr) 3366, 2996, 2852, 1692, 1450  $\text{cm}^{-1}$ . RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, TMS)  
 $\delta$ =0.72(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-18 )  $\delta$ =0.9(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-19 )  $\delta$ =1.0(1H, d, CH<sub>3</sub> en C-16)  
 $\delta$ =2.1(3H, s, CH<sub>3</sub> en C-20 ),  $\delta$ =3.3(1H, m, protón base del OH en C-3)  
 $\delta$ =5.2(1H, d, protón vinílico en C-6).

## Síntesis de 17- $\alpha$ -hidroxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.



Se mezclaron 1 g de 3- $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxi-16- $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona (fig. XX pág. 11), 2.9 g de carbonato de litio, 2 g de bromuro de litio y 13.6 mL de dimetilformamida (DMF), se agitó y se calentó hasta 60°C.

A la mezcla anterior se adicionó gota a gota una solución de 0.3 mL de bromuro disuelto previamente en 6 mL de dioxano. Se aumentó entonces la temperatura a 75°C manteniéndola durante tres horas con agitación constante. La transformación de la materia prima se detectó por cromatografía en capa fina(c.c.f.).

Finalizada la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró al vacío las sales de carbonato y bromuro de litio. Las sales se lavaron con el volumen necesario de DMF, para que recuperaran su color blanco original. Al filtrado se le adicionó cuatro veces el volumen empleado de DMF para lavar las sales de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  y  $\text{Br}_2\text{CO}_3$  de una solución de 0.3 g de bisulfito de sodio y 0.3 g de bicarbonato de sodio disueltos en 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Se disminuyó posteriormente la temperatura a 4°C, se filtró al vacío y se lavó con agua hasta pH neutro.

p.f. 212-215 °C

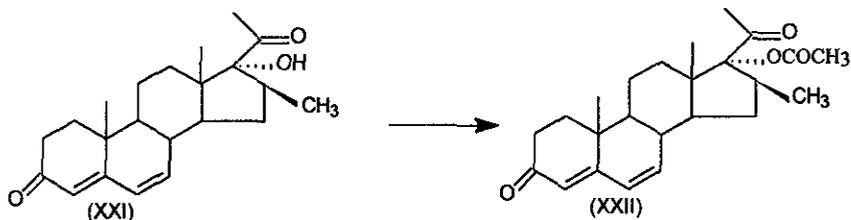
Peso molecular 354 g/mol

Rendimiento: (0.71 g) que corresponde al 70 % del rendimiento teórico.

### CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA.

$\lambda_{\text{max}}$  284 nm. IR max (KBr) 3436, 2938, 2864, 1702, 1682  $\text{cm}^{-1}$ . RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta$ =1.0(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-19)  $\delta$ =1.1(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-18)  $\delta$ =1.2(3H, d, CH<sub>3</sub> en C-16)  $\delta$ =2.1(3H, s, CH<sub>3</sub> en C-20)  $\delta$ =5.7(1H, s, protón vinílico en C-6)  $\delta$ =6.1(1H, s, protones en C-4 y C-7).

## Síntesis de 17- $\alpha$ -acetoxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona



Se mezclaron 0.01 g de ácido-p-toluensulfónico previamente secado a 40°C durante una hora, 0.6 mL de anhídrido trifluoroacético y 0.078 mL de ácido acético, esta mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó gota a gota 0.1 g de 17- $\alpha$ -hidroxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (fig XXI, pág. 20) previamente disuelto en 5 mL de cloroformo, se mantuvo la agitación durante una hora a temperatura ambiente. La transformación de la materia prima se detectó por c.c.f.

Finalizado el tiempo de la reacción, se agregó 20 mL de H<sub>2</sub>O, posteriormente se adicionó poco a poco la cantidad necesaria de bicarbonato de sodio hasta que el pH fuera neutro. La mezcla anterior se trasladó a un embudo de separación y se lavó la fase orgánica tres veces con 30 mL de H<sub>2</sub>O, verificando que el pH de la última porción acuosa fuera neutro. Posteriormente a la fase clorofórmica se le eliminaron las trazas de agua con sulfato de sodio anhidro, y se eliminó el disolvente a presión reducida.

El producto final se purificó por placa preparativa, empleando como adsorbente gel de sílice y un sistema de elución 7:3 Hexano:acetato de etilo.

*p.f.* 185-187 °C

Peso molecular 396 g/mol

Rendimiento: (0.05 g) que corresponde al 50 % del rendimiento teórico.

### CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA.

$\lambda_{\max}$  284 nm. IR max (KBr) 2944, 2870, 1730, 1664, 1254 cm<sup>-1</sup>. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta$ =0.7(1H, s, CH<sub>3</sub>, C-19)  $\delta$ =0.9(3H, s, CH<sub>3</sub>, C-18)  $\delta$ =1.2(3H, d, CH<sub>3</sub> en C-16)  $\delta$ =1.9(3H, s, CH<sub>3</sub> en C-20)  $\delta$ =2.1(3H, s, CH<sub>3</sub> del acetoxi en C-17)  $\delta$ =5.6(1H, s, protón en C-6)  $\delta$ =6.1(1H, s, protones en C-4 y C-7).

## ENSAYO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

### INHIBICIÓN *in vitro* DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA.

La inhibición de la conversión de testosterona (fig. VII, pág.8) a productos 5 $\alpha$ -reducidos como la DHT (fig. VIII, pág. 8), fueron evaluados empleando testículo e hígado de rata como fuente de obtención de la enzima en cuestión.<sup>18</sup>

La actividad antiandrogénica de los derivados sintetizados se llevó a cabo tomando como parámetro la potencia antiandrogénica de los compuestos, de acuerdo a su capacidad para inhibir la actividad de la enzima 5 $\alpha$ - reductasa, tomando como 100 % el efecto observado para la finasterida (fig. XIV, pág. 9).

### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO DE PROTEINAS

Siguiendo técnicas de extracción de la enzima previamente reportadas en la literatura<sup>30</sup>, se dispuso de dos ratas wistar macho de 250 g de peso, sacrificándolas por desnucamiento. Inmediatamente, fueron extraídos el hígado y los testículos. Estos tejidos se homogeneizaron por separado en dos porciones de solución de KCl 0.17 m. El extracto se filtró y centrifugó a 15000 xg durante 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se saturó al 50% con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en frío, el precipitado formado se dializó en contra de 1 L de buffer Tris-HCl 50mM, pH 7.3 durante 24 horas. El dializado obtenido se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto concentrado de proteínas para realizar el ensayo enzimático. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C.

La proteína del extracto se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina sérica de bovino para construir la curva estándar. Este método involucra la unión del colorante azul brillante de coomassieG-250 a la proteína. La unión del colorante a la proteína provoca un desplazamiento en la longitud de absorción máxima de 465 nm (rojo) a 595 nm (azul).<sup>28</sup>

### CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA.

La cuantificación de la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa se realizó incubando 100  $\mu$ g de proteína del extracto concentrado obtenido, en un

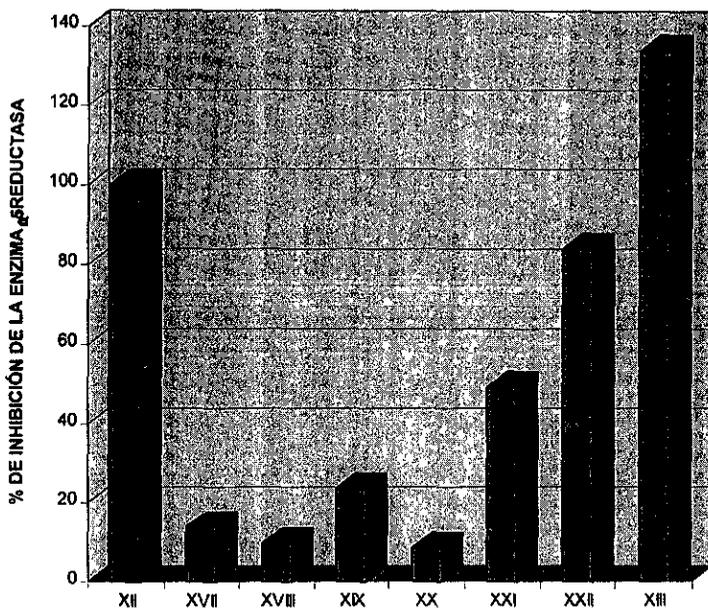
medio de reacción que contenía: 500 $\mu$ M de testosterona, 500 $\mu$ M de finasterida, buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7 y NADPH 100 $\mu$ M. Se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación y se determinó actividad antiandrogénica midiendo la variación de la absorbancia del NADPH a 340 nm. en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lamda 2. A esta longitud de onda el NADPH absorbe pero no el NADP<sup>+</sup>, por lo que los cambios en la oxidación pueden ser medidos.<sup>29</sup>

Se trabajaron al menos cuatro réplicas por tratamiento a una sola concentración (500  $\mu$ M), tanto de la finasterida como de los derivados sintetizados.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA
XII	100
XVII	13,9
XVIII	9,6
XIX	23,6
XX	8,6
XXI	49,4
XXII	83,9
XIII	134

GRAFICA 1 INHIBICIÓN *in vitro* DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA DE HÍGADO Y TESTÍCULO DE RATA



## CONCLUSIONES

A partir de un compuesto de origen natural, acetato de 16-dehidropregnenolona (fig. XV, pág. 11), se logró la síntesis y caracterización de las propiedades físicas y espectroscópicas de 17- $\alpha$ -acetoxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (fig. XXII, pág. 20). Este compuesto es un intermediario en la preparación de esteroides con una actividad antiandrogénica superior.

En lo concerniente a la evaluación de la actividad farmacológica, el compuesto XXII (pág. 11) resultó ser menos activo *in vitro* que la finasterida, ya que fue capaz de inhibir en un 83.9% la actividad enzimática. Sin embargo este compuesto es sólo un intermediario en la síntesis de antiandrógenos más potentes. Derivados siguientes como es 17- $\alpha$ -acetoxi-16- $\beta$ -metil-6-bromo-4,6-pregnadien-3,20-diona (fig. XIII, pág. 9), presenta una potencia superior (134%), con respecto a la finasterida.

La introducción de un halógeno en el C-6 interfiere con la resonancia usual de la cetona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturada, desestabilizando la molécula y disminuyendo la energía de activación necesaria para la transferencia del hidruro.

Lo anterior nos sugiere que los estudios realizados *in vitro*, son importantes en la predicción de la eficacia en estudios *in vivo*.

## NOTAS

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

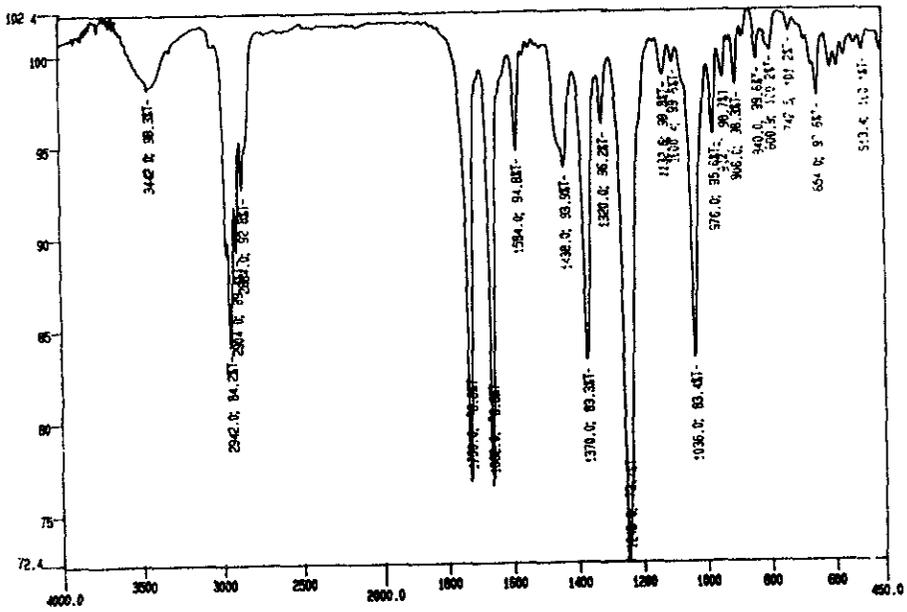
Los espectros de ultravioleta (UV) se realizaron en metanol como disolvente, en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer 202.

Los espectros de Infrarrojo (IR) se realizaron en pastillas de bromuro de potasio, en un espectrofotómetro de Infrarrojo Perkin-Elmer 337.

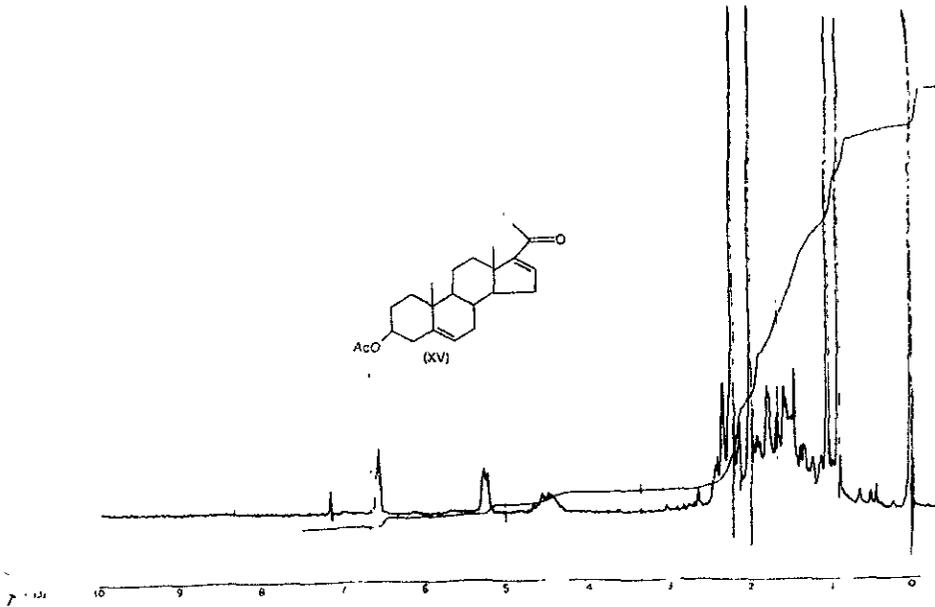
Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se realizaron en un espectrofotómetro Varian EM 390, utilizando como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

La purificación del producto final se realizó por cromatografía en placa fina, empleando gel de sílice Merca Art. 7730 Sílica Gel 60 GF. Se empleó un sistema de elución 7:3 n-hexano: acetato de etilo y como revelador luz UV  $\lambda$  245 nm.

La detección del punto final de la reacción se logró por cromatografía en capa fina, en cromatofolios de gel de sílice 60F<sub>254</sub> Merck, un sistema de elución 7:3 n-hexano: acetato de etilo y como revelador una solución de CoCl<sub>2</sub> al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

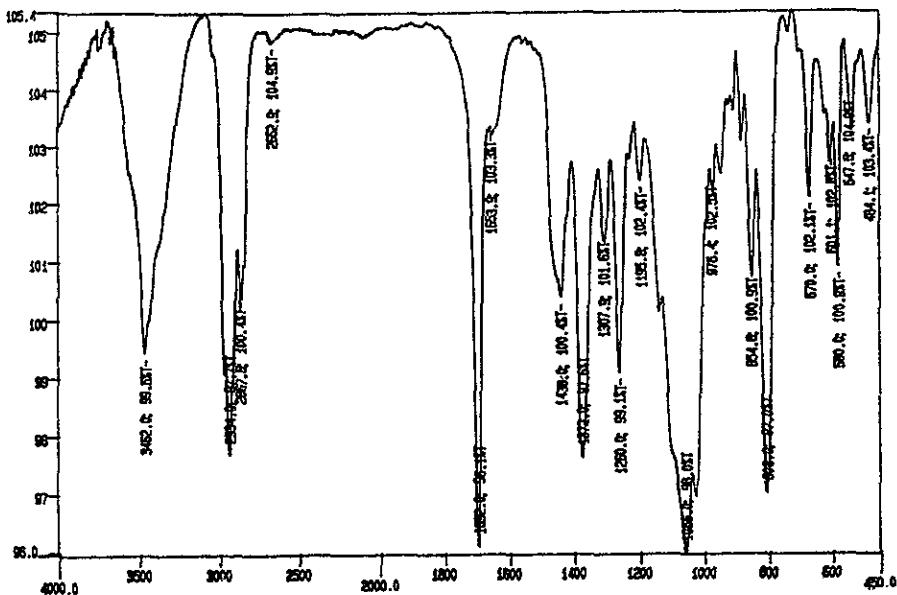


ESPECTRO N° 1

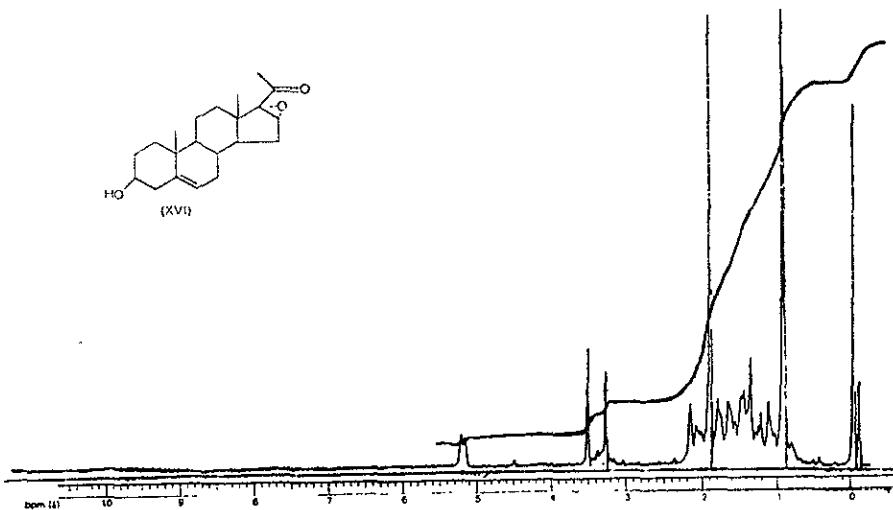
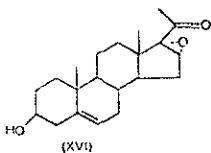


ESPECTRO N° 2

Acetato de 16-dehidropregnenolona.(XV)

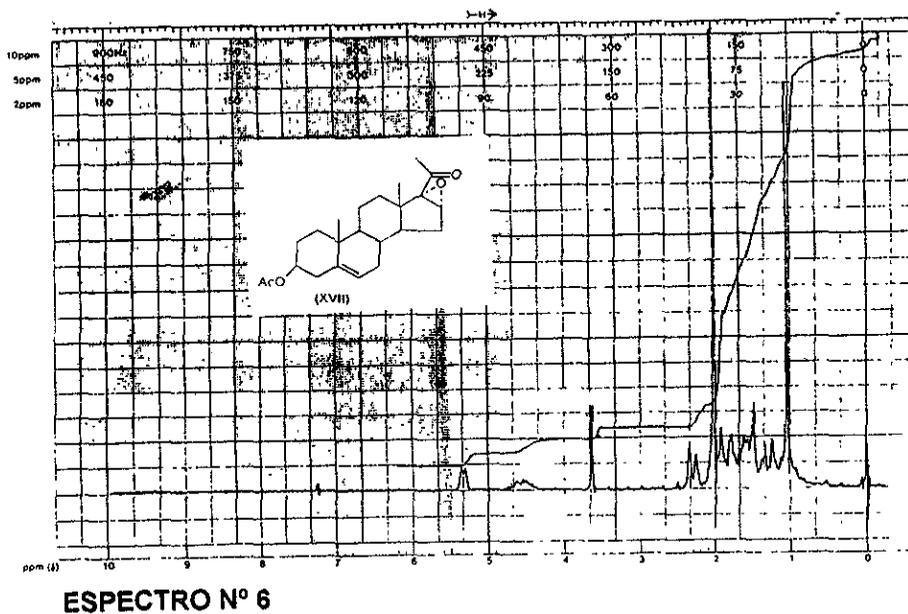
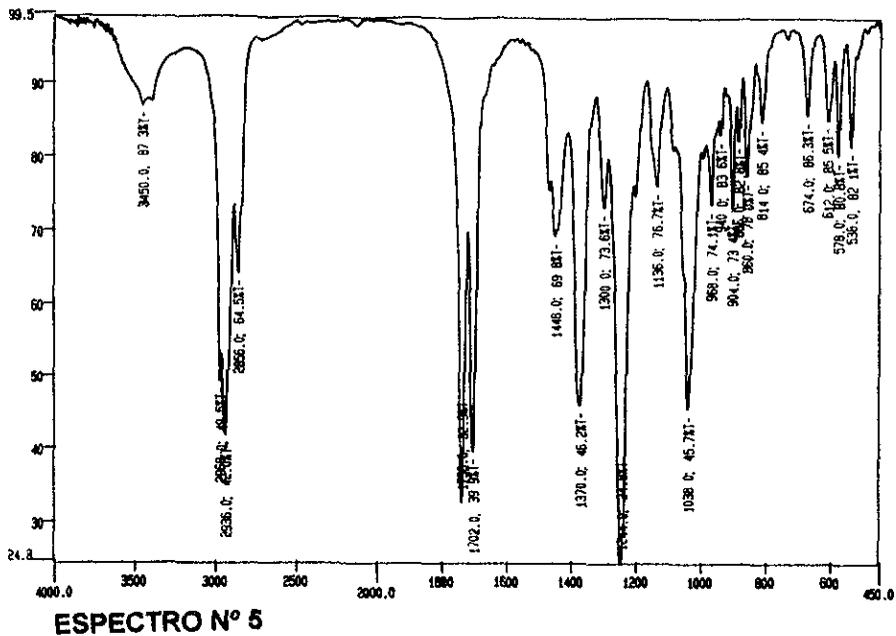


ESPECTRO N° 3

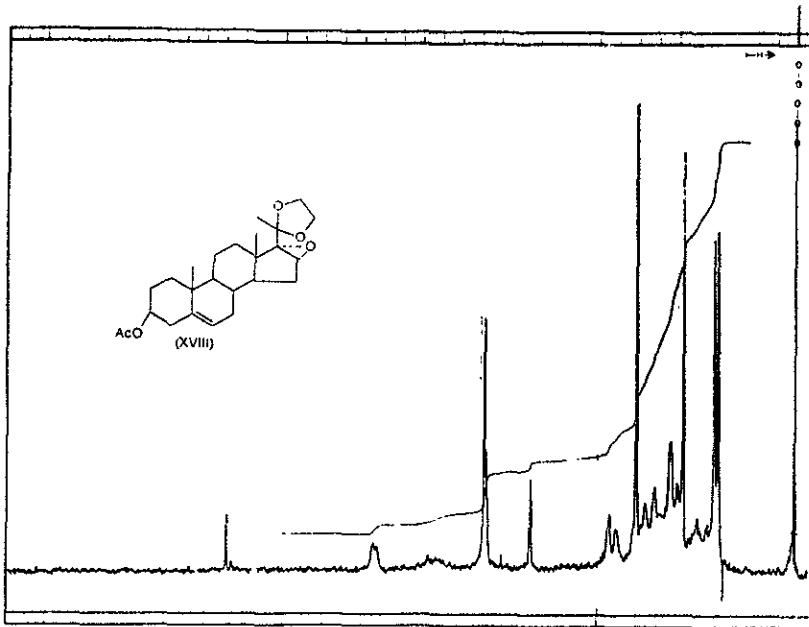
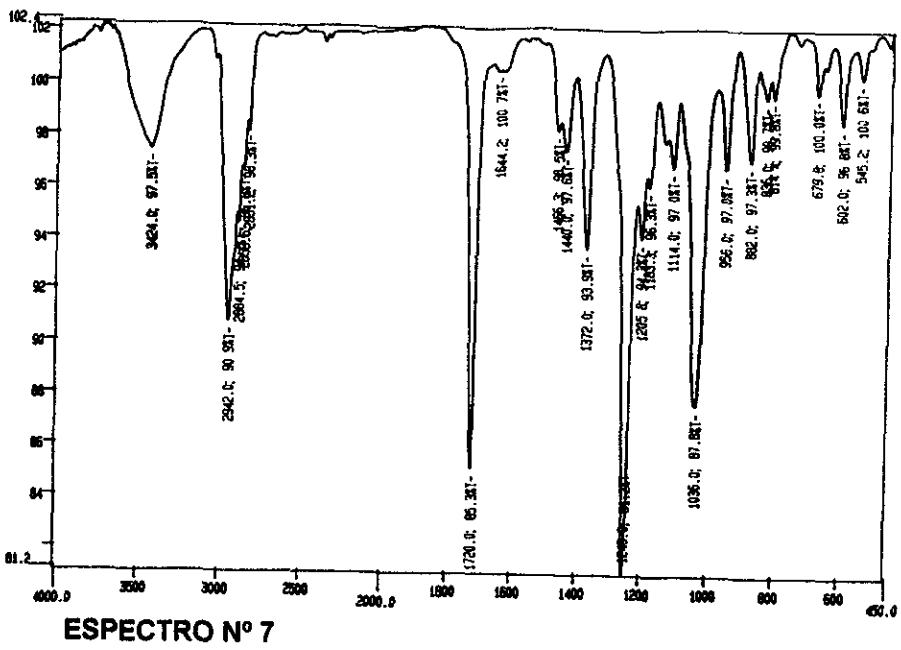


ESPECTRO N° 4

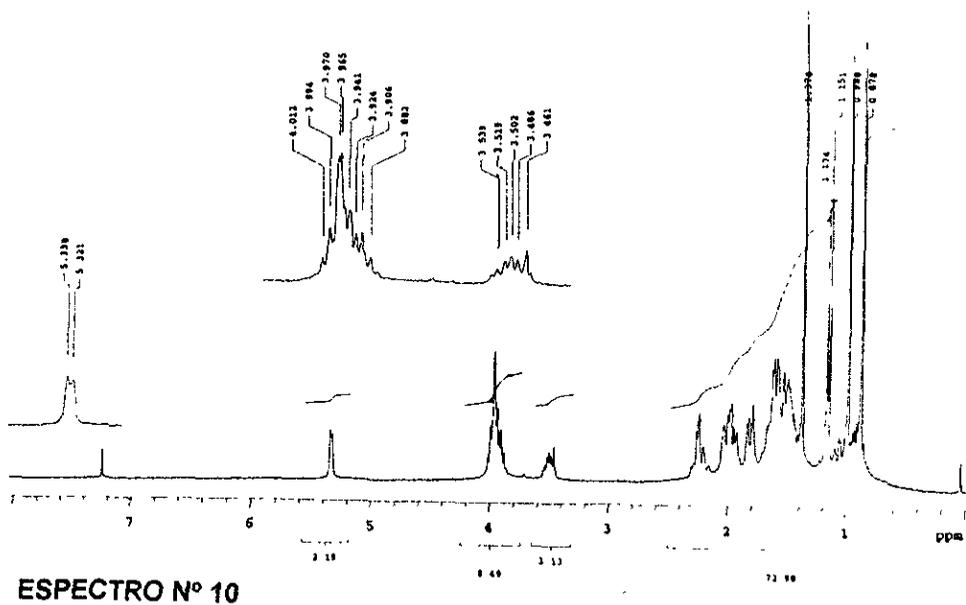
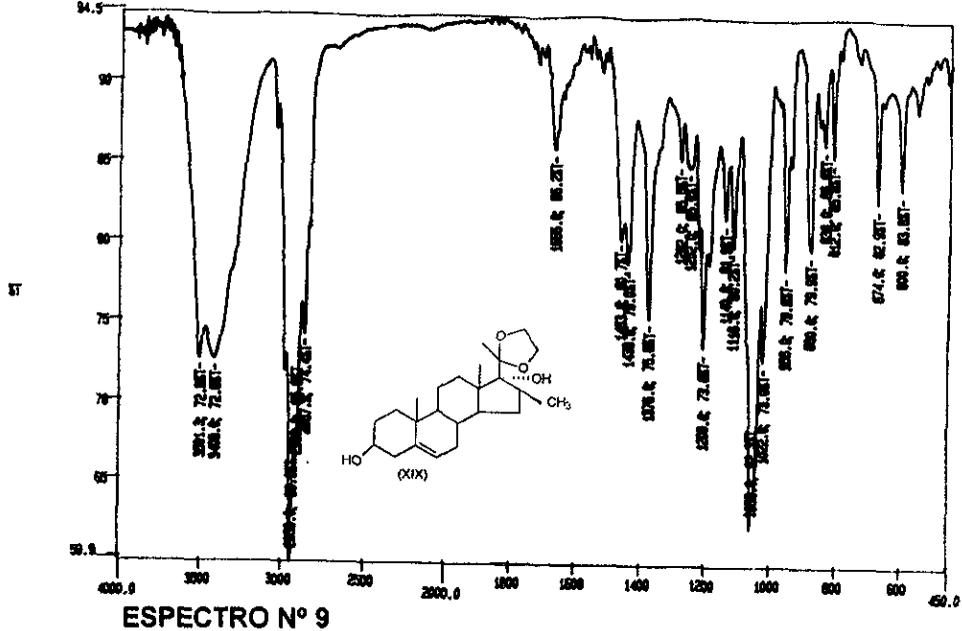
16- $\alpha$ -17- $\alpha$ -epoxi-3- $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (XVI)



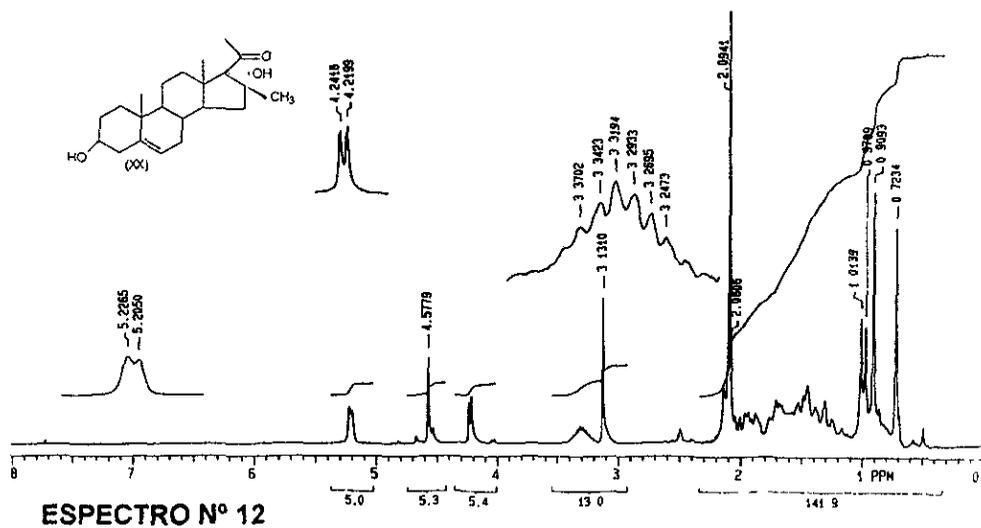
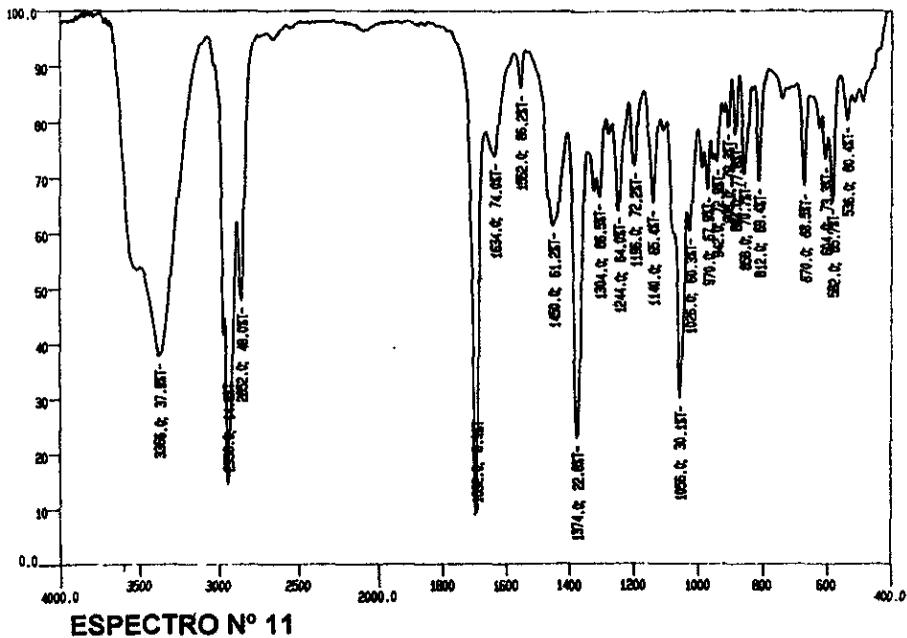
3-β-acetoxi-16-α-17-α-epoxi-5-pregnen-20-ona. (XVII)



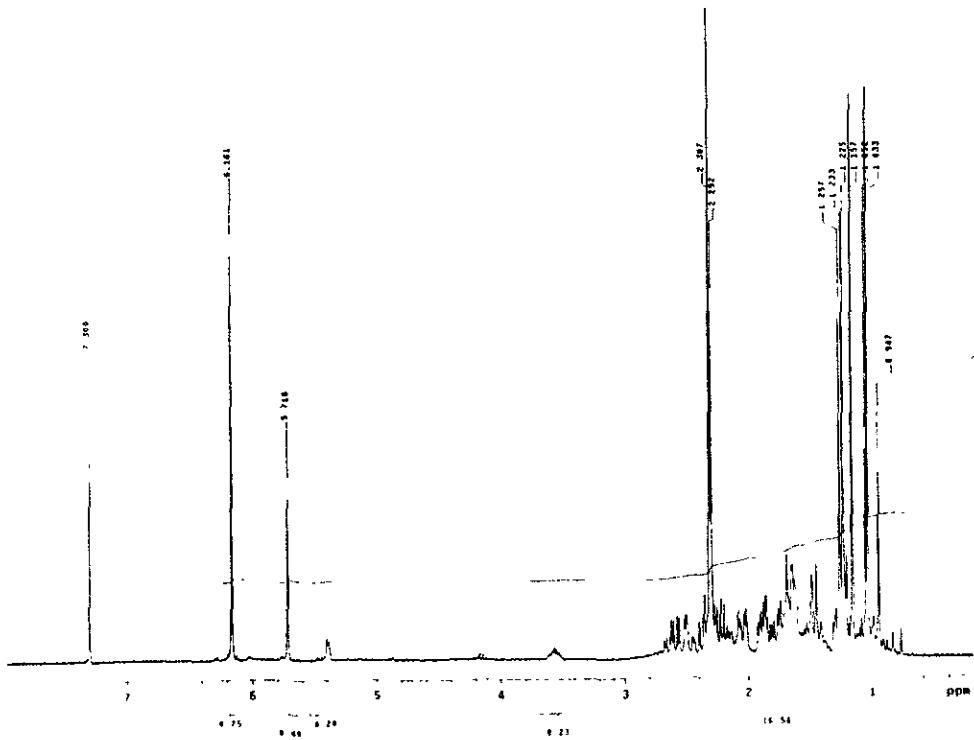
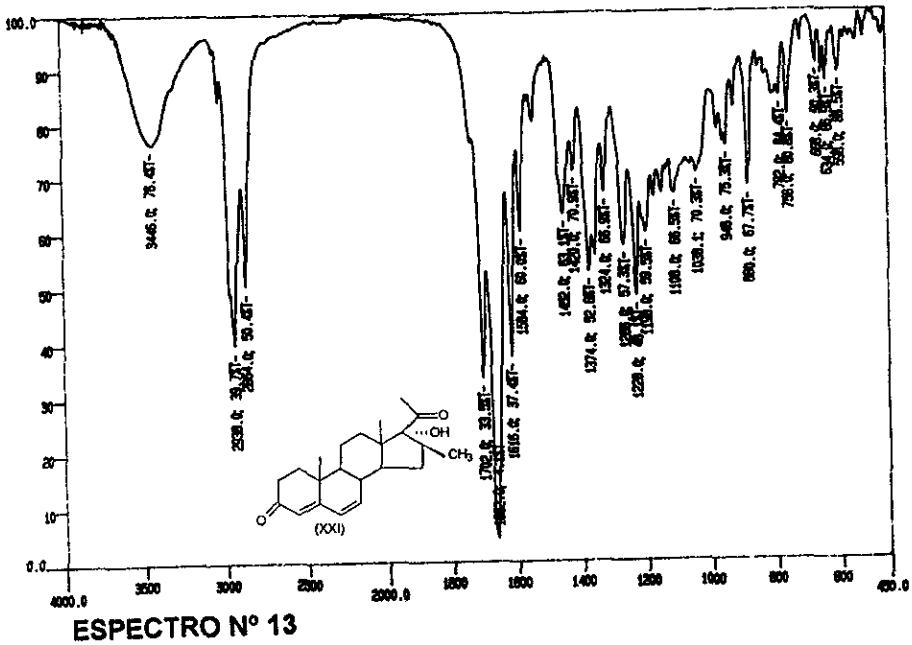
3-β-acetoxi-20-etilendioxi-16-α-epoxi-5-pregneno. (XVIII)



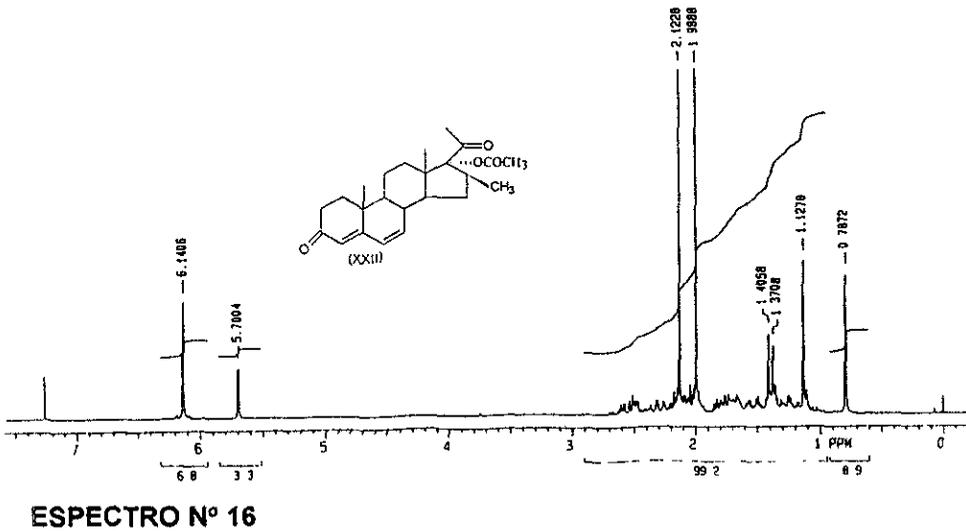
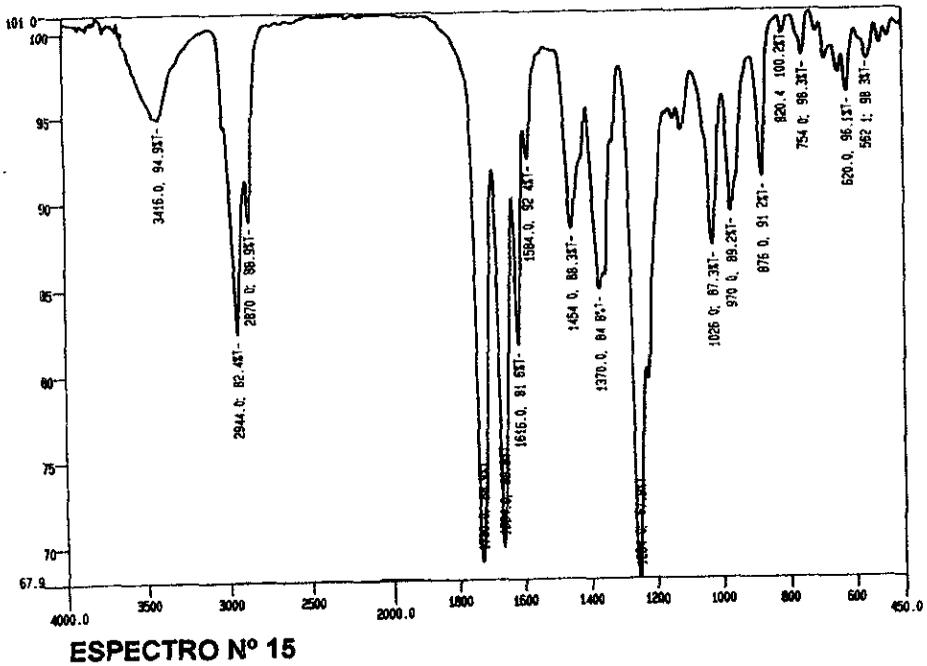
3-β-17-α-dihidroxi-20-etilendioxi-16-β-metil-5-pregneno. (XIX)



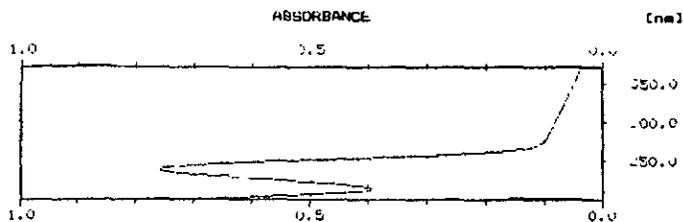
3-β-17-α-dihidroxi-16-β-metil-5-pregnen-20-ona. (XX)



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



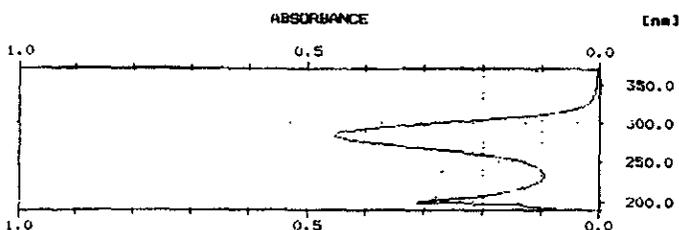
17- $\alpha$ -acetoxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (XXII)



**ESPECTRO N° 17**

WAVELENGTH	DATA
238.3 nm (MAX)	0.759 ABS
213.9 nm (MIN)	0.396 ABS

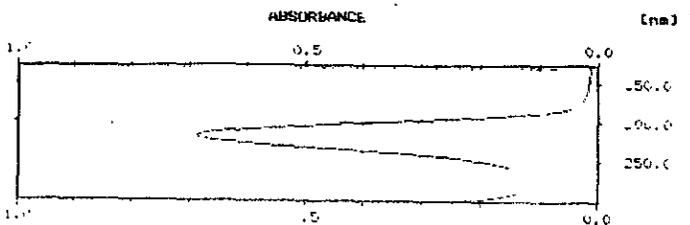
**Acetato de 16-dehidropregnenolona.(XV)**



**ESPECTRO N° 18**

WAVELENGTH	DATA
284.2 nm (MAX)	0.455 ABS

**17- $\alpha$ -hidroxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (XXI)**



**ESPECTRO N° 19**

WAVELENGTH	DATA
282.7 nm (MAX)	0.687 ABS
220.2 nm (MIN)	0.118 ABS

**17- $\alpha$ -acetoxi-16- $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (XXII)**

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Bull H., García M., Anderson S., 1996. "Mechanism based inhibition of human steroid 5 $\alpha$ -reductase by finasteride". *J Am Chem Soc*, **118**: 2359-2365.
- 2.-Cousty B., Bergaud B., Bruyant M. 1994. "Preliminary pharmacokinetics and metabolism of novel non-steroidal antiandrogens in the rat: Relation of their systemic activity to the formation of a common metabolite". *J Steroid Biochem Mol Biol*. **51**: 47-55.
- 3.-Deghenghi R., Revez C., Gaudry R., 1962, "New synthesis and structure activity relationship in the 17-alkylated progesterone series". *J Am Chem Soc*. **84**: 301-304.
- 4.-Ege S., *Organic Chemistry: Structure and Reactivity.*, third ed. Edit. Heath and Company, 1994
- 5.-Figg W., Sator O., Cooper M., 1995., "Prostate specific antigen decline following the discontinuation of flutamide in patients with stage D2 prostate cancer". *Am j Med.*, **98**: 412-414.
- 6.-Flores Rodríguez G. 1992. Tesis: Síntesis de 17- $\alpha$ -butiroxi-6-bromo-1,4,6-pregnatrien 3,20 diona. UNAM.
- 7.-Goodman & Gilman, *The pharmacological basis of therapeutics*, Eighth ed. Edit. Pergamon Press, 1990.
- 8.-Jimeno Villalobos O. 1987, Tesis: Síntesis de ésteres de esteroides impedidos. UNAM.
- 9.-Jones E., 1995., "Androgenic effects of oral contraceptives implications for patient compliance". *Am J Med.*, **98**: 116s-199s.
- 10.-Kuil C. W. and Mulder E. 1995., "Effects of androgens on the conformation of the androge receptor". *Ann N Y Acad SCI*, **761**:351-357.
- 11.-Labrie F. 1994., "Prostate cancer" *Lancet.*, **346**: 1031-1032.
- 12.-Löken B., Kaufman B.; Rosenkranz S., Sondheimer G. 1956. "Steroids LXXVII: synthesis and reactions of 16 $\beta$ -oxigenated pregna-20-ona derivatives". *J Am Chem Soc*, **78**: 1738-1744.
- 13.-Matias J. and Martine G., 1995, "Local inhibition of sebaceous gland growth by topically applied RU-58841". *Ann N Y Acad SCI*, **761**:56-65.
- 14.-Martínez Velazco Anelly. 1997, Tesis: Síntesis de 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. UNAM.
- 15.-Mc Murry, *Química Orgánica.*, 1a ed., Editorial Iberoamericana.1994
- 16.-Morrison & Boyd *Organic Chemistry*, Sixth edition, Edit. Prentice Hall, 1992.
- 17.-Pine, E., *Química Orgánica*, 2a ed. Editorial Mc Graw Hill, 1988
- 18.-Salle E. di., Guidici D., Cominato C., Briatico G., Panzeri A., 1995. "Effects of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors on intraprostatic androgens in the rat". *J Steroid Biochem Mol Biol*. **53**: 381-385.
- 19.-Sánchez Arellano P. 1992, Tesis: Síntesis de 17- $\alpha$ -caproxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnadien 3,20 diona. UNAM.
- 20.-Schwartz J., 1994., " Pharmacodynamics of MK-0963, a new 5 $\alpha$ -reductase inhibitor". *Clin Pharm Ther.*, **55**: 50-54.

- 21.-Shapiro E., L. Weber L., Harris H., 1972. "Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehydro-16-methylene-17 $\alpha$ -hydroxyprogesterones". *J Med Chem*, 15c 716-720.
- 22.-Solomons, G. *Organic Chemistry*, Fifth edition., Edit. Jhon Willey & Sons.,1992.
- 23.-Thigpen A. E., Russel D. W., 1992 "4-Amino acid segment in steroid 5 $\alpha$ -reductase-1- confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor". *J Bio Chem*. 267: 8577-8583.
- 24.-Voet & Voet, *Bioquímica*, 2a de. Edit. Omega, 1992.
- 25.-Vollhardt, P., *Química Orgánica.*, 2a ed',Ediciones Omega, 1994.
- 26.-Wade L.G., *Organic Chemistry.*, Third edition Edit. Prentice Hall, 1995.
- 27.-Waxman H., 1995, "Antiandrogens in treatment of prostate cancer", *Lancet*. 346: 1030-1031.
- 28.-Bradford M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding", *Ann Biochem*, 72: 248-254.
- 29.-Passoneau J. et. al., *Enzimatic analysis: Apractical guide*, Edit. Humana Press, 1993.
- 30.-Frederikson. D. 1971, "Partial characterization of the nuclear reduced nicaotinamide adenine dinucleotide phosphate:  $\Delta^4$ -3-ketosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase of rat protaste", *J Bio Chem* , 246: 2584-2593.

ÉSTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA