

22

00570

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

1  
2Fj



**SÍNTESIS DE 6-BROMO- 16- BETA METIL- 17-ALFA  
PROPIONILOXI- 4, 6- PREGNADIEN- 3, 20 DIONA .**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**P R E S E N T A:**

**QUIM. GREGORIA FLORES RODRÍGUEZ**

L

**DIRECTOR: DR. EUGENE BRATOFF**

**MEXICO, D.F.**

**1999**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** Dr. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO  
**VOCAL:** Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA  
**SECRETARIO:** M. en C. JOSE MANUEL MÉNDEZ STIVALET  
**PRIMER SUPLENTE:** Dra. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS  
**SEGUNDO SUPLENTE:** Dra. CARMEN RIVERA MUÑOZ

### SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Farmacia. Conjunto E. Laboratorio 125  
División de Estudios de Posgrado  
Facultad de Química, U.N.A.M.

#### ASESOR:

Dr. Eugene A. Bratoeff Titter

*Eugene A. Bratoeff*

#### SUSTENTANTE:

Quim. Gregoria Flores Rodríguez

*Gregoria Flores Rodríguez*

**DEDICATORIAS :**

**CON TODO MI CARIÑO A :**

**A MI ESPOSO V. ANTONIO GUTIÉRREZ**

**A MI HIJO ERIC ALEJANDRO**

## **DÉDICO ESTE TRABAJO :**

**A mis padres ESTEBAN y ELVIRA**  
por el cariño y apoyo que siempre me  
han brindado.

**A mis hermanas TONY, INES y  
GABY** por compartir la vida y seguir  
adelante cada día.

**A los guerreros IRAYS, ALEJANDRO,  
EDUARDO y DANIEL,** que inician  
una vida.

Con gran cariño, respeto y admiración a mi asesor **Dr. EUGENE A. BRATOEFF,**  
por su gran apoyo, que con sus conocimientos y paciencia llevó a cabo la  
culminación de este trabajo y por representar un ejemplo digno a seguir. **GRACIAS**

# INDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN.....	i
II. ABSTRACT.....	ii
III. ABREVIATURAS.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Andrógenos.....	3
2.2. Los andrógenos en la fisiología de la próstata.....	5
2.3. Carcinoma de la próstata.....	7
2.4. Farmacología de los antiandrógenos.....	8
2.5. Relación estructura molecular-actividad biológica de los compuestos derivados del pregnano.....	14
2.6. Inhibidores de la Enzima 5 $\alpha$ -reductasa.....	17
2.7. Mecanismos de acción para los inhibidores de la Enzima 5 $\alpha$ -reductasa.....	19
3. Objetivos.....	22
4. Metodología.....	23
5. Parte Experimental.....	27
6. Análisis y discusión.....	35
6.1. Parte Química.....	35
6.2. Parte Biológica.....	62
6.2.1. Ensayo de la actividad biológica ( <i>In vitro</i> ).....	62
6.3. Resultados.....	67
7. Conclusiones.....	69
8. Espectroscopía.....	71
9. Bibliografía.....	105

# INDICE DE ESQUEMAS

	<b>Página</b>
Esquema No. 1 Diagrama de síntesis y liberación de Testosterona en el organismo .....	4
Esquema No. 2 Mecanismo de inactivación de la cadena lateral de la progesterona .....	16
Esquema No. 3 Conversión de Testosterona a Dihidrotestosterona. ....	17
Esquema No. 4 Mecanismo de reducción de la Testosterona a Dihidrotestosterona catalizada por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa .....	20
Esquema No. 5 Diagrama general de síntesis .....	26

# INDICE DE ESPECTROS

	Página
Espectro No. 1	Espectroscopia de UV del compuesto $3\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona. (18) . . . . . 71
Espectro No. 2	Espectroscopia de IR del compuesto $3\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona. (18) . . . . . 72
Espectro No. 3	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H del compuesto $3\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona. (18) . . . . . 73
Espectro No. 4	Espectroscopia de IR del compuesto $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- $3\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (19) . . . . . 74
Espectro No. 5	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H del compuesto $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- $3\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (19) . . . . . 75
Espectro No. 6	Espectroscopia de IR del compuesto $3\beta$ -acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona. (20) . . . . . 76
Espectro No. 7	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H del compuesto $3\beta$ -acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona. (20) . . . . . 77
Espectro No. 8	Espectroscopia de IR del compuesto $3\beta$ -acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno. (21) . . . . . 78
Espectro No. 9	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H del compuesto $3\beta$ -acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno. (21) . . . . . 79
Espectro No. 10	Espectroscopia de IR del compuesto $3\beta,17\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi- $16\beta$ -metil-5-pregneno. (22) . . . . . 80
Espectro No. 11	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H del compuesto $3\beta,17\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi- $16\beta$ -metil-5-pregneno. (22) . . . . . 81



Espectro No. 12	Espectroscopía de IR del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23) .....	82
Espectro No. 13	Espectroscopía de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23).....	83
Espectro No. 14	Espectroscopía de MASAS(EI <sup>+</sup> ) del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23) .....	84
Espectro No. 15	Espectroscopía de UV del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24) .....	85
Espectro No. 16	Espectroscopía de IR del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24) .....	86
Espectro No. 17	Espectroscopía de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24) .....	87
Espectro No. 18	Espectroscopía amplificada de RMN <sup>1</sup> H, zona 0.8-2.4 ppm del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24) .....	88
Espectro No. 19	Espectroscopía de MASAS(EI <sup>+</sup> ) del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24) .....	89
Espectro No. 20	Espectroscopía de UV del compuesto 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25) .....	90
Espectro No. 21	Espectroscopía de IR del compuesto 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25) .....	91
Espectro No. 22	Espectroscopía de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25) .....	92
Espectro No. 23	Espectroscopía amplificada de RMN <sup>1</sup> H, zona 0.8-2.8 ppm del compuesto 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25) .....	93

Espectro No. 24	Espectroscopía de <b>MASAS(EI<sup>+</sup>)</b> del compuesto 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25) . . . . .	94
Espectro No. 25	Espectroscopía de <b>UV</b> del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26) . . . . .	95
Espectro No. 26	Espectroscopía de <b>IR</b> del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26) . . . . .	96
Espectro No. 27	Espectroscopía de <b>RMN<sup>1</sup>H</b> del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26) . . .	97
Espectro No. 28	Espectroscopía de <b>MASAS(EI<sup>+</sup>)</b> del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26) . .	98
Espectro No. 29	Espectroscopía de <b>UV</b> del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) . . . . .	99
Espectro No. 30	Espectroscopía de <b>IR</b> del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) . . . . .	100
Espectro No. 31	Espectroscopía de <b>RMN<sup>1</sup>H</b> del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) . . . .	101
Espectro No. 32	Espectroscopía de <b>RMN<sup>13</sup>C</b> del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) . . . .	102
Espectro No. 33	Espectroscopía amplificada de <b>RMN<sup>13</sup>C</b> , zona 10-50 ppm del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) . . . . .	103
Espectro No. 34	Espectroscopía de <b>MASAS(EI<sup>+</sup>)</b> del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)	104

# INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura No. 1 Principales andrógenos producidos en el organismo. ....	3
Figura No. 2 PRÓSTATA, glándula en forma de nuez situada por de debajo de la vejiga .....	5
Figura No. 3 Asignación de los desplazamiento químicos del compuesto final (3) en RMN <sup>13</sup> C. ....	59
Figura No. 4 Evaluación farmacológica de los intermediarios y del compuesto final (3) .....	65
Figura No. 5 Correlación de los compuestos evaluados y el color de la barra de la gráfica. ....	66

# INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla No. 1 Acción de los andrógenos en el organismo .....	6
Tabla No. 2 Preparación de agentes cromógenos .....	24
Tabla No. 3 Propiedades físicas y espectroscópicas para la materia prima 3 $\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona. (18) .....	36
Tabla No. 4 Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (19) .....	39
Tabla No. 5 Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 3 $\beta$ -acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona. (20) .....	41
Tabla No. 6 Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 3 $\beta$ -acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno. (21) ...	43
Tabla No. 7 Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregneno. (22) ...	45
Tabla No. 8 Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23) .....	47
Tabla No. 9 Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24) .....	51
Tabla No.10 Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25) ..	54
Tabla No.11 Propiedades físicas para el intermediario 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ - metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26) .....	56
Tabla No.12 Datos espectroscópicos para el intermediario 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26) .....	57

Tabla No.13	Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto final 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) .....	60
Tabla No.14	Propiedades espectroscópicas de RMN <sup>13</sup> C para el compuesto final 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) .....	61
Tabla No.15	Propiedades espectroscópicas de MASAS(EI <sup>+</sup> ) del compuesto final 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3) .....	62

## I. RESUMEN

Los antagonistas androgénicos ofrecen un tratamiento útil para un gran número de enfermedades reguladas por los andrógenos tales como: cáncer de la próstata, hirsutismo, acné, seborrea, alopecia androgénica e hiperplasia prostática benigna. La aplicación terapéutica más importante de los antiandrogénicos se encuentra en el tratamiento del cáncer de la próstata y en la hiperplasia prostática benigna, que constituyen los principales problemas de salud en el varón de edad avanzada.

Aunque la cirugía representa actualmente el tratamiento más aceptado para el cáncer de próstata (400 000 prostatectomías ejecutadas cada año en los Estados Unidos), hay otras modalidades disponibles para el tratamiento de esta enfermedad, como puede ser la inhibición de la conversión de testosterona (1) a dihidrotestosterona (2) mediante el empleo de inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa.

Se ha observado que cuando la testosterona se reduce a su metabolito más activo la dihidrotestosterona, en presencia de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y NADPH (esquema 3, página 17) este metabolito está asociado a los desórdenes patológicos mencionados. Algunos investigadores sostienen que el sitio lógico de intervención terapéutica debe ser en este paso. Tomando en cuenta esta hipótesis y considerando que por lo menos 50% de los hombres mayores de 60 años de edad padecen de estas enfermedades, en este trabajo se describe la síntesis de "6-bromo-16-beta-metil-17-alfa-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona" (3) que constituye un nuevo compuesto con posible actividad antiandrogénica, evaluado como un inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -reductasa.

La actividad *in vitro* de este compuesto se determinó usando la enzima  $5\alpha$ -reductasa de próstata preincubada con NADPH de ratas Wistar como fuente de tejido ventral prostático. La actividad inhibitoria del compuesto obtenido resultó 20% mayor que la de los fármacos comerciales acetato de ciproterona (4) y proscar (5).

## II. ABSTRACT

The antiandrogens are compounds which could be used in the treatment of androgen mediated diseases such as: prostate cancer, hirsutism, acne, seborrhea, androgenic alopecia and benign prostatic hyperplasia. The main therapeutic value of the antiandrogens is found in the treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia which is a major problem in the aging male.

Although surgery is presently the most used treatment for prostate cancer (400 000 prostatectomies are performed each year in the USA), there are several other modalities available for the treatment of this disease such as: inhibition of the conversion of testosterone (1) to dihydrotestosterone (2) by the enzyme  $5\alpha$ -reductase.

It has been observed that when testosterone is reduced to its pharmacologically more active metabolite the dihydrotestosterone in the presence of NADPH (scheme 3, page 17), this compound is responsible for the above mentioned diseases. Many researchers think that the inhibition of dihydrotestosterone formation is probably the most suitable therapy for the treatment and prevention of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. On the basis of this hypothesis, in this work is described the synthesis of 6-bromo-16 $\beta$ -methyl-17 $\alpha$ -propyloxy-4,6-pregnadiene-3,20-dione (3), a new inhibitor of the enzyme  $5\alpha$ -reductase.

The in vitro activity of this compound was assayed using  $5\alpha$ -reductase from wistar rats preincubated with NADPH. It was determined that the activity of this compound was about 20 % higher than that of the controls, cyproterone acetate (4) and proscar (5).

### III. ABREVIATURAS

Anal.	Análisis
Ab. rel.	Abundancia relativa
AcOEt	Acetato de Etilo
ATFA	Anhídrido TriFluoroacético
BOMT	6 $\alpha$ -bromo-17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metil-4-oxa-5 $\alpha$ -androstan-3-ona
BPH	Hiperplasia Prostática Benigna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado
CuI <sub>2</sub>	catalizador Yoduro de Cobre II
CH(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Ortoformiato de metilo
CH <sub>3</sub> MgCl	Cloruro de Metil Magnesio
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
$\delta$	Desplazamiento químico
d	Señal doble en RMN <sup>1</sup> H
dd	Señal doble de dobles en RMN <sup>1</sup> H
DHT	5 $\alpha$ -DiHidroTestosterona
DMF	DiMetilFormamida
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPA	Acetato de 16-Dehidropregnanolona
EM	Espectroscopía de Masas
EMIE	Espectroscopía de Masas por Impacto Electrónico
g	gramos
h	horas
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HEF(FSH)	Hormona Folículo Estimulante
HL	Hormona Luteinizante
HLG	Hormona Liberadora de las Gonadotropinas
HLHL(LHRH)	Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante
Hz	Hertz
IR	InfraRojo
J	Constante de Acoplamiento
KBr	Bromuro de Potasio
KCl	Cloruro de potasio



<b>Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de Litio
<b>LiBr</b>	Bromuro de Litio
<b>λ<sub>max</sub></b>	Longitud de onda de máxima absorción
<b>M</b>	Banda de Mediana intensidad en IR
<b>m</b>	Señal múltiple en RMN <sup>1</sup> H
<b>m/z</b>	Relación masa/carga
<b>M<sup>+</sup></b>	Ion molecular
<b>MCPBA</b>	Ácido metacloroperbenzoico
<b>Mex.</b>	México
<b>mg</b>	miligramos
<b>mmolec.</b>	Masa molecular
<b>ml</b>	mililitros
<b>μM</b>	microMolar
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotin Adenin Dinucleótido Phosphate en su forma oxidada
<b>NADPH</b>	Nicotin Adenin Dinucleótido Phosphate en su forma reducida
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>NaHSO<sub>3</sub></b>	Bisulfito de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>nm</b>	nanómetros
<b>OPP</b>	Oxidación de Oppenauer
<b>p/v</b>	relación peso/volumen
<b>pb</b>	pico base
<b>PCC</b>	Cloro Cromato de Piridinio
<b>Pf</b>	Punto de fusión
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>pTSA</b>	Ácido para Toluen Sulfónico
<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
<b>S</b>	Banda de intensidad fuerte en IR
<b>s</b>	Señal simple en RMN <sup>1</sup> H
<b>t</b>	Señal triple en RMN <sup>1</sup> H
<b>THF</b>	TetraHidroFurano
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>uma</b>	unidad de masa atómica
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>W</b>	Banda de intensidad débil en IR

## 1. INTRODUCCION

Durante largo tiempo la lucha del hombre contra las enfermedades ha sido una batalla extenuante; enfermedades que hasta hace algunos años parecían incurables actualmente, gracias al desarrollo de la ciencia y al diseño de nuevos fármacos de origen sintético y semisintético, son controladas y en otros casos pueden ser erradicadas.

Los desórdenes patológicos afines con los andrógenos no constituyen una excepción, ya que enfermedades relacionadas con el hiperandrogenismo (niveles altos de andrógenos en la sangre) acné, hirsutismo, alopecia androgénica, pubertad precoz, hiperplasia prostática benigna y cáncer prostático (1) cuentan en la actualidad con una variada gama de fármacos que permiten el control de dichas enfermedades. Si bien es sabido que el acné, hirsutismo y la alopecia androgénica (2) no producen la muerte y sólo son desórdenes patológicos estéticos que constituyen una fuente de angustia y severos traumas emocionales para quienes lo padecen.

Por otra parte, el cáncer de la próstata y la hiperplasia prostática benigna (enfermedad caracterizada por el agrandamiento ANORMAL de la próstata) son los padecimientos más comunes en el hombre cuya incidencia aumenta con la edad y suele diagnosticarse en personas mayores de 65 años. Como consecuencia de esto la prostectomía (extirpación de la próstata) ocupa el segundo lugar en el mundo entre las cirugías practicadas en el hombre de edad avanzada, y aún cuando ésta constituye un tratamiento aceptable para este mal, se deben contemplar los riesgos

## Introducción

inherentes a las intervenciones quirúrgicas en pacientes mayores, en los que se presentan enfermedades crónicas contundentes como diabetes e hipertensión, hecho que aumentan los riesgos de la cirugía.

Aunque los porcentajes de complicaciones aumentan con la edad, es importante mencionar que el cáncer de próstata es más agresivo en los hombres jóvenes (3) y se aconseja el tratamiento inmediato a través de las opciones terapéuticas.

Resulta interesante aclarar que en el caso de estas enfermedades, el tipo de tratamiento utilizado esta determinado por el matiz particular de cada variante de hiperandrogenismo y el grado de avance de la enfermedad.

La prostatectomía radical y la radiación son tratamientos severos para destruir las células cancerosas en las etapas tempranas de cáncer, las cuales que pueden afectar la calidad de vida del enfermo porque producen efectos secundarios como incontinencia, lesión intestinal, impotencia sexual (4,3), además de los propios de la radiación. Aunque la cirugía representa actualmente el tratamiento más aceptado para el cáncer de próstata, hay otras modalidades disponibles. La alternativa terapéutica existente, que cada vez va adquiriendo más fuerza, se fundamenta en el hecho de que estas enfermedades son dependientes de andrógenos. Algunos investigadores (6,3) sostienen que "las hormonas masculinas androgénicas aceleran el crecimiento del cáncer de la próstata y la desaparición de la hormona lo retarda". Las nuevas alternativas se basan en el uso de antiandrógenos (antagonistas de andrógenos), los cuales actúan en los sitios donde se originan los andrógenos inhibiendo su producción. Existe una gran variedad de antiandrógenos entre los cuales se encuentran los INHIBIDORES de la ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA (6,7), siendo este tema la base principal para desarrollar uno de los objetivos de este trabajo de investigación consistente en el diseño y síntesis de nuevos antiandrógenos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. ANDRÓGENOS

Los andrógenos son esteroides que regulan las características más importantes de la fisiología y el comportamiento sexual de los varones (8), siendo esenciales en el caso del hombre, para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos reproductivos como son los testículos, próstata, epidídimo, vesículas seminales y el pene. Estos también son los responsables de la expresión de los caracteres secundarios masculinos, como fuerza muscular, desarrollo de la libido y la potencia sexual entre otras.

Los principales andrógenos producidos por el organismo son la Testosterona (1) y la Dihidrotestosterona (2), siendo el primero el andrógeno más conocido y el segundo un metabolito secundario más activo que la misma Testosterona.

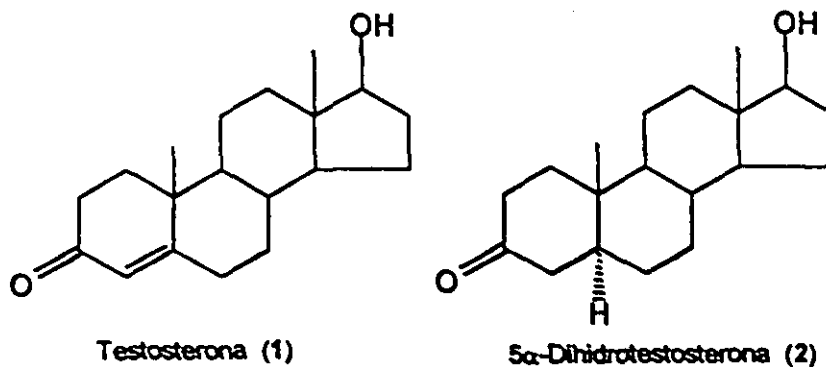
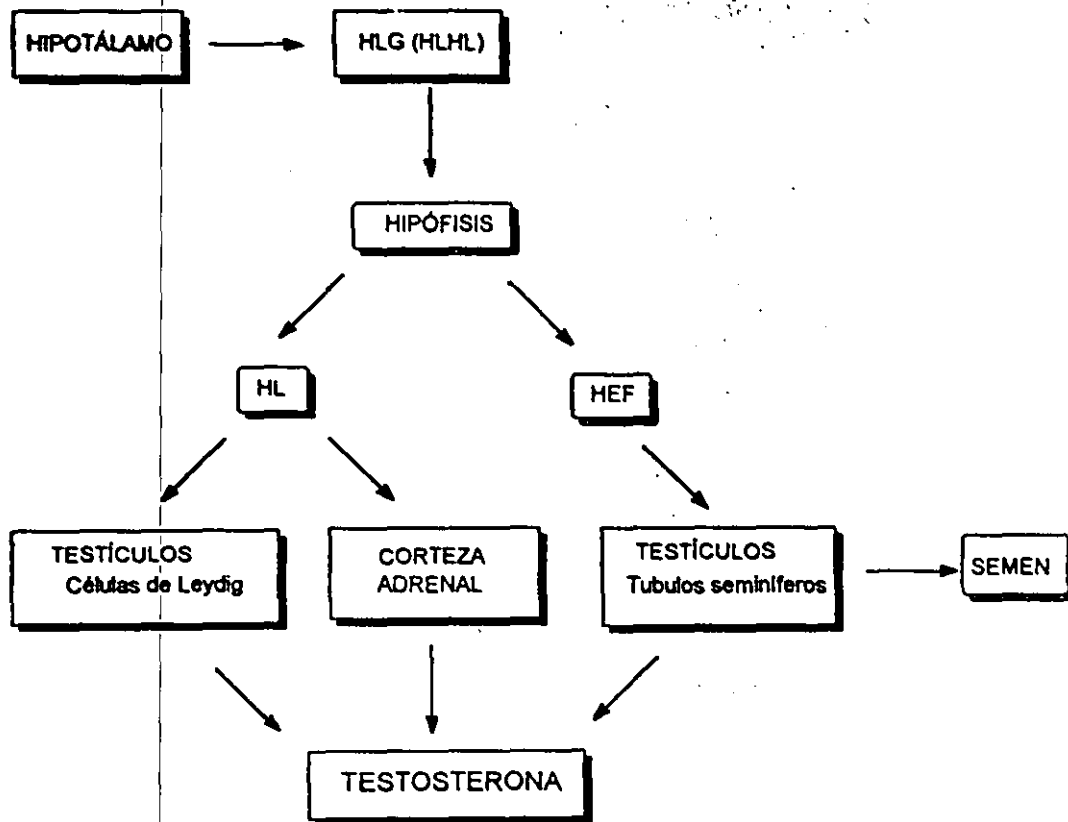


Fig. 1 Principales andrógenos producidos por el organismo

Antecedentes

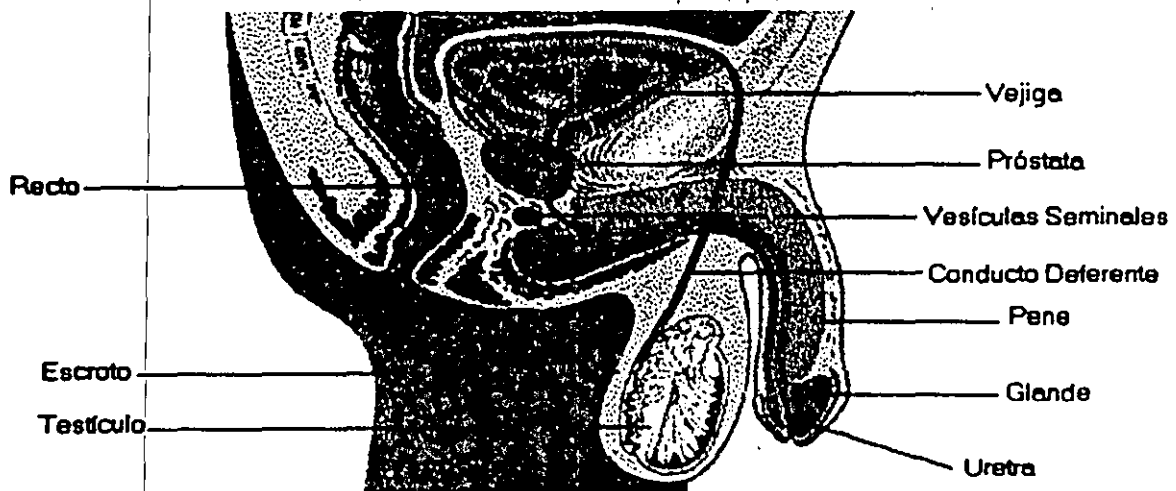
La síntesis y liberación de la testosterona (1), de las gónadas se encuentra regula por la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (HLG) que es secretada en el organismo por el hipotálamo y cuyo nombre particular es Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (HLHL) (9). Esta hormona, estimula al Lóbulo anterior de la glándula adenohipófisis para llevar a cabo la producción de la Hormona Luteinizante (HL), la cual es de suma importancia por que estimula el desarrollo de las células intersticiales o células de Leydig (situadas alrededor de los vasos sanguíneos y linfáticos del testículo) así como la corteza de las glándulas suprarrenales para realizar la secreción de la hormona, la Testosterona (1)(10).



**ESQUEMA 1.** Diagrama de síntesis y liberación de Testosterona en el organismo.

## 2.2. LOS ANDRÓGENOS EN LA FISIOLÓGIA DE LA PRÓSTATA.

La próstata es un órgano que se localiza en el *tracto seminal o genital*. Durante el desarrollo masculino, los testículos fetales secretan testosterona (1) a la circulación fetal, en niveles suficientes como para estimular la diferenciación y crecimiento de una porción del tejido sinuoso urogenital, que da origen a la glándula prostática definitiva. Si la cantidad de testosterona (1), presente en el suero fetal no es suficiente durante el desarrollo uterino, la próstata no se desarrollará (11). Al nacimiento, la próstata pesa 1 g, incrementa a 4 g durante la pubertad, crece a 20 g a la edad de 20 años. De ahí aumenta a 60 g en edad madura (60 años).



**Fig. 2** PROSTATA, glándula en forma de nuez (centro) situada por debajo de la vejiga urinaria y alrededor de la uretra.

Los principales andrógenos que circulan en la sangre, la Testosterona y la Dihidrotestosterona (fig.1) son importantes en diversas actividades fisiológicas (12) que se resumen en la siguiente tabla :

**TABLA 1. ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS EN EL ORGANISMO.**

Inducción de la TESTOSTERONA

- Buen funcionamiento de órganos sexuales masculinos
- Incremento de masa muscular
- Engrosamiento del pene
- Engrosamiento del escroto
- Buen funcionamiento de la Espermatogénesis

Inducción de la DIHIDROTESTOSTERONA

- Incremento del vello facial y corporal
- Incremento de la secreción de glándulas sebáceas (Acné Vulgaris)
- Alopecia prematura
- Agrandamiento de la próstata
- Hiperplasia prostática benigna

EL papel de cada andrógeno en el organismo es diferente, mientras que la testosterona (1) se encuentra estimulando los caracteres sexuales secundarios masculinos como se muestra en la tabla 1, la dihidrotestosterona (2) en concentraciones altas en el organismo, está relacionada con diversos desórdenes patológicos como los descritos en la tabla 1, particularmente cuando hay un incremento anormal del peso y tamaño de la próstata puede tener un curso de

hiperplasia prostática benigna (BPH) y desencadenar el *Cáncer de la próstata*, que en la mayoría de los casos, si no es tratado a tiempo conduce a la muerte.

La hiperplasia prostática benigna (BPH), es un trastorno común en los hombres mayores de 50 años, y su frecuencia aumenta con la edad. Tanto el desarrollo de la próstata como la BPH dependen de la conversión de la testosterona (1) en  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (2) en la propia próstata. Como sucede con otros procesos mediados por los andrógenos, la BPH es una alteración lenta y progresiva. Los síntomas principales de la BPH se refieren al obstáculo mecánico a la evacuación urinaria de la vejiga, lo que obliga muchas veces a la resección de la próstata. (10)

### 2. 3. CARCINOMA DE LA PRÓSTATA.

El cáncer prostático nace generalmente en el lóbulo posterior del órgano adyacente al recto y cuando provoca metástasis (tumores secundarios) en órganos alejados (huesos, ganglios linfáticos), ésta produce fosfatasa ácida (13, 14). Las células del carcinoma prostático, igual que las células glandulares prostáticas normales, dependen en su desarrollo y mantenimiento de la secreción de la testosterona (1) (cáncer hormona - dependiente), de manera que el tumor es activado por los andrógenos e inhibido por la castración y / o la administración de ANTIANDROGENOS que antagonizan la acción de los andrógenos, siendo capaces de mejorar el cuadro clínico (desaparición del dolor por metástasis).(15)



## **2.4. FARMACOLOGÍA DE LOS ANTIANDRÓGENOS.**

Los antiandrógenos constituyen una gran variedad de compuestos químicos que disminuyen la concentración de dihidrotestosterona (2) sin tener efecto en los niveles de testosterona (1) (16,17).

El efecto inhibitorio de estas sustancias se debe diferenciar de aquellos compuestos que disminuyen la síntesis o liberación de gonadotropinas del hipotálamo y la hipófisis anterior, o de aquellas que actúan directamente en las gónadas inhibiendo la biosíntesis o secreción de los andrógenos. En la actualidad los antiandrógenos están considerados como un arma potencial para el tratamiento de los desórdenes patológicos dependientes de los andrógenos, como son la seborrea (18), la alopecia androgénica (19), hirsutismo (20), la pubertad precoz (21), la BPH (22) y principalmente el cáncer de próstata (10).

Existen diversos tipos de clasificación de los antiandrógenos entre los cuales se encuentra la siguiente división de acuerdo a su mecanismo de acción :

- i.* agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (HLHL) (23)
- ii.* antagonistas competitivos del receptor androgénico (24)
- iii.* antagonistas de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (25)
- iv.* inhibidores de la enzima aromatasa (impide la conversión de los andrógenos a estrógenos)
- v.* inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa (6, 7), entre otros. (26)

Es importante mencionar que los estrógenos no son antiandrógenos pues su función está basada en la acción del esteroide sobre la glándula pituitaria, lo que reduce la concentración de la hormona gonadotrópica (HLG) y con ello la producción de testosterona (1).

### 2.4.1. ANTIANDRÓGENOS ESTEROIDALES

Los antiandrógenos de mayor interés terapéutico pertenecen a la serie esteroidal (7, 11), en especial los derivados de la progesterona debido a que son homólogos de los esteroides de origen natural. Probablemente el antiandrógeno más conocido y ampliamente caracterizado es el Acetato de Ciproterona (4) (27), el fármaco más reciente lanzado al mercado es Proscar (5) (28, 29), otros compuestos esteroidales menos conocidos pero activos son BOMT (6) (30) y la Oxendolona (7) (31) que tienen una muy marcada actividad antiandrogénica.

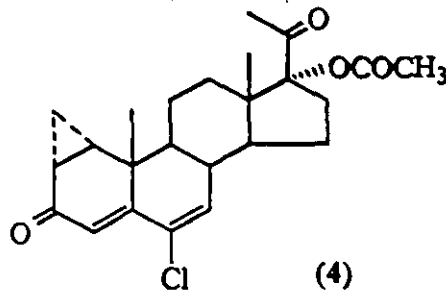
A continuación se describirán algunas características de estos fármacos.

#### ACETATO DE CIPROTERONA (4)

ANDROCUR, Schering, Mex.

Es un antiandrógeno por vía oral con actividad progestacional parcial. El acetato de ciproterona es un antagonista específico de la unión del andrógeno a su receptor. Bloquea las acciones periféricas de la testosterona, pero su principal acción antiandrogénica se ejerce en el sistema nervioso central.

*Contraindicación* en disfunción hepática (hepatopatías). Efectos secundarios : impotencia, reducción del libido, debilidad muscular, pérdida de peso, en algunos casos náuseas. Probablemente es el antiandrógeno más conocido y ampliamente utilizado en el mundo. (32)



**PROSCAR (5)**

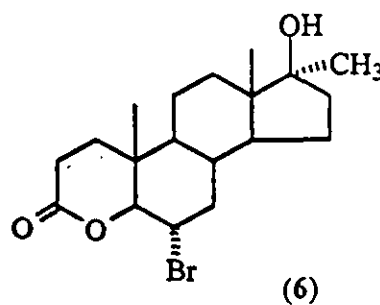
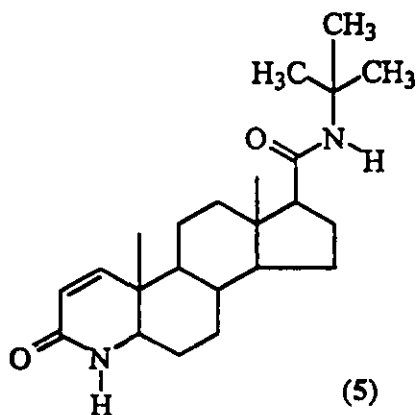
Finasteride, Laboratorios Prosalud, Mex.

Finasteride, MSD es un compuesto 4-azasteroide sintético. Es el primero de una nueva clase de inhibidores específicos de la 5 $\alpha$ -reductasa, enzima que transforma la testosterona (1) a dihidrotestosterona (2). Este fármaco no tiene ninguna afinidad por los receptores de andrógenos. El proscar está indicado para el tratamiento y el control de hiperplasia prostática benigna, es sumamente eficaz para disminuir la dihidrotestosterona circundante e intraprostática, para disminuir el tamaño de la próstata, mejorar el flujo urinario y síntomas asociados a la hiperplasia prostática benigna. Se considera un fármaco dependiente del tiempo. (33)

**BOMT (6)**

Antagonista androgénico que actúa a nivel de la retroalimentación negativa de la testosterona en el sistema nervioso central, exhibiendo pequeña actividad androgénica y progestacional.

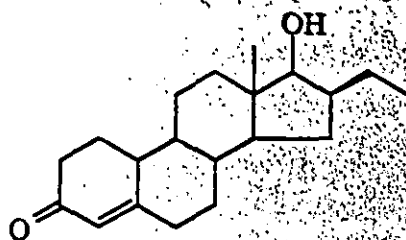
Presenta un actividad antiandrogénica mediana. (27)



## **OXENDOLONA (7)**

Roxenona, TSAA 291.

Es un potente agente antiandrógeno de baja toxicidad. Este fármaco es bien tolerado en humanos y ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de hipertrofia prostática benigna en etapa temprana. No es bien conocido su mecanismo de acción. (28)



(7)

Como se observa estos compuestos tienen diferente mecanismo de acción y algunos muestran efectos secundarios severos que reducen su utilidad clínica. Entre los efectos nocivos se sabe que se mantiene la actividad progestacional parcial, con tratamientos prolongados pueden provocar atrofas celulares, disminución de la libido, impotencia sexual y regresión de los caracteres sexuales secundarios. (34, 35)

### **2.4.2. ANTIANDRÓGENOS NO ESTEROIDALES.**

Los antiandrógenos no esteroideos no presentan efectos agonistas hormonales pero sus efectos secundarios son más agresivos, el más común es el efecto hepatotóxico del ketoconazol (8), así como el de causar náuseas severas en el caso de la flutamida (10) lo cual es debido a sus propiedades de

## Antecedentes

antiandrógenos puros, no puede interactuar con el ciclo de retroalimentación negativa por la testosterona (1) y por lo tanto carece de utilidad en pacientes que no se han sometido a prostatectomía. (36, 37)

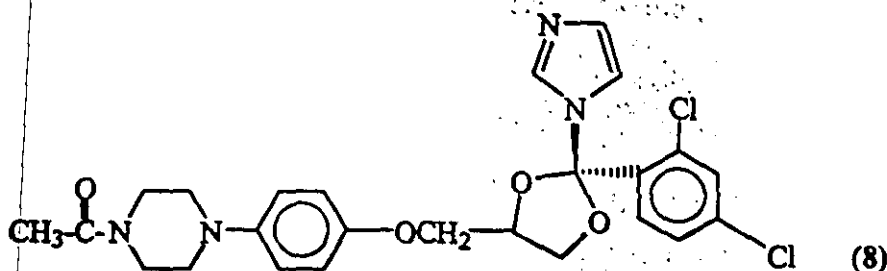
A continuación se describen algunos antiandrógenos no esteroideos de mayor utilidad terapéutica. Los más importantes son Ketoconazol (8) (38), Flutamida (10) (39) y Bicalutamida (13) (40, 41)

### **KETOCONAZOL (8)**

CONAZOLE, Laboratorios Liomont.

Es un agente antifúngico imidazólico de amplio espectro activo que ha demostrado efectos antiandrogénicos en tratamientos de micosis crónica. Inhibe la biosíntesis de ergosterol (9) y a la enzima citocromo P-450. (38)

Contraindicaciones: Hipersensibilidad al ketoconazol, disfunción hepática.

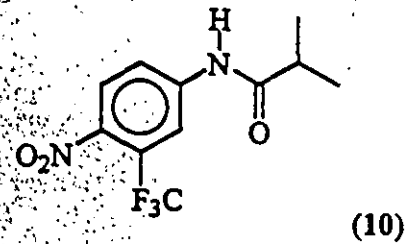
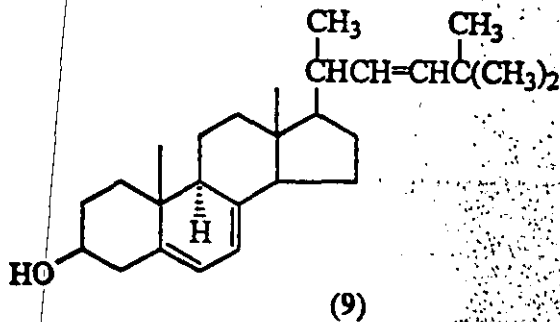


### **FLUTAMIDA (10)**

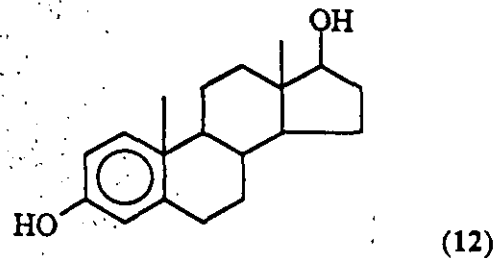
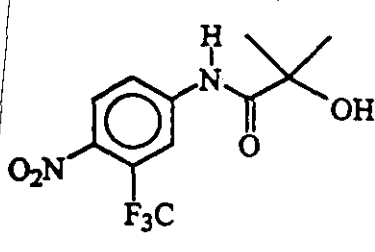
EULEXIN, Laboratorios Schering.

Antiandrógeno activo por vía oral utilizado contra el carcinoma avanzado de próstata. Demuestra un efecto antiandrogénico potente. Es un antagonista específico de la unión del andrógeno a su receptor. Se ha reconocido un metabolito más activo (20 %), la flutamida hidroxilada (11).

## Antecedentes



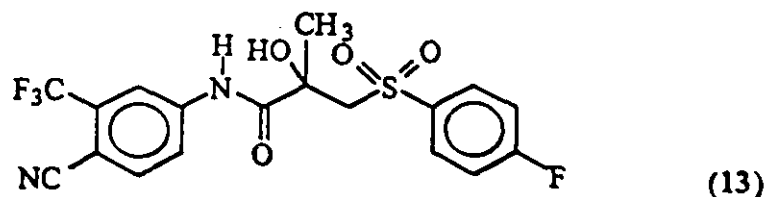
El EULEXIN está indicado en tratamiento paliativo de carcinoma prostático avanzado en enfermos no tratados previamente, o que presentan sensibilidad a tratamientos hormonales. Contraindicaciones: Sensibilidad a la flutamida (cuando se administra tiende a elevar los niveles plasmáticos de testosterona (1) y estradiol (12), puede ocurrir retención de líquidos), disfunción hepática. (39)



### **BICALUTAMIDA (13)**

**CASODEX**, Laboratorios Zeneca.

Antiandrógeno no esterooidal en tratamiento de cáncer prostático avanzado en combinación con agonistas de LHRH. Se ha investigado en una gran variedad de niveles de dosis; la dosis recomendada es 50 mg por día.



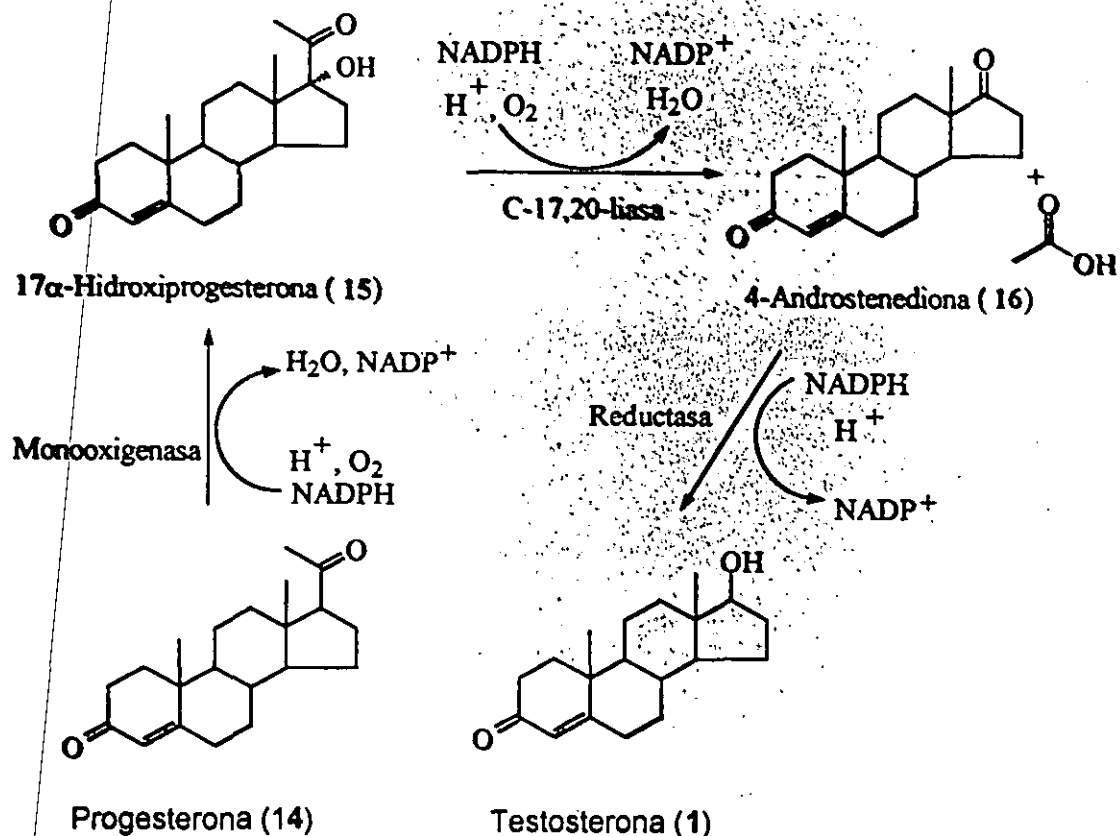
Los requisitos estructurales en la molécula para que pueda actuar como un antiandrógeno se describen a continuación:

**2.5.1. Un átomo de halógeno en C-6 con el sistema 4,6-dien-3-ona.**

El primer requisito presente en la molécula es el sistema 4,6-dien-3-ona. Como antecedente se encuentra la entidad 4-en-3-ona presente en las moléculas de la testosterona (1) y la progesterona (14). La presencia de esta entidad ha resultado esencial para que los compuestos sintetizados lleven a cabo la inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa, al competir por el receptor androgénico de modo similar como lo hace la progesterona (14). Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (17), han indicado que la introducción de un átomo de halógeno en C-6 dentro de la molécula de la progesterona (14) incrementan la actividad antiandrogénica como resultado de la interferencia del halógeno en la resonancia de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, con desestabilización de la molécula y disminuyendo la energía de activación necesaria para la transferencia del hidruro. (43)

**2.5.2. Función  $17\alpha$ -éster o grupo oxihidrilo**

Otra cuestión importante para este diseño, fue en relación a las inactivaciones que sufre la progesterona y análogos de ésta durante su metabolismo. Una de ellas se refiere a la reducción enzimática del carbonilo en C-20 y la otra, a la degradación de la cadena lateral que conduce a la síntesis eventual de testosterona (1) (44, 45). Se ha encontrado que este último tipo de inactivación es catalizada por la enzima C-17, C-20-liasa (46) acoplada al citocromo P-450, la cual a partir de la progesterona (14) se produce la 4-androstenediona (16) que cuando se reduce origina a la testosterona (1) como se puede observar en el siguiente ESQUEMA 2.



**ESQUEMA 2.** Mecanismo de inactivación de la cadena lateral de la progesterona.

Se ha visto que la progesterona (14) y análogos de ésta se inactivan rápidamente en el plasma por el metabolismo descrito; la protección de la cadena lateral es un requisito esencial para el diseño de fármacos con una estructura similar a esta. Tomando como base que los derivados 17 $\alpha$ -alquil o 17 $\alpha$ -aciloxi de la progesterona (14) han demostrado un incremento notable tanto en la actividad antiandrogénica (44, 45) como en su biodisponibilidad oral, se han preparado en nuestro laboratorio (17) algunas series de compuestos donde se examina el efecto del tamaño del éster en la posición C-17 $\alpha$  sobre la actividad antiandrogénica, encontrando que ésta aumenta a medida de que disminuye el número de los átomos de carbono en el éster.

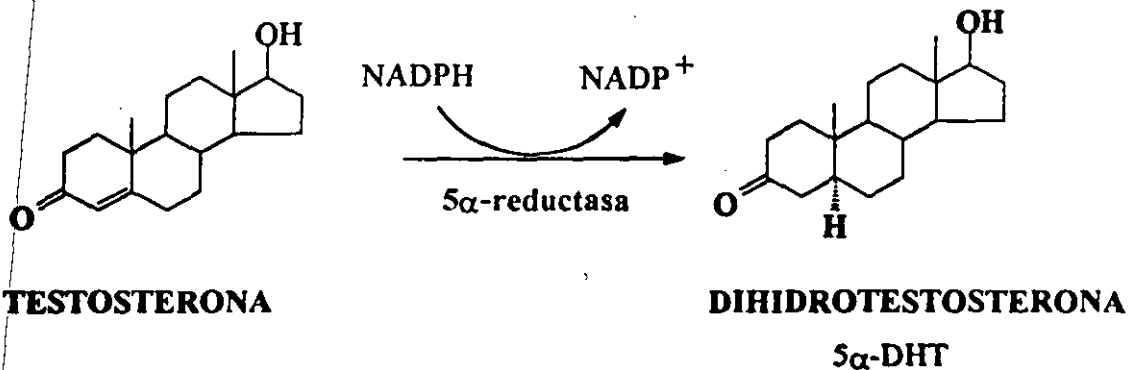


### 5.2.3. Un grupo $\beta$ -metilo en C-16

Finalmente, se ha visto que la alquilación en C-16 es un factor adicional muy importante para la protección de la cadena lateral de los derivados de progesterona hacia su metabolismo, ya sea por la reducción del carbonilo en C-20, o por la degradación de la cadena lateral. Se ha hecho evidente que dicha alquilación separa la actividad progestacional de la androgénica, lo cual es importante porque los efectos secundarios como la ginecomastia y la pérdida del libido se ven disminuidos. Shapiro (9) ha establecido que la sustitución de un hidrógeno en C-16 por un grupo metilo con una conformación  $\beta$  disminuye notablemente la actividad progestacional de los derivados de la progesterona (14).

### 2.6. INHIBIDORES DE LA ENZIMA $5\alpha$ -REDUCTASA.

Una de las funciones biológicas llevadas a cabo por los agentes antiandrógenicos es la de inhibir la enzima  $5\alpha$ -reductasa. La testosterona se convierte en forma irreversible a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (47) por acción de una enzima localizada en la membrana celular dependiente del NADPH, llamada  $5\alpha$ -reductasa. (11, 12)



**ESQUEMA 3.** Conversión de la Testosterona a Dihidrotestosterona.

De acuerdo a este mecanismo, algunos investigadores (11, 17, 19) han sugerido que si la producción del cáncer de próstata depende preferentemente de la dihidrotestosterona (2), entonces el tratamiento mediante el empleo de inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa disminuirían los niveles de ésta, sin afectar los de su precursor, conllevando a un decremento en el tamaño de la próstata. Lo anterior evitaría consecuencias indeseables que se producirían si se llevara a cabo una disminución simultánea de los niveles de testosterona (1), hecho que sucede cuando se somete a cirugía (50). Esta hipótesis surgió de la identificación de una deficiencia genética de la enzima  $5\alpha$ -reductasa en un grupo de hombres pseudohermafroditas en la República Dominicana (51), estas personas nacen con genitales externos ambiguos y son considerados como niñas hasta la pubertad, que es cuando se incrementan los niveles de testosterona (1) y causan el desarrollo del fenotipo masculino. Después de la pubertad, estas personas como hombres llevan una vida normal presentando tres rasgos característicos: no se les detecta agrandamiento de próstata, no presentan acné y no adquieren calvicie.

Este hallazgo ha supuesto la intervención de la dihidrotestosterona (2) como un andrógeno más activo que la testosterona misma (esquema 3) y de ahí que los esfuerzos para la prevención del cáncer de próstata se encaminen al desarrollo y empleo de inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa. Otro hecho importante es el referente a los hombres de origen oriental que presentan poco riesgo de padecer Cáncer de la próstata debido a que la actividad metabólica de su enzima  $5\alpha$ -reductasa se encuentra disminuida (3, 11, 47, 52) en comparación a los hombres de origen africano.

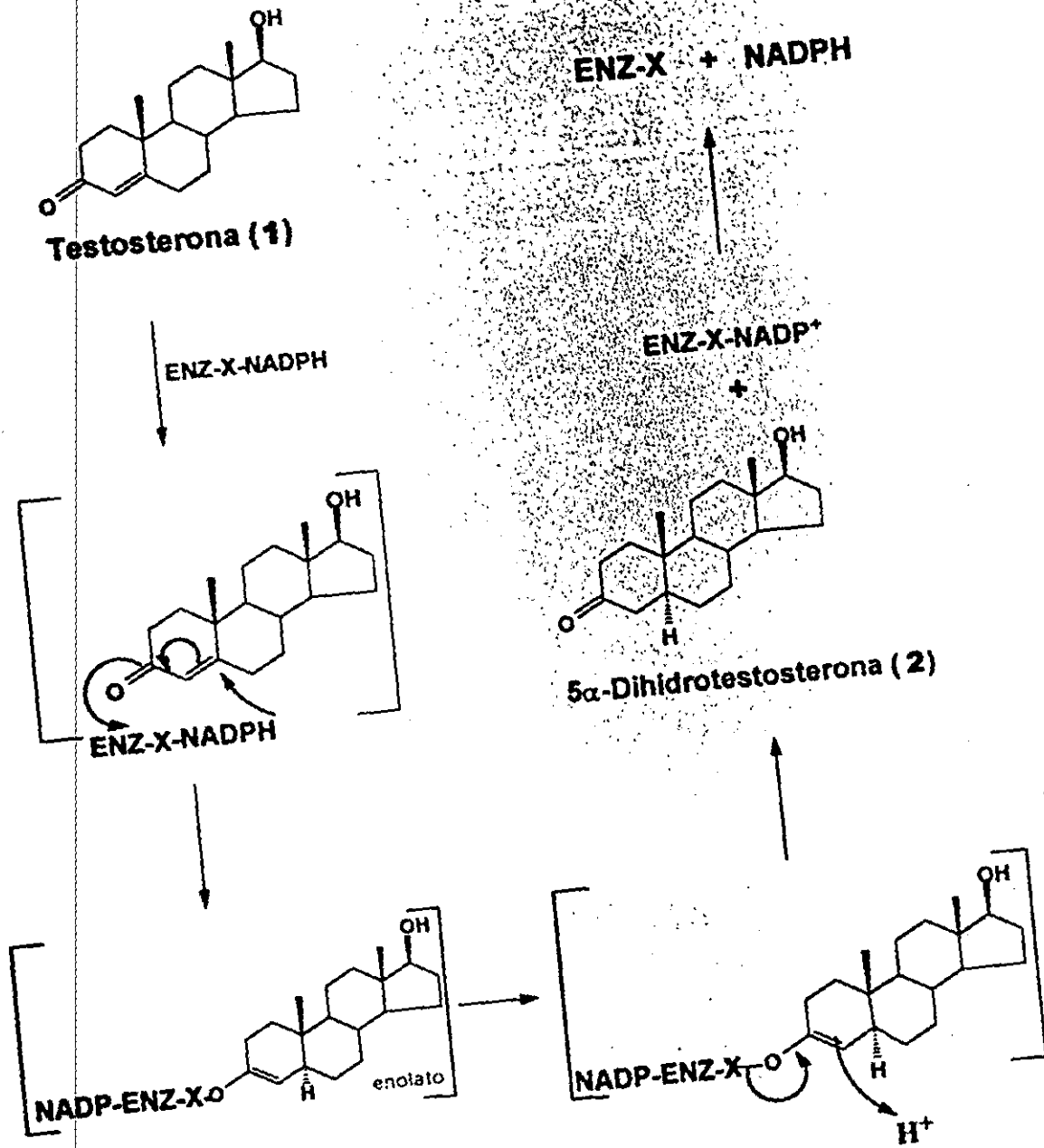
El inhibir esta enzima induce solamente a un decremento en la concentración de dihidrotestosterona sin afectar los niveles de testosterona (ESQUEMA 3), con ello se produce únicamente una disminución en el tamaño de

la próstata sin presentar efectos secundarios no deseables entre los que se incluyen la pérdida de la libido, masa muscular y potencia, mejorando la calidad de vida del enfermo, en contraste si se realizara la cirugía.

## 2.7. MECANISMO DE ACCIÓN PARA LOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA.

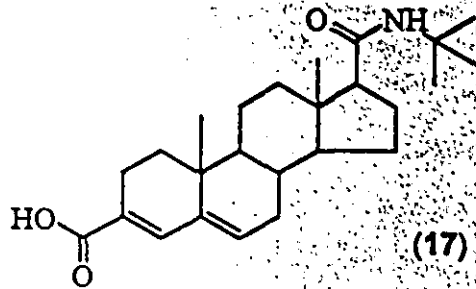
Estudios bioquímicos han demostrado que la conversión irreversible de la testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa involucra la siguiente secuencia de etapas (53), **ESQUEMA 4**. Se inicia con la formación del complejo 5 $\alpha$ -reductasa-NADPH, donde el cofactor NADPH se une a la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, una vez formado el complejo, la testosterona se une a éste y se realiza la transferencia estereoespecífica de un hidruro del NADPH a la posición 5 de la testosterona para reducir el doble enlace en C-4 y C-5, esto produce un enolato en C-3 y C-4 que se estabiliza por algún residuo electrofílico de la enzima con lo cual se forma el complejo NADP-5 $\alpha$ -reductasa-5 $\alpha$ -dihidrotestosterona. La liberación de dihidrotestosterona del complejo se produce por el tautomerismo mediado por la enzima y por último, la regeneración de la misma se logra a través de otro ciclo catalítico con la subsecuente liberación de NADP<sup>+</sup>(54).

Se han diseñado dos tipos de inhibidores reversibles con base a este mecanismo de acción enzimática. En el primer tipo de inhibidores se encuentran substratos análogos a la testosterona los cuales compiten con ella inhibiendo su unión al complejo 5 $\alpha$ -reductasa-NADPH. El prototipo de este sustrato reversible lo constituye Proscar (5) (30, 31, 55). El segundo tipo de inhibidores lo constituyen compuestos análogos a la dihidrotestosterona (2) los cuales se unen al complejo 5 $\alpha$ -reductasa-NADP<sup>+</sup> después de que la dihidrotestosterona (2)



ESQUEMA 4. Mecanismo de reducción de la testosterona a dihidrotestosterona catalizada por la enzima 5α-reductasa.

ha sido liberada bloqueando la liberación del complejo enzima-coenzima, lo cual ocasiona que no pueda entrar a otro ciclo catalítico. El ejemplo correspondiente de este tipo de inhibición lo constituye Epristerida (17) (54, 55).



## 2.8. ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA.

Existen dos isoformas de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa denominadas Tipo I y Tipo II. Cada una de estas isoformas a nivel de genes comparten una homología en la secuencia de su DNA del 46%. Los genes de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa Tipo I requieren de concentraciones elevadas de testosterona (1) para saturarse y se ha observado que ésta enzima es insensible a la inhibición por el Proscar (5). La isoenzima Tipo I se encuentra presente en niveles bajos en la próstata, pero predomina en el tejido cutáneo, aunque también se encuentra en el hígado. La isoenzima 5 $\alpha$ -reductasa Tipo II tiene un pH óptimo ácido, requiere de concentraciones bajas de testosterona para saturarse, y es muy sensible a la inhibición de Proscar. Predomina en los tejidos blanco de los andrógenos incluyendo a la próstata. (56, 57) El análisis de individuos con pseudohermafroditismo causado por la deficiencia de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa ha revelado que no existe una mutación en el gene que codifica para la isoenzima Tipo I. En contraste con esto, se ha demostrado molecularmente que la mutación en este gene sí causa desórdenes.

### **3. OBJETIVOS**

Considerando la problemática del cáncer de próstata discutida con anterioridad y tomando en cuenta las sustituciones químicas esenciales para conferir actividad antiandrogénica a los derivados del pregnano, los objetivos del presente trabajo son :

#### **OBJETIVOS GENERALES :**

1. Sintetizar un antiandrógeno que sea más activo que los fármacos comerciales Acetato de Ciproterona (4) y Proscar (5).
2. Obtener un antiandrógeno que muestre mínimos efectos colaterales.
3. Valorar la actividad antiandrogénica del compuesto sintetizado a través de su capacidad de inhibir la actividad de la enzima  $5\alpha$ -reductasa.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES :**

Para llevar a cabo los objetivos generales anteriores se contemplan los siguientes objetivos particulares :

1. Realizar la síntesis del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona.
2. Optimizar los métodos sintéticos utilizados previamente, mediante rutas alternativas, variación en tiempo y temperatura de las reacciones, así como la modificación en las concentraciones y tipo de catalizadores y disolventes utilizados.
3. Sintetizar, aislar, purificar e identificar espectroscópicamente el compuesto final y los intermediarios.
4. Estandarizar el método de aislamiento de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y cuantificar su actividad en presencia de los fármacos sintetizados.

## **4. METODOLOGÍA.**

La metodología realizada en este trabajo se llevó a cabo en dos fases, siendo la parte química la primera en la cual se realizó la síntesis química, purificación, caracterización física y espectroscópica de cada uno de los intermediarios y producto final. En el ESQUEMA 5 (página 26) se muestra la secuencia de síntesis realizada. En la segunda parte, la biológica se hizo el estudio de la actividad antiandrogénica de los compuestos tomando como parámetro de evaluación la capacidad inhibitoria de la Enzima 5 $\alpha$ -reductasa.

### **4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS AISLADOS.**

#### **4.1.1. Técnicas Cromatográficas Preparativas y Analíticas.**

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, y se utilizaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> Merck, con un espesor de capa de 0.25 mm.

Las cromatografías preparativas en columna abierta se realizaron en gel de sílice 60 ( malla 70-230 ASTM) como adsorbente, con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck. Como fase móvil se utilizó mezcla Hex-AcOEt con gradiente de polaridad durante la elución. La purificación de los compuestos mediante cromatografía en capa fina a nivel preparativo se realizó en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice ( 20 x 20 cm; 0.2 mm).

El análisis cromatográfico de cada uno de los intermediarios y producto final se realizó de la siguiente manera :

1. Mediante un capilar fino se tomó una pequeña muestra en solución diluida del intermediario, se aplicó sobre un punto en la superficie inferior del cromatofolio.
2. La resolución de esta cromatoplaca se realizó mediante el empleo de un sistema de elución adecuada para cada intermediario, utilizando una cámara cromatográfica previamente saturada con el eluyente y en la cual se introdujo al cromatofolio.
3. Para la detección de los constituyentes, en primer lugar, se dejó evaporar el disolvente en la placa y, después, se observó con una lámpara con emisión de luz ultravioleta de onda corta (252 nm) y de onda larga (365 nm). Cualquier zona que presentó fluorescencia fue marcada.
4. Posteriormente, las placas se impregnaron con un agente cromógeno tabla 2, y se revelaron por calentamiento suave sobre una parrilla.

**TABLA 2.** Preparación de agentes cromógenos

REVELADOR	COMPOSICION
1.- Sulfato cérico / ácido sulfúrico	Sulfato cérico ( 12 g) y 200 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. en 350 g de hielo
2.- Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> 1 % en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 N

#### 4.2. IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS PUROS.

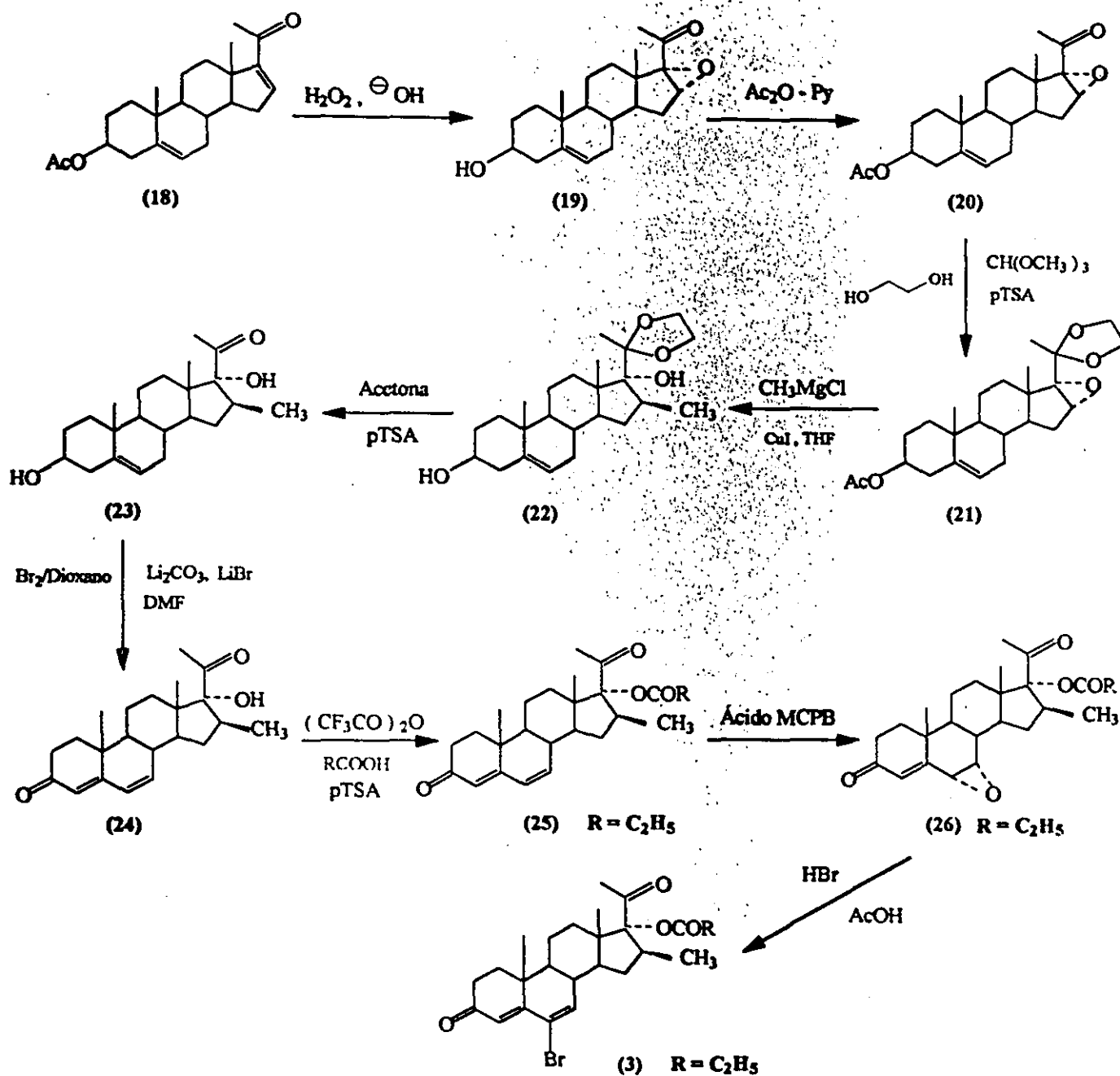
Los puntos de fusión de los compuestos obtenidos se determinaron en un aparato Fisher-Johns modelo A 169296 (1.5 A ) y no están corregidos. Las técnicas y equipos empleados en la identificación de los diversos compuestos se describen a continuación :



1. Espectrofotometría de absorción al Ultravioleta (UV). Se empleó un equipo Perkin Elmer 200; los análisis se obtuvieron por barrido de los compuestos disueltos en metanol. Los datos se expresan en longitud de onda de los máximos de absorción ( $\lambda_{max}$ , nm).
2. Espectrofotometría de absorción de Infrarrojo (IR). Se empleó un equipo Perkin Elmer 549B; utilizando la técnica de película o pastilla de KBr. Los datos se expresan en número de onda ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ) de los máximos de absorción. En esta técnica, para indicar la intensidad de las bandas, se emplean las siguientes abreviaturas: (S) = fuerte, (M) = media y (W) = débil.
3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono-13 (RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C). Se determinaron en un espectrofotómetro Varian VXR-300S y Varian EM390. Los datos se expresan en corrimientos químicos ( $\delta$ , ppm), respecto al tetrametilsilano (TMS) o DMSO como referencia interna en disoluciones de  $CDCl_3$ . Las constantes de acoplamiento J se expresan en Hz. Para indicar los patrones de acoplamiento se utilizaron las siguientes abreviaturas: s = señal simple "singulete", d = señal doble, t = señal triple, dd = señal doble de doble, m = señal múltiple.
4. Espectrometría de masas (EM). Los espectros de masas se determinaron por la técnica de ionización química o impacto electrónico en un aparato Hewlett-Packard 5985-B CG/MS. Los datos se expresan como relación masa a carga m/e, de los correspondientes fragmentos. El ion molecular se designó como M<sup>+</sup>.

La ruta general de síntesis llevada a cabo en este trabajo se muestra en el ESQUEMA 5 denominado DIAGRAMA GENERAL DE SÍNTESIS.

Metodología



ESQUEMA 5. DIAGRAMA GENERAL DE SINTESIS.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. SÍNTESIS DE 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -EPOXI-3 $\beta$ -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA. (19)

En un matraz de 250 ml, equipado con agitación magnética, se disolvieron 3 g (0.0084 moles) de 16-DPA (18) disueltos en 200 ml de metanol. A ésta solución se adicionaron 6 ml de NaOH 4N y 12 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 8 h. Después de este tiempo destiló el metanol y el concentrado obtenido se agregó una mezcla de hielo/agua hasta tener un volumen de 500 ml. El precipitado obtenido se filtró y lavó con agua hasta lograr un pH = 7. El compuesto filtrado y seco se recristalizó de metanol, obteniéndose 2.70 g (0.0054 moles) de unos cristales blancos en un 90% de rendimiento.

Anal. C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>

mmolec.= 330.46 g/mol

Pf.= 180-183°C (reportado 180-1°C) (57)

IR (película, cm<sup>-1</sup>) : 3370.92(S), 2937.35(S), 1692.00(S), 1632.59(W), 1375.92(M), 1056.28(M).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) : 1.023(s,3H), 1.049(s,3H), 2.034(s,3H), 3.685(s, 1H), 3.217(s,1H), 5.342(d, J = 3 Hz, 1H).

## 5.2. SÍNTESIS DE 3 $\beta$ -ACETOXI-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -EPOXI-5-PREGNEN-20-ONA (20)

La reacción de acetilación en posición C-3 del compuesto (19), se realizó de la siguiente manera: a 2 g (0.0060 moles) del compuesto (19), disueltos en 5 ml de piridina, se adicionaron 2 ml de anhídrido acético. La mezcla resultante se agitó durante 6 h a temperatura ambiente y en condiciones anhidras. Después de este tiempo la mezcla de reacción se vació sobre 60 g de hielo agitándolo lentamente, posteriormente se adicionó 200 ml de una mezcla de agua/hielo hasta que precipitó todo el producto, y se dejó en agitación otros 20 minutos, el precipitado resultante se filtró y se lavó con H<sub>2</sub>O. El producto obtenido se recristalizó de metanol obteniéndose 2.0 g ( 0.0053 moles) de producto correspondientes al 88 % de rendimiento.

Anal. C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>

mmolec.= 372.230059 g/mol

Pf.= 157-159°C (reportado 160-162°C) (57)

IR (película, cm<sup>-1</sup>) : 2942.6515(S), 1731.92(S), 1697.93(S), 1436.01(M), 1376.09(M), 1359.50(M), 1245.00(S), 1032.03(M), 852.31(M).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) : 0.965(s,3H), 0.949(s,3H), 1.962(s,3H), 2.104(s,3H), 3.418(s,1H), 4.443(m,1H), 5.370(dd, J = 3 Hz, 1H).

## 5.3. SÍNTESIS DE 3 $\beta$ -ACETOXI-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -EPOXI-20-ETILENDIOXI-5-PREGNENO. (21)

A una solución de 1 g (0.00261 moles) del compuesto (20), 7 ml de tolueno anhidro y 20 mg pTSA, se adicionaron 3 ml de ortoformiato de metilo [CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] y 3 ml de etilenglicol. Esta reacción se agitó durante 6 h a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se neutralizó con 20 mg de acetato de

Parte experimental

Anal.  $C_{24}H_{35}O_4$  mmolec.= 390.56 g/mol

Pf.= 156-162°C (reportado 160-163°) (59)

IR (película,  $cm^{-1}$ ) : 3450.22(M), 2935.00(S), 2897.01(S), 1452.53(W), 1376.31(W), 1065.17(M), 1044.71(S).

RMN<sup>1</sup>H ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm) : 0.878(s,3H), 0.988(s,3H), 1.162(d,3H,J=1.5hz), 1.378(s,3H), 3.502(m,1H), 3.96(m,4H), 5.3(d, J = 3 Hz, 1H).

### 5.5. SÍNTESIS DE 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -DIHIDROXI-16 $\beta$ -METIL-5-PREGNEN-20-ONA. (23)

A una solución de 1.0 g (0.0025 moles) del compuesto (22) en 5 ml de acetona se adicionaron 80 mg de pTSA a temperatura ambiente se dejó reaccionar por 1 h, con agitación magnética continua. Terminado el tiempo de reacción se destiló el disolvente y se adicionó una mezcla de agua/hielo. El precipitado resultante se filtró a vacío y se lavó con agua hasta obtener un pH = 7, dando 0.8951 g de producto crudo, que por recristalización de metanol pesó 0.7056 g (0.0022 moles) y correspondió el 79 % de rendimiento del compuesto (23).

Anal.  $C_{22}H_{34}O_3$  mmolec.= 346.51 g/mol

Pf.= 208-210°C (reportado 208-210°C) (60, 61)

IR (película,  $cm^{-1}$ ) : 3400.22(S), 3342.28(S), 2928.27(S), 1690.00(S), 1350.37(M), 1052.64(S).

RMN<sup>1</sup>H ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm) : 0.860(s,3H), 0.900(s,3H), 1.049(d,3H), 2.0941(s,3H), 3.420(s,1H), 3.852(s,1H), 5.351(d,J=3 Hz,1H), 7.19( $CHCl_3$ ).

EMIE (m/z) : 346 M<sup>+</sup>, 328(M-H<sub>2</sub>O), 313(328-CH<sub>3</sub>), 303(M-[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>), 285(M-H<sub>2</sub>O-[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>), 267(100% Ab. rel)pb 285-H<sub>2</sub>O, 43 [CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>.

Parte experimental

**5.6. SINTESIS DE 17 $\alpha$ -HIDROXI-16 $\beta$ -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA. (24).**

A una suspensión de 1 g (0.0028 moles) de compuesto (23), 3 g de carbonato de litio y 2 g de bromuro de litio en 20 ml de DMF, se agregó por medio de un embudo de adición 1 ml de bromo disuelto en 10 ml de dioxano, en un periodo de 30 minutos, ( 1 ml de esta solución contiene 0.11 g de bromo). La mezcla resultante se agitó por 2.5 h a una temperatura de 80°C. El producto de la reacción se enfrió y se filtró. Al líquido filtrado se le adicionaron 250 ml de H<sub>2</sub>O con 0.4 g de NaHCO<sub>3</sub> y 0.4 g de NaHSO<sub>3</sub> previamente disueltos. El precipitado obtenido representa el producto crudo (24), que posteriormente se filtró y recrystalizó de metanol, obteniéndose 0.8449 g (0.0023 moles) y representó el 84 % de rendimiento.

Anal. C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>

mmolec. = 342.47 g/mol

Pf. = 212-215°C (No hay Pf. reportado por ser un producto nuevo)

UV (MeOH,  $\lambda_{max}$ , nm) : 284.02

IR (película, cm<sup>-1</sup>) : 3500.56(S), 2937.80(M), 2865.82(W), 1705.93(M), 1666.00(S), 1617.60(M), 1376.60(W), 1074.68(W).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) : 1.033(s,3H), 1.157(s,3H), 1.257(d,3H), 2.307(s,3H), 3.500(m,1H), 5.40(d,1H), 5.716(s,1H), 6.161(t,1H), 7.30(CHCl<sub>3</sub>).

EMIE (m/z) : 342 M<sup>+</sup>, 324(M-H<sub>2</sub>O, 100 %, Ab. rel.) pb, 309(324-CH<sub>3</sub>), 281(M-H<sub>2</sub>O - [CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>), 254(M-H<sub>2</sub>O, C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>., ciclopentano)

**5.7. SÍNTESIS DE 16 $\beta$ -METIL-17 $\alpha$ -PROPIONILOXI-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA. (25)**

A una solución de 1 g (0.0029 moles) del compuesto (24), 10 ml de ácido propionico [C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO<sub>2</sub>H] y 100 mg de pTSA se adicionaron rápidamente 5 ml de

## Parte experimental

ATFA. La mezcla de reacción se dejó con agitación magnética constante en condiciones anhidras durante 1 h. Terminado el tiempo de reacción se adicionaron poco a poco 100 ml de H<sub>2</sub>O y posteriormente 200 ml de CHCl<sub>3</sub>. Esta mezcla se agitó por 10 minutos y después se decantó la fase acuosa. De nuevo se adicionó 100 ml de H<sub>2</sub>O a la fase orgánica y se agitó por 10 minutos, se repitió el procedimiento y se procedió a neutralizar la mezcla con bicarbonato de sodio. Se decantó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó una vez más, se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se destiló. El producto crudo (25) se purificó por cromatografía en columna empleando como mezcla de elución hexano-acetato de etilo (8:2). Se obtuvo un rendimiento del 0.75 g (0.0018 moles) correspondientes al 62 %.

Anal. C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>

mmolec. = 398.54 g/mol

Pf. = 238-242°C (No hay Pf. reportado por ser un producto nuevo)

UV (MeOH, λ<sub>max</sub>, nm) : 283.94

IR (película, cm<sup>-1</sup>) : 2946.00(S), 2872.00(M), 1730.00(S), 1664.00(S), 1618.60(M), 1350.00(M), 1192.00(M), 754.00(M)

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm) : 0.7865(s,3H), 1.1270(s,3H), 1.1829(t, J=3Hz, 3H), 1.3914(d, J=3Hz, 3H), 1.9728(s;3H), 2.3957(q, J=2Hz, 2H), 5.6985(S,1H), 6.1383(t,2H), 7.30(CHCl<sub>3</sub>).

EMIE (m/z) : 398 M<sup>+</sup>, 355(M-[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>), 342(M-CH<sub>3</sub>CH=C=O), 324(342-H<sub>2</sub>O), 299(342-[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>), 281(100 %, Ab. rel.) pb, M-[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>-HOCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> ó 299-H<sub>2</sub>O, 57[CH<sub>3</sub>CH=C=O]<sup>+</sup>, 43[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>.

### 6.8. 6α,7α-EPOXI-16β-METIL-17α-PROPIONILOXI-4-PREGNEN-3,20-DIONA. (26)

A una solución de 1 g (0.0025 moles) del compuesto (25) en 20 ml de cloroformo se agregó 1.4 g de ácido m-cloroperbenzoico. La mezcla resultante se dejó a reflujo

Parte experimental

por 3 h. Terminado el tiempo se concentró la mezcla al 50 % de volumen y el ácido m-clorobenzoico precipitado se filtró. La mezcla resultante se neutralizó con 100 ml de una solución de NaOH al 5 %, el compuesto (26) se extrajo tres veces con cloroformo. La fase orgánica se lavó, se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se destiló. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna. El rendimiento obtenido fue 0.58 g (0.0014 moles) y correspondió al 50 %.

Anal.  $C_{25}H_{34}O_5$

mmolec. = 414.56 g/mol

Pf. = 185-188°C (No hay Pf. reportado por ser un producto nuevo)

UV (MeOH,  $\lambda_{max}$  nm) : 239.4

IR (película,  $cm^{-1}$ ) : 2946.00(W), 2870.00(M), 1728.00(S), 1676.00(S), 1456.00(M), 1352.00(M), 1186.00(M).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) : 0.763(s,3H), 1.113(s,3H), 1.191(t, J=3Hz, 3H), 1.411(d, J=2Hz, 3H), 1.969(s;3H), 2.417(q, J=2Hz, 2H), 3.4(dd, J=2Hz, 2H,sistema AB), 6.144(s,1H), 7.30(CHCl<sub>3</sub>).

EMIE (m/z) : 414 M<sup>+</sup>, 371(M-[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>), 358(M-CH<sub>3</sub>CH=C=O), 340(M-OCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) y/o 358-H<sub>2</sub>O, 315(371-HOCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), 297(100 %, Ab. rel.) pb, M-[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup> - HOCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 279(297-H<sub>2</sub>O), 57[CH<sub>3</sub>CH=C=O]<sup>+</sup>, 43[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>.

5.9. 6-BROMO-16 $\beta$ -METIL-17 $\alpha$ -PROPIONILOXI-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA.(3)

A una solución de 1 g (0.0024 moles) del compuesto (26) en ácido acético (5 ml) se agregó 0.8 ml de solución de ácido bromhídrico en anhídrido acético al 28 % (p/v). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 h bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se vació en un vaso de precipitado que contenía hielo/agua y se neutralizó poco a poco con bisulfito de sodio. El precipitado obtenido se filtró, se lavó y secó. El producto crudo (3), se purificó por



Parte experimental

cromatografía en columna usando como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo 80/20. El rendimiento de la reacción fue de 0.59 gramos (0.0014 moles) 58%.

Anal.  $C_{25}H_{33}O_4Br$  mmolec. = 476.9069 g/mol

Pf. 220-222°C (No hay Pf. reportado por ser un producto nuevo)

UV (MeOH,  $\lambda_{max}$ , nm) : 286.6

IR (película,  $cm^{-1}$ ) : 2946.00(M), 2872.00(W), 1728.00(S), 1662.00(M), 1598.00(W), 1456.00(W), 1352.00(M), 1184.00(M), 754.00(W)

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) : 0.7803(s,3H), 0.9367(t,3H), 1.1622(s, 3H), 1.3738(d, J=3Hz, 3H), 1.9729(s;3H), 2.400(q, J=2Hz, 2H), 6.3218(s,1H), 6.5892(d, J=2Hz, 1H), 7.2705(CHCl<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm) : 34.5435 C-1, 34.2331 C-2, 199.103 C-3, 142.827 C-4, 159.362 C-5, 121.481 C-6, 126.671C-7, 39.7613 C-8, 46.3605 C-9, 46.5095 C-10, 28.1151 C-11, 33.9040 C-12, 48.4557 C-13, 46.33 C-14, 32.2620 C-15, 49.5235 C-16, 94.811 C-17, 14.9012 C-18, 16.4440 C-19, 204.0380 C-20, 20.2650 C-21, 174.3670 C-1', 38.2020 C-2', 8.9757 C-3'.

EMIE (m/z) : 476 M<sup>+</sup>, 433(M-[CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup>), 420(M-CH<sub>3</sub>CH=C=O), 404(420-OH), 361(100 %, Ab. rel.) pb, 379-H<sub>2</sub>O, 281(361-Bromo), 57[CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C=O]<sup>+</sup>, 43[CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>.

## 6. ANALISIS Y DISCUSION

Como se describió anteriormente el presente trabajo involucra aspectos químicos y biológicos, en este capítulo de análisis y discusión se hará el análisis por separado. A continuación se realiza el análisis de la parte química.

### 6.1. PARTE QUÍMICA

Los resultados que se presentan a continuación son la obtención de al menos tres reproducciones independientes de la técnica química descrita, básicamente se realizó el análisis de las constantes físicas y espectroscópicas de cada uno de los intermediarios obtenidos y producto final.

La ruta sintética que se planteo para la obtención del compuesto final se muestra el diagrama general de síntesis ESQUEMA 5, página 26.

#### **Materia prima. (18)**

Se utilizó como materia prima al acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA) conocida como Neosterol (62)  $3\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (18). Este compuesto esta considerado como punto de partida para la síntesis parcial de la mayoría de los esteroides debido a que presenta una estructura sencilla que permite hacer las modificaciones necesarias para sintetizar el esteroide 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3). La materia prima es un esteroide sintético barato de fácil adquisición en el mercado. Ante s de iniciar la secuencia sintética propuesta, se realizó la caracterización de la materia prima a través de sus

propiedades físicas y espectroscópicas, comparándolos con los reportados en la literatura (63).

Los resultados de la caracterización de la materia prima 3β-acetoxi-5,16-pregnadien-20-diona (18) se analizan a continuación y se condensan en la tabla 3. Como puede observarse en el espectro de UV (espectro no. 1) se muestra la existencia de un cromóforo con  $\lambda_{\text{max}} = 238.21$  nm correspondiente a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en C-16-en-20-ona, valor indicativo para este tipo de sistema ( $\lambda_{\text{calculado}} = 237$  nm)

**Tabla 3.** Propiedades físicas y espectroscópicas para la materia prima 3β-acetoxi-5,16-pregnadien-20-diona. (18)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	170-172
fórmula molecular	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>
masa molecular (uma)	316.479
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	<b>Asignación</b>
<b>UV (nm)</b>	
$\lambda_{\text{max}}$ 238.21	cetona $\alpha,\beta$ -insaturada en C-20
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
2945.27	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, -CH-, presentes en el esteroide
1729.76	carbonilo del grupo acetoxi en C-3
1661.20	cetona $\alpha,\beta$ -insaturada en C-20
1583.90	-CH <sub>2</sub> -, -CH-, presentes en el esteroide
1372.77	CH <sub>3</sub> presentes en la molécula
1247.26	-C-O- st. del grupo acetoxi
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.920	s(3H, metilo angular en C-18)
1.059	s(3H, metilo angular en C-19)
2.037	s(3H, metilo en C-21)
2.265	s(3H, metilo del grupo acetoxi en C-3)
4.60	m(1H, base del grupo acetoxi en C-3)
5.20	d(1H, protón vinílico en C-6)
6.70	t(1H, protón vinílico en C-16)

En el espectro no. 2 de IR se registran principalmente dos absorciones en la zona de los carbonilos en 1729.76 y 1661.20  $\text{cm}^{-1}$  los cuales son indicativos del carbonilo del grupo acetoxi en C-3 y de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en C-20 respectivamente.

En el espectro no. 3 de RMN<sup>1</sup>H presenta señales características del núcleo del esteroide como son las señales simples e intensas a un  $\delta$  0.920, 1.059, 2.037 y 2.265 ppm cada singulete integra para 3 protones y se asignaron a los cuatro metilos angulares presentes en el esteroide en C-18 y C-19, en C-20 para la metilcetona y el metilo del grupo acetoxi en C-3 respectivamente. La señal múltiple que integra para un protón en 4.60 ppm se asignó al protón base del acetoxi en C-3 y la señal doble de dobles que integra para un protón en 5.20 ppm, se debe al protón vinílico en C-6, el cual esta acoplado a cada uno de los protones vecinos en C-7. Por ultimo, la señal triple en 6.70 ppm que integra para un protón, se asignó al protón vinílico en C-16 que se encuentra acoplado a los dos protones vecinos en C-15.

#### **16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (19)**

Uno de los objetivos del presente trabajo de investigación es insertar un grupo metilo con orientación beta en C-16 y un grupo  $\alpha$ -oxhidrilo en C-17, ya que se ha observado que al insertar un grupo metilo con configuración  $\beta$ , le confiere a la molécula mayor actividad antiandrogénica (64); por lo tanto el primer paso de la ruta sintética consiste en la oxidación de la insaturación en C-16 de la materia prima, seleccionándose en este caso la epoxidación selectiva con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %) en medio básico (NaOH 4N) tal como se plantea para cetoesteroides donde se presentan dobles enlaces conjugados con una cetona (65), reacción que se ve favorecida en nuestro caso por la conjugación con el carbonilo en C-20. Bajo estas condiciones también ocurre la hidrólisis del grupo acetoxi (66). La reacción

transcurre con una transformación cuantitativa hacia el epóxido deseado. Se inicia con la adición reversible del anión hidropéroxido ( $\text{^-OOH}$ ) al doble enlace carbono-carbono ocurriendo el típico mecanismo de Michael, seguido de un paso lento irreversible que implica la formación del oxirano. La reacción produce el 88 % del producto alfa de manera predominante, ya que la presencia de sustituyentes axiales sobre C-10 y C-13 dificultan estéricamente la aproximación por la cara superior.

El primer intermediario  $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- $3\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (19) se identificó mediante la correlación de sus datos físicos y espectroscópicos (tabla 4) con los reportados en la literatura química (65). Este intermediario se caracterizó por presentar un Pf.=  $180\text{-}183^\circ\text{C}$ , los datos espectroscópicos se analizan a continuación.

El espectro no. 4 de IR del compuesto en cuestión (19) muestra la presencia de un banda intensa en  $1692.00\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la frecuencia de absorción del grupo carbonilo en C-20 y se observó la desaparición de la banda característica de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en  $1661.20\text{ cm}^{-1}$ . La hidrólisis el grupo acetoxi en C-3 quedó confirmada por la ausencia de la señal del carbonilo del éster en  $1729.92\text{ cm}^{-1}$ , así como la aparición de una señal en  $3370.92\text{ cm}^{-1}$  intensa asignada para el alcohol en C-3.

En el espectro no. 5 de RMN<sup>1</sup>H de este compuesto (19) se observó la desaparición de la señal triple en 6.70 ppm correspondiente al protón vinílico en C-16 y la aparición de una señal simple en 3.685 ppm que integra para un protón base del epóxido en la misma posición. La señal simple 3.217 ppm que integra para un protón se asignó al protón base del alcohol en C-3 y sustituye a la señal múltiple en 4.60 ppm que integraba para un protón que fue la base del grupo acetoxi en C-3, las demás señales permanecen constantes.

**Tabla 4.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (19)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	180-183
fórmula molecular	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>
masa molecular (uma)	330.46
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	<b>Asignación</b>
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
3370.92	OH en C-3
2937.35	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, -CH-, presentes en el esteroide
1692.00	C=O en C-20
1632.51	doble ligadura en C-5
1375.92	CH <sub>3</sub> presentes en el esteroide
1056.28	C-O st. en C-3
857.73	-C-O-C del epóxido en el anillo D
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
1.023	s(3H, metilo angular en C-18)
1.049	s(3H, metilo angular en C-19)
2.034	s(3H, metilo en C-21)
3.217	s(1H, protón base de OH en C-3)
3.685	s(1H, protón base del epóxido en C-16)
5.342	d(1H, J=3 Hz, protón vinílico en C-6)

En la síntesis de esteroides, muchas veces es necesario proteger grupos funcionales que puedan intervenir y sufrir algunas transformaciones no deseadas durante el transcurso de una reacción química. Para el caso de las cetonas se han usado un gran número de grupos protectores, entre ellos los cetales alquiléteres, tiobenciléteres, enaminas, etc. (67). En la siguiente parte de nuestro estudio la introducción del grupo metilo en C-16 con la estereoquímica necesaria, se logró mediante la apertura del intermediario 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (19) con el reactivo de Grignard (R-Mg-Cl), para esto fue necesario proteger al

oxhidrilo en C-3 como un grupo acetoxi y al carbonilo de la metilcetona en C-20 como cetal, ya que es bien sabido que éste tipo de compuestos reaccionan con avidéz con los alcoholes, grupos cetos (grupos electrofílicos), ésteres, etc. formando sales insolubles.

A continuación se discute esta parte del trabajo realizado.

### **3 $\beta$ -acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona. (20)**

Con el propósito de proteger al grupo oxhidrilo en C-3 del intermediario 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (19), se efectuó una reacción de acetilación con anhídrido acético-piridina, como se recomienda para alcoholes secundarios (68), obteniéndose un rendimiento del 88 %. La formación del electrófilo acetil-piridinio se considera como la especie acetilante. El compuesto acetilado se identificó como tal por la correlación de sus datos físicos y espectroscópicos (tabla 5) con los reportados en la literatura. (57)

Los datos más relevantes del espectro no. 6 de IR del compuesto (20) son la señal en 1731.92 cm<sup>-1</sup> causada por la tensión del grupo carbonilo del acetato en C-3 y la ausencia de la banda en 3370.92 cm<sup>-1</sup> que pertenecía al alcohol en esa misma posición, confirmando con ello la reacción de acetilación. La señal en 1697.93 cm<sup>-1</sup> se asignó al carbonilo de la metilcetona en C-20.

En el espectro no. 7 de RMN<sup>1</sup>H del compuesto (20) se observaron las siguientes señales:  $\delta$  0.965, 0.979, 1.962 y 2.104 ppm en la que cada señal integró para 3 protones y se asignaron a los metilos angulares en C-18 y C-19, al metilo del grupo acetoxi en C-3 y al metilo en C-21 respectivamente. El singulete que integra para un protón en 3.418 ppm se asignó al protón base del anillo oxirano en C-16, la

Análisis y discusión

señal múltiple ubicada en 4.433 ppm que integra para un protón, se asignó al protón base del grupo acetoxi en C-3 y la última señal doble ubicada en 5.370 ppm que integra para un protón se asignó al protón vinílico acoplado a los 2 protones vecinos en C-7.

**Tabla 5.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario  
3 $\beta$ -acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona. (20)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	157-159
fórmula molecular	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>
masa molecular (uma)	372.23
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Asignación</b>
2942.65	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, -CH-, presentes en el esteroide
1731.92	C=O de CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> en C-3
1697.93	C=O de cetona en C-20
1436.01	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> - en el esteroide
1359.50	CH <sub>3</sub> en el esteroide
1245.00	C-O- de CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> en C-3
1032.03	enlace de vibración de C-O del epóxido
852.31	C-O-C st. del epóxido en el anillo D
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.965	s(3H, metilo angular en C-18)
0.976	s(3H, metilo angular en C-19)
1.962	s(3H, metilo del grupo acetoxi en C-3)
2.104	s(3H, metilo en C-21)
3.418	s(1H, protón base del epóxido en C-16)
4.443	m(1H, protón base del grupo acetoxi en C-3)
5.370	dd(1H, J=3 Hz, protón vinílico en C-6)



**3 $\beta$ -acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено. (21)**

Esta reacción tiene por objeto la protección del carbonilo del compuesto anterior (20) ya que la próxima reacción a realizar involucra el reactivo de CH<sub>3</sub>MgCl. El método seleccionado es la protección mediante la formación de cetales, que al ser estos resistentes a condiciones violentas y de obtención sencilla, permiten proteger selectivamente al carbonilo en C-20 sin afectar otros grupos funcionales (69). Esta protección se llevó a cabo con etilenglicol, ortoformiato de metilo (70) y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador (68), produciendo un derivado cíclico dioxolano. Los cetales, tiocetales cíclicos o no, hemiacetales, éteres de enol, etc. son estables en medio básico y en medio ácido se desdoblan a la cetona de partida. (71, 72)

El compuesto se obtuvo con un 83 % de rendimiento y se identificó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (tabla 6) y corroboradas con las reportadas en la literatura química. (68, 73)

El análisis del espectro no. 8 de IR para este intermediario (21) mostró la desaparición de la banda en 1697.93 cm<sup>-1</sup> correspondiente al carbonilo en C-20. Se aprecia la banda del carbonilo del grupo acetoxi de C-3 en 1719.36 cm<sup>-1</sup> corroborándose con la señal en 1248.00 cm<sup>-1</sup> que muestra el enlace de vibración C-O del acetoxi. La señal en 1033.63 cm<sup>-1</sup> se asignó a la banda de vibración del cetal -C-O-C- así como en 877.49 cm<sup>-1</sup> se asignó la banda de vibración del epóxido.

Los datos del espectro no. 9 de RMN<sup>1</sup>H del compuesto (21) muestra las señales simples y constantes de los metilos angulares y el metilo del grupo acetoxi asignados a los desplazamientos en 0.997, 1.044 y 2.039 ppm además cada señal integra para tres protones. El metilo asignado a la posición C-21 se ha desplazado a campo más alto porque desapareció el carbonilo en C-20 que lo desprotegía. En 3.39 ppm el espectro muestra un singulete que integra para un protón asignándose

al protón base del epóxido en C-16. Con la señal simple a 3.954 ppm que integra para 4 protones se confirma la formación del etilendioxi en C-20, la señal múltiple en 4.62 ppm que integra para un protón se asignó al protón base del grupo acetoxi en C-3 y por último la señal dobleteada en 5.35 ppm que integra para un protón con  $J = 3$  Hz se asignó al protón vinílico en C-6 que esta acoplado con los 2 protones presentes C-7.

**Tabla 6.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario  $3\beta$ -acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено. (21)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	194-196
fórmula molecular	$C_{25}H_{36}O_5$
masa molecular (uma)	416.55
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	
<b>IR (<math>cm^{-1}</math>)</b>	<b>Asignación</b>
2941.89	$CH_3$ , $-CH_2-$ , $-CH-$ , presentes en el esteroide
1719.36	C=O del grupo acetoxi en C-3
1371.33	$CH_3$ presentes en el esteroide
1248.00	C-O- de vibración del grupo acetoxi en C-3
1033.63	C-O-C de vibración del cetal en C-20
878.49	C-O-C st. del epóxido en el anillo D
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.997	s(3H, metilo angular en C-18)
1.044	s(3H, metilo angular en C-19)
1.443	s(3H, metilo en C-21)
2.039	s(3H, metilo del grupo acetoxi en C-3)
3.390	s(1H, protón base del epóxido en C-16)
3.954	s(4H, $-O-CH_2-CH_2-O-$ en C-20)
4.620	m(1H, protón base del grupo acetoxi en C-3)
5.350	dd(1H, $J=3$ Hz, protón vinílico en C-6)

**3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregнено. (22)**

Como ya se mencionó, la introducción de un metilo en la posición 16- $\beta$  de un esteroide, debe aumentar su actividad antiandrogénica. La apertura del epóxido 16 $\alpha$ -17 $\alpha$  se lleva a cabo por la sustitución nucleofílica del metilo (del reactivo CH<sub>3</sub>MgX) por la cara  $\beta$  del esteroide obteniéndose el producto trans-diaxial (74).

En 1961, se reportó la obtención de la 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -acetoxiprogesterona; realizada mediante la apertura del epóxido en la posición C16-17 con el reactivo de Grignard utilizando la relación esteroide-reactivo 1:25 y el rendimiento obtenido fue de un 41% (75, 76). En nuestro caso la apertura del 16 $\alpha$ -17 $\alpha$  epóxido (21), se efectuó con el reactivo CH<sub>3</sub>MgCl 3M en THF y CuI<sub>2</sub> como catalizador bajo reflujo moderado en atmósfera de nitrógeno con un rendimiento del 65% y cuya estructura se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas las cuales están descritas en la tabla 7.

El espectro no. 10 de IR para del compuesto (22) corrobora la apertura del epóxido por una banda ancha a 3450.22 cm<sup>-1</sup> asignándose a los 2 oxhidrilos, uno corresponde a la hidrólisis del grupo acetoxi en C-3 y el otro corresponde al oxhidrilo terciario situado en C-17 con orientación  $\alpha$  y se corroboró con la banda en 1065.17 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la vibración del enlace de C-O para alcoholes terciarios y la banda en 1044.91 cm<sup>-1</sup> que se asignó a la vibración del enlace -C-O- del cetol.

El espectro no. 11 de RMN<sup>1</sup>H de este compuesto (22) igual que el anterior intermediario presenta tres singuletes a 0.878, 0.988 y 1.378 ppm que integran para 3 protones cada uno y corresponden a los metilos angulares C-18 y C-19, el restante corresponde al metilo en C-21 en posición alfa al dioxolano sobre C-20. Se corrobora la presencia del cuarto metilo en la molécula por la señal doble con J = 1.5 hz en 1.17 ppm que integra para 2 protones en C-16 $\beta$ . El doblete resulta del acoplamiento de estos protones con el protón base del mismo carbono. La señal múltiple en 3.5 ppm que integra para un protón se asignó al protón base del alcohol

## Análisis y discusión

en C-3. La siguiente señal múltiple en 3.96 ppm que integra para cuatro protones se asignó a los protones de los metilenos del grupo etilendioxi sobre C-20. Finalmente, en la zona de protones vinílicos se observa un doblete en 5.3 ppm que integra para un protón, que se asignó al protón vinílico en C-6.

**Tabla 7.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario  $3\beta,17\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregнено (22).

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	156-162
fórmula molecular	$C_{24}H_{38}O_4$
masa molecular (uma)	390.56
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Asignación</b>
3450.22	alcohol en C-3 $\beta$ y C-17 $\alpha$
2935.00	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, -CH-, presentes en el esteroide
2897.01	CH <sub>2</sub> -, -CH- insaturado
1452.53	enlace de vibración C-H para insaturaciones
1376.31	enlace de vibración C-H para CH <sub>3</sub>
1065.17	enlace de vibración C-O para alcoholes en C-17 $\alpha$
1044.71	enlace de vibración para el dioxolano
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.878	s(3H, metilo angular en C-18)
0.988	s(3H, metilo angular en C-19)
1.170	d(3H, J=1.5 hz, metilo en C-16 $\beta$ )
1.378	s(3H, metilo en C-21, $\alpha$ al dioxolano)
3.500	m(1H, protón base del alcohol en C-3)
3.960	m(4H, metilenos del -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O- sobre C-20)
5.300	dd(1H, J=3 Hz, protón vinílico en C-6)

**3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23)**

La regeneración del carbonilo en C-20 se realizó mediante una hidrólisis ácida del compuesto (22). En condiciones suaves la reacción se lleva a cabo en acetona y ácido pTS a temperatura ambiente y 40 minutos de reacción (57). Bajo las condiciones de reacción descritas se obtiene el producto deseado con un rendimiento del 79 %. El compuesto obtenido (23), se caracterizó por las constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 8. Como un producto secundario se obtuvo en esta reacción el compuesto 16-en-20-ona como resultado de la deshidratación del alcohol terciario axial en C-17.

El espectro no. 12 de IR para este compuesto (23) denotó dos bandas intensas a 3400.22 y 3342.28  $\text{cm}^{-1}$  que se asignaron a los grupos oxhidrilos en C-3 $\beta$  y C-17 $\alpha$ . La reacción de hidrólisis del cetil se corrobora con la banda intensa en 1690.00  $\text{cm}^{-1}$  que se asigna al carbonilo en C-20.

En el espectro no.13 de RMN<sup>1</sup>H de este compuesto (23) una vez más se observa la regeneración de este grupo carbonilo en C-20, debido a la desaparición de la señal múltiple que integraba para 4 protones ( 3.96 ppm) y existe una señal en 2.0941 ppm que integra para 3 protones y se asignó a la metilcetona en C-20. Las señales en 3.42 y 3.852 ppm, ambas integran para un protón, uno se asignó al protón base del oxhidrilo en C-3 y el restante al protón del OH en C-17 $\alpha$  y la última señal doble que integra para un protón en 5.351 ppm con J= 3 hz se asignó al protón vinílico en C-6, las demás señales permanecen constantes al compuesto anterior.

Por último, en el espectro de EMIE (espectro no.14) para el compuesto (23) muestra un ion molecular pequeño con relación m/z 346 que establece el peso molecular del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona (23). Se

observa un pico en  $m/z$  328 debido a la pérdida de 18 unidades dada por la deshidratación de uno de los alcoholes en C-3 o C-17 $\alpha$ . El pico observado con relación  $m/z$  313 se produjo por la pérdida de un metilo de la relación  $m/z$  328 (328-CH<sub>3</sub>) y el pico observado con relación  $m/z$  285 se produce de la pérdida del ion molecular de una molécula de H<sub>2</sub>O con el fragmento de la metilcetona ( M<sup>+</sup>- H<sub>2</sub>O - [CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup>) y se corrobora con el fragmento  $m/z$  43 que corresponde a la metilcetona. La relación  $m/z$  267 se determinó como pico base 100% Ab. rel., la que se originó por la pérdida de una molécula de H<sub>2</sub>O del pico  $m/z$  285.

**Tabla 8.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario  
3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	208-210
fórmula molecular	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>
masa molecular (uma)	346.51
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Asignación</b>
3400.22	alcohol en C-3 $\beta$
3342.28	alcohol en C-17 $\alpha$
1690.00	carbonilo en C-20
1350.37	vibración de enlace C-H para CH <sub>3</sub>
1052.64	vibración de enlace C-O para los alcoholes
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.8600	s(3H, metilo angular en C-18)
0.9000	s(3H, metilo angular en C-19)
1.0490	d(3H, J=3 hz, metilo en C-16 $\beta$ )
2.0941	s(3H, metilo en C-21, $\alpha$ al carbonilo)
3.4200	s(1H, protón base del alcohol en C-3)
3.8520	s(1H, protón del O-H en C-17)
5.3510	dd(1H, J=3 Hz, protón vinílico en C-6)

EMIE(m/z)	
346	M <sup>+</sup>
328	M-H <sub>2</sub> O
313	328-CH <sub>3</sub>
303	M-[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>
285	M-H <sub>2</sub> O-[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>
267(100% Ab.rel) pb	285-H <sub>2</sub> O
43	[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>

**17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24)**

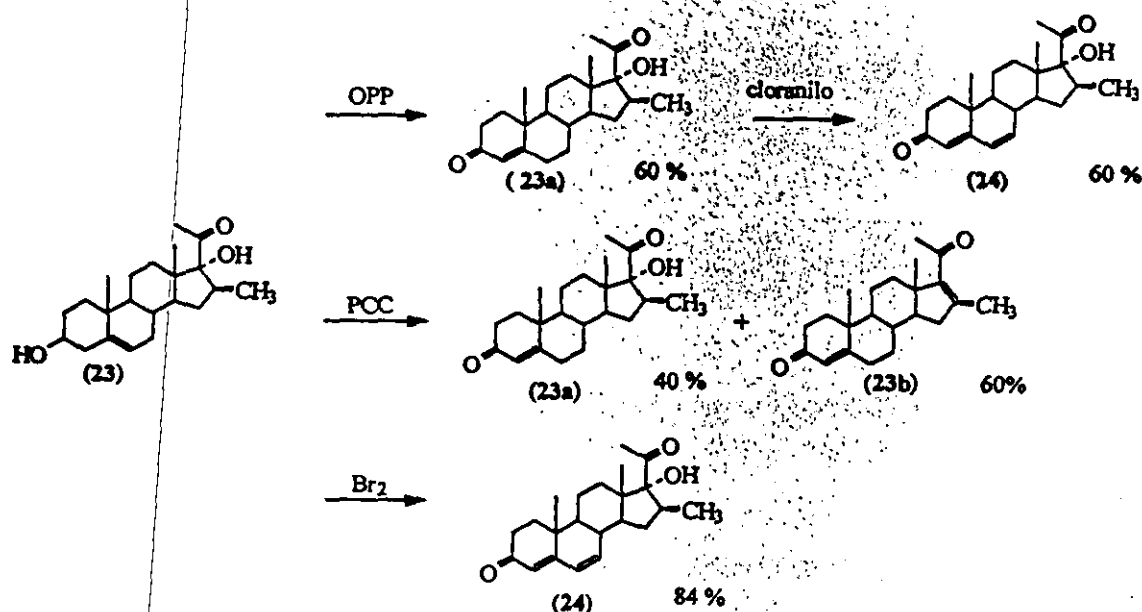
Como se planteó anteriormente, uno de los objetivos del presente trabajo es la formación del sistema 4,6-dien-3-ona en el esteroide como constituyente principal de los requisitos estructurales para que exhiba actividad antiandrogénica. Este sistema se obtiene oxidando el alcohol en C-3  $\beta$ , que se conjuga con la insaturación presente en C-5, obteniéndose el sistema deseado.

Para la obtención del siguiente intermediario (24) se plantearon tres métodos de oxidación :

1. Oxidación de Oppenauer (OPP): Reacción selectiva para alcoholes donde se obtienen sistemas carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, se realiza con acetona e isopropóxido de aluminio. (77, 78)
2. Oxidación esteroidal : Obtención de  $\Delta^4$ -3-cetonas utilizando clorocromato de piridinio (PCC). Se realiza la oxidación de  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -alcoholes esteroidales a las correspondientes  $\Delta^4$ -3-cetonas en un medio básico con un aceptable rendimiento (79) .

3. Oxidación selectiva con bromo. Consiste en la técnica oxidativa bromación-dehidrobromación de Dryden y Kalm. Se utiliza como agente oxidante al bromo en un medio básico.(80)

Las reacciones se ilustran en el siguiente esquema :



**ESQUEMA 6.** Obtención del sistema 4,6-dien-3-ona

La oxidación planteada con OPP en el primer método del esquema 6, se observa que no es un método directo para obtener el compuesto oxidado (24), implicó realizar un paso adicional de síntesis, ya que solamente se obtenía el intermediario con el sistema 4-en-3-ona (23a) y posteriormente se tuvo que introducir la doble ligadura en C-6 mediante la técnica de deshidrogenación con cloranilo (81, 82), obteniéndose de esta manera el producto deseado (24). El segundo método fue descartado por que después de varios intentos se observó que el compuesto mayoritario era el producto de eliminación del alcohol terciario en C-17 $\alpha$  (23b). En el tercer método de oxidación se observaron resultados aceptables,



representó el ahorro de pasos adicionales de la síntesis, obteniéndose inmediatamente el producto esperado (24) con un mejor rendimiento (84%). La reacción de bromación-dehidrobromación empleada se implementó utilizando bromo como agente de oxidación obteniéndose como producto el sistema deseado. Esta reacción se mejoró en su rendimiento con respecto a los obtenidos en trabajos previos así como en el artículo publicado (registrando un 60%) (80). El rendimiento obtenido se logró variando la concentración de bromo, tiempo de reacción necesario para que no se destruyera el sistema una vez formado y/o la deshidratación del alcohol terciario que resultaba muy lábil. Esta reacción se efectuó con bromo en DMF y la presencia de LiBr, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 80°C por un tiempo de 2.5 horas.

Las constantes físicas y espectroscópicas que identifican al compuesto oxidado 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (24), se enlistan en la tabla 9.

La formación del cromóforo 4,6-dien-3-ona se confirmó en la espectro no.15 de UV por la presencia de un máximo de absorción a 284.02 nm, anteriores trabajos registran una absorbancia a 284 nm,  $\epsilon = 31,167$  (43, 82).

El espectro no. 16 de IR del compuesto (24) denotó la presencia de dos señales en la zona de los carbonilos, una en 1705.93 cm<sup>-1</sup> correspondiente al carbonilo de la metilcetona en C-20 y la otra en 1666 cm<sup>-1</sup> que se asignó a la cetona en C-3, corroborándose la oxidación. También se observó una señal en la zona de los alcoholes en 3500.56 cm<sup>-1</sup> que se asignó al oxhidrilo en C-17 $\alpha$ . Las señales restantes se detallan en la tabla 9.

En el espectro no. 17 de RMN<sup>1</sup>H se observaron señales asignables al compuesto, esperado de las cuales, los singuletes que integran para tres protones cada uno en  $\delta$  1.033, 1.157 y 2.303 ppm, se asignaron a los metilos angulares C-18 y C-19, y al metilo C-21 respectivamente. La señal doble en 1.2 ppm se aprecia

mejor en el espectro amplificado (espectro no. 18) y se asignó al metilo en C-16 $\beta$ . En la zona de los protones vinílicos se registraron 2 señales simples y una doble; la señal doble a 5.20 ppm integró para un protón y se asignó al protón vinílico en C-6 que se acopla con el protón de C-7. Las señales simples en 5.176 y 6.616 ppm integrando cada una para un protón, se asignaron a los protones vinílicos en C-4 y C-7 respectivamente.

El espectro no.19 de MASAS para este compuesto (24) muestra un ion molecular de  $m/z$  342 que corresponde al peso molecular de la molécula en cuestión. El pico base se detecta como  $m/z$  324 ( $M^+ - H_2O$ ). El pico de  $m/z$  281 se ha producido por la pérdida de agua seguido del fragmento de la metilcetona. Las demás señales se detallan en la siguiente tabla 9.

**Tabla 9.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario  
17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	212-215
fórmula molecular	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>
masa molecular (uma)	342.47
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	<b>Asignación</b>
<b>UV (nm)</b>	
$\lambda_{max}$ 284.02	cetona $\alpha,\beta-\gamma,\delta$ -insaturada en el esteroide
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
3500.56	alcohol en C-17 $\alpha$
2937.80	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, CH presentes en el esteroide
2865.82	enlaces C-C insaturado en la molécula
1705.93	carbonilo en C-20
1666.00	carbonilo en C-3
1617.60	doble ligadura conjugada en C-4 y C-6

<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
1.033	s(3H, metilo angular en C-18)
1.157	s(3H, metilo angular en C-19)
1.200	d(3H, J=3 Hz, metilo en C-16 $\beta$ )
2.307	s(3H, metilo en C-21, $\alpha$ al carbonilo en C-20)
5.400	d(1H, J=3 Hz, protón vinílico en C-6)
5.716	s(1H, protón vinílico en C-4)
6.161	s(1H, protón vinílico en C-7)
<b>EMIE(m/z)</b>	
342	M <sup>+</sup>
324(100% Ab.rel) pb	M-H <sub>2</sub> O
309	324-CH <sub>3</sub>
281	M-H <sub>2</sub> O -[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>
267	M-OH-[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>
254	M-H <sub>2</sub> O -C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>

**16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25)**

Siguiendo el esquema sintético planteado se realizó la esterificación del grupo oxhidrilo en C-17 $\alpha$  del compuesto anterior (24) reacción que se llevó a cabo mediante el anhídrido trifluoracético, ácido propiónico y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador (22, 80). Esta reacción requirió de cuidados especiales porque la acidez generada con la formación del ácido trifluoracético, es capaz de catalizar la eliminación del alcohol terciario en C-17 $\alpha$  como H<sub>2</sub>O o como ácido propiónico. Esta condición fue controlada regulando el tiempo de reacción de una hora, este tiempo permitió obtener un máximo del rendimiento del éster deseado y un mínimo de productos secundarios. El éster propionato esperado 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (25) se identificó por sus propiedades físicas y espectroscópicas condensadas en la tabla 10.

El espectro no. 20 de UV del compuesto obtenido (25) permaneció sin alteración con el cromóforo 4,6-dien-3-ona a un máximo de absorción de 283.9 nm.

## Análisis y discusión

En el espectro no. 21 de IR de este intermediario (25) corrobora la esterificación del alcohol terciario en C-17 $\alpha$ , ya que desaparece la banda ancha en 3500.56 cm<sup>-1</sup> del compuesto anterior (espectro no.16) y se aprecia una nueva señal en la zona de los carbonilos en 1730.00 cm<sup>-1</sup> asignada al carbonilo del éster propioniloxi, además, en 1222.00 cm<sup>-1</sup> se observa el alargamiento -C-O- característico del éster. La señal en 1664 cm<sup>-1</sup> se asignó al carbonilo en C-3.

El espectro no. 22 de RMN<sup>1</sup>H del compuesto (25) muestra señales simples en un  $\delta$  0.7865, 1.1270 y 1.9728 ppm, cada una integró para 3 protones y se asignaron a los metilos angulares en C-18 y C-19, y al metilo en C-21. La señal doble en 1.3914 ppm con J=3 Hz que integró para 3 protones, se asignó al metilo en C-16 $\beta$ . Más adelante se registran dos señales simples en la zona de los protones vinílicos, una a un  $\delta$  de 5.6985 ppm que integró para un protón y se asignó al protón en C-4 y la otra señal a un  $\delta$  de 6.1383 ppm que integró para 2 protones, se asignó a los protones presentes en C-6 y C-7.

En el espectro no. 24 de MASAS del compuesto obtenido (25) se nota un ion molecular pequeño m/z 398 que corresponde al peso molecular del intermediario obtenido. El pico en m/z 355 se produce por la pérdida de 43 unidades del ion molecular y se debe a la ruptura del fragmento [CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup> y se corroboró con el pico m/z 43. El pico m/z 342 se obtuvo por la pérdida de la entidad propilcetena CH<sub>3</sub>CH=C=O a partir del ion molecular. El pico observado en la relación m/z 299 se asignó a la pérdida de [M-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C=O]<sup>+</sup> corroborándose con el fragmento a m/z 57. El pico a m/z 281 100% se asignó como el pico base y se propone su formación a partir del ion molecular menos los fragmentos [CH<sub>3</sub>C=O]<sup>+</sup> y CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H y/o a la pérdida de H<sub>2</sub>O del pico m/z 299.

Tabla 10. Propiedades físicas y espectroscópicas para el intermediario 16β-metil-17α-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	238-240
fórmula molecular	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>
masa molecular	398.23
<b>Valor espectroscópico obtenido</b>	
<b>UV(nm)</b>	<b>Asignación</b>
λ <sub>max</sub> 283.94	sistema 4,6-dien-3-ona
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
2946.0	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, CH presentes en el esteroide
2872.0	enlaces C-C insaturado en la molécula
1730.0	C=O del éster propionato en C-17α
1664.0	carbonilo en C-3
1618.6	doble ligadura conjugada C-4 y C-6
1350.0	vibración del enlace C-H para CH <sub>3</sub>
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.7865	s(3H, metilo angular en C-18)
1.1270	s(3H, metilo angular en C-19)
1.1829	t(3H, J=2 hz, CH <sub>3</sub> del éster en C-17α)
1.3914	d(3H, J=3 hz, metilo en C-16β)
1.9728	s(3H, metilo en C-20)
2.3957	q(2H, J=2 hz, CH <sub>2</sub> del -O-CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> en C-17α)
5.6985	s(1H, protón vinílico en C-4)
6.1383	s(2H, protón vinílico en C-6 y C-7)
<b>EMIE(m/z)</b>	
398	M <sup>+</sup>
355	M-[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>
342	M-CH <sub>3</sub> CH=C=O
324	M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> o 342-H <sub>2</sub> O
299	M-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H
281(100% Ab.rel) pb	M-[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> COOH o 299-H <sub>2</sub> O
57	[CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> C=O] <sup>+</sup>
43	[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>

**6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona (26).**

El antepenúltimo paso de la ruta sintética constituyó la formación del epóxido en la posición C-6 y C-7 del intermediario (25), esta función química es necesaria para la inserción del halógeno en C-6.

Para la epoxidación de las dobles ligaduras aisladas, en la literatura se recomienda la epoxidación con perácidos. En este trabajo se tiene un sistema conjugado con una cetona, por lo que podría emplearse la reacción de epoxidación con peróxido en medio básico. Sin embargo, la necesidad de la configuración alfa del epóxido para dirigir la sustitución en C-6 en la siguiente reacción, determinó la utilización del perácido sobre el peróxido (83). La oxidación selectiva de la insaturación en C-6 $\alpha$  y C-7 $\alpha$  se realizó mediante la epoxidación con el ácido metacloroperbenzoico (MCPBA). Se utilizó CHCl<sub>3</sub> como disolvente, por un mecanismo concertado, donde la formación de un puente de hidrógeno intramolecular del MCPBA facilita la adición electrofílica del átomo de oxígeno a la doble ligadura en C-6, lo que permite la formación exclusiva del  $\alpha$ -oxirano. (84)

La reacción se efectuó en condiciones anhidras, se obtuvo un rendimiento de 50 % del producto deseado, 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona (26), se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 11 y 12.

El espectro no. 25 de UV del compuesto (26) mostró la presencia de un máximo de absorción en  $\lambda_{max}$  239.4 nm asignable al cromóforo de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada y así se corroboró la epoxidación de la ligadura en C-6 y C-7.

En el espectro no. 26 de IR para el compuesto (26), las bandas más significativas se aprecian a 752.0 cm<sup>-1</sup> que se asignó al alargamiento del enlace C-O

del epóxido y la banda a  $1186\text{ cm}^{-1}$ , que se asignó al alargamiento del enlace C-O para el carbonilo del éster en posición C-17 $\alpha$ .

En el espectro no. 27 de RMN<sup>1</sup>H para el intermediario (26), la señal más representativa que confirmó la presencia del epóxido, se asignó a la señal doble en 3.49 ppm con  $J = 2\text{ hz}$  e integró para 2 protones, la señal doblete dobleteada se origina por la interacción de los protones bases del epóxido (HA y HB) en C-6 $\beta$  y C-7 $\beta$ , formando un sistema AB. Las demás señales permanecen constantes y se detallan en la tabla correspondiente.

En el espectro de MASAS del compuesto (26) (espectro no. 28) se observó un ion molecular pequeño  $m/z$  414 concordante con el peso molecular del compuesto. El pico siguiente  $m/z$  371 se debe a la pérdida de la metilcetona en C-17 $\beta$  ( $M - [CH_3C=O]^+$ ). El pico observado en la relación  $m/z$  358 se debe a la pérdida de la fracción  $CH_3CH=C=O$  a partir del ion molecular, el siguiente pico  $m/z$  340 se asignó a la pérdida de  $H_2O$  de la relación  $m/z$  358. Se consideró la relación  $m/z$  297 como pico base 100% de la Ab. rel., tomando en cuenta que el ion molecular ha perdido los fragmentos  $[CH_3C=O]^+$  y  $[CH_3CH_2C=O]^+$  y se corroboran con los picos en las relaciones  $m/z$  43 y  $m/z$  57. Los demás fragmentos se detallan en la tabla correspondiente.

**Tabla 11.** Propiedades físicas para el intermediario 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona (26)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	185-188
fórmula molecular	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>
masa molecular	414.56

Tabla 12. Datos espectroscópicos para el intermediario 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona,(26)

Datos espectroscópicos	
UV(nm)	Asignación
$\lambda_{max}$ 239.4	sistema 4-en-3-ona en anillo A
IR (cm <sup>-1</sup> )	
2946.0	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, CH presentes en el esteroide
2870.0	enlaces C-C insaturado en la molécula
1728.0	C=O del éster propionato en C-17 $\alpha$
1676.0	carbonilo en C-3
1456.0	doble ligadura conjugada en C-4
1352.0	vibración del enlace C-H para CH <sub>3</sub>
1186.0	C-O st del éster en C-17 $\alpha$
752.0	alargamiento del enlace C-O del epóxido
RMN <sup>1</sup> H (ppm)	
0.763	s(3H, metilo angular en C-18)
1.113	s(3H, metilo angular en C-19)
1.191	t(3H, J=3 hz, CH <sub>3</sub> del éster en C-17 $\alpha$ )
1.411	d(3H, J=2 hz, metilo en C-16 $\beta$ )
1.969	s(3H, metilo en C-21)
2.417	q(2H, J=2 hz, protones $\alpha$ al carbonilo en el éster)
3.490	dd(2H, J=2 hz, sistema AB del epóxido en C-6y C-7)
6.144	s(1H, protón vinílico en C-4)
EMIE(m/z)	
414	M <sup>+</sup>
371	M-[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>
358	M-CH <sub>3</sub> CH=C=O
340	M-HOCOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> y/o 358-H <sub>2</sub> O
315	371- HOCOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
297(100% Ab.rel) pb	M-([CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup> -HOCOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )
279	297-H <sub>2</sub> O
57	[CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> C=O] <sup>+</sup>
43	[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>



**6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregradien-3,20-diona (3)**

El último paso de esta ruta sintética lo constituyó la inserción del bromo, con la apertura del epóxido (25) para obtener el compuesto objetivo (3). En esta reacción se hacen modificaciones a la técnica recomendada (80, 84, 85), ya que se observó que un exceso de HBr daba lugar a la formación de compuestos adicionales, probablemente derivados del bromo y en ciertos casos se destruía el sistema 4-en-3-ona. El máximo rendimiento alcanzado para esta reacción fue cuando se disminuyó la cantidad de ácido. La inserción en C-6 del átomo de bromo resulta de la configuración alfa del epóxido (25) utilizado, ya que al ser una sustitución nucleofílica *trans diaxial* es necesario que el nucleófilo se aproxime por la posición axial, siendo ésta en C-6.

El derivado bromado (3) se identificó satisfactoriamente por medio de sus constantes físicas y espectroscópicas detalladas en las tablas 13, 14 y 15.

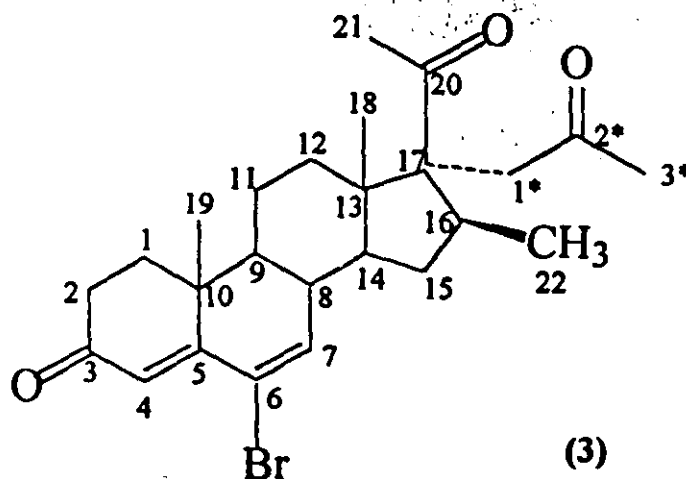
En el espectro no. 29 de UV del compuesto final (3) la absorción máxima a 286.7 nm corroboró la formación del sistema 4,6-dien-3-ona y la inserción del átomo de bromo en C-6.

El espectro de IR del compuesto (3) (espectro no. 30) indicó la presencia del carbonilo del éster en C-17 $\alpha$  en 1728 cm<sup>-1</sup> y la cetona conjugada en C-3 a 1662 cm<sup>-1</sup>.

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto (3) (espectro no. 31) se observó la presencia del bromo por una alteración en la densidad electrónica de los protones vinílicos desplazados ligeramente a campo bajo, la señal simple que integra para un protón a 6.3217 ppm se asignó al protón vinílico en C-4 y la señal doble que integra para un protón en 6.5892 ppm con J= 2 hz se asignó al protón vinílico en C-7 y se acopla con el protón en C-8.

El espectro no. 32 de RMN<sup>13</sup>C del compuesto final (3) fue posible confirmar la identidad química del producto sintetizado (86) corroborándose la existencia de 25

señales asignables a los diferentes carbonos que conforman este compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3). Se estableció la existencia de 5 tipos de carbonos para los metilos en C-18, C-19, C-21, C-22 y C-3\*, asignándoseles las señales en 14.9012, 16.4440, 20.2650, 19.7125 y 8.9757 ppm, es preciso mencionar que estas señales se observan mejor en el espectro ampliado no. 33. También se detectó la presencia de 3 tipos de carbonilos en  $\delta$  204.038, 199.103 y 174.367 ppm que se asignaron a los carbonos en C-20, C-3 y C-1\* respectivamente y los carbonos con insaturación en C-4, C-5, C-6 y C-7 se asignan a los desplazamientos en 142.827, 159.362, 121.481 y 126.671 ppm. La totalidad de las asignaciones de RMN<sup>13</sup>C se observan a continuación y se detallan en la tabla 14.



**Fig. 3** Asignación de los desplazamientos químicos del compuesto final (3) en RMN<sup>13</sup>C

Finalmente en el espectro de MASAS (EI\*) del compuesto final (3) (espectro no. 34) se confirmó el peso molecular del producto (476.90 g/mol calculado) con el ion molecular pequeño  $m/z$  476 y la presencia del bromo con el fragmento  $M+1 = 478$  de igual tamaño, las demás señales se detallan en la tabla correspondiente.

**Tabla 13. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto final  
6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)**

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	220-222
fórmula molecular	C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub> Br
masa molecular	476.9069
Valor espectroscópico	
UV(nm)	Asignación
$\lambda_{max}$ 286.6	sistema 4,6-dien-3-ona
IR (cm <sup>-1</sup> )	
2946.0	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> , CH presentes en el esteroide
2872.0	enlaces C-C insaturado en la molécula
1728.0	C=O del éster propionato en C-17 $\alpha$
1662.0	carbonilo en C-3
1598.0	doble ligadura conjugada C-4 y C-6
1456.0	vibración del enlace C-C insaturado
1352.0	vibración del enlace C-H para CH <sub>3</sub>
1184.0	C-O st del éster en C-17 $\alpha$
RMN <sup>1</sup> H (ppm)	
0.7803	s(3H, metilo angular en C-18)
0.9367	t(3H, J=3 hz, CH <sub>3</sub> del éster propionato)
1.1622	s(3H, metilo angular en C-19)
1.3738	d(3H, J=2 hz, metilo en C-16 $\beta$ )
1.9729	s(3H, metilo en C-21 $\alpha$ al carbonilo)
2.4000	q(2H, J=2 hz, protones $\alpha$ al carbonilo del éster propionato)
6.3218	s(1H, protón vinílico en C-4)
6.5892	s(1H, protón vinílico en C-7)

**Tabla 13.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto final  
6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)

Propiedades físicas	Valor encontrado o calculado
punto de fusión (°C)	220-222
fórmula molecular	C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub> Br
masa molecular	476.9069
Valor espectroscópico	
UV(nm)	Asignación
$\lambda_{max}$ 286.6	sistema 4,6-dien-3-ona
IR (cm <sup>-1</sup> )	
2946.0	CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -, CH presentes en el esteroide
2872.0	enlaces C-C insaturado en la molécula
1728.0	C=O del éster propionato en C-17 $\alpha$
1662.0	carbonilo en C-3
1598.0	doble ligadura conjugada C-4 y C-6
1456.0	vibración del enlace C-C insaturado
1352.0	vibración del enlace C-H para CH <sub>3</sub>
1184.0	C-O st del éster en C-17 $\alpha$
RMN <sup>1</sup> H (ppm)	
0.7803	s(3H, metilo angular en C-18)
0.9367	t(3H, J=3 hz, CH <sub>3</sub> del éster propionato)
1.1622	s(3H, metilo angular en C-19)
1.3738	d(3H, J=2 hz, metilo en C-16 $\beta$ )
1.9729	s(3H, metilo en C-21 $\alpha$ al carbonilo)
2.4000	q(2H, J=2 hz, protones $\alpha$ al carbonilo del éster propionato)
6.3218	s(1H, protón vinílico en C-4)
6.5892	s(1H, protón vinílico en C-7)

Tabla 14. Propiedades espectroscópicas RMN<sup>13</sup>C para el compuesto final

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

RMN <sup>13</sup> C (ppm)		
No. de carbón	desplazamiento	asignación
C-1	34.5435	-CH <sub>2</sub> -
C-2	34.2331	-CH <sub>2</sub> -
C-3	199.103	C=O en anillo A
C-4	142.827	carbón vinílico terciario
C-5	159.362	carbón vinílico cuaternario
C-6	121.481	carbón vinílico cuaternario
C-7	126.671	carbón vinílico terciario
C-8	39.7613	carbón terciario
C-9	46.3605	carbón terciario
C-10	46.5095	carbón cuaternario base de CH <sub>3</sub> angular en C-19
C-11	28.1151	-CH <sub>2</sub> - en anillo C
C-12	33.9040	-CH <sub>2</sub> - en anillo C
C-13	48.4557	carbón cuaternario base de CH <sub>3</sub> angular C-18
C-14	46.3300	carbón terciario inferior en unión de anillo C y D
C-15	32.2620	-CH <sub>2</sub> - en anillo D
C-16	49.5235	carbón terciario base de CH <sub>3</sub> β en anillo D
C-17	94.8110	carbón cuaternario en anillo D
C-18	14.9012	CH <sub>3</sub> angular
C-19	16.4440	CH <sub>3</sub> angular
C-20	204.0380	C=O
C-21	20.2650	CH <sub>3</sub> α al C=O anterior
C-22	19.7125	CH <sub>3</sub> β en anillo D
C-1*	174.3670	C=O del éster
C-2	28.2020	-CH <sub>2</sub> - α al C=O del éster
C-3	8.9757	CH <sub>3</sub> terminal al C=O del éster

Tabla 15. Propiedades espectroscópicas EM(EI<sup>+</sup>) para el compuesto final 6-bromo-16β-metil-17α-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)

EM(EI <sup>+</sup> )	
relación (m/z)	asignación
476	M <sup>+</sup>
433	M-[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>
420	M-CH <sub>3</sub> CH=C=O
404	420-OH
361(100% Ab.rel) pb	379-H <sub>2</sub> O
281	361-Bromo (79.909)
57	[CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> C=O] <sup>+</sup>
43	[CH <sub>3</sub> C=O] <sup>+</sup>

## 6.2. PARTE BIOLÓGICA

### 6.2.1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA (*In vitro*)

La inhibición de la conversión de testosterona (1) a productos 5α-reducidos como la DHT (2), fueron evaluados empleando testículo e hígado de rata como fuente de obtención de la enzima en cuestión (87). La actividad antiandrogénica de los derivados sintetizados: el producto final (3) y sus intermediarios de síntesis 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 proscar (5).

En este estudio también se analizó la actividad farmacológica de los siguientes compuestos: 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -butiroloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (25a), 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -butiroloxi-4-pregnen-3,20-diona (26a), 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -butiroloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3a), 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-trien-3,20-diona (27), previamente sintetizados en nuestro laboratorio (43).

#### 6.2.2. EXTRACCION DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ - REDUCTASA.

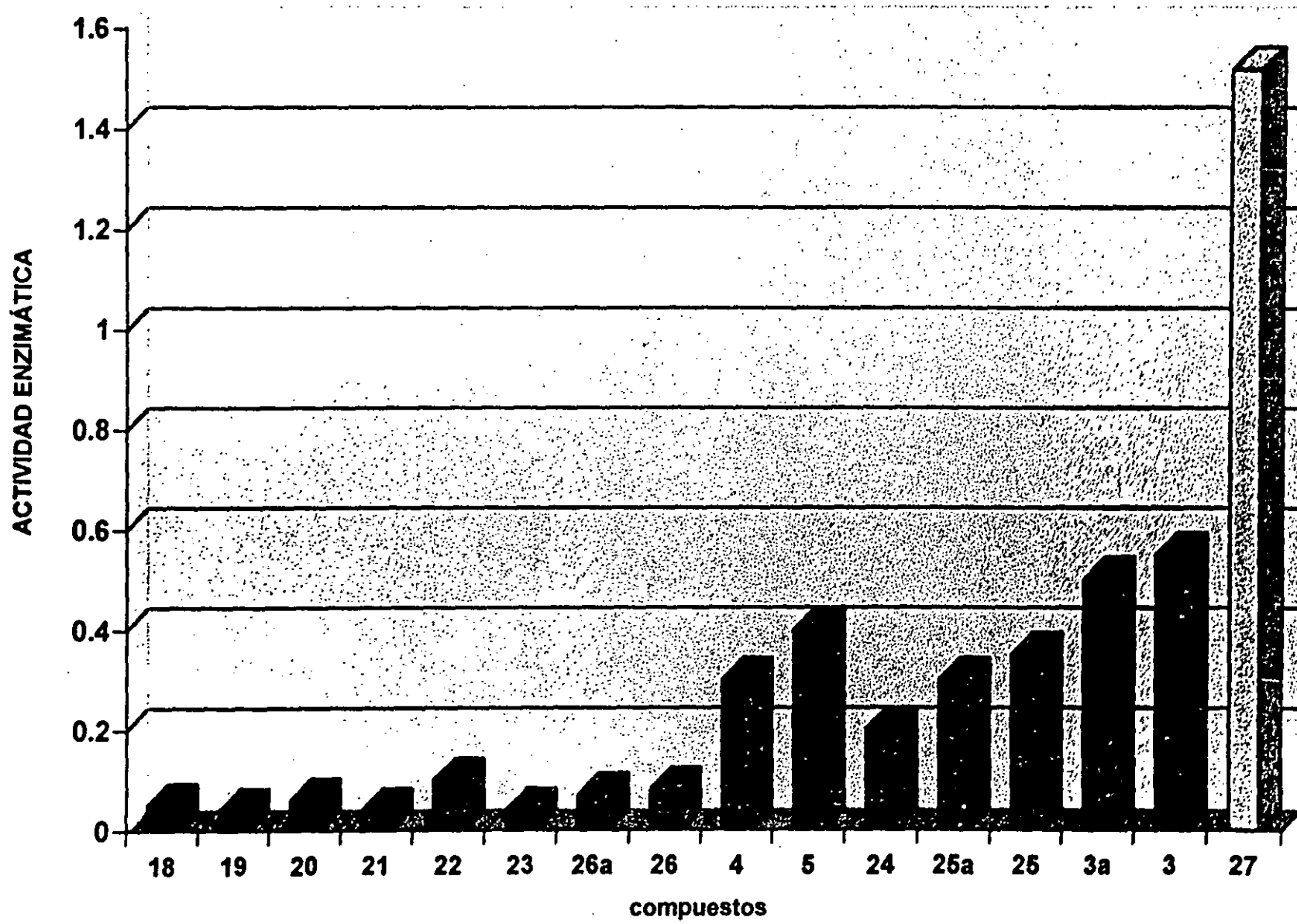
Siguiendo las técnicas de extracción de la enzima previamente reportadas en la literatura (88), se dispuso de dos ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio 250 g cada una (57, 89). Los animales se sacrificaron por desnucamiento y posteriormente se realizó la disección de los testículos e hígado. Estos tejidos se homogeneizaron por separado en dos porciones de solución acuosa 0.17 M de KCl (20 ml). El extracto se filtró y se centrifugó a 15 000 xg durante 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se saturó con una solución acuosa de sulfato de amonio al 50 % (100 ml) en frío, el precipitado formado se se dializó con 1 litro de buffer Tris-HCl 25 mM (pH 7.3), durante 24 horas. El producto dializado se centrifugó a 10 000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se usó como extracto concentrado de proteínas para determinaciones enzimáticas.

El contenido de proteínas del extracto se determinó por el método de Bradford (90) empleando albúmina de bovino como estándar.

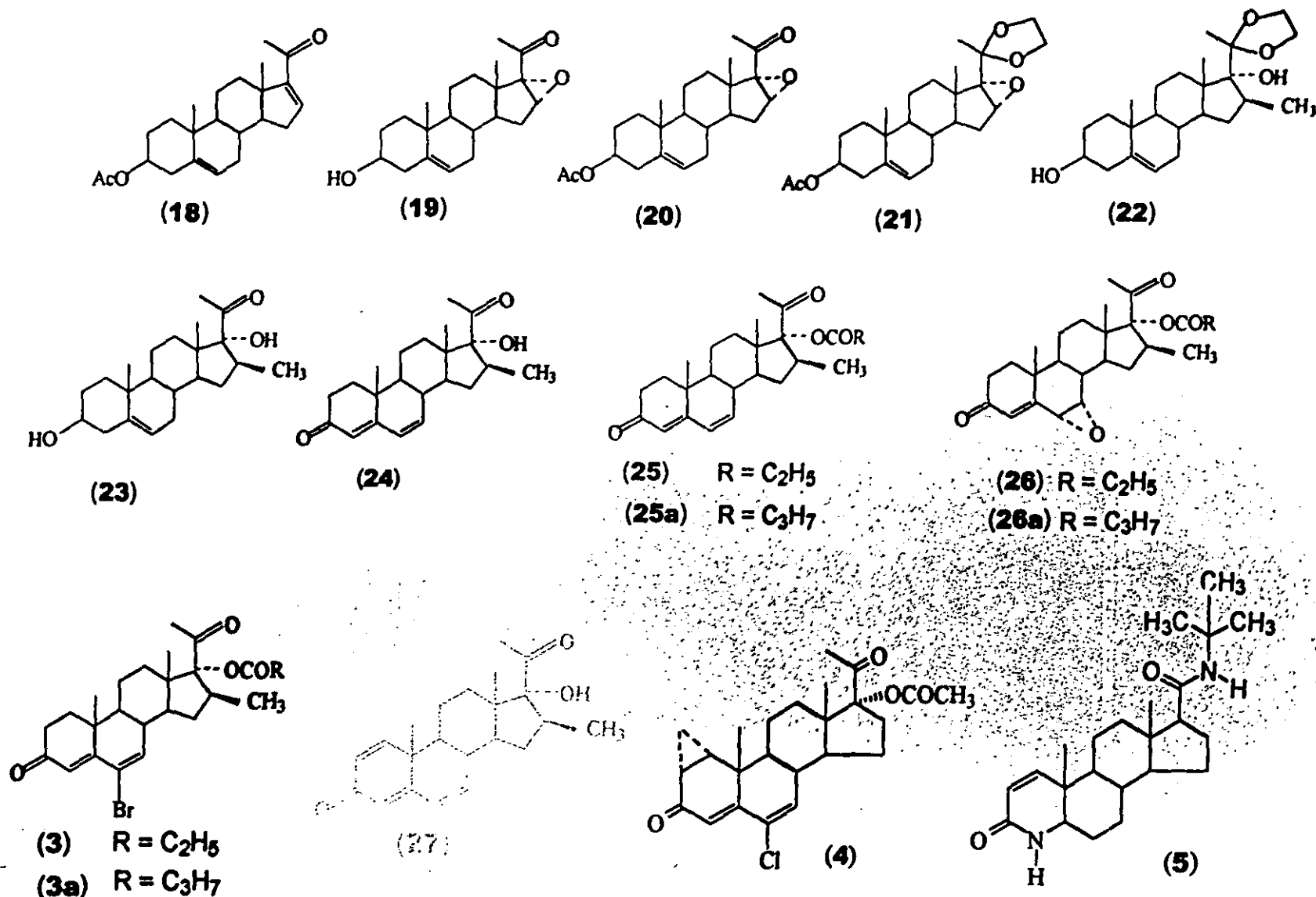
### 6.2.3. PREPARACION DE LA MEZCLA DE INCUBACION Y CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA.

La cuantificación de la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa se realizó incubando 100  $\mu$ g del extracto proteínico por 30 minutos a 37°C con 100 mM de solución buffer Tris-HCl (pH 7.0), 100  $\mu$ M NADPH, 500  $\mu$ M de testosterona ( $1.74 \times 10^{-3}$  mmol) 500  $\mu$ M del antiandrógeno ( $1.74 \times 10^{-3}$  mmol) que se deseaba analizar. El blanco en ésta determinación contenía todo lo anterior excepto el antiandrógeno. Los estándares utilizados fueron el acetato de ciproterona (4) y el proscar(5). La actividad enzimática se determinó 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 el no NADP<sup>+</sup>, por lo que los cambios en la oxidación pueden ser medidos siguiendo la disminución de la concentración de NADPH. Los valores de actividad farmacológica de cada intermediario y producto final son el promedio de cuatro determinaciones (91). Los datos se graficaron en función del % de inhibición de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa versus el tipo de esteroide (figura 4).





**FIGURA 4.** EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS INTERMEDIARIOS Y EL COMPUESTO FINAL



ESTANDARES

FIGURA 5. CORRELACIÓN DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS Y EL COLOR DE LA BARRA

### 6.3. RESULTADOS

Cabe mencionar que el presente trabajo es parte de un gran proyecto donde se realiza el diseño y síntesis de fármacos de naturaleza esteroidal que presenten actividad antiandrogénica por inhibir la acción de la enzima  $5\alpha$ -reductasa con solo un mínimo de efectos secundarios.

Al analizar los resultados obtenidos y considerando la parte estructural de la molécula que confiere actividad antiandrogénica a los derivados del pregnano, se observaron los siguientes resultados :

Como se esperaba, los compuestos intermedarios :

$3\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-diona (18)

$16\alpha,17\alpha$ -epoxi- $3\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (19)

$3\beta$ -acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (20)

$3\beta$ -acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno (21)

$6\alpha,7\alpha$ -epoxi- $16\beta$ -metil- $17\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona (26)

$6\alpha,7\alpha$ -epoxi- $16\beta$ -metil- $17\alpha$ -butiroloxi-4-pregnen-3,20-diona (26a)

no mostraron actividad antiandrogénica apreciable ( debido a la falta del sistema conjugado 4,6-dien-3-ona).

Los intermedarios :

$16\beta$ -metil- $17\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (25)

$16\beta$ -metil- $17\alpha$ -butiroloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (25a)

exhibieron un efecto antiandrogénico ligeramente menor que proscar (5) pero más alta que acetato de ciproterona (4). Este hecho era de esperarse porque ambos compuestos tienen la entidad altamente conjugada 4,6-dien-3-ona, que es muy similar al compuesto denominado trienona (1,4,6-trien-3-ona, 27)

Los compuesto :

**6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3)** y el compuesto similar (3a), exhibieron una actividad más alta que proscar (5), pero en cambio el compuesto denominado como trienona (27) presentó una actividad mayor en un 300 %. El compuesto oxidado libre (24) tuvo una actividad más baja comparada con los derivados oxidados (25) y (25a), donde se presenta el alcohol en C-17 $\alpha$  esterificado.

Los resultados demuestran que cuando el antiandrógeno tiene un sistema conjugado más largo, este rasgo estructural mejora la actividad como se observa en el caso del compuesto denominado trienona (27).

Los resultados de la actividad *in vitro* preliminar de los compuestos más activos en este análisis :

**6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3)**

**17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (27)**

los hacen buenos candidatos para realizar estudios farmacológicos adicionales como:

- estudios específicos *in vitro* sobre la inhibición de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (Tipo II) , a efectuarse próximamente en la división de Bioquímica de la Universidad de Lexington, Kentucky, E.U.
- actividad antiandrogénica *in vivo* sobre la regresión del cáncer prostático inducido en ratas, así como la valoración de efectos colaterales (prostágenos y tóxicos).
- establecer el mecanismo cinético de inhibición

así como también se propone realizar los ensayos sobre vías celulares que recomienden su eficacia sobre la posible utilización o eliminación en tratamientos de antiandrógenos en humanos.

## 7. CONCLUSIONES

En éste trabajo se presentó la síntesis y la evaluación farmacológica de un nuevo compuesto esteroidal 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3) con actividad antiandrogénica. El rendimiento global para este nuevo derivado es 7.01% de rendimiento neto.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos y la discusión realizada en el trabajo se concluye lo siguiente :

- Se obtuvo el derivado esteroidal

**6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3)**

con una actividad antiandrogénica 20 % mayor que el fármaco comercial acetato de ciproterona (4), pero más baja que proscar (5) que actualmente es el fármaco de elección para la inhibición de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.

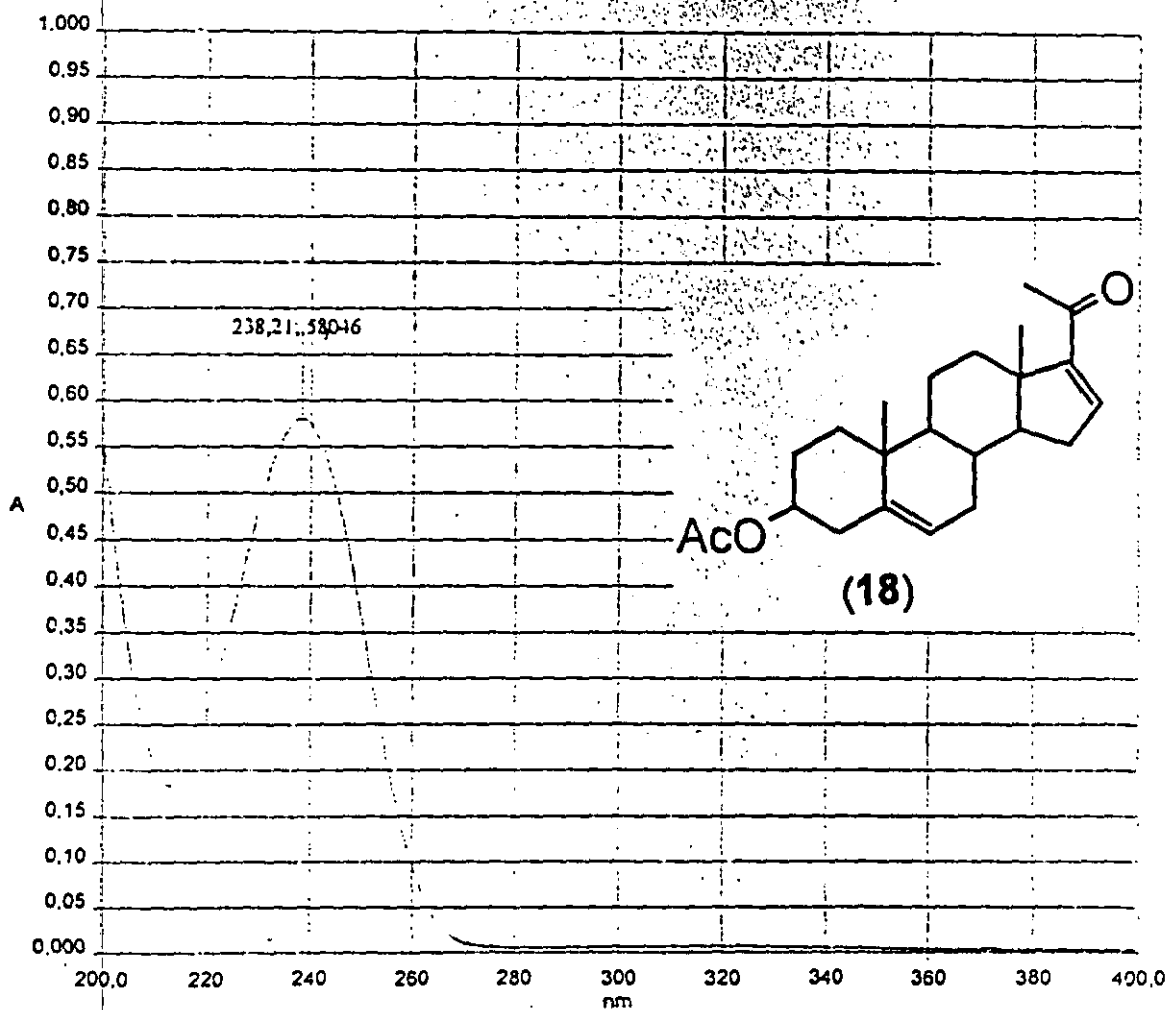
El producto sintetizado (3) presentó mayor actividad que su homólogo 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -butiroloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (3a) que tiene un átomo de carbono más en la cadena lateral del éster. Al parecer la longitud de la cadena del éster es inversamente proporcional al porcentaje de inhibición de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.

- Se implementó la obtención directa del sistema 4,6-dien-3-ona mediante un método desarrollado en nuestro laboratorio y con buen rendimiento.

## Conclusiones

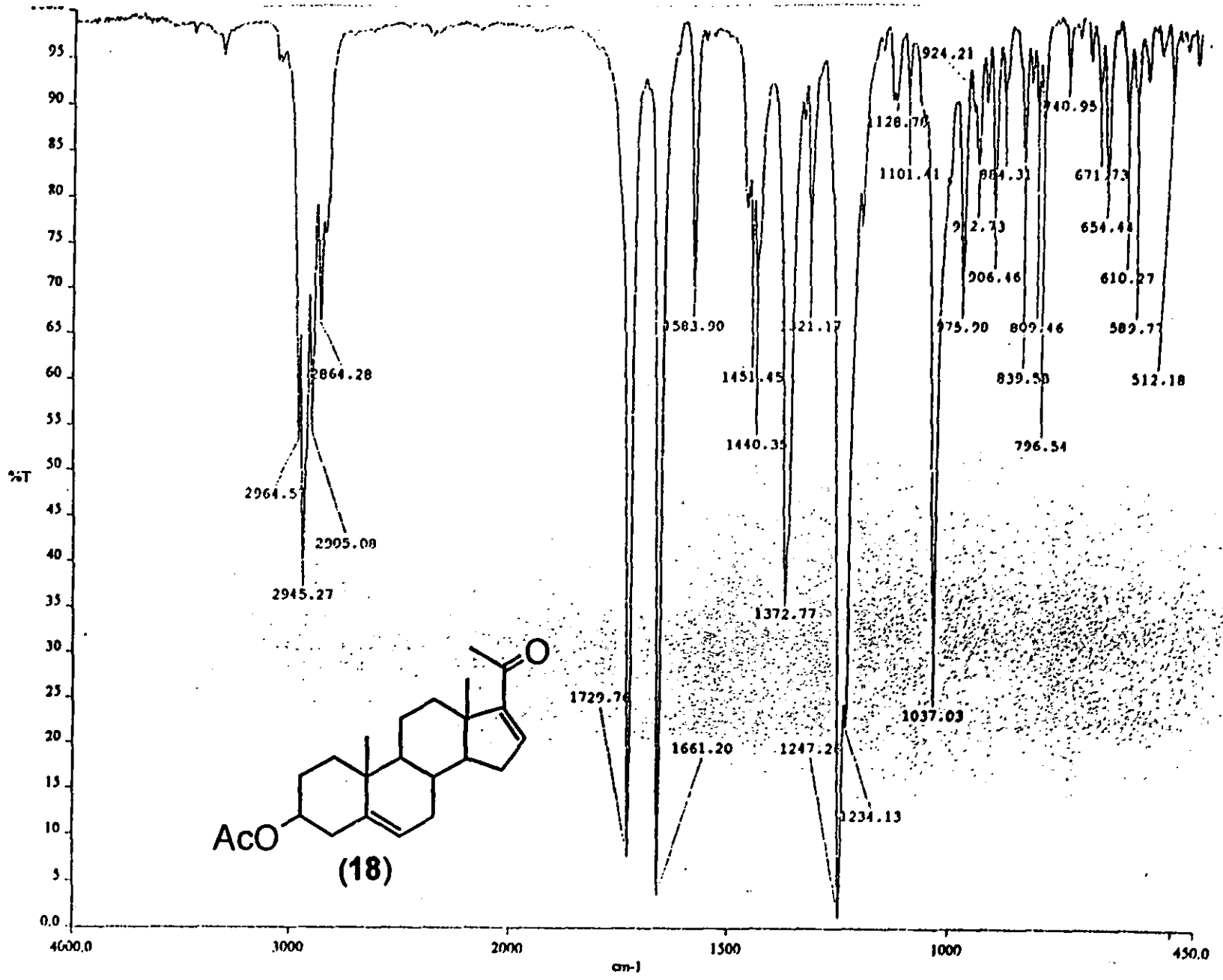
- Las funciones necesarias para que un compuesto esteroidal derivado del pregnano presente actividad antiandrogénica se enlistan a continuación :
  - un sistema conjugado 4,6-dien-3-ona
  - un halógeno en C-6
  - un éster en C-17 $\alpha$
  - un metilo en C-16  $\beta$
- Resulta indispensable llevar a cabo el ensayo de actividad biológica exclusivamente sobre la isoforma de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (Tipo II) que recomienden o descarten la eficacia de los nuevos antiandrógenos.

## 8. ESPECTROSCOPIA



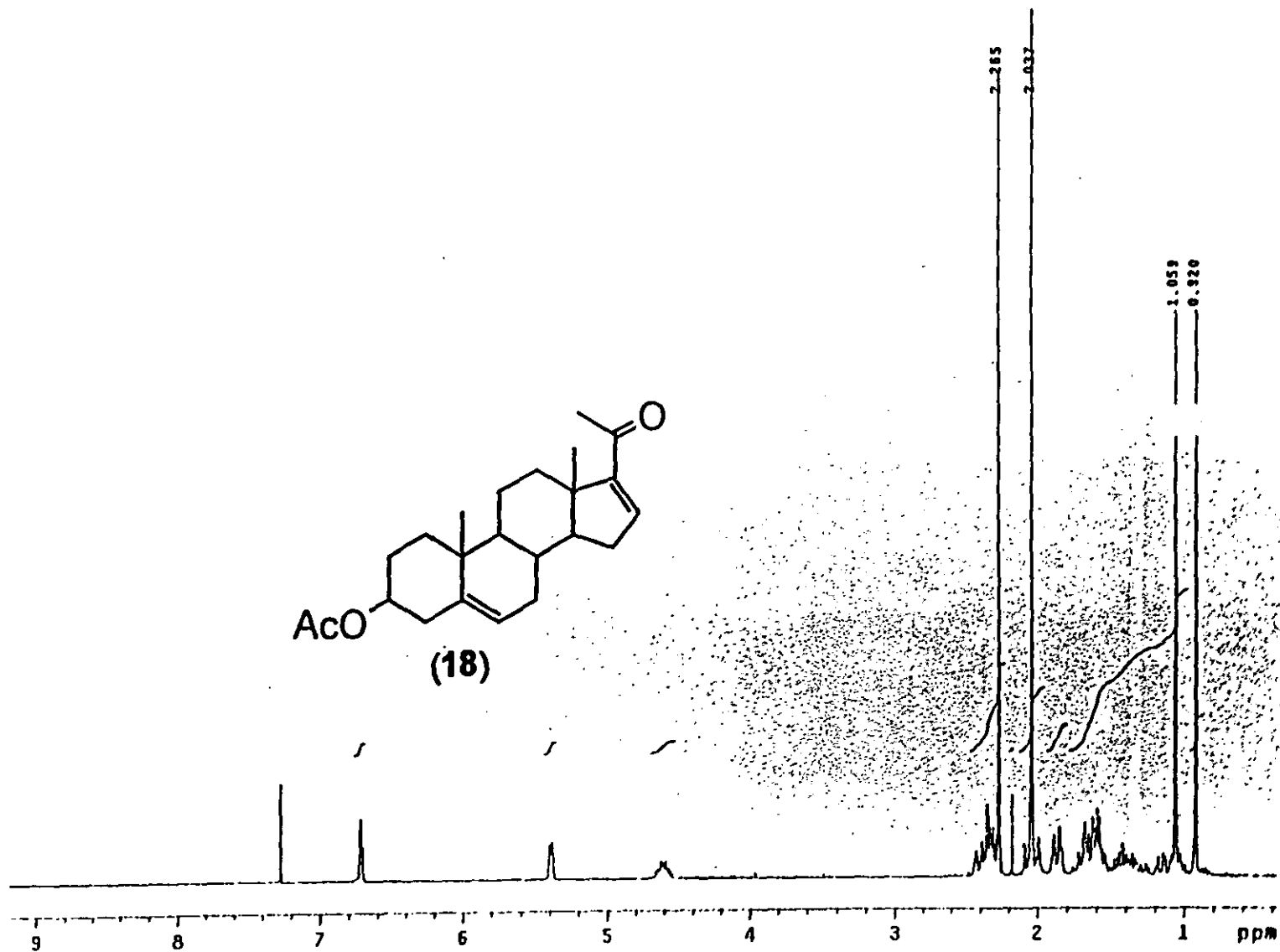
**Espectro No. 1** Espectroscopia de UV del compuesto 3β-acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona. (18)

72

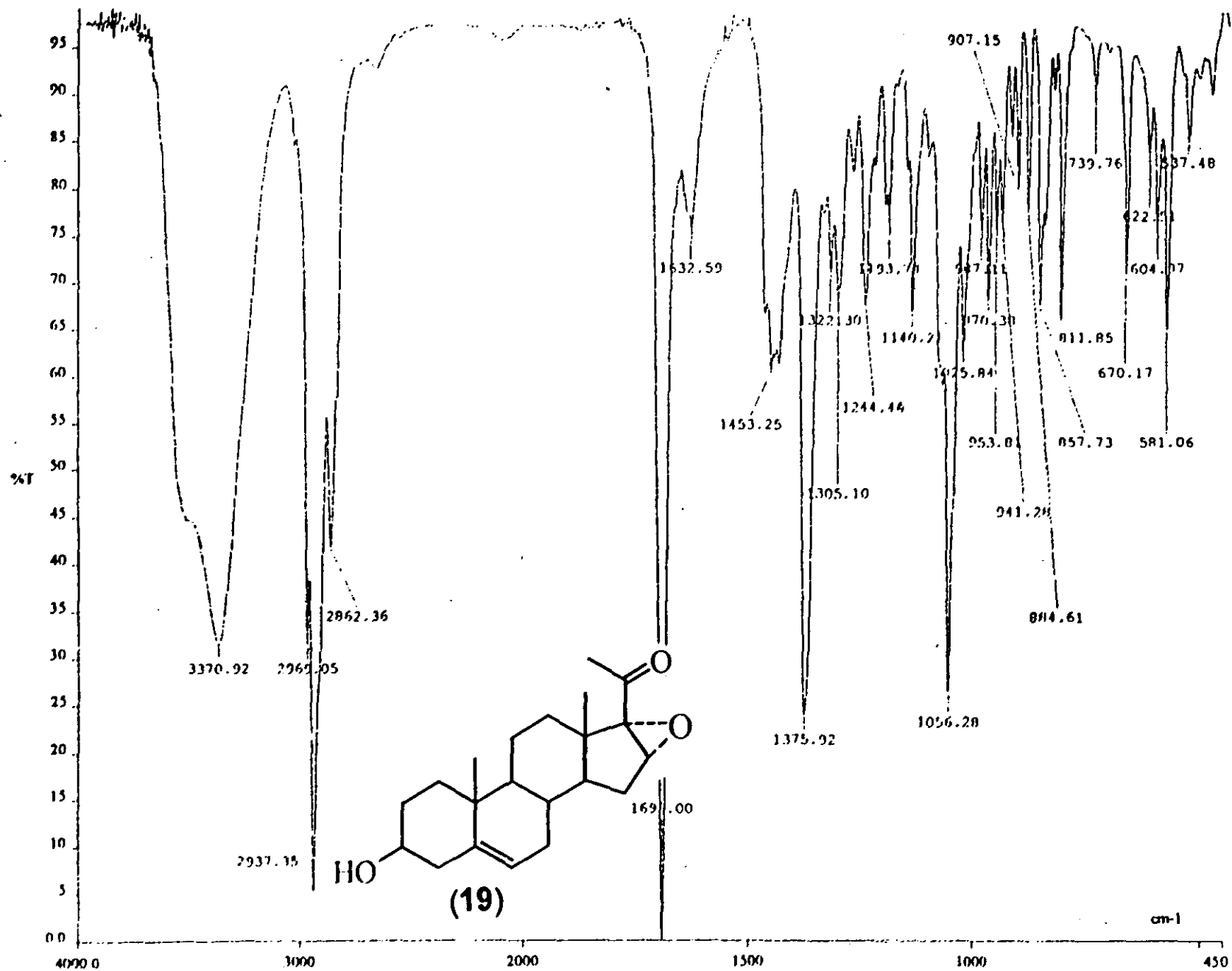


Espectro No. 2 Espectroscopía de IR del compuesto 3β-acetoxy-5,16-pregnadien-20-ona. (18)



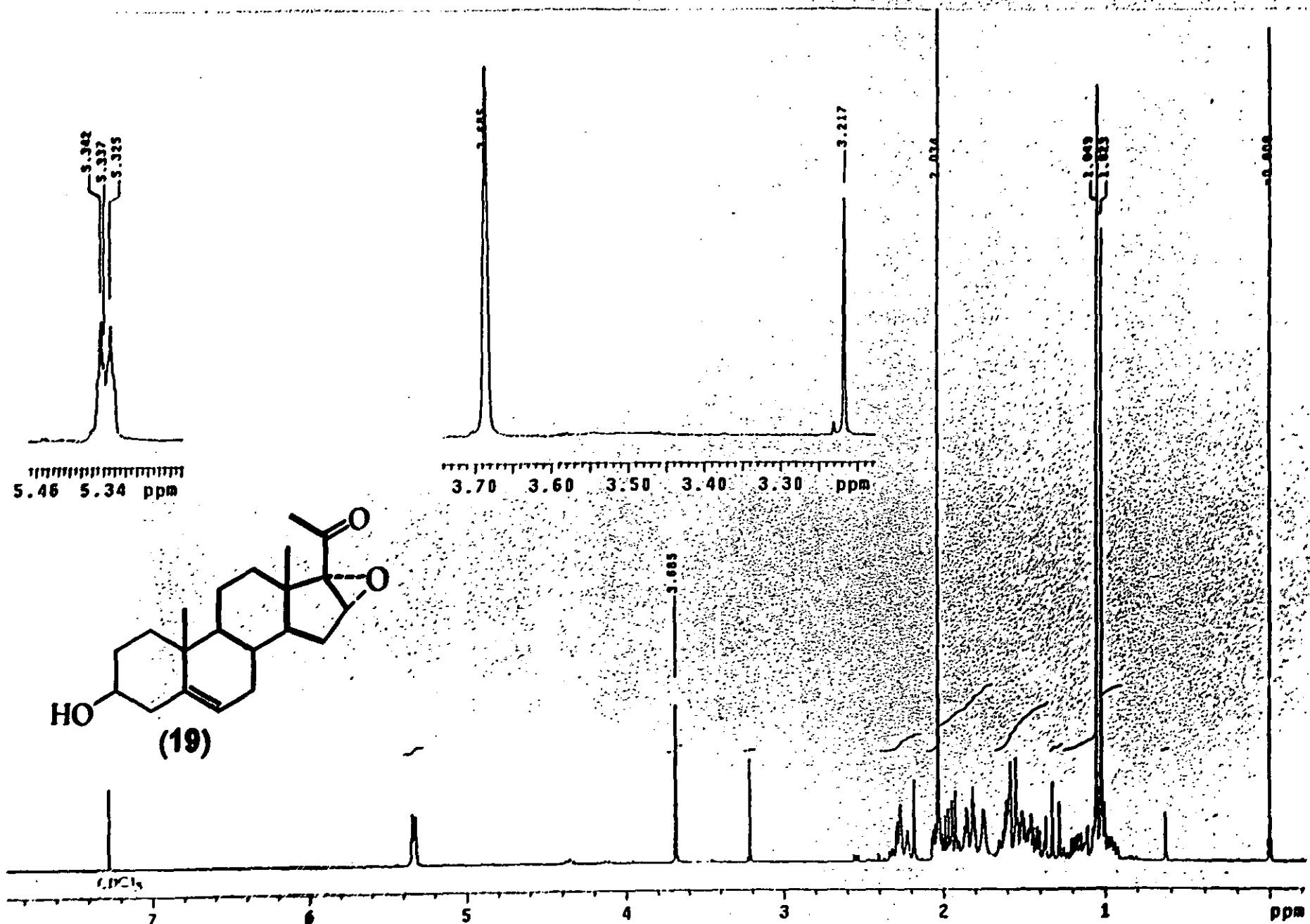


Espectro No. 3 Espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 3β-acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona. (18)

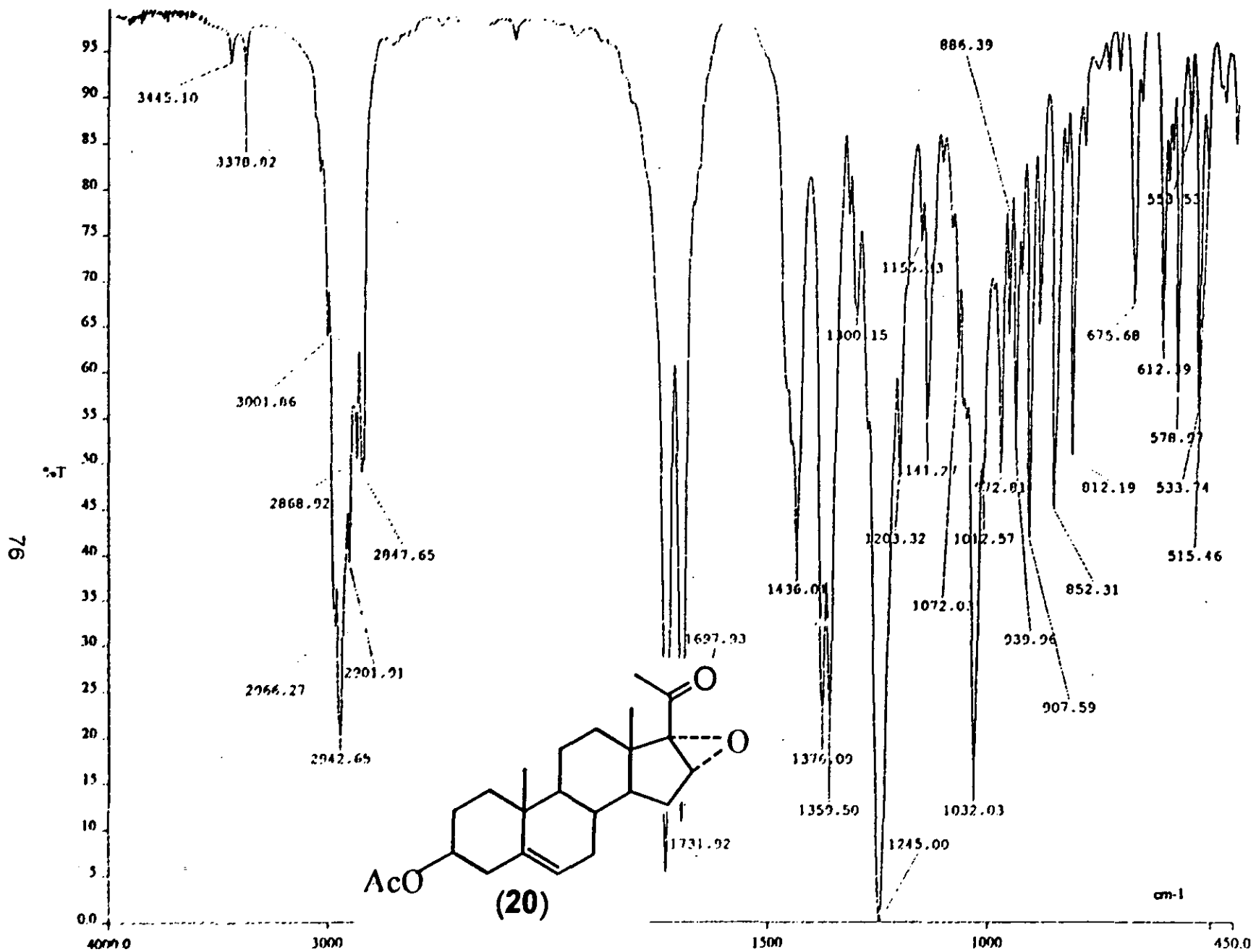


Espectro No. 4 Espectroscopía de IR del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (19)

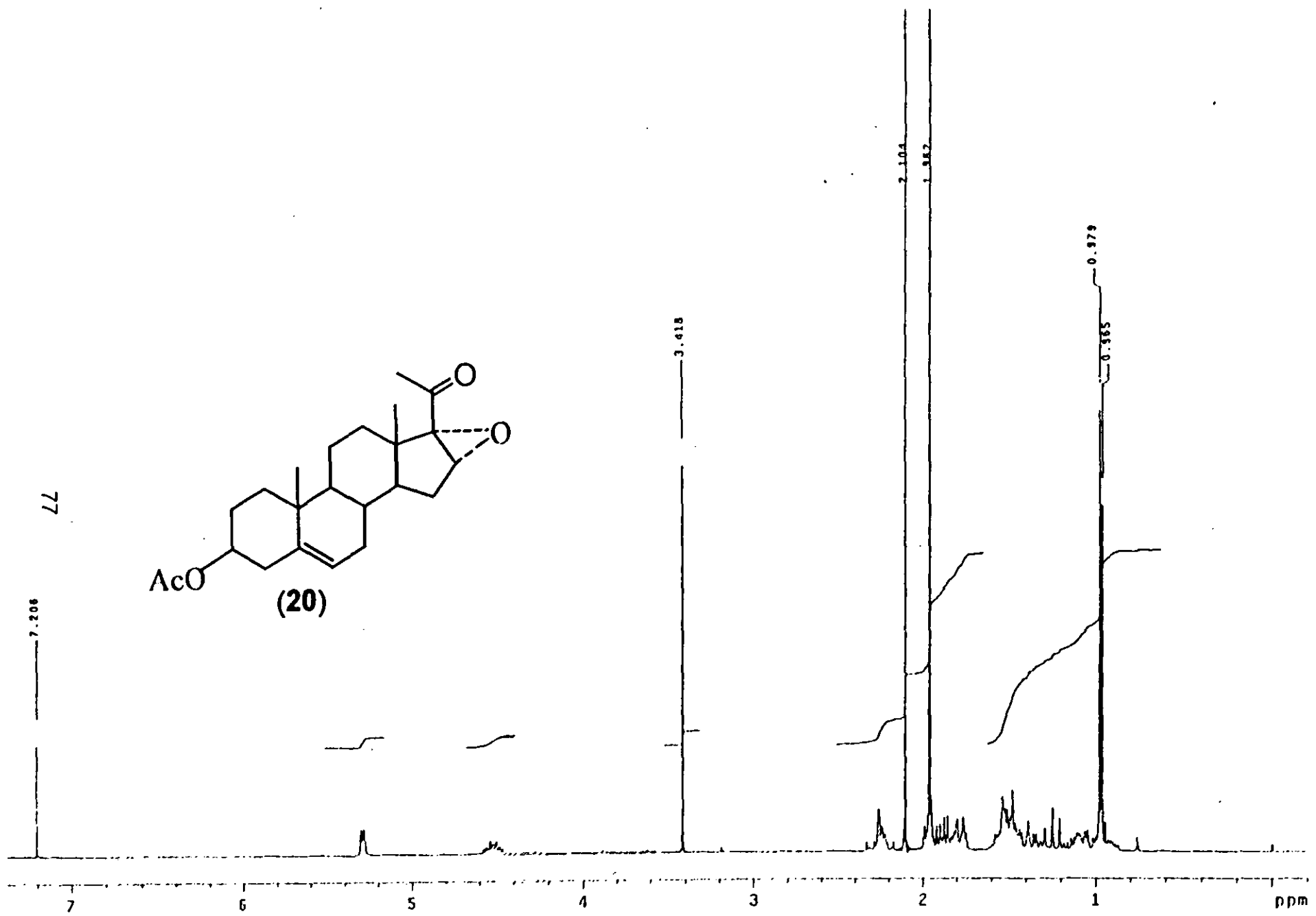
75



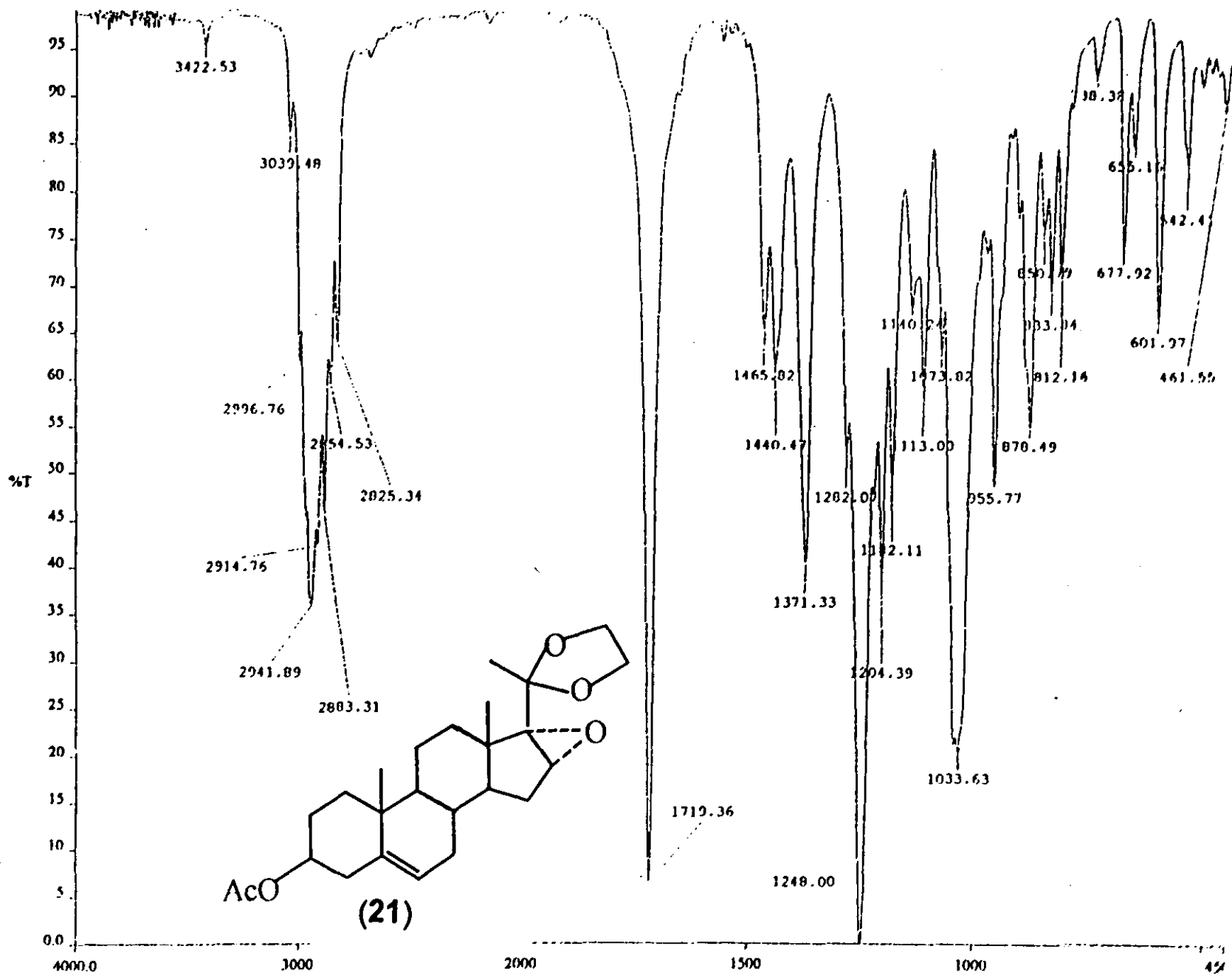
Espectro No. 5 Espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona. (19)



Espectro No. 6 Espectroscopía de IR del compuesto 3 $\beta$ -acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona. (20)

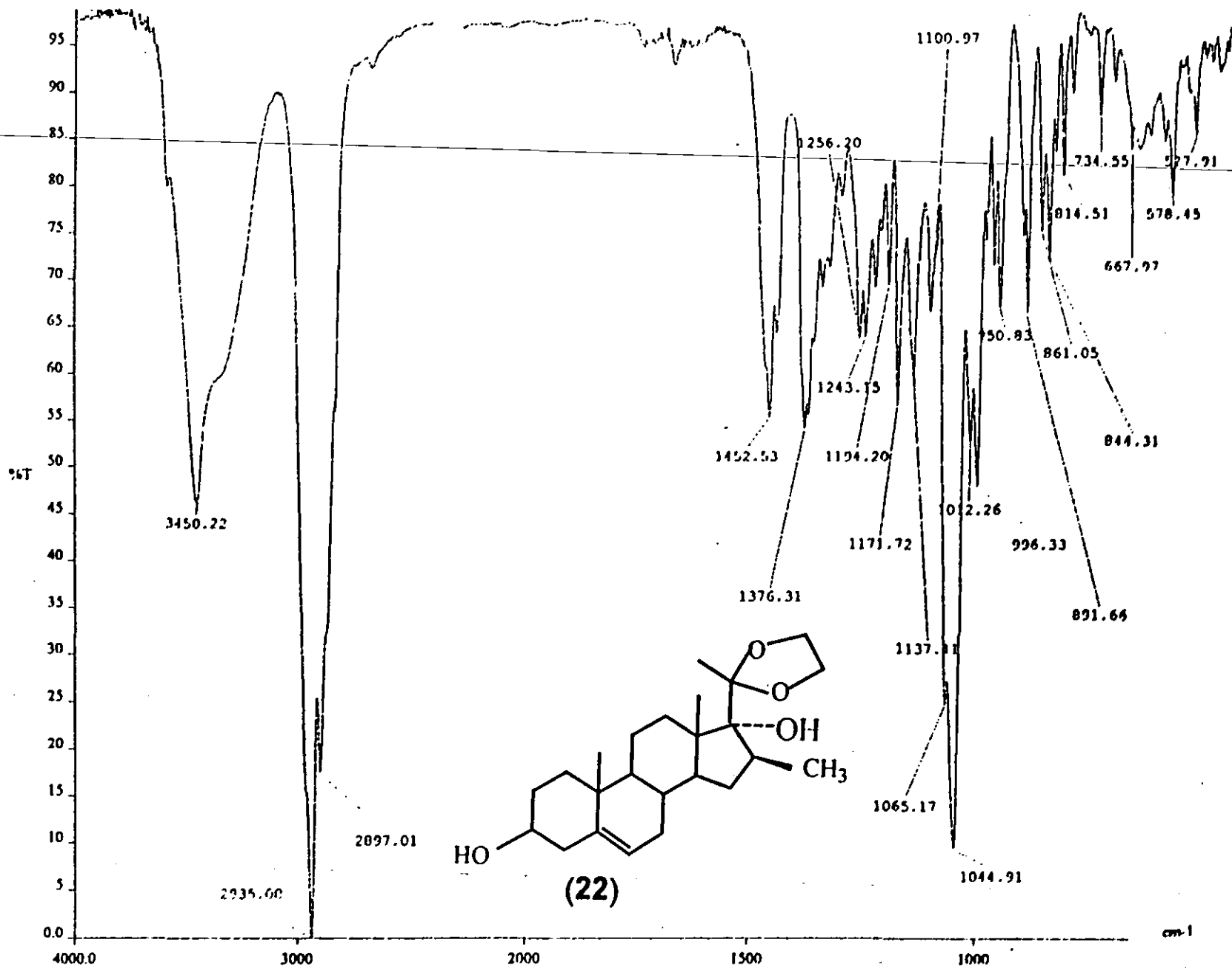


Espectro No. 7 Espectroscopia de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 3β-acetoxi-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona. (20)

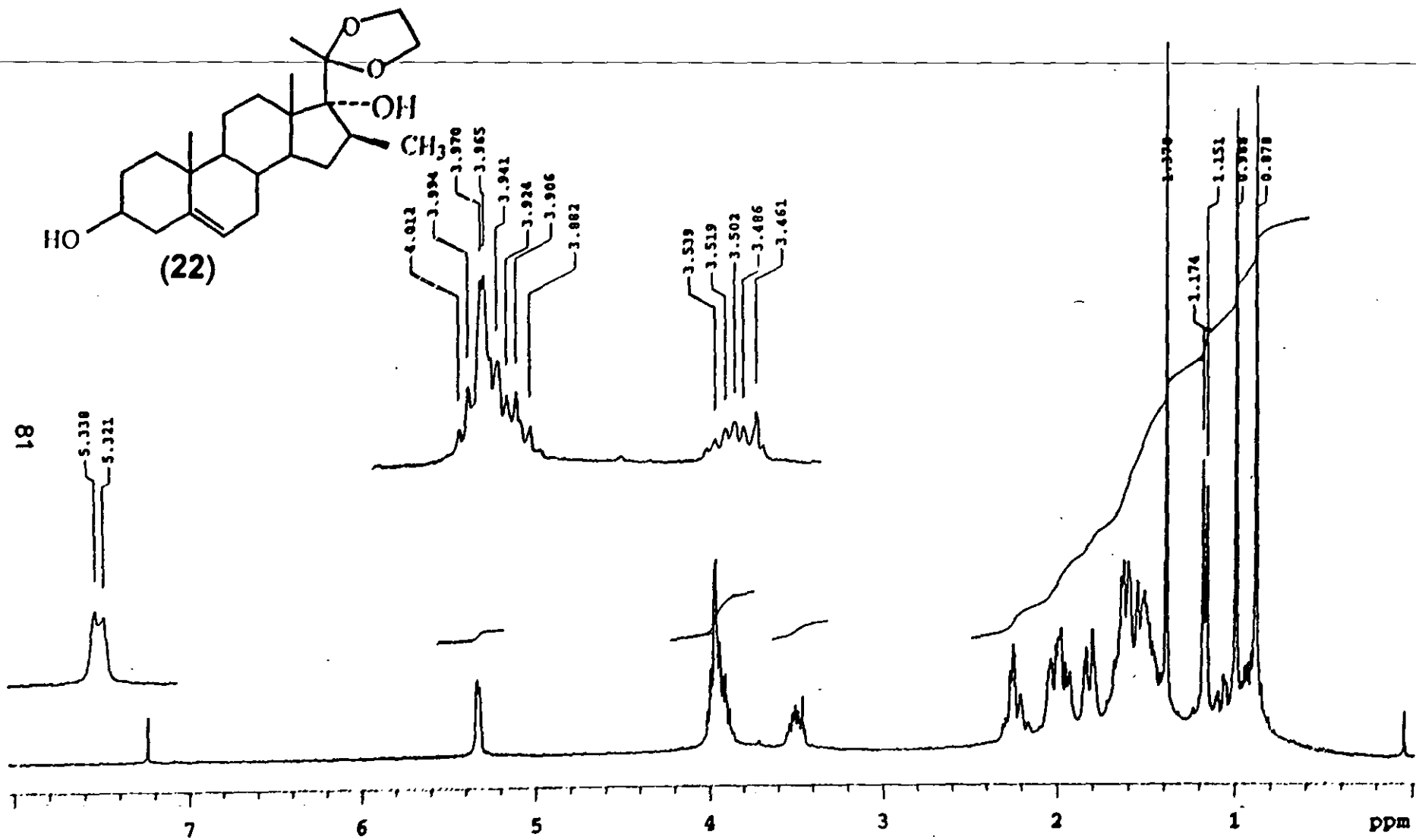


Espectro No. 8 Espectroscopía de IR del compuesto 3β-acetoxy-16α,17α-epoxy-20-etilendioxi-5-pregneno. (21)

08

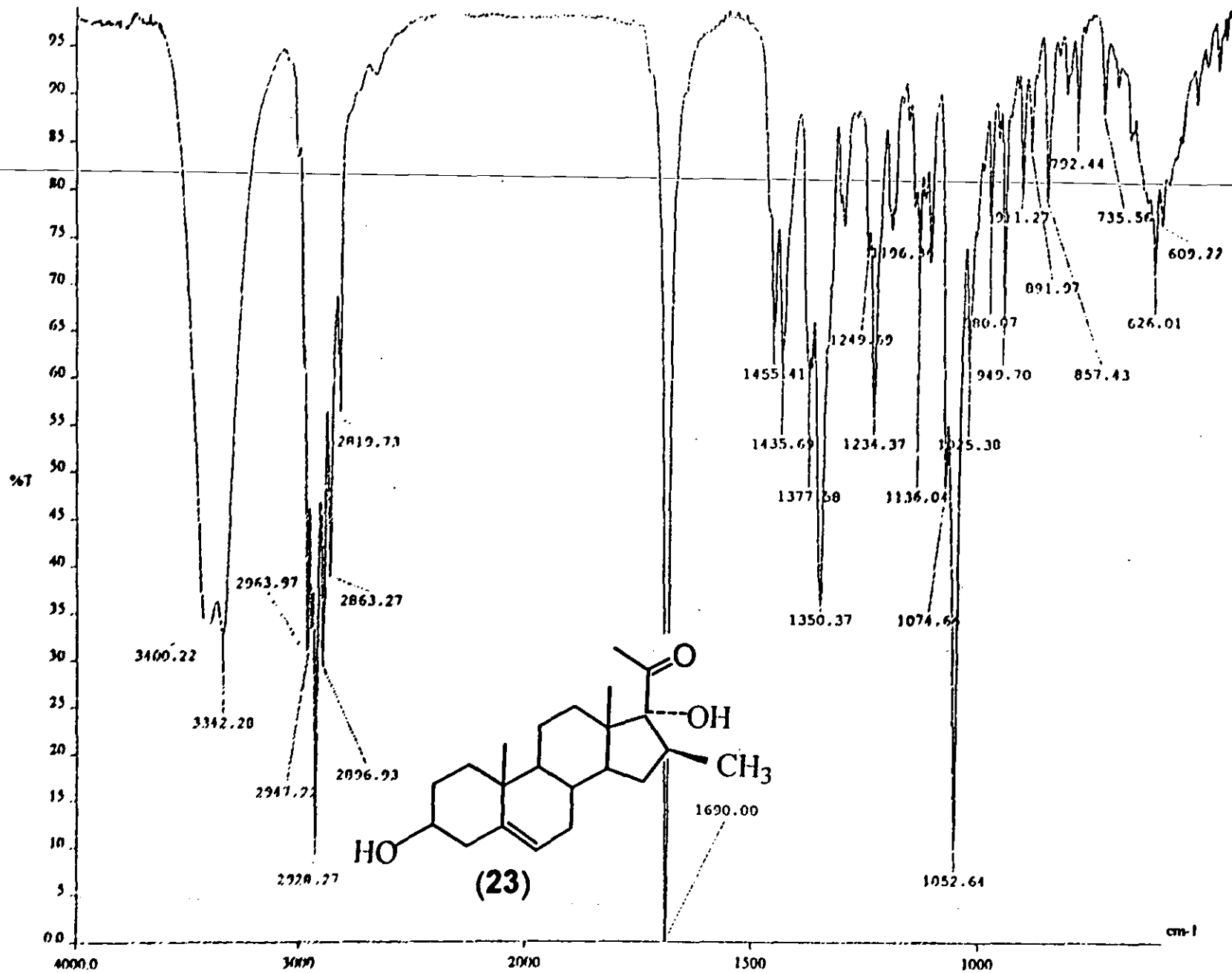


Espectro No.10 Espectroscopía de IR del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregнено. (22)



Espectro No.11 Espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 3β,17α-dihidroxi-20-etilendioxi-16β-metil-5-pregнено. (22)

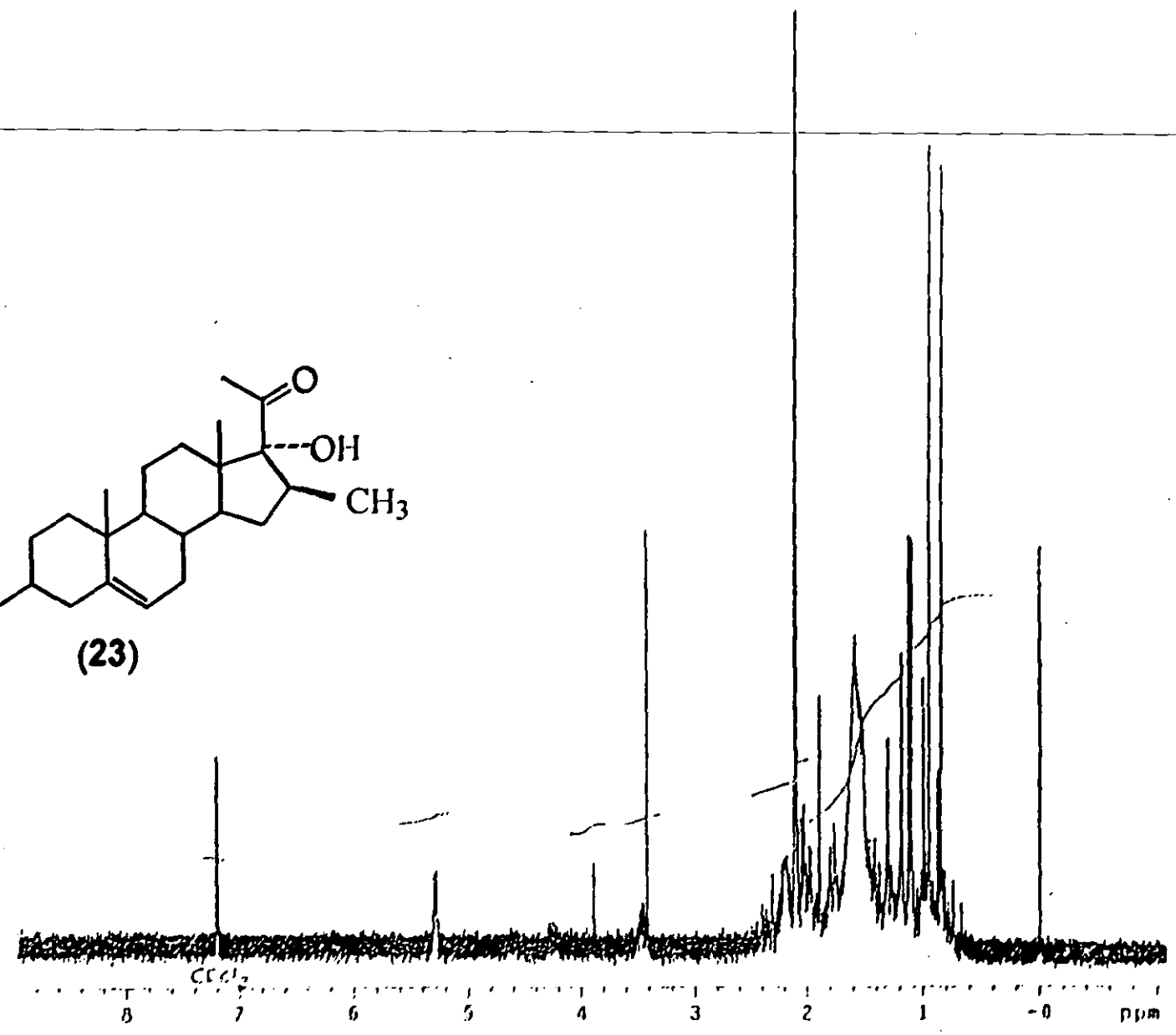
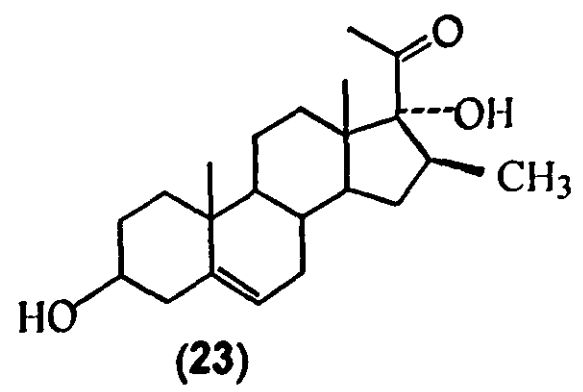




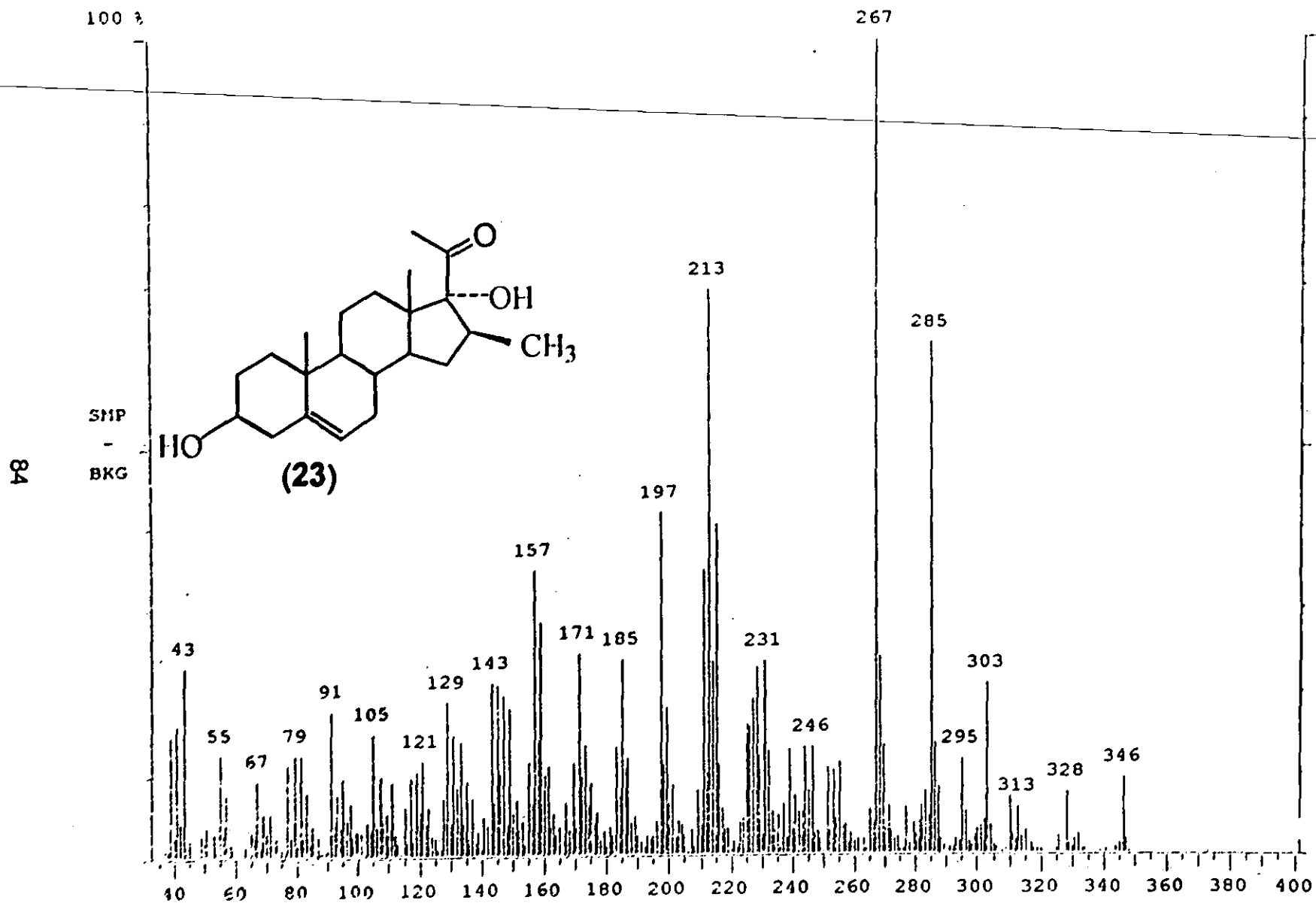
Espectro No.12

Espectroscopía de IR del compuesto 3β,17α-dihidroxi-16β-metil-5-pregnen-20-ona. (23)

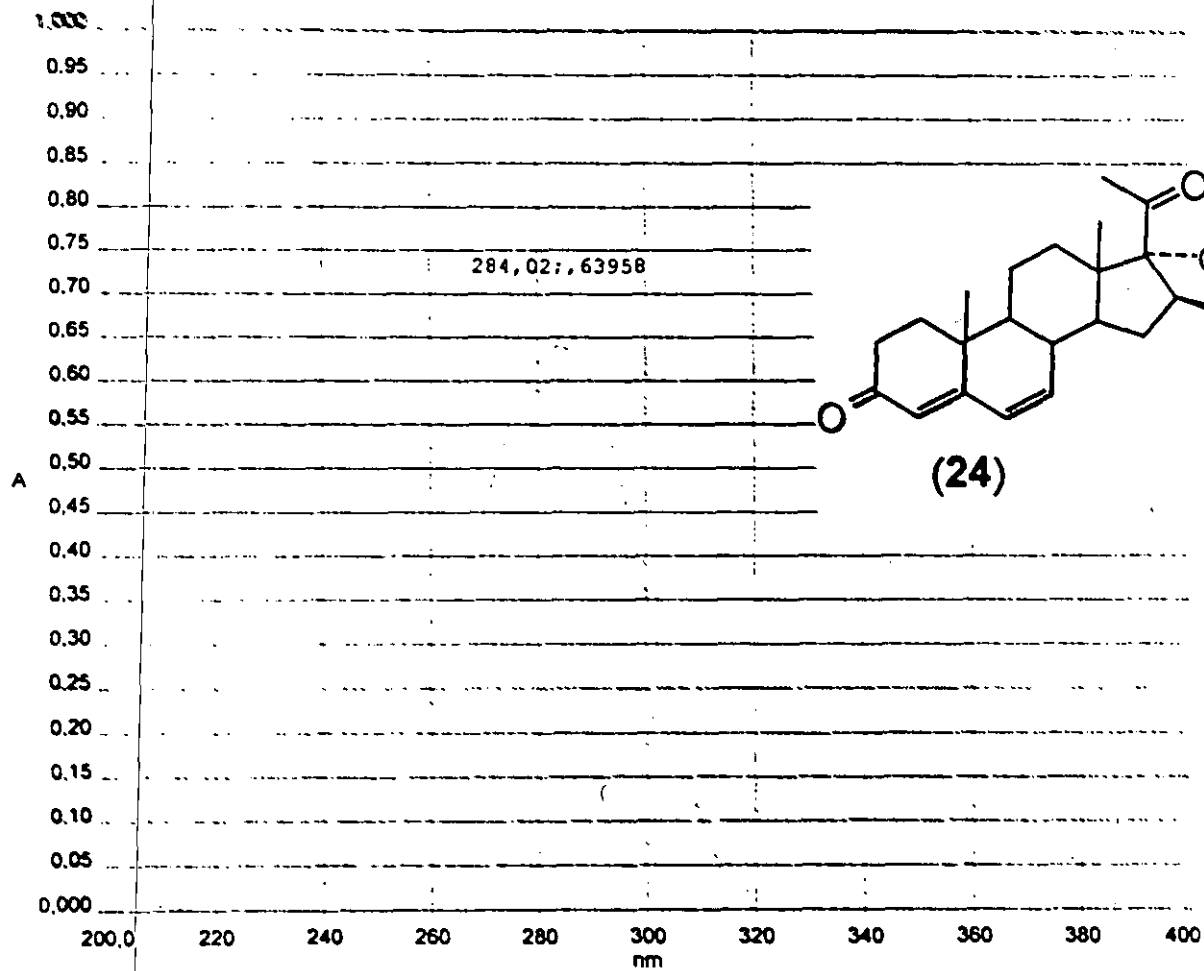
83



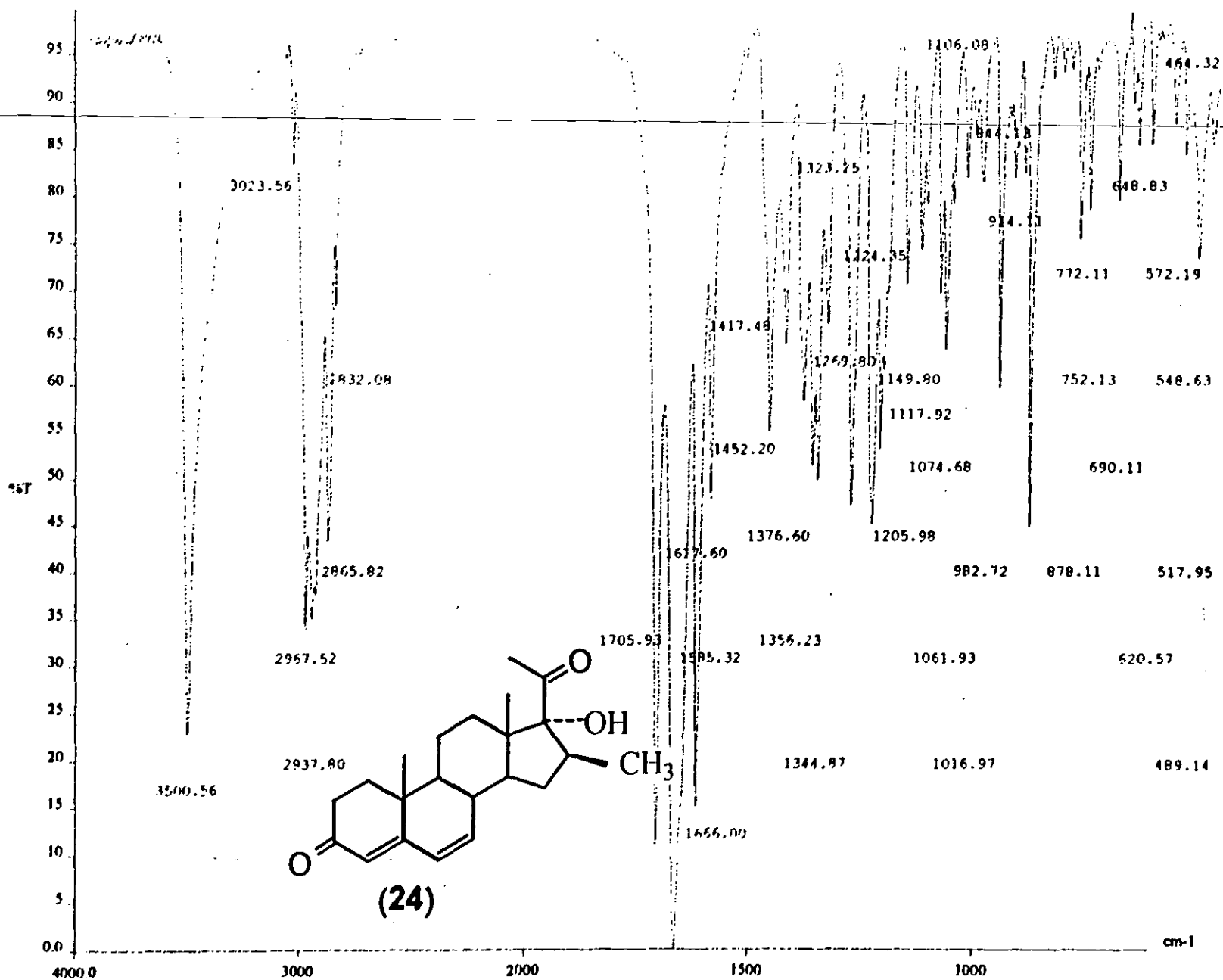
Espectro No.13 Espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23)



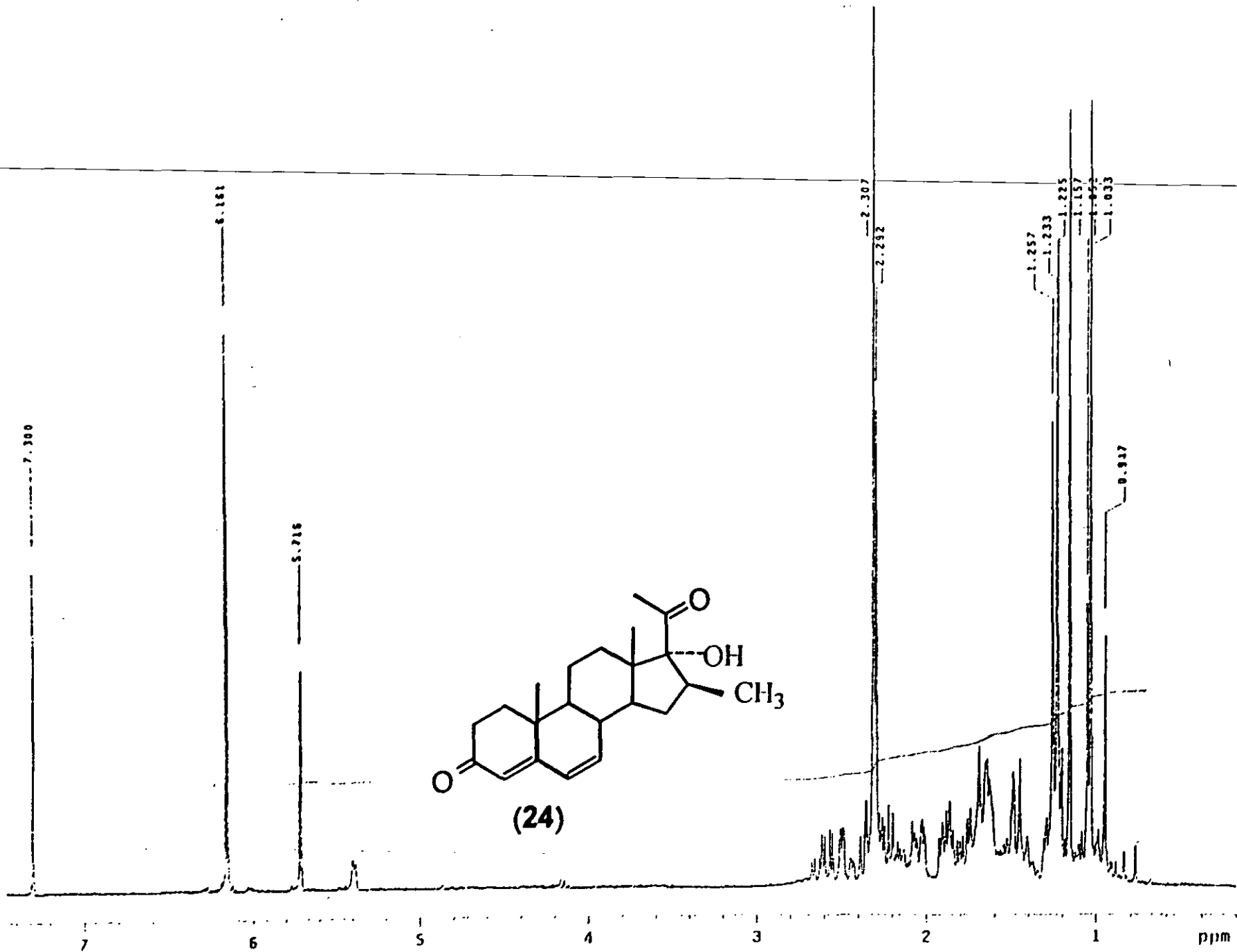
Espectro No.14 Espectroscopía de MASAS(EI) del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona. (23)



**Espectro No.15** Espectroscopía de UV del compuesto **17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24)**

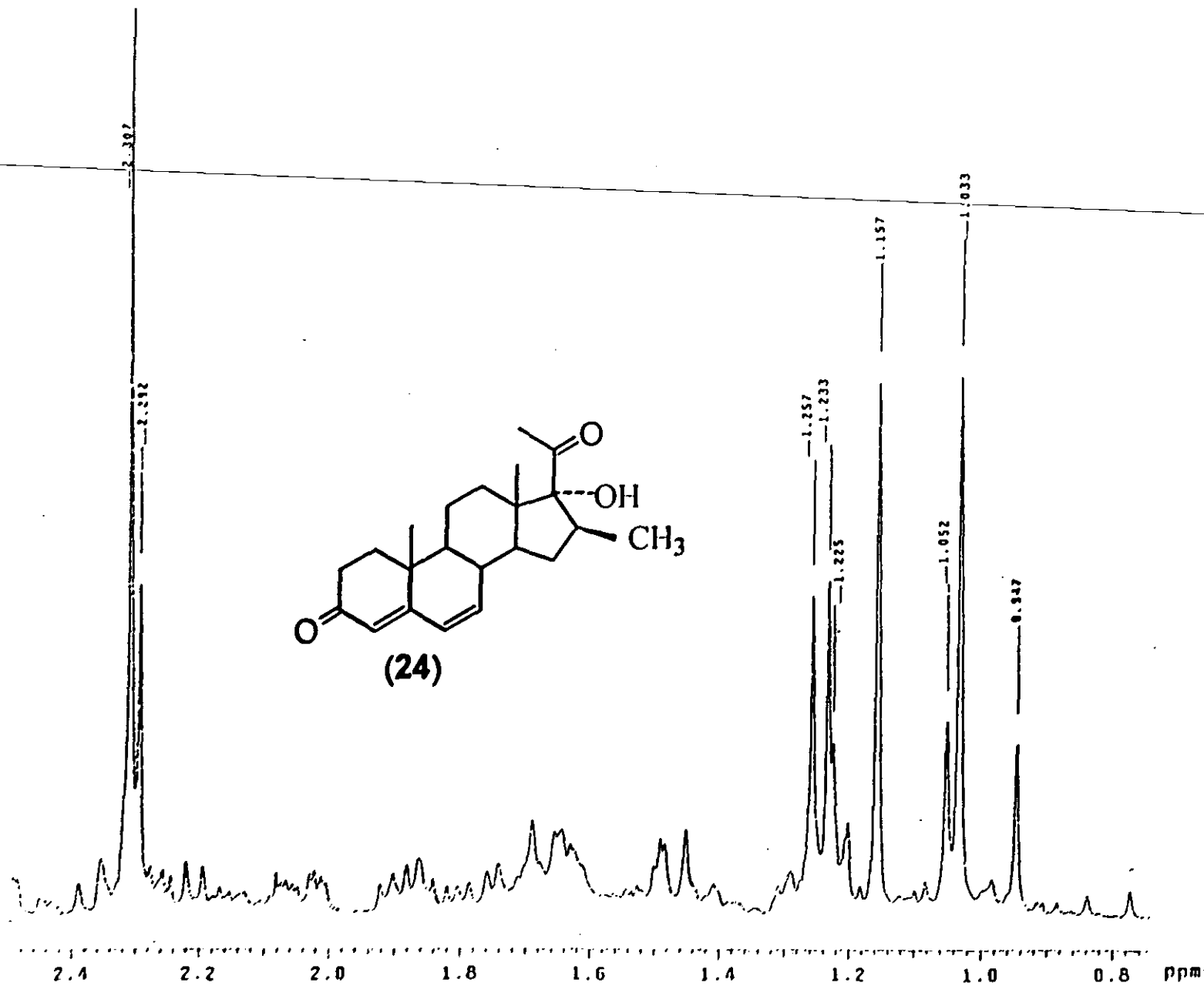


Espectro No.16 Espectroscopía de IR del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24)

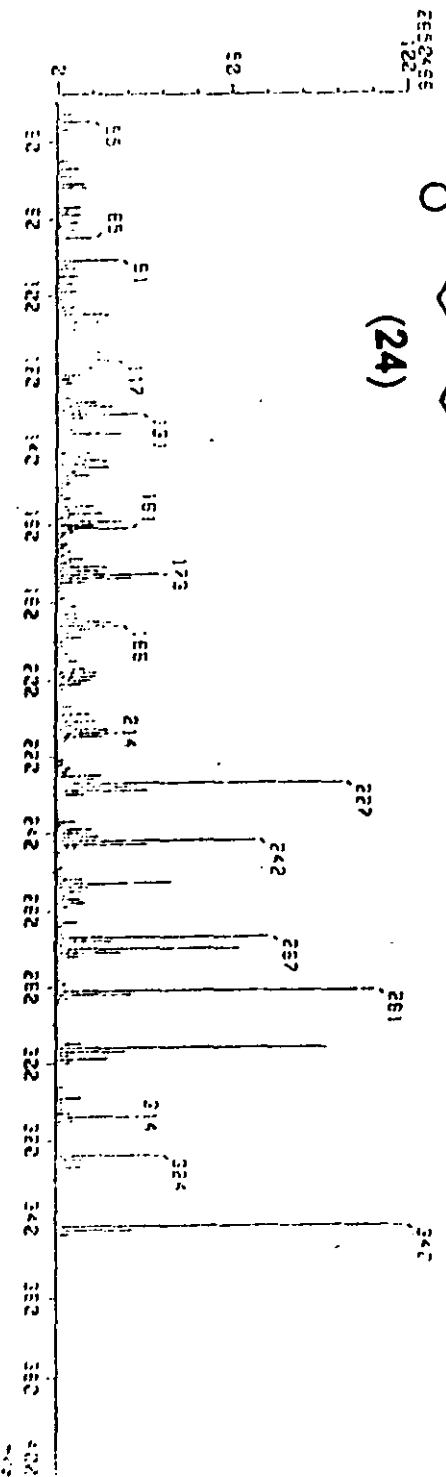
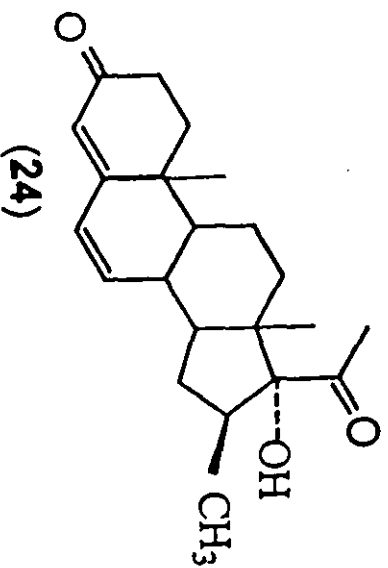


Espectro No.17 Espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24)

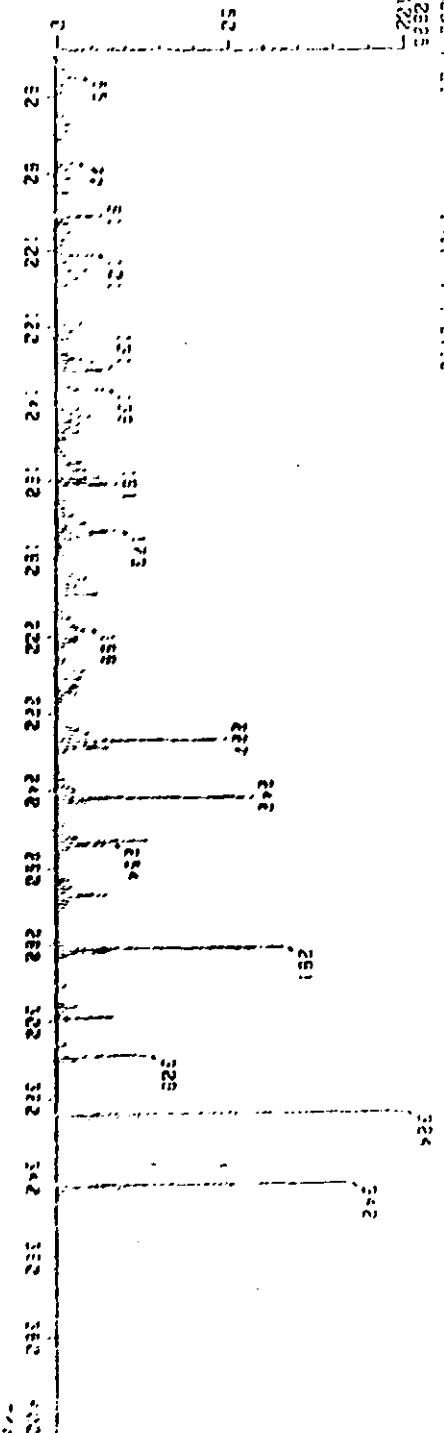
88



**Espectro No.18 Espectroscopía amplificada de RMN<sup>1</sup>H, zona 0.8-2.4 ppm del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24)**

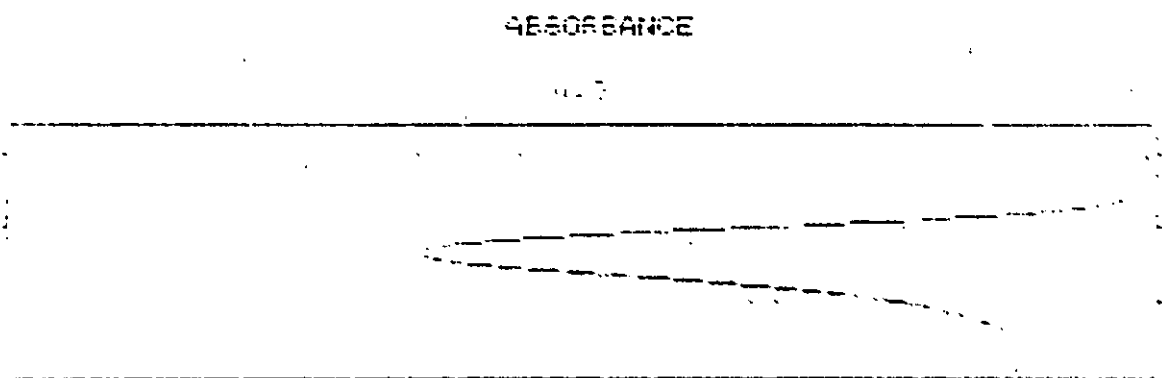
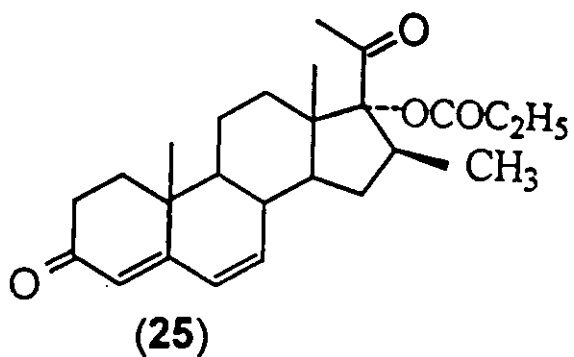


Mass Spectrum  
 RT : 26.66 min  
 Ion Mode : EI+  
 Scan : 575-585-588  
 Vol. : 42.15  
 Temp : 32.2 deg.C



**Espectro No.19 Espectroscopia de MASAS(EI<sup>+</sup>) del compuesto 17α-hidroxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona. (24)**



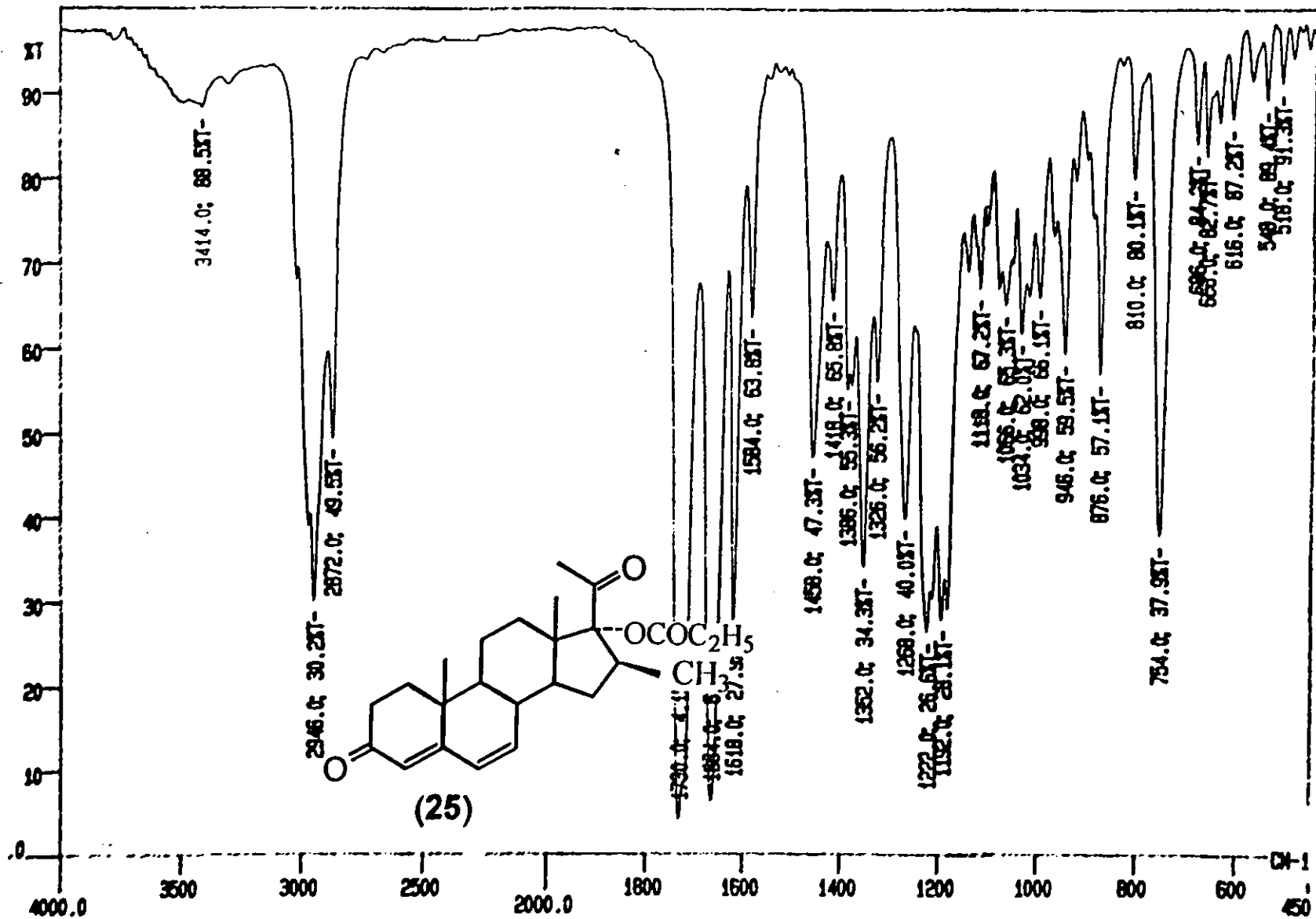


WAVELENGTH : 200-300

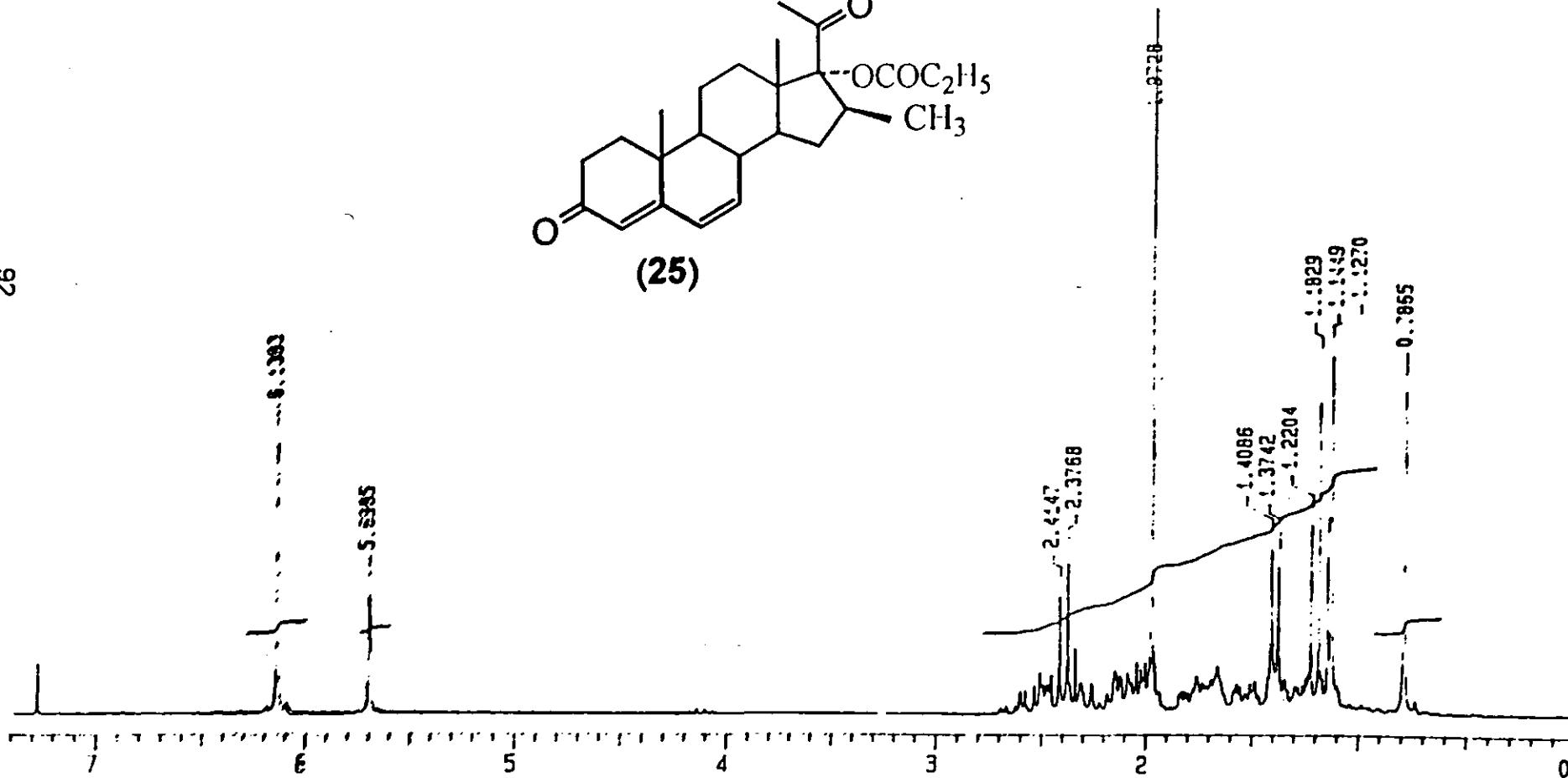
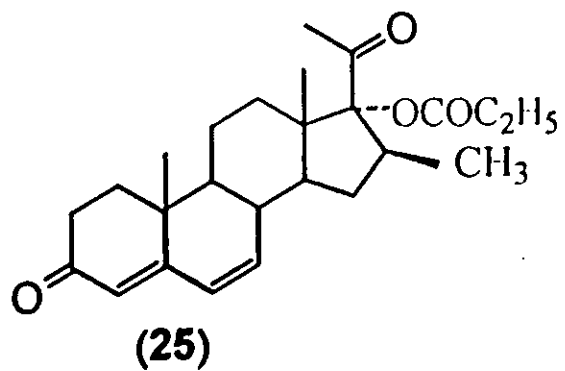
SCALE: 0.01

WAVELENGTH	ABSORBANCE	WAVELENGTH	ABSORBANCE
200	0.041	240	0.101
220	0.041	260	0.101
240	0.041	280	0.101
260	0.041	300	0.101

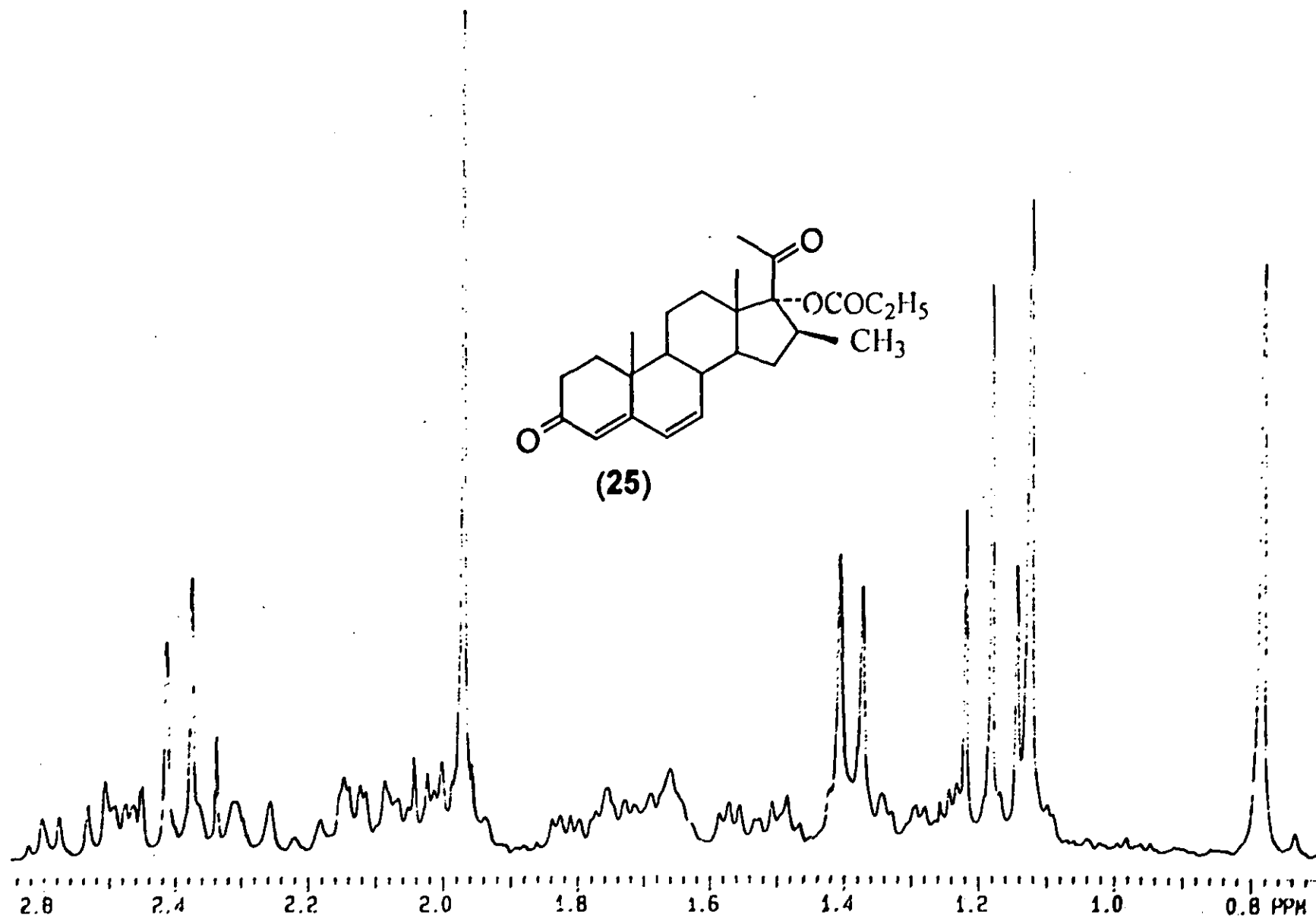
Espectro No. 20 Espectroscopía de UV del compuesto del compuesto 16β-metil-17α-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25)



Espectro No. 21 Espectroscopía de IR del compuesto 16β-metil-17α-propioniloxy-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25)

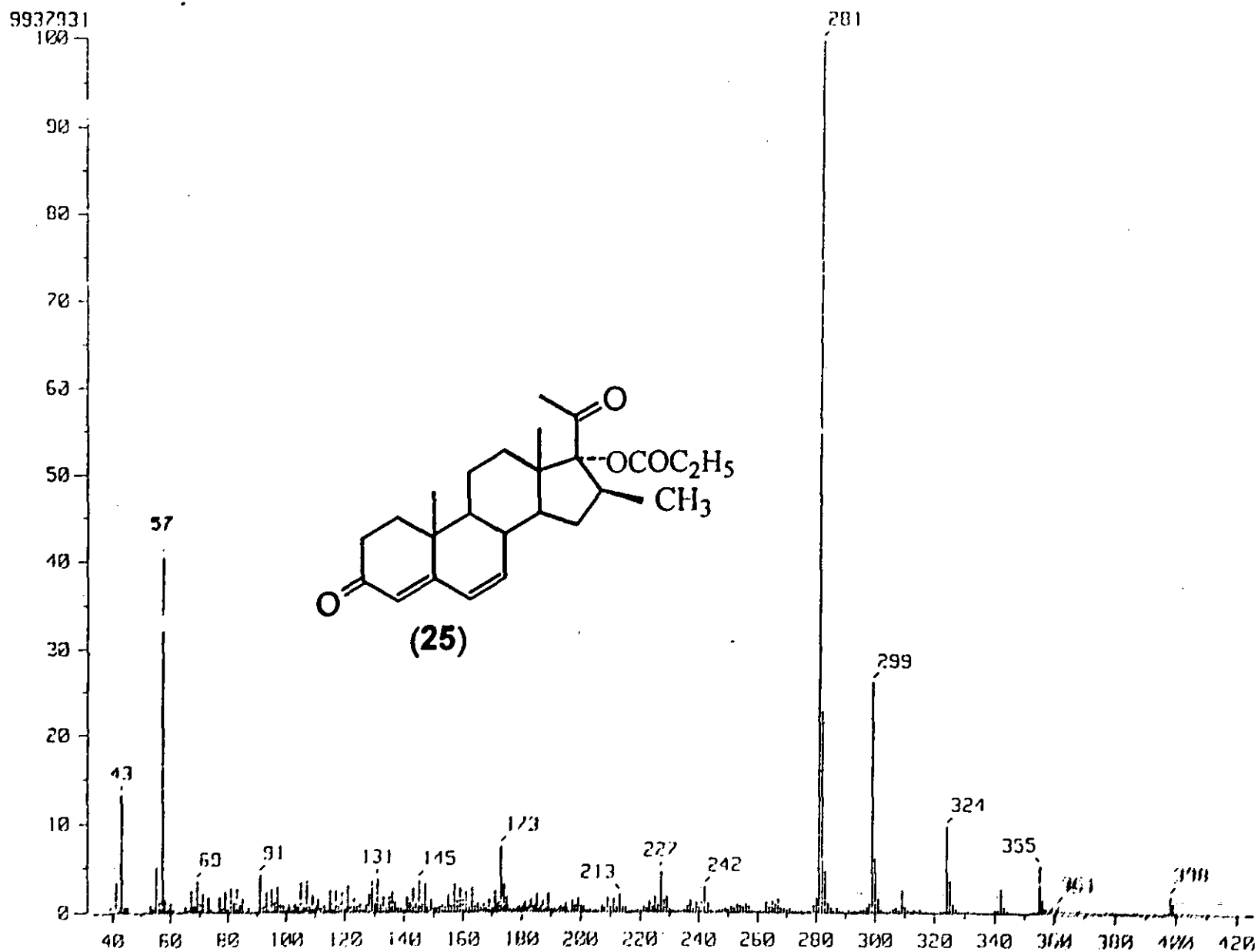


Espectro No. 22 Espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25)

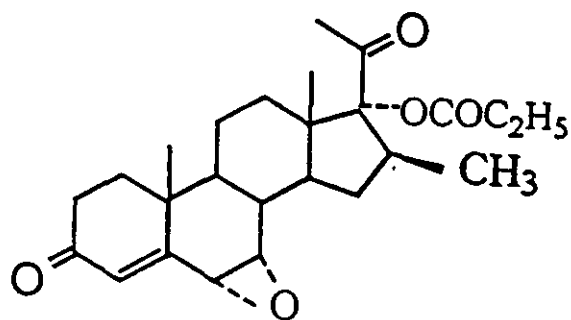


**Espectro No. 23** Espectroscopía amplificada de  $\text{RMN}^1\text{H}$ , zona 0.8-2.8 ppm del compuesto 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25)

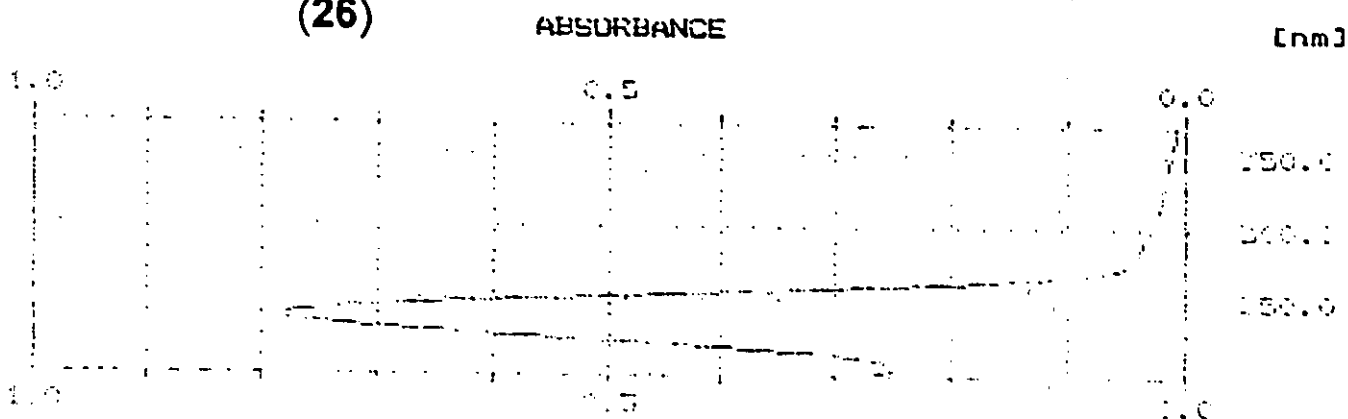
94



**Espectro No. 24** Espectroscopia de MASAS(EI) del compuesto 16β-metil-17α-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (25)



(26)

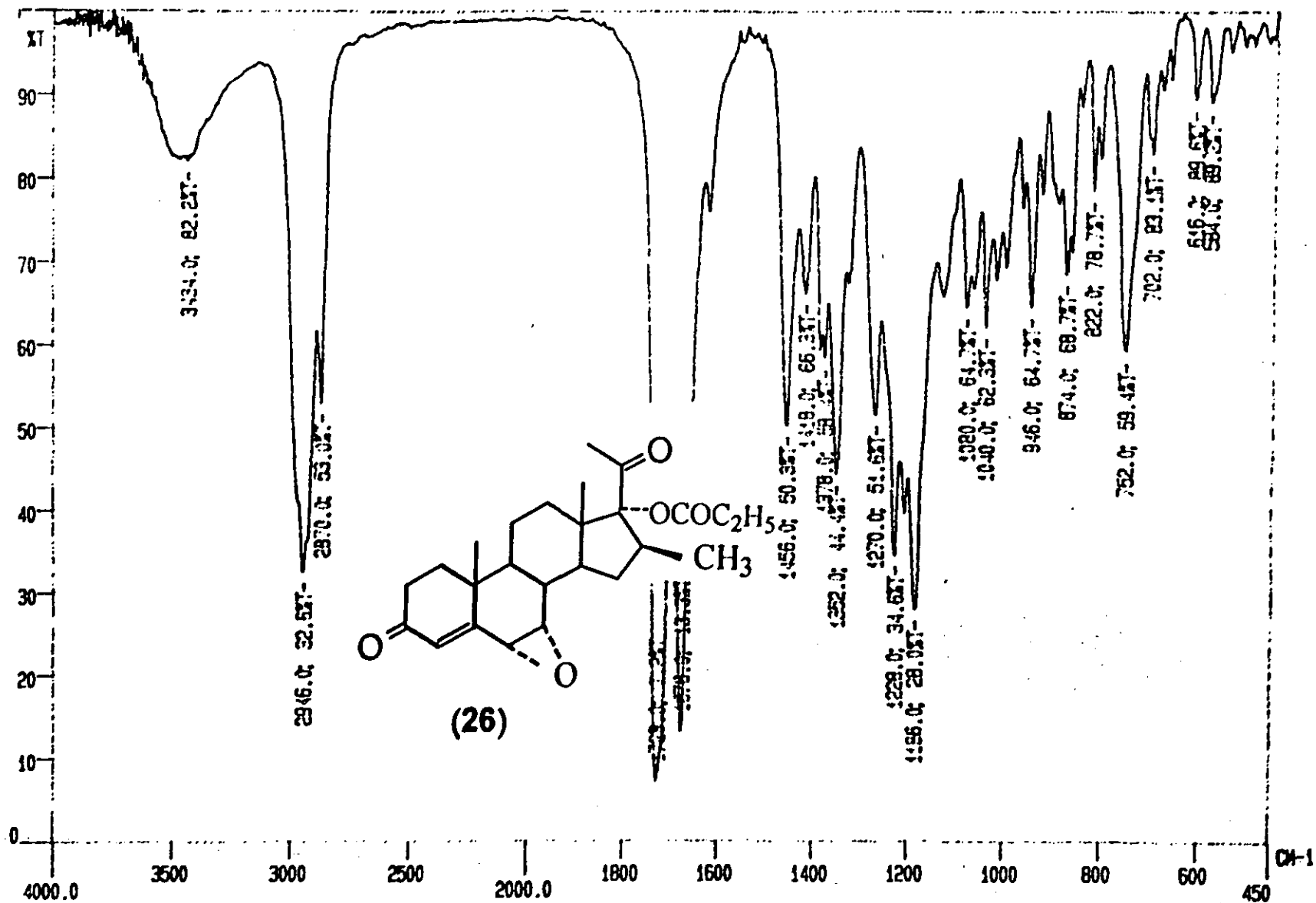


THRESHOLD : 0.010

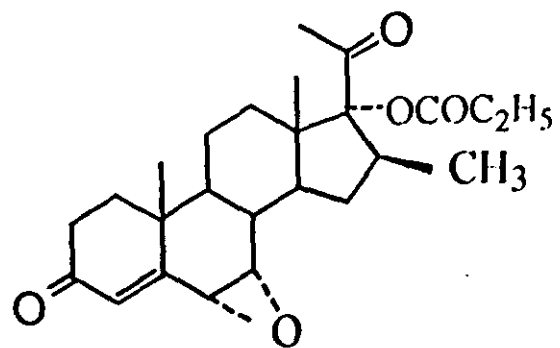
BATCH: 002

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	12:13	225.4 nm (MAX)	0.781 ABS
		205.7 nm (MIN)	0.150 ABS

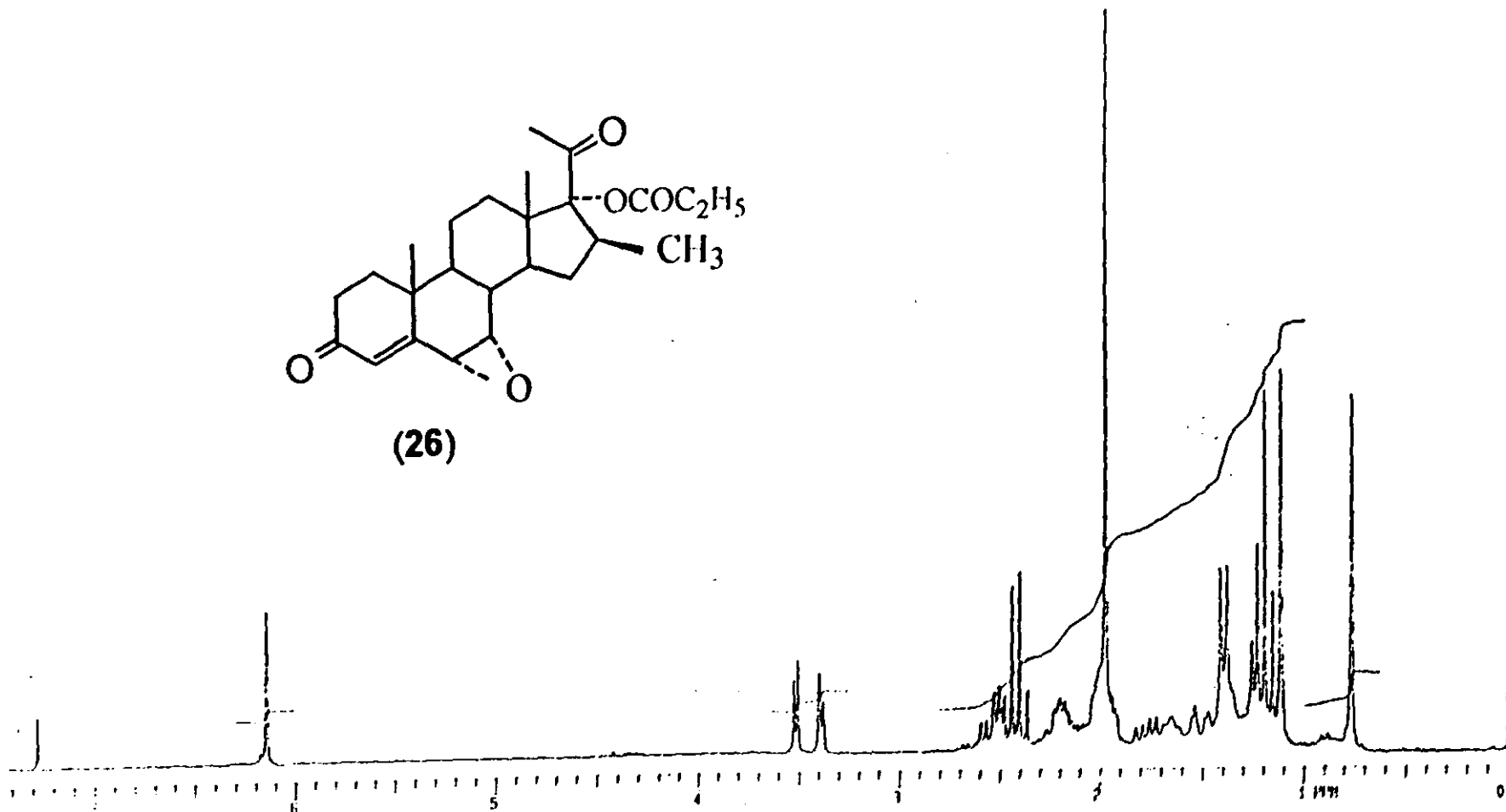
Espectro No. 25 Espectroscopía UV del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26)



Espectro No. 26 Espectroscopía de IR del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26)

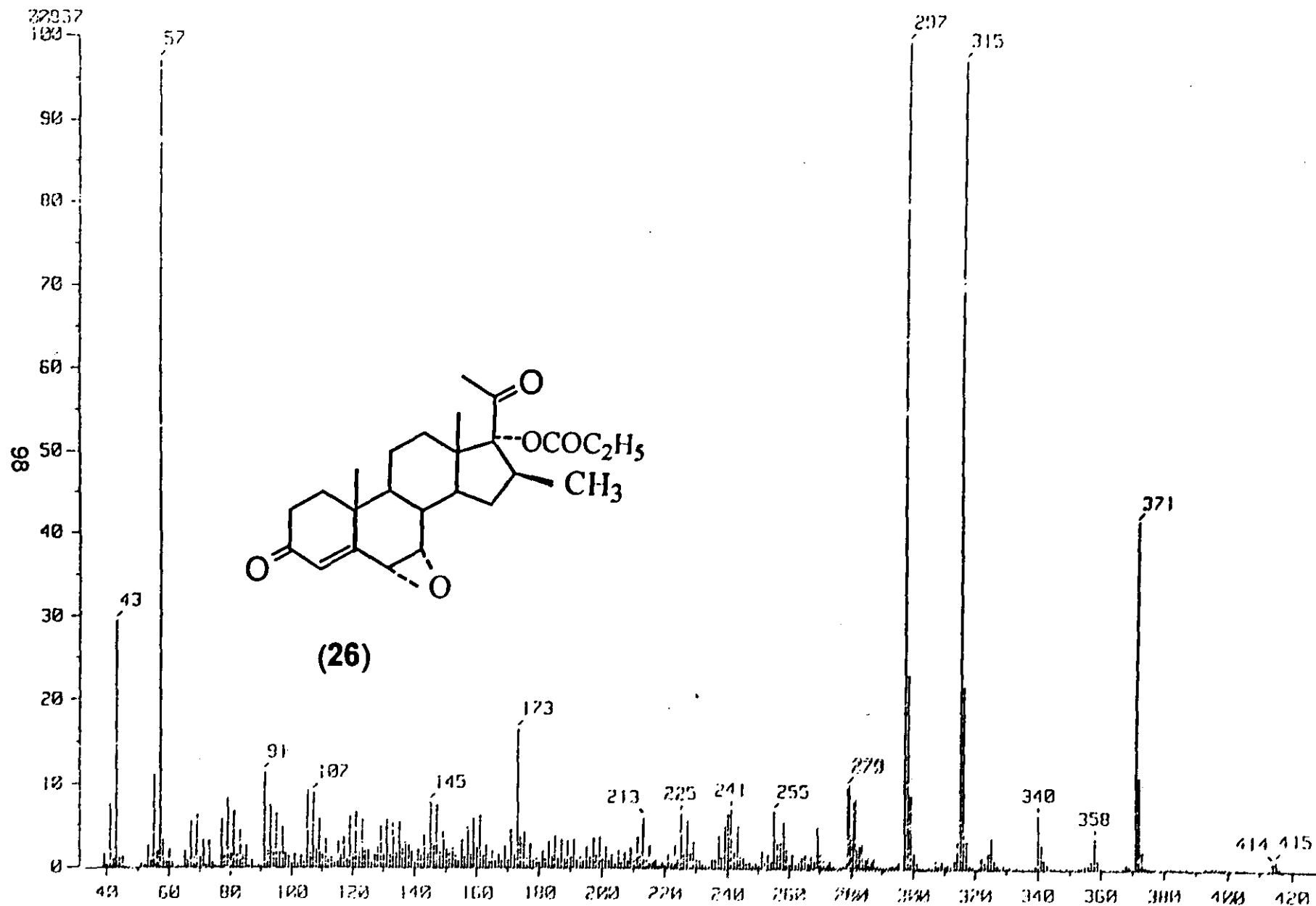


(26)

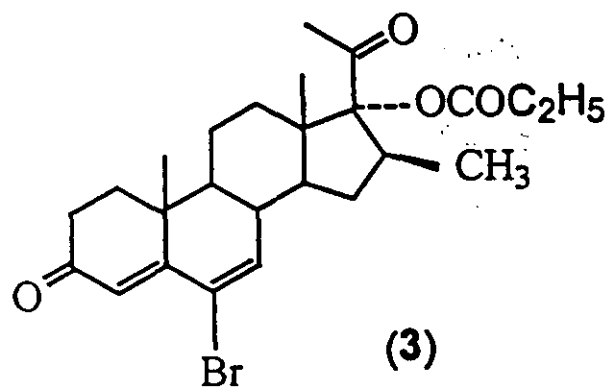


Espectro No. 27 Espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26)

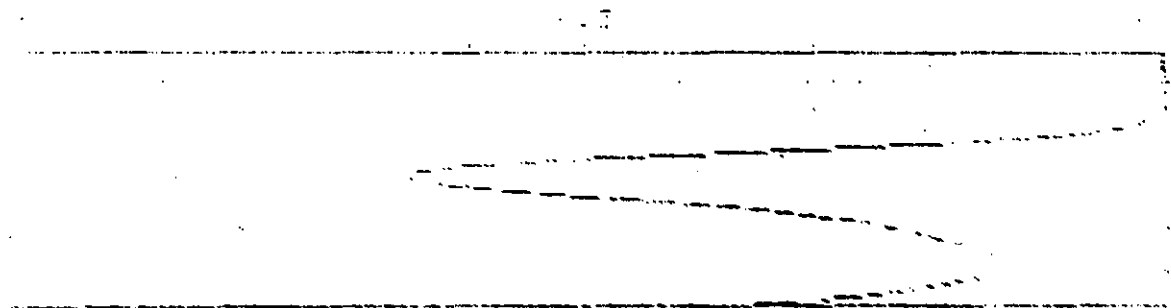




**Espectro No. 28 Espectroscopía de MASAS(EI') del compuesto 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4-pregnen-3,20-diona. (26)**



ABSORBANCE

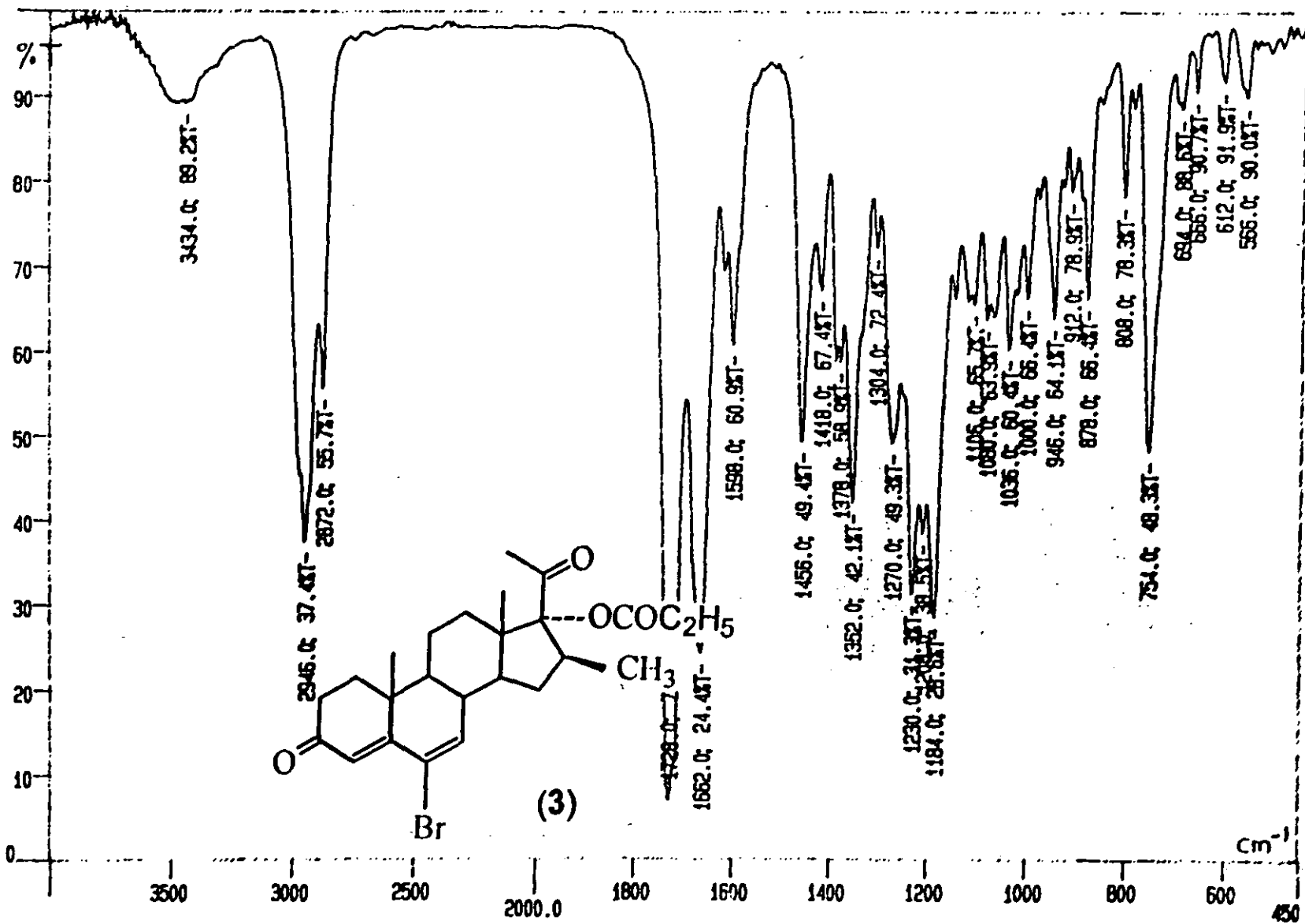


THRESHOLD : 0.001

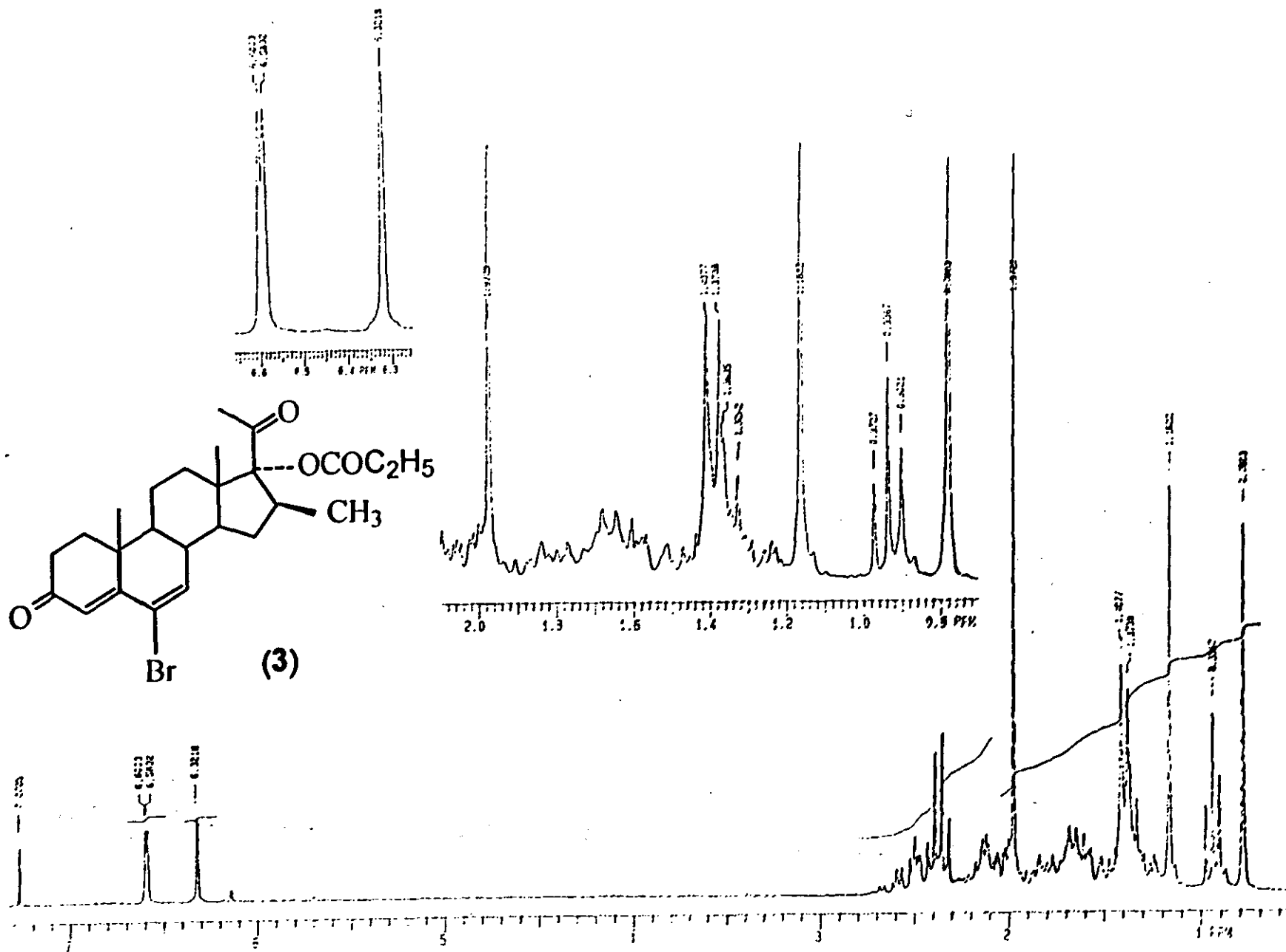
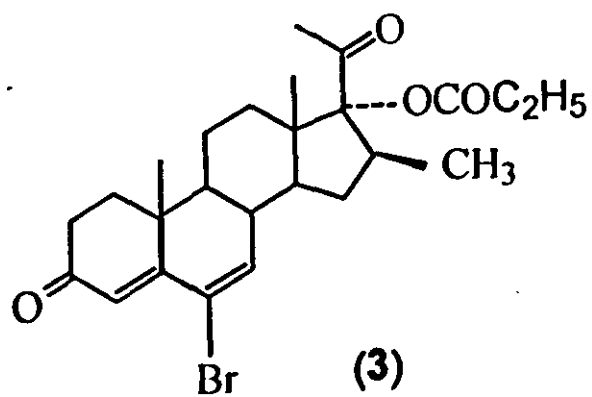
BATCH: 001

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
000	00107	226.4 nm (MAX)	0.201 ABS
		227.4 nm (MIN)	0.142 ABS

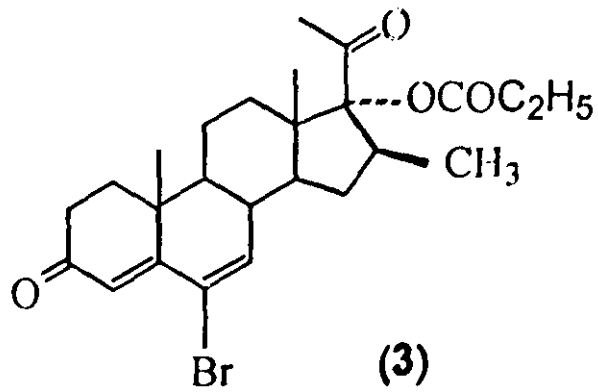
**Espectro No. 29 Espectroscopía UV del compuesto 6-bromo-16β-metil-17α-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)**



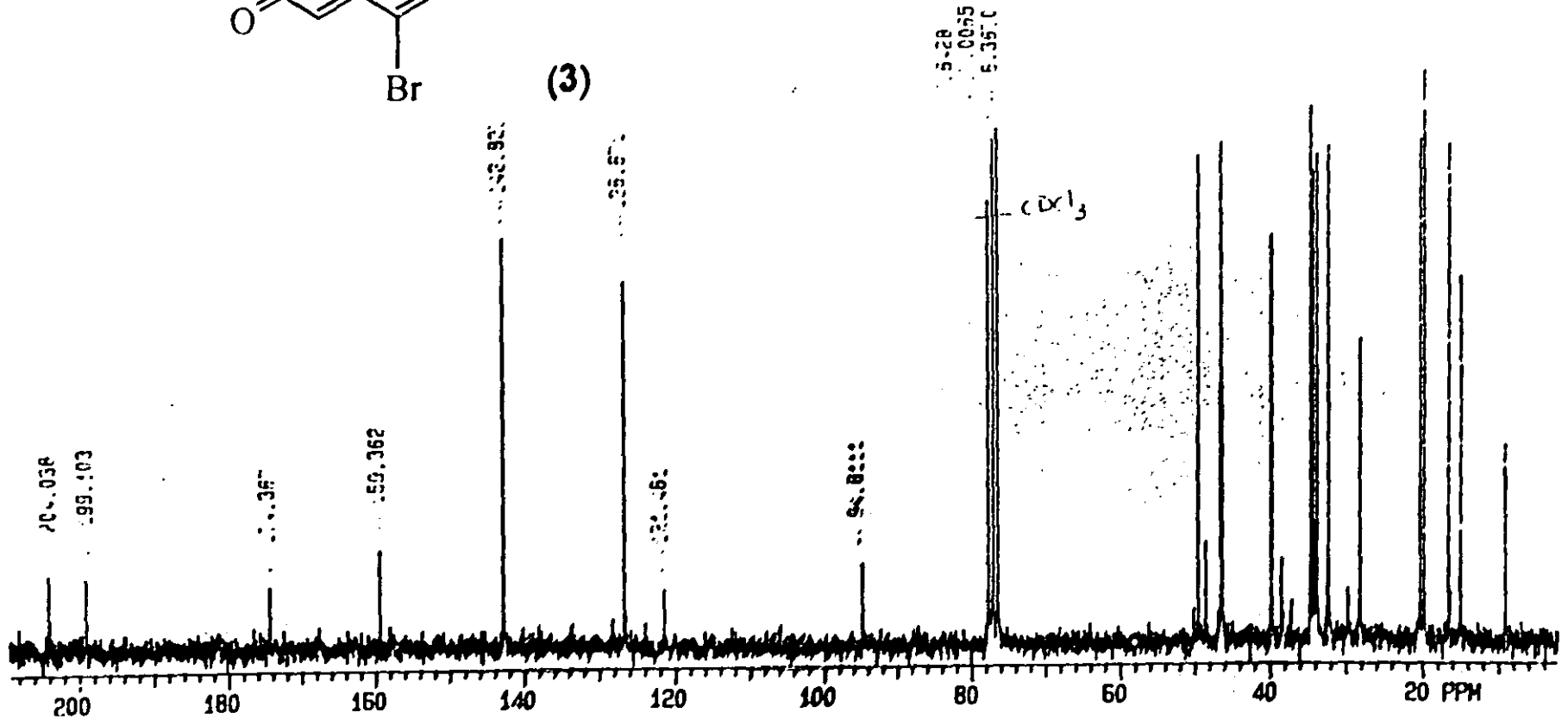
Espectro No. 30 Espectroscopía IR del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)



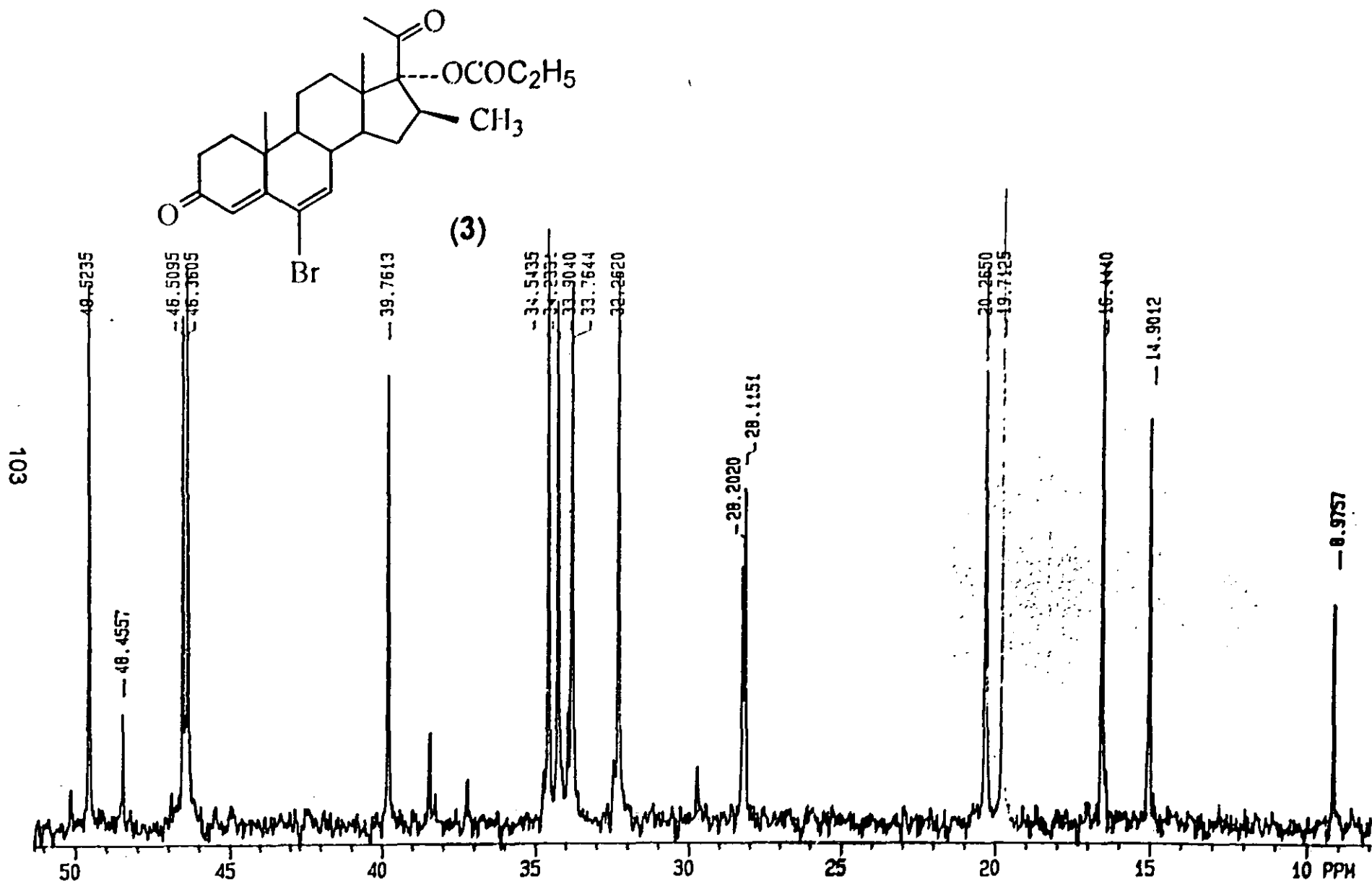
Espectro No. 31 Espectroscopia RMN<sup>1</sup>H del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)



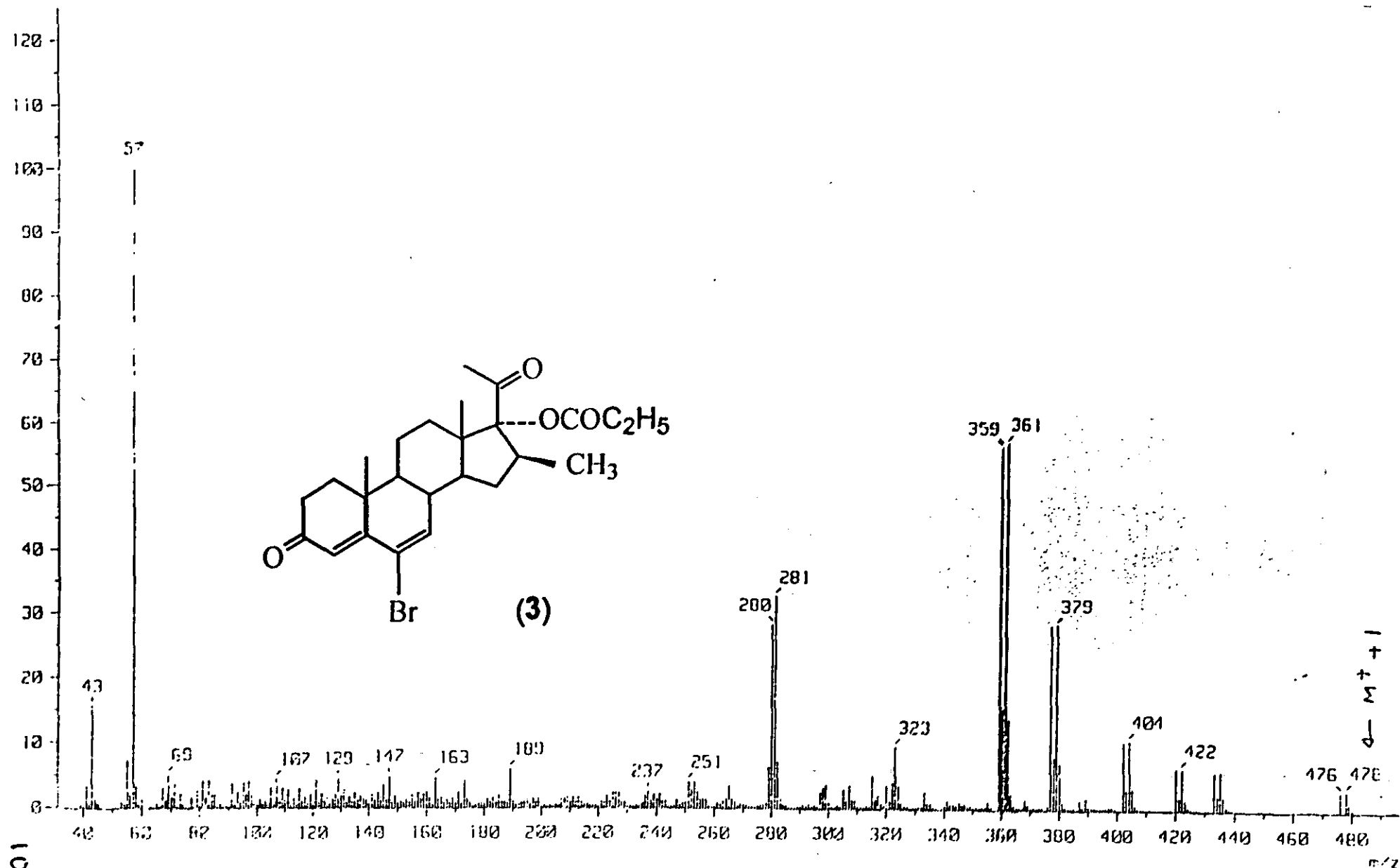
102



Espectro No. 32 Espectroscopía  $RMN^{13}C$  del compuesto 6-bromo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)



Espectro No.33 Espectroscopía amplificada de RMN<sup>13</sup>C, zona 10-50 ppm del compuesto 6-bromo-16β-metil-17α-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)



**Espectro No.34** Espectroscopía de MASAS(EI<sup>+</sup>) del compuesto 6-bromo-16β-metil-17α-propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. (3)

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks, R. Androgens: physiology and pathology, in *Biochemistry of steroids hormone*. Edit. Making, H. L., Balckwell SCI. Pub. 2<sup>nd</sup> edition (1984) :565-594.
2. Biffignandi, P. and Molinatti. Antiandrogens and Hirsutism. *Hormone Res.* (1987), 28: 242-249.
3. Garnick, Marc B., Cáncer de próstata. *Investigación y ciencia.* (1994), junio, 46-53.
4. Garnick, M. B. Prostate cancer. Screening, diagnosis and management. *Ann. Intern. Med.* (1993). 118 : 804-818.
5. Gittes, R. F. Carcinoma of prostate. *N. Engl. J. Med.* (1991), 324 : 263-245.
6. Brooks, R., Berman, C., Nguyen, H., et al. Effect of castration, DES, flutamide and the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, MK-906, on the grow of the Dunning rat prostatic carcinoma, R-3327. *Prostate* (1991) 18 :215-217.
7. Isaacs, T., 5 $\alpha$ -reductase inhibitor and the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drug. Fut.* (1993), 29 (5) :335-342.
8. Grower, D. The role of cytochrome P-450 in steroidogenesis and properties of some of the steroid transforming enzymes in *Biochemistry of steroids hormones*, Edit. Making, H. L., Balckwell SCI. Pub. 2<sup>nd</sup> Edition (1984) :239-292.
9. Shapiro, E., Leggett, T., 16-Alkylated progesterone. *J. Med. Pharm. Chem.* (1962) 5 :975-988.



10. Foye, William O., *Cancer Chemotherapeutic Agents*. ACS Professional Reference Book. American Chemical Society, Washington, DC 1995.
11. Petrow, V., Padilla, G and Mukherji, S., Endocrine dependence of prostatic cancer upon dihydrotestosterona and not upon testosterone. *J.Pharm. Pharmacol* (1984) 36 :352-353.
12. Metcalf, Brian W., Levy, Mark A. and Holt, Dennis, A., Inhibitors of steroid 5 $\alpha$ -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne. *Trends Pharmacol Science* (1989) 10 :491-493.
13. Chodak, Gerald W., and cols. Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *New England Journal of Medicine* (1994) 330 (4), 242-248.
14. Lietter, M. *Farmacología Experimental y Clínica*. 7ª Ed. Editorial El Ateneo, Argentina (1988).
15. Wingo, P. A., Tong, T. Bolden, S. and Keele, C. A. *Cancer Statistic Cancer J. Clin.* (1995) 45 :8-30
16. Bratoeff, E., Trejo, A., Hernández, J. y Sánchez, P. "Síntesis de derivados de pregnano con un grupo metilo en posición C-16" *Rev. Mex. Cienc. Farm.* (1992) 22 :14-17.
17. Bratoeff, E., Flores, G., Ramírez, E., Valencia, N. and Calderón, D., *Chemistry Today*, August 1997.
18. Green, M., Tiberi, R., et al. Novel 17 $\alpha$ -chloro-17 $\beta$ -sulfinyl steroids as specific inhibitors of sebaceous gland activity: Potential Antiacne Agents. *J. Med. Chem.* (1983) 26 :78-85.
19. Murphy, G. "Current status of therapy in prostatic cancer." En: M. Tannenbaum (ed.), *Urologic Patology: The Prostate*. Lea and Febiger Press, Philadelphia, 1977, pp. 225-229.
20. Rasmusson, G.H., Reynolds, G. F., Utne, T., Jobson, R. B., Primka, R. L., Bermán, C., & Brooks, J. R. *J. Med. Chem.* (1984) 27 :1690-1701.

21. Sultan, Ch., Medlej, R., Chevalier, C. and Lobbaccaro, J. M. Management of hyperandrogenism in Adolescent Girls. *Horm. Res.* (1991) **36** :160-164.
22. Krieg, M., Bartsch, W., Janssen, W., & Voigt, K. D. *J. Steroid Biochem.* (1979) **11** :615-614.
- 22a. Hudson, R. W., Moffitt, P. M., & Owens, W-A. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* (1983) **16** :750-755.
23. Mallamo, J., Pilling, G., Wetzel, J., et al. Antiandrogenic steroidal sulfonylheterocycles. Utility of electrostatic complementary in defining bioisosteric sulfonyl heterocycles. *J. Med. Chem.* (1992) **35** :1663-1670.
24. Labre, C., Trudel, L and Shengmin, L. Combination of antiandrogen and a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor: a further step towards total androgen blockade? *Endocrin.* (1991) **128** :1673-1679.
25. Rabasseda, X. and Fitzpatrick, J. Mamsulosin. The first prostate-selective  $\alpha$ -adrenoreceptor antagonist for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Drugs of Today* (1996) **32**: (suppl C).
26. Santen, R. J., Hormonal therapy of prostate cancer: Choosing among several available options. *Intl. J. of Andrology* (1989) **12** :165-170.
27. Traish A., Muller R., Wotiz H., "Interaction of cyproterone acetate with rats prostatic androgen receptors". *Steroids* (1985) **45**: 247-262
28. Clark, C. and Nowell, N., BOMT is not an androgen antagonist within the central nervous system. *Steroids* (1979) **41** :521-536.
29. Midgley, A. and Fowkes, G., The metabolic fate of the anti-androgenic agent oxendolone in man, *Steroids* (1983) **40** :511-516.
30. Bull, H., Garcia, M., Andersson, S., Baginsky, W., Chan, K., Elisworth, D., Miller, R. Mechanism based inhibition of human steroid 5 $\alpha$ -reductase by finasteride: enzyme-catalyzed formation of NADP-dihydrofinasteride, a potent bisubstrate analog inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* (1996) **118** :2359-2365.

31. Merck & Co., Du Pont, Neopharmed, Sigma Tau and Yamanouchi, Finasteride. *Drugs Fut.* (1992) 17 :1043.
32. López, M. L. and Cerda, M. C. Effects of ciproterone acetate on the ultrastructure of the human epididymis. *Andrologia* (1993) 25 :39-45.
33. Shibata, K., and Takegawa, S. Antiandrogen I. 2-Azapregnane and 2-oxapregnane steroid. *Chem Pharm. Bull.* (1992) 40 :935-941.
34. Migally, N. Effect of cyproterone acetate on the mouse adenohipophyses. II. Gonadotrophs and somatrophs. *Archives of andrology* (1981) 6 :127-132.
35. Migally, N. Effect of LHRH on cyproterone acetate-injected adenohipophyses of castrated mice, *Archives of andrology* (1982) 8 :247-250.
36. Donn, F., Becker, H., Effect of cyproterone acetate in comparison to flutamide on the ventral prostate of adult male castrated Copenhagen-Fisher rats on Dunning B-3327H tumors. *Andrologia* (1989) 25 :462-467.
37. Mukherjee, M., Chattopadhyay, S., Effect of flutamide on the physiological status epididymis and epididymal sperms. *Andrologia* (1992) 24 :113-116.
38. Morris, J., Hughes, L., Glen, A. and Taylor, P. Non-steroidal antiandrogens. Design of novel compounds based on an infrared study of dominant conformation and hydrogenbonding properties of a series of anilide antiandrogens. *J. Med. Chem.* (1991) 34 :447-452.
39. Morris, J., Hughes, L. et al. Bicalutamide. *Drugs of Today* (1997) 22 :229.
40. Tucker, H., Crook, J. and Chesterson. Non steroidal Antiandrogens. Synthesis and structure-relationships of 3-substituted derivatives of 2-hydroxypropioanilides. *J. Med. Chem.* (1988) 31 :954-959.
41. Christiansen, R. and Bell, M. Antiandrogenic Steroidal Sulfonylpyrazoles. *J. Med. Chem.* (1990) 33 :2094-2100.
42. Eil, C., Ketoconazole binds to the human androgen receptor. *Horm. Metab. Res.* (1992) 24 :367-370.

43. Flores, C. Síntesis de un derivado esteroide con actividad antiandrogénica potencial. Tesis de Maestría (1996). DEPg. Facultad de Química, UNAM.
- 43a. Ligon, K. Síntesis de derivados de progesterona con acción antiandrogénica potencial. Tesis de Maestría UNAM, 1978.
44. Deghenghi, R. and Revesz, C. New synthesis and structure activity relationships in the 17-alkylated progesterone series. *J. Med. Chem.* (1963) 3 :301-304.
45. Cooke, B. and Vallance, D. Metabolism of megestrol acetate and related progesterone analogues by liver preparations *in vitro*. *Biochem. J.* (1965) 97 :672-677.
46. Newsholme, E., and Leech, A., *Biochemistry for medical sciences*. John Wiley & Sons 1983, USA, pp. 720-725, 765.
47. Petrow, V., Wang, Y. and Lack, L. Prostatic cancer I. 6-methylene-4-pregnen-3-ones as an irreversible inhibitors of rat prostatic  $\Delta^4$ -3-ketosteroid-5 $\alpha$ -reductase. *Steroids* (1981) 38 :121-139.
48. Ross, R., Benstein and Lobo, R. 5 $\alpha$ -reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and Black males. *Lancet* (1992) 339 :887-889.
49. Imperato-McGinley, J., Guerrero, L., Gautier, T., Peterson, R. E. Steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency in a 65 year old male pseudohermaphrodite: The natural history ultrastructure of testes and evidence for inherited enzyme heterogeneity. *Science* (1979) 186 :1213-1215.
50. Wilson, J. D. The endocrine control of sexual differentiation. *Harvey lecture* (1984) 79 :145-172.
51. Kochakian, C. D., Arimasa, N., The metabolism *in vitro* of anabolic-androgenic steroids by mammalian tissues. *Handb. Exp. Pharmacol.* (1976) 43 :287-359.
52. Bruchovsky, N., Wilson, J. D. The conversion of testosterone to 5 $\alpha$ -androstane-17 $\beta$ -ol-3-one by the rat prostate *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* (1968) 243 :2012-2021.

53. Levy, M. A., Brandt, M., Heys, J. R., Metcalf, B. W. Inhibition of rat liver steroid  $5\alpha$ -reductase by 3-androstene-3-carboxylic acids: Mechanism of enzyme inhibitor interaction. *Biochemistry* (1990) 29 :2815-2824.
54. Bosh, R. J. L. H., Griffiths, D.J., Blom, J. H. M., Shroeder, F. H. Treatment of benign prostatic hyperplasia by androgen deprivation: Effects on prostate size and urodynamic parameters. *J. Urol.* (1989) 141 :68-72.
55. Liang, T., Cascieri, A., Cheung, A. H., Reynolds, F. G., Rasmusson, G. H., Species difference in prostate steroid  $5\alpha$ -reductase of rat, dog and man. *Endocrinology* (1985) 117 :571-579.
56. Labrie, F., Sugimoto, Y., Luu-The, et al. Structure of human type II  $5\alpha$ -reductase gene. *Endocrinology* (1992) 131 :1571-1573.
57. Isaac, J. T.  $5\alpha$ -reductase inhibitor and the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drugs of Today* (1993) 29 :335-342.
58. Glatz, B., Helmchen, G. A total synthesis and structural aspects of racemic 8-Oxygenated tetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.* (1979) 101 :2171-2176.
59. Dauben, H., Löken, B. And Ringold, J. Preparation of ethylenedioxy derivatives of improved synthesis of testosterone from  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione. *J. Am. Chem. Soc.* (1954) 76 :1359-1369.
60. Fredricksen, D. and Wilson, J. Partial characterization of nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  $\Delta^4$ -3-ketosteroid- $5\alpha$ -oxidoreductase of rat prostate. *J. Biol. Chem.* (1971) 246 :2584-2593.
61. Raynaud, J. and Fiet, J. Design of antiandrogens and the mechanisms of acción. *Horm. Res.* (1987) 28 :230-241.
62. Hill, R. A., Kirk, D. N., Makin, H. L. J., and Murphy, G. M. Dictionary of steroids. Chemical Data Structures and bibliographies. Ed. Chapman & Hall. 1991, 1<sup>ra</sup> Edition.
63. Marker, R., Tsukamoto, T. and Turner, L. Sterols C. Diosgenin. *J. Am. Chem. Soc.* (1940) 62 :2525-2300.

64. Shapiro, E., Gentles, M. et al. 17-Heteroaroyl Esters of Corticoids. 2. 11 $\beta$ -Hydroxy series. *J. Med. Chem.* (1987) **30** :1581-1588.
65. Meyer, J. *J. Am. Chem. Soc.*, (1950) **72** :5145-5147.
66. Gary, J. M. and Hassner, A. Synthesis of oxiranes, aziridines and episulfides. *J. Chem. Soc.* (1990) **9** :182-185.
67. Djerassi, C. Steroid Reactions. An Outline for Organic Chemists. 1963 Holden-day, Inc. San Francisco
68. Glatz, B. and Helmchen, G. A total synthesis of structural aspect or recemic 8-oxygenated tetracyclenes. *J. Am. Chem. Soc.* (1971) **101** :2171-2174.
69. Dauben, H., Löken, B. and Ringold, J. Preparation of ethylendioxy derivatives of improved syntheses of testosterone from  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione. *J. Am. Chem. Soc.* (1954) **76** :1359-1362.
70. Jerry March. "Advanced Organic Chemistry, reactions, Mechanisms and structure" (1992) 4<sup>a</sup> Edition, John Wiley & Sons, New York. Cap. 18 :843-849.
71. Ringold, H. J., and col. "6-methyl derivates of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,15 $\beta$ -trihydroxy-5-pregnen-20-one. *Steroid* (1981) **37** :294-301.
72. Gary, R.W., and col; "Conversion of 15 $\alpha$ -hydroxy-11-oxoprogesterone to 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,15 $\beta$ -trihydroxy-5-pregnen-20-one." *Steroid* (1982) **37** :290-294.
73. Idem 16
74. Bersntein, S. and Litell, R. *J. Chem. Soc.* (1960) **82** :1235.
75. Morrison, R.T. and col. Química Orgánica. 3<sup>er</sup>. Edition, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. (1990) :703-707.
76. Sciaky, R., Sintesis del 16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -acetoxiprogesterona. *Gazz. Chim. Ital.* (1961) **91** :562-566.
77. Eastham, J. T. and Teranish, R. *Org. Syn. Coll. Vol. 4* :192 (1963)
78. Denney, Ronald C., Named Organic Reactions. pp. 111-114. Butterworth & CO. (Publishers) Ltd. 1969.

79. Parish, E. J. and Hiroshi, H. A facile synthesis of steroidal  $\Delta^4$ -3-ketones using pyridinium chlorochromate. *Synthetic communications* (1990) **20** (8) :1167-1174.
80. Shapiro, E., L., Weber, L. and Harris, H. Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehydro-16-methylene-17 $\alpha$ -hydroxyprogesterones. *J. Med. Chem.* (1972) **15** :716-720.
81. Agnello, E. and Laubach, G. The dehydrogenation of corticosteroids with chloranil. *J. Am. Chem. Soc.* (1960) **82** :4293-4299.
82. Panting Magaña J. M. Síntesis de 6-bromo -17a-propoxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona. Tesis de Licenciatura (1993). Facultad de Química, UNAM.
83. Akagi, S. and Tsuda, K. Bromo derivatives of cholesterol. *Chem. Pharm. Bull.* (1961) **9** :464-467.
84. Shering, A. 1,2 $\alpha$ -16,17 $\alpha$ -dimethylenepregna-4,6-dienes. Brit. Patent 1,095,956 (1967). *Chem. Abs.* **59** :10186a.
85. Shibata, K., and Takegawa, S. et al. Antiandrogen I. 2-Azapregnane and 2-oxapregnane steroid. *Chem. Pharm. Bull.* (1992) **40** :935-941.
86. Blunt, J. and Stother, J. RMN<sup>13</sup>C spectra of steroids- A survey and commentary. *Org. Mag. Res.* (1977) **9** :439-464.
87. Salle, E., Guidici, D., Cominato, D., Briatico G., Panzeri, A. Effects of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor on intraprostatic. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* (1995) **53** :381-385.
88. Fredricksen, D. and Wilson, J. Partial characterization of nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  $\Delta^4$ -3-ketosteroid. 5 $\alpha$ -oxidoreductase of rat prostate. *J. Biol. Chem.* (1971) **246** :2584-2593.
89. Usi, T., Ishibe, T., et al. Effect of Diethylstilbestrol diphosphate on activity of 5 $\alpha$ -reductase in human prostate. *Archives of andrology.* (1987) **19** :229-235.
90. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein. *Ann. Biochem.* (1976) **72** :284-253.

91. Herbert, G. B., Garcia-Calvo, M. et al. Mechanism-based inhibition of Human steroid 5 $\alpha$ -reductase by Finasteride: Enzyme-Catalyzed Formation of NADP-Dihydrofinasteride, a Potent Bisubstrate Analog Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* (1996) 118 :2359-2365.
92. Tan, S., Yamanouchi. Testosterone 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, treatment for BPH. *Drugs Fut.* (1992) 17 :1043-1045.