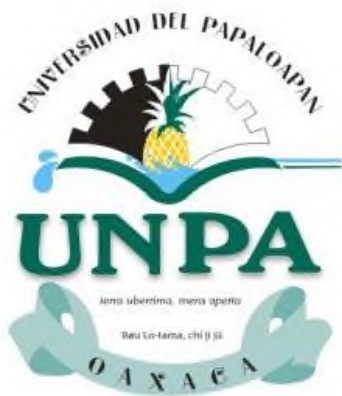




Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

Licenciatura en Ciencias Químicas

“Síntesis de nuevos derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -dieno-3-ona a partir de pregn-5-en-3 β -ol-ona y β -Sitosterol”

Tesis



Licenciada en Ciencias Químicas



Lidia Gabriela Felipe Zaragoza



Dra. Roxana Martínez Pascual

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca

Abril 2024

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Síntesis de moléculas bioactivas del Centro de Investigaciones Científicas (CIC) de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Roxana Martínez Pascual. Además, se agradece al CONAHCYT por el financiamiento del proyecto INFRA-2015-01-252013 y 317105.



Universidad del Papaloapan

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 03 de abril del 2024

UNPA/LCQ/089/2024

Asunto: Autorización de impresión de tesis

M.E. Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan
P R E S E N T E

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis presentado por la egresada de la Licenciatura en Ciencias Químicas LIDIA GABRIELA FELIPE ZARAGOZA y que lleva por título "Síntesis de nuevos derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -dieno-3-ona a partir de pregn-5-en-3 β -ol-ona y β -Sitosterol" para su presentación y defensa por parte de la egresada y así obtener el título de Licenciada en Ciencias Químicas, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

Sin otro asunto en particular me despido cordialmente agradeciendo la atención a la presente.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju




Jorge Carlos Conde Acevedo
Jefe de Carrera
Licenciatura en Ciencias Químicas
Campus Tuxtepec




Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vicerrector Académico
Universidad del Papaloapan
VICE-RECTORIA
ACADEMICA

C.c.p. Dra. Roxana Martínez Pascual. Directora de tesis. Para su conocimiento.
C.c.p. Lidia Gabriela Felipe Zaragoza. Tesista egresada. Para su conocimiento
C.c.p. Archivo



Universidad del Papaloapan

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 03 de abril del 2024

UNPA/LCQ/090/2024

Asunto: Designación de sinodales

C. Lidia Gabriela Felipe Zaragoza
Pasante de la carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas
P R E S E N T E

Por este medio le informo la propuesta de la jefatura de carrera de los profesores investigadores que fungirán como sinodales en el examen de defensa de tesis para obtener el título de Licenciada en Ciencias Químicas.

El jurado del examen profesional estará compuesto por los siguientes profesores investigadores:

Presidente: Dr. Omar Viñas Bravo
Secretario: Dr. Lemuel Pérez Picaso
Vocal: Dra. Roxana Martínez Pascual
Primer Suplente: Dr. Francisco Daniel Díaz Coutiño
Segundo Suplente: Dra. María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce

Sin otro asunto en particular me despido cordialmente agradeciendo la atención a la presente.



Lic. Carlos Conde Acevedo
Jefe de Carrera
Lic. en Ciencias Químicas

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vicerrector Académico
Universidad del Papaloapan



VICE-RECTORIA
ACADEMICA

C.c.p. Dra. Roxana Martínez Pascual. Directora de tesis. Para su conocimiento.
C.c.p. Lidia Gabriela Felipe Zaragoza. Tesista egresada. Para su conocimiento
C.c.p. Archivo

Publicación

Como parte de los resultados obtenidos de este trabajo se permitió la publicación del artículo:

- Martínez-Pascual, R.; Felipe-Zaragoza, L.G.; Peña-Rico, M.A.; Cruz-Nolasco, A.; Pérez-Picaso, L.; Núñez-López, S.; López-Torres, A.; Viñas-Bravo, O. A novel and easy protocol to obtain 6-alkoxy- $\Delta^{4,6}$ -diene-3-one derivatives from available sterols, *Steroids*. **2023**, 200. 109323.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis **Dra. Roxana Martínez Pascual** por aceptarme en su grupo de trabajo, por el apoyo, tiempo y dedicación brindada para la realización y culminación de esta tesis, y sobre todo por los conocimientos, experiencias adquiridas, fue de gran ayuda. Muchas gracias.

Al **Dr. Omar Viñas Bravo** por el tiempo, apoyo y conocimientos brindado, así como los consejos tanto académicos como personal.

Al **Dr. Adolfo López Torres** por el tiempo brindado en la obtención de los espectros de Espectrometrías de Masas.

A **M. en Bt Alaín Cruz Nolasco** por su apoyo y tiempo en las pruebas biológicas realizadas.

Al **Dr. Miguel Ángel Peña Rico** por su tiempo y asesoramiento brindado para la realización de las pruebas biológicas.

A mis revisores, **Dra. María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce**, **Dr. Lemuel Pérez Picaso** por su valioso tiempo invertido en las observaciones y comentarios para el mejoramiento de este trabajo de tesis.

A las químicas: **QFB. Leticia Saldaña Medina** y **MCQ. Beatriz Castro Hilarario**, por el apoyo y accesibilidad a los equipos de laboratorio utilizados para la culminación de este trabajo.

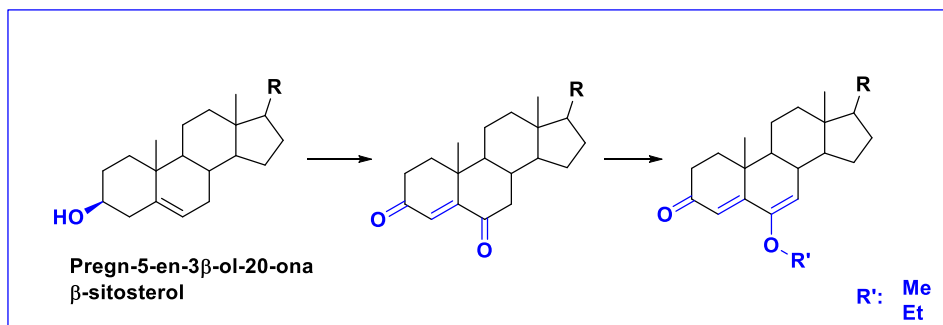
A **Shardey**, que me apoyo y me acompañó durante este tiempo, por los consejos, ánimos brindados. Gracias infinitas.

DEDICATORIA

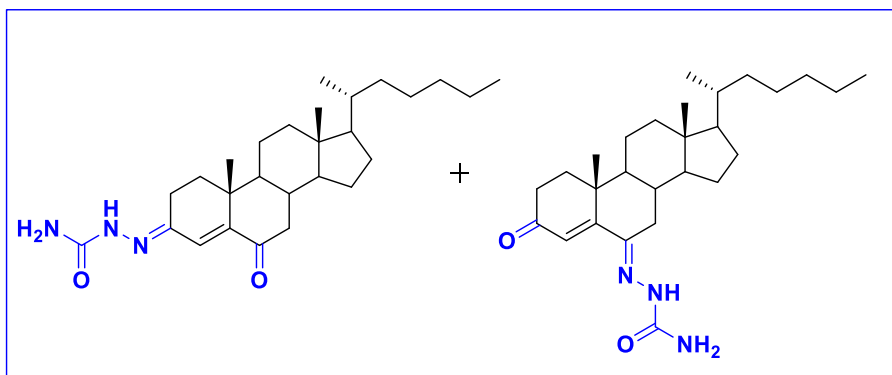
Dedico este trabajo a mis padres, Fabián y Patricia que siempre me apoyaron y confiaron en mí, por los consejos que siempre me dieron para luchar y salir adelante. Sin ustedes no lo habría logrado. Los quiero mucho.

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta una síntesis eficiente para generar cuatro derivados con el sistema 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -dieno-3-ona en dos pasos de reacción, a partir de los esteroides comerciales pregn-5-en-3 β -ol-20-ona y β -sitosterol. El primer paso consistió en una oxidación del alcohol y del doble enlace presente en los esteroides usando el reactivo de Jones para obtener los derivados esteroidales Δ^4 -3,6-dionas. Posteriormente, las dionas correspondientes se sometieron a un tratamiento con yodo molecular, (cantidades catalíticas), usando metanol o etanol a reflujo, con lo cual se favoreció la conversión 6-ceto del esteroide a la forma enol-éter



Una vez formado los derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -dieno-3-ona, resultó interesante estudiar su reactividad química, por lo que se decidió utilizar como modelo al 6-metoxicolesta-4,6-dien-3-ona y tratarlo con semicarbazida y acetato de sodio, esperando que el carbonilo del C-3 se condensara para formar la semicarbazona correspondiente, sin embargo, bajo esas condiciones se favoreció la conversión enol-éter hacia la forma ceto y la posterior condensación de la semicarbazida tanto en C-3 como en C-6, obtenido una mezcla de productos que no fue posible separar por cromatografía en columna.



Por último, debido a que no se obtuvo un iminosteroide en el C-3, se optó por formar un iminoesteroide en la cadena lateral esterooidal, haciendo reaccionar la *p*-anisidina con el diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-en-3 β ,16-diilo (**82**), este último se obtuvo en dos pasos de reacción a partir de diosgenina. Sin embargo, no fue posible obtener el iminoesteroide esperado, observándose en su defecto, la formación de una 1,4-dihidropiridina (**84**), cuya obtención se explicó mediante una condensación 1,5-dicarbonílica con del grupo amino de la *p*-anisidina.

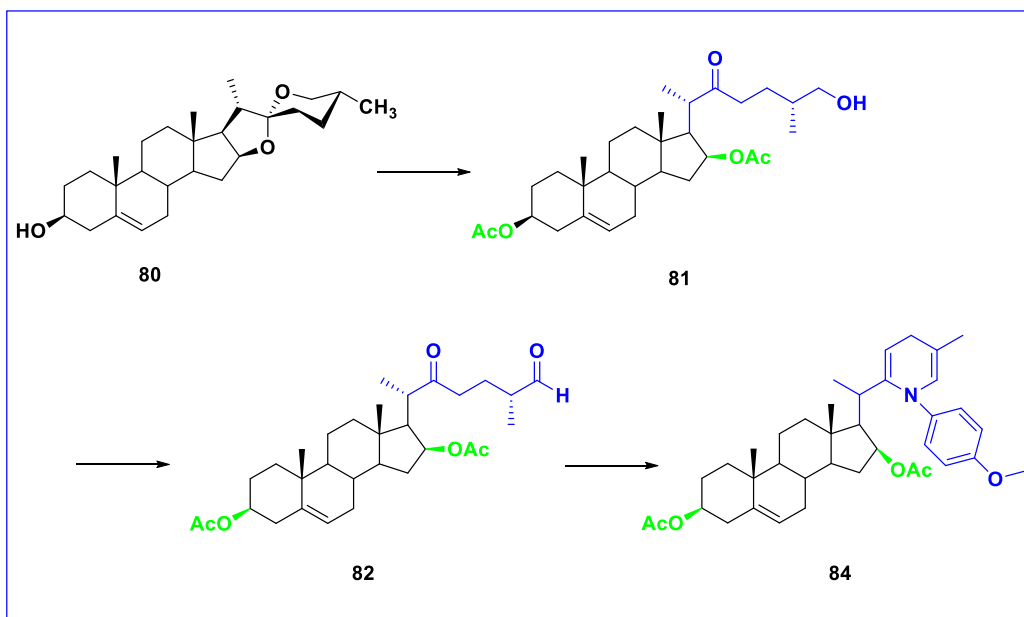


TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE ESQUEMAS	15
ÍNDICE DE TABLAS	16
ABREVIATURAS	17
1. INTRODUCCIÓN	18
2. MARCO TEÓRICO.....	20
2.1 Clasificación de los esteroides.....	20
2.2 Nomenclatura de los esteroides	22
2.3 Estereoquímica y forma tridimensional de los esteroides.....	23
2.4 Características e importancia del yodo	24
3. ANTECEDENTES.....	26
3.1 Reacciones efectuadas con I ₂	34
4. JUSTIFICACIÓN	37
5. HIPÓTESIS.....	38
6. OBJETIVOS	39
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
7.1. Síntesis para la obtención de dicetonas (73a y 74a)	42
7.1.1. <i>Análisis del espectro de ¹H y ¹³C del Pren-4-en-3,6,20-triona (72a)</i>	42
7.1.2 <i>Análisis de la caracterización de Pren-4-en-3,6,20-triona (72a) de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	45
7.2. Síntesis para la obtención de los enol éteres (72b, c y 73b, c).....	46
7.2.1 <i>Análisis del espectro de ¹H y ¹³C del 6-metoxi-4,6-dieno-3,20-diona (72b)</i>	47
7.2.2 <i>Análisis de la caracterización de 6-metoxi-4,6-dieno-3,20-diona (72b) de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	49
7.2.3 <i>Análisis del espectro de ¹H y ¹³C del 6-etoxi-4,6-dieno-3,20-diona (72c)</i>	50

7.2.4	Análisis de la caracterización de 72c de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	53
7.3.	Reactividad de los derivados de enol éteres	54
7.4.	Reacción de condensación entre un derivado de diosgenina 22,26-dioxocolestánico y <i>p</i> -anisidina	56
7.4.1.	Apertura de los anillos E y F de la diosgenina	57
7.4.2.	Oxidación del diacetato de 25(R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (79) con PCC	62
7.4.3.	Reacción de condensación de 26-aldehído con <i>p</i> -anisidina	65
7.5.	Evaluación biológica de los derivados esteroidales.....	69
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	75
8.1	Reactivos y disolventes	75
8.2	Cromatografía.....	75
8.3	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	75
8.4	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	75
8.5	Espectrometría masas (EM).....	76
8.6	Preparación del reactivo de Jones	76
8.7	Ensayo por el método MTT	76
8.7.1	Líneas celulares	77
8.7.2	Condiciones del medio:	77
9.	PARTE EXPERIMENTAL	78
9.1.	Procedimiento para la síntesis de derivados 4-en-3,6-endionas.....	78
9.2.	Procedimiento para la síntesis de los derivados 6-alcoxi-4,6-dien-3-onas	79
9.3.	Procedimiento para la formación del diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (79)	83
9.4.	Procedimiento para la obtención de diacetato de (25R)-22,26-dioxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo. (80)..	84
9.5.	Procedimiento de la reacción de condensación del 26-aldehído (80) con <i>p</i> -anisidina.....	85
10.	CONCLUSIONES	86
11.	ANEXO	87
11.1.	24-Etilcolest-4-eno-3,6-diona (73a)	87
11.2.	6-Metoxi-24-Etilcolest-4,6-eno-3-ona (73b)	89

11.3.	6-etoxi-24-Etilcolest-4,6-eno-3-ona (73c).....	91
12.	REFERENCIAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Familia de estrógenos	20
Figura 2.	Compuestos pertenecientes a la familia de andrógenos	21
Figura 3.	Compuestos pertenecientes a la familia de progestinas	21
Figura 4.	Compuestos pertenecientes a la familia de corticosteroides	22
Figura 5.	Numeración del núcleo esteroidal.....	22
Figura 6.	Estereoquímica y forma tridimensional del núcleo esteroidal	24
Figura 7.	Derivados esteroidales con insaturaciones en el anillo A/B. ²⁸	29
Figura 8.	Derivados esteroidales con sistema 3-ceto-4-eno y 3-ceto-1,4-dieno sustituidos en 6 α . ¹¹	30
Figura 9.	Diversos metabolitos secundarios con sistema $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona. ⁴¹	33
Figura 10.	Espectro de RMN de ^1H del compuesto Pren-4-en-3,6,20-triona (72a).....	43
Figura 11.	Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto Pren-4-en-3,6,20-triona (72a).	44
Figura 12.	Espectro de IR del compuesto 72a	46
Figura 13.	Espectro de RMN de ^1H del compuesto 72b	48
Figura 14.	Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 72b	49
Figura 15.	Espectro de IR del compuesto 72b	50
Figura 16.	Espectro de RMN de ^1H del compuesto 72c	51
Figura 17.	Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 72c	52
Figura 18.	Espectro de IR del compuesto 72c	54
Figura 19.	Espectro de ^{13}C del compuesto 79	56
Figura 20.	Espectro de ^1H de RMN del compuesto 79	59
Figura 21.	Espectro de ^{13}C de RMN del compuesto 79	60
Figura 22.	Espectro de IR del compuesto 79	61
Figura 23.	Espectro de RMN de ^1H del compuesto 80	63
Figura 24.	Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 80	64
Figura 25.	Espectro de IR del compuesto 80	65

Figura 26.	Espectro de RMN de ^1H del compuesto 82	67
Figura 27.	Espectro de ^{13}C de RMN del compuesto 82	68
Figura 28.	Espectro de IR del compuesto 82	69
Figura 29.	Ensayo MTT de distintos porcentajes de DMSO contra células MCF-7 con 24 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control negativo (CN). Los datos se expresan como valores $\pm$ de desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett. Los valores con $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significantes. Siendo $** p < 0.01$	70
Figura 30.	Ensayos MTT de los compuestos esteroidales sintetizados (derivados metoxi: 72b y 73b ., derivados etoxi: 72c y 73c ., y 82) contra células de cáncer de mama MCF-7 con 24 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control negativo (CN). Los datos se expresan como valores $\pm$ de desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett. Los valores con $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significantes. Siendo $* p < 0.05$, $** p < 0.01$ and $*** p < 0.001$	71
Figura 31.	Ensayos MTT de los compuestos esteroidales sintetizados (derivados metoxi: 72b y 73b ., derivados etoxi: 72c y 73c ., y 82) contra células de cáncer de mama MCF-7 con 24 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control negativo (CN). Los datos se expresan como valores $\pm$ de desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc Dunnett. Los valores con $p < 0.05$, $** p < 0.01$ and $*** p < 0.001$	73
Figura 32.	Espectro de RMN de ^1H de 24-Etilcolest-4-eno-3,6-diona 73a	87
Figura 33.	Espectro de RMN de ^{13}C de 24-Etilcolest-4-eno-3,6-diona 73a	88
Figura 34.	Espectro de IR del compuesto 73a	88
Figura 35.	Espectro de RMN de ^1H del compuesto 73b	89
Figura 36.	Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 73b	89
Figura 37.	Espectro de IR del compuesto 73b	90
Figura 38.	Espectro de RMN de ^1H del compuesto 73c	91
Figura 39.	Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 73c	91
Figura 40.	Espectro de IR del compuesto 73c	92

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Ejemplo de algunas reacciones químicas catalizadas con I_2 . ²⁴⁻²⁵	25
Esquema 2.	Síntesis de derivados de acetato de 16-pregnenolona. ²⁹	26
Esquema 3.	Síntesis de pregna-4,16-dien-6,20-diona (27) y los derivados 28 y 29 . ³¹	27
Esquema 4.	Ruta de síntesis para la obtención de derivados Δ^4 -eno-3-ona y $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona. ¹²	28
Esquema 5.	Ruta de síntesis del 6-metoxi o 6-etoxi-4,6-dieno. ¹¹	29
Esquema 6.	Síntesis de derivados de testosterona con sistema Δ^4 -en-3-ona y $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona. ³³	30
Esquema 7.	Reacción de acetato de 6 β -bromotestosterona en presencia y ausencia de piridina. ³³	31
Esquema 8.	Síntesis para obtener el derivado 6-metoxicolesta-4,6-dien-3-ona. ³⁴	32
Esquema 9.	Síntesis de enol etil éter con <i>p</i> -TsOH. ³⁵	32
Esquema 10.	Síntesis de 7 β -metilcortisona propuesta por Campbell y col. ³⁶	33
Esquema 11.	Síntesis para la obtención de los derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$	34
Esquema 12.	Reacción de deshidrogenación de testosterona utilizando yodo. ⁴²	35
Esquema 13.	Reacciones catalizadas por I_2 en MeOH y CH_3CN . ⁴⁶⁻⁴⁷	35
Esquema 14.	Ejemplos de desprotección de acetales y cetales catalizada por yodo molecular en acetona.	36
Esquema 15.	Síntesis general para la obtención de los derivados esteroideos 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona.....	41
Esquema 16.	Mecanismo hipotético para la transformación de los esteroides $\Delta^{4,6}$ -3-ona hacia los derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -3-ona con yodo en ROH.	47
Esquema 17.	Trabajo previo, reacción del 6-metoxicolesta-4,6-dien-3-ona (76) con hidroxilamina.	55
Esquema 18.	Ruta de síntesis para obtener el derivado imino.....	55
Esquema 19.	Reacción general para la obtención del compuesto 80	57
Esquema 20.	Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 79	58
Esquema 21.	Síntesis para la obtención del compuesto 80	62
Esquema 22.	Reacción de condensación de 82 con <i>p</i> -anisidina.	66
Esquema 23.	Síntesis de derivados de 4-en-3,6-endionas.	78
Esquema 24.	Ruta de síntesis para la obtención de enol éter derivados de pregn-5-en-3 β -ol-20-ona y β -sitosterol	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Rendimientos de las endionas 72a y 73a.	42
Tabla 2.	Desplazamientos químicos δ (ppm) seleccionados para las endionas 72a y 73b.....	45
Tabla 3.	Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C δ (ppm) seleccionados para los derivados metoxi (72b, 73b) y etoxi (72c, 73c).....	53
Tabla 4.	Concentración de los compuestos sintetizados en diferentes porcentajes de DMSO.	70
Tabla 5.	Concentración estándar de los compuestos sintetizados.....	72
Tabla 6.	Actividad citotóxica (LC_{50}) contra la lineal celular MCF-7.	74

ABREVIATURAS

CC	Cromatografía en columna
COSY	Correlation Spectroscopy
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
DHT	Dihidrotestosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMPA	Hexametilfosforamida
Hz	<i>Hertz</i>
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IR	Infrarrojo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LC ₅₀	Concentración letal media
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PCC	Clorocromato de piridinio
ppm	Partes por millón
<i>p</i> -TsOH	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico
THF	Tetrahidrofurano
CCF	Cromatografía en capa fina
TMS	Tetrametilsilano
δ	Desplazamiento químico
Δ	Doble enlace
μ M	micromolar

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades comúnmente diagnosticada, posicionándose dentro de las principales causas de muerte en las mujeres y hombres,¹ se caracteriza por un crecimiento anormal de células llegando a propagarse a otros tejidos del organismo, lo cual se conoce como metástasis.²

En las mujeres, la enfermedad más comúnmente diagnosticada es el cáncer de mama, mientras que, en los hombres, es el cáncer de próstata, seguido del cáncer de pulmón. Según datos reportados se estima que en el año 2020 se produjeron 2.3 millones de casos nuevos (11.7%) de cáncer de mama, superando al cáncer de pulmón que era conocido como el cáncer más común.³ El cáncer de mama junto con el cáncer de próstata y cervicouterino son tumores que dependen de ciertas hormonas esteroidales para su proliferación, es decir que muestran tener una hormono-dependencia y en ausencia de éstas las células tumorales mueren.⁴

Los principales tratamientos para el cáncer de mama son la cirugía, radioterapia y quimioterapia o la combinación de éstas, los cuales, para su aplicación, dependen de dos factores como es el tipo de cáncer y su grado de avance. El tratamiento de la quimioterapia está constituido por el uso de uno o más agentes citotóxicos con efecto antineoplásico, sin embargo, se consideran no selectivos y como consecuencia de su mecanismo de acción pueden llegar a causar efectos adversos a los pacientes como dolor, diarrea, pérdida de peso y de cabello, entre otros.⁵

Además, existen otras alternativas más suaves que la quimioterapia y con menos efectos adversos para el tratamiento contra el cáncer hormono-dependiente, donde se emplean moléculas de bajo peso molecular, actuando como inhibidoras de alguna enzima implicada en el crecimiento tumoral. Estos inhibidores se dividen en dos familias: 1) inhibidores de tipo I: son generalmente esteroides que actúan como inhibidores irreversibles y 2) inhibidores de tipo II: estos no son esteroides y son reversibles.⁶ Los fármacos empleados en este tipo de terapias están dirigidas a dianas moleculares específicas que son importantes para la proliferación o metástasis de las células cancerosas.⁷ En este contexto, de acuerdo a la literatura se reportan estudios sobre los inhibidores de tipo I realizados a enzimas esteroideogénicas que participan en la biosíntesis de diferentes familias de hormonas esteroideas tales como, progestinas, mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos y estrógenos, estas dos últimas familias juegan un papel importante

en los cánceres hormono-dependientes. Entre las enzimas implicadas en el cáncer hormono-dependiente se encuentran la aromatasas,⁸ 5 α -reductasa,⁹ 17 α -hidroxilasa/17 α -liasa, la primera de ellas, por ejemplo, está relacionada en la biosíntesis de la dihidrotestosterona, que a su vez se encuentra implicada en el desarrollo de hiperplasia benigna prostática.⁶ Por ello, se puede considerar al núcleo esteroidal una estructura privilegiada para la generación de nuevas moléculas con actividad citotóxica, como inhibidores enzimáticos y como adyuvantes en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.¹⁰

En el año 2000, Numazawa y colaboradores reportaron la síntesis de compuestos que contienen insaturaciones en los anillos A y B del núcleo esteroidal ($\Delta^{1,4}$, $\Delta^{1,4,6}$, $\Delta^{4,6}$) y con diferentes sustituyentes en el C-6, estos compuestos presentaron ser potentes inhibidores de la enzima aromatasas, siendo esta enzima una diana terapéutica potencial para la reducción selectiva de los niveles de estrógenos en pacientes de cáncer de mama avanzado.¹¹

La formación del sistema $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona ha sido reportada por diversos grupos de investigación, y conlleva metodologías complejas de hasta 5 pasos de reacción partiendo del colesterol con Δ^5 .¹²

Dado al interés y la importancia de su actividad como posibles inhibidores, en este trabajo se plantea sintetizar en dos pasos cuatro derivados de 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona partiendo de pregn-5-en-3 β -ol-20-ona y β -sitosterol. Además, se estudia la reactividad de dicho sistema frente a semicarbazida. Por último, se evalúa su actividad citotóxica frente a células cancerosas de mama MCF-7 con el ensayo MTT.

2. MARCO TEÓRICO

Los esteroides son moléculas lipofílicas que desempeñan funciones esenciales tales como fisiológicas incluida el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, diferenciación sexual y como intermediarios metabólicos.¹³

2.1 Clasificación de los esteroides

Uno de los esteroides más importantes es el colesterol (**Figura 1, 1**), el cual es considerado el principal precursor en la biosíntesis de hormonas esteroideas que son secretadas por tres glándulas, la corteza suprarrenal, los testículos y los ovarios. Estas hormonas se clasifican de acuerdo con el órgano que las segrega como: esteroides suprarrenales, éstos son secretados por la corteza suprarrenal, en esta familia se incluyen a los corticoesteroides (glucocorticoides y mineralocorticoides); y, las hormonas sexuales, que son producidas por el ovario y testículos, en esta familia se encuentran presentes los andrógenos, estrógenos y progestinas.¹⁴⁻¹⁵

Los estrógenos: son compuestos esteroideos como el estradiol y la estrona (**Figura 1, 2 y 3**). Estructuralmente se diferencian por contener 18 carbonos en el núcleo esteroideal y desempeñan un papel importante en el desarrollo de las características sexuales femeninas.

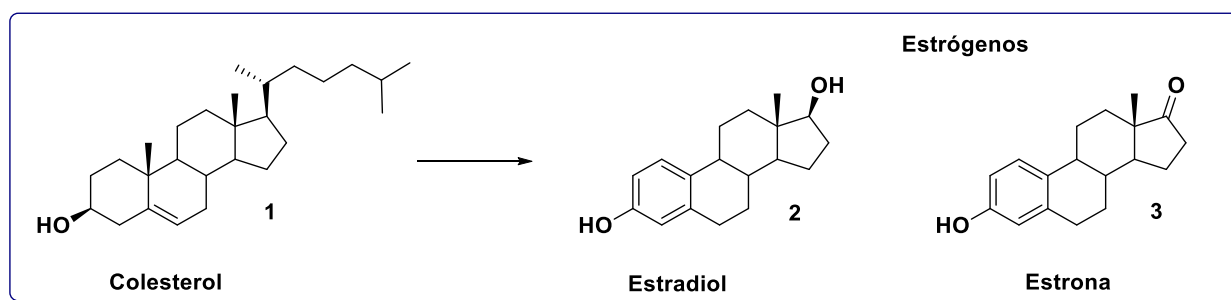


Figura 1. Familia de estrógenos

En la familia de los andrógenos se encuentran la testosterona (4), dihidrotestosterona (5) y 11-cetotestosterona (6), son esteroides con 19 carbonos en su estructura como se muestra en la **Figura 2**. Influyen en el comportamiento sexual masculino y en las características sexuales secundarias.

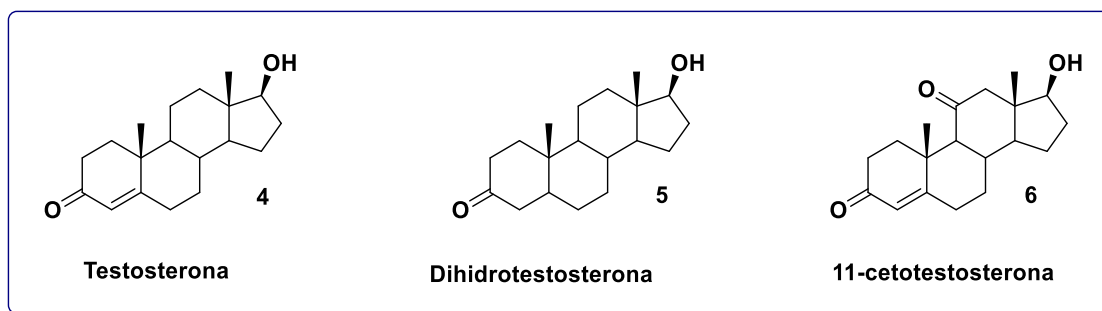


Figura 2. Compuestos pertenecientes a la familia de andrógenos

Las progestinas son esteroides con 21 átomos de carbono, las principales hormonas de esta familia son la progesterona (7) y 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (8) (**Figura 3**), responsables del mantenimiento del embarazo.

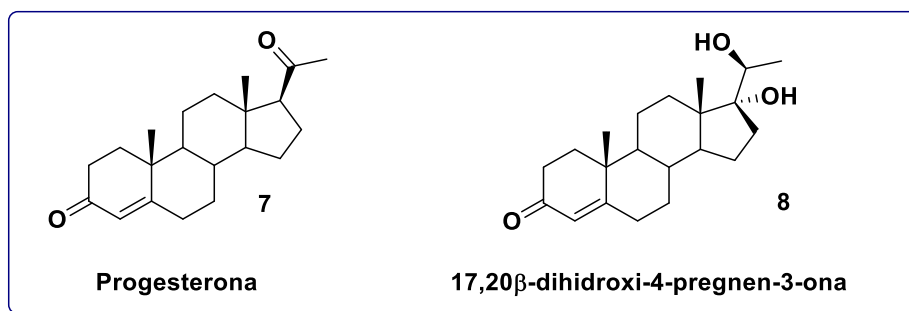


Figura 3. Compuestos pertenecientes a la familia de progestinas

Los corticoesteroides son esteroides con 21 átomos de carbonos, en esta familia se encuentran el cortisol (9), corticosterona (10), aldosterona (11) y deoxicorticosterona (12) (**Figura 4**). Se consideran reguladores claves en la homeostasis del cuerpo que proveen al organismo la capacidad de resistir a cambios medioambientales y a la invasión de sustancias extrañas; además producen alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y la modulación del balance de los electrolitos y agua.¹⁶

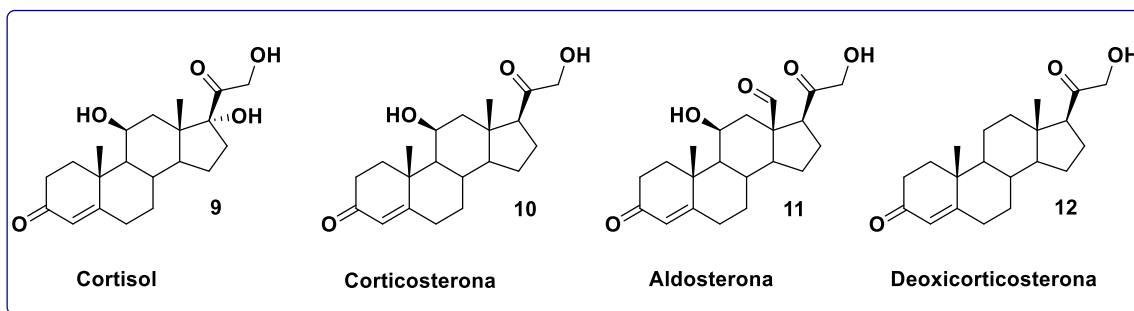


Figura 4. Compuestos pertenecientes a la familia de corticosteroides

2.2 Nomenclatura de los esteroides

Los esteroides tienen un núcleo común denominado ciclopentanoperhidrofenantreno, el cual consiste en cuatro anillos fusionados, tres de ellos son de seis miembros y uno de cinco miembros. En la **Figura 5** se muestra la numeración de acuerdo por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), que nombra a cada uno de los anillos como A, B, C y D; es común encontrar grupos metilos en las posiciones C-10 y C-13, numerados como 18 y 19, así como también una variedad de cadenas laterales en la posición C-17.¹⁷

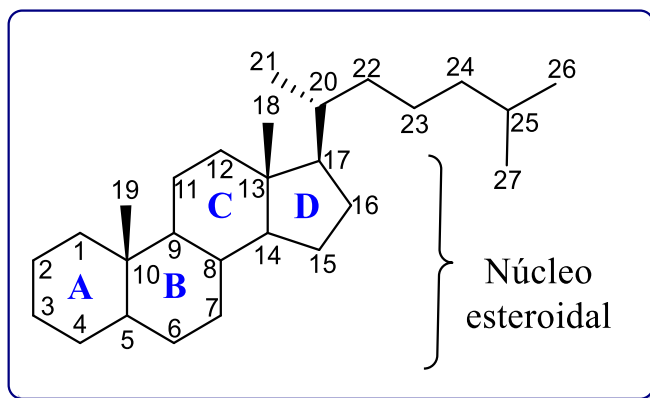


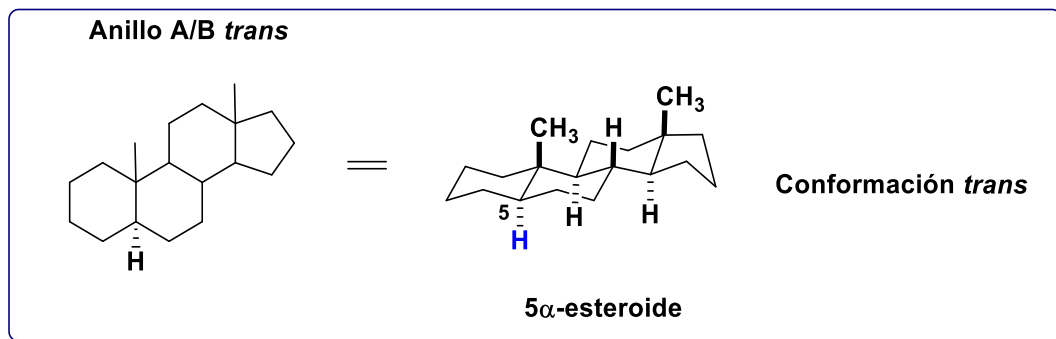
Figura 5. Numeración del núcleo esteroidal

2.3 Estereoquímica y forma tridimensional de los esteroides

Los esteroides no son moléculas planas, en realidad el sistema de anillos de los esteroides tiene una forma tridimensional. Cada anillo de seis miembros tiene una conformación en forma de silla que tiene los grupos metilos en posición opuesta, que le confiere a la molécula estabilidad. Sin embargo, el anillo de cinco miembros adopta una conformación no plana denominada “media silla”, su forma varía en cada esteroide minimizando las tensiones generadas con su modo de unión con el anillo C o cualquier sustituyente.

Es importante considerar la posición de los enlaces unidos al anillo del sistema, los cuales se dividen en dos grupos: 1) los que se encuentran cerca del plano medio del anillo se denominan enlaces ecuatoriales; 2) los que son perpendiculares al plano se denominan enlaces axiales. Esta distinción tiene importancia en las propiedades químicas (reactividad) y físicas (características espectroscópicas) de los esteroides. Por otro lado, para indicar la posición de los enlaces del anillo D de cinco miembros no se consideran totalmente axiales o ecuatoriales, sino que se utilizan términos como: cuasiaxial y cuasiecuatorial. Para representar la estereoquímica de los sustituyentes, se dibuja una línea continua si el enlace es β , y si el enlace es α una línea discontinua.

La mayoría de los esteroides presentan la configuración *trans* en los anillos A y B, es decir, el enlace C-10, C-19 es *trans* con respecto a C-5 y H-5. Igualmente, los anillos B-C y C-D son *trans* entre ellos. Por otro lado, hay esteroides que difieren en la configuración solamente en los anillos A y B adoptando una configuración *cis*. Esta configuración se invierte por el cambio de configuración α o β del átomo de hidrogeno presente en C-5 (**Figura 6**).¹⁸⁻¹⁹



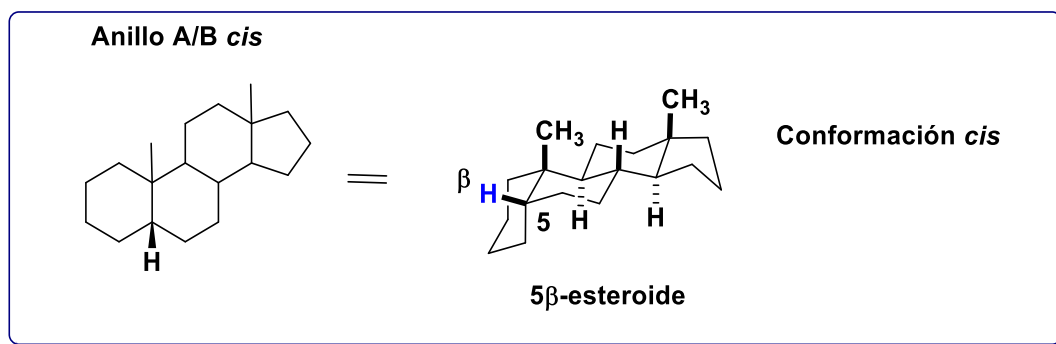


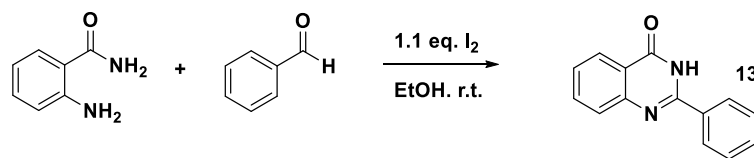
Figura 6. Estereoquímica y forma tridimensional del núcleo esteroidal

En los esteroides 5 α , la clasificación de los enlaces axial/ecuatorial de sustituyentes es sencilla porque están orientados de manera similar. A diferencia de como se muestra en los esteroides 5 β , la unión A/B *cis* provoca una curva o forma de L en la estructura del anillo A con los otros tres anillos respectivamente. Se debe considerar que la diferencia entre los esteroides 5 α y 5 β tiene un efecto importante en su movilidad cromatográfica (separación por cromatografía) y sobre todo en sus propiedades espectroscópicas y químicas.²⁰

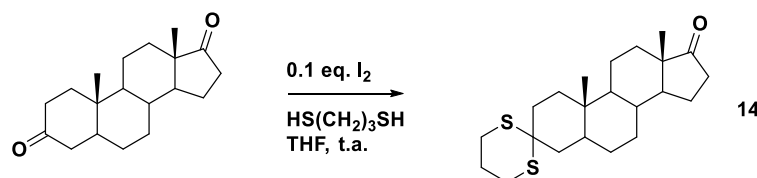
2.4 Características e importancia del yodo

El yodo fue descubierto en 1811, es un elemento sólido de color negro azulado con apariencia cristalina brillante, debido a su alta electronegatividad forma yoduros (I⁻) con algunos elementos (KI, HI, AgI), también se puede encontrar en la naturaleza en forma de yodatos.²¹⁻²² Es soluble en diversos disolventes orgánicos como acetonitrilo, cloroformo, acetona, etanol, por mencionar algunos, pero es ligeramente soluble en agua. Es considerado un excelente catalizador no metálico, no es tóxico, es económico, de fácil disponibilidad y es amigable con el medio ambiente. Se utiliza principalmente en reacciones químicas por sus propiedades como oxidante, además de que posee propiedades como desinfectante y biocida.²³ Algunas reacciones químicas en las que se ha reportado el uso del yodo son: reacciones de oxidación, síntesis de compuestos heterocíclicos, yodación de compuestos orgánicos, protección y desprotección de grupos funcionales, adiciones de Michael, aromatización de cetonas α , β -insaturadas, entre otras (**Esquema 1**).²⁴⁻²⁵

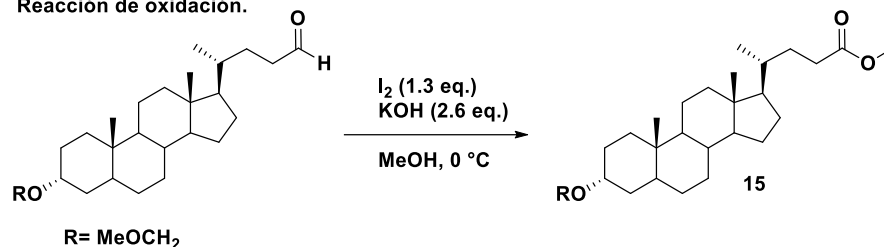
Reacción para la formación de compuestos heterocíclicos.



Protección de grupos funcionales.



Reacción de oxidación.



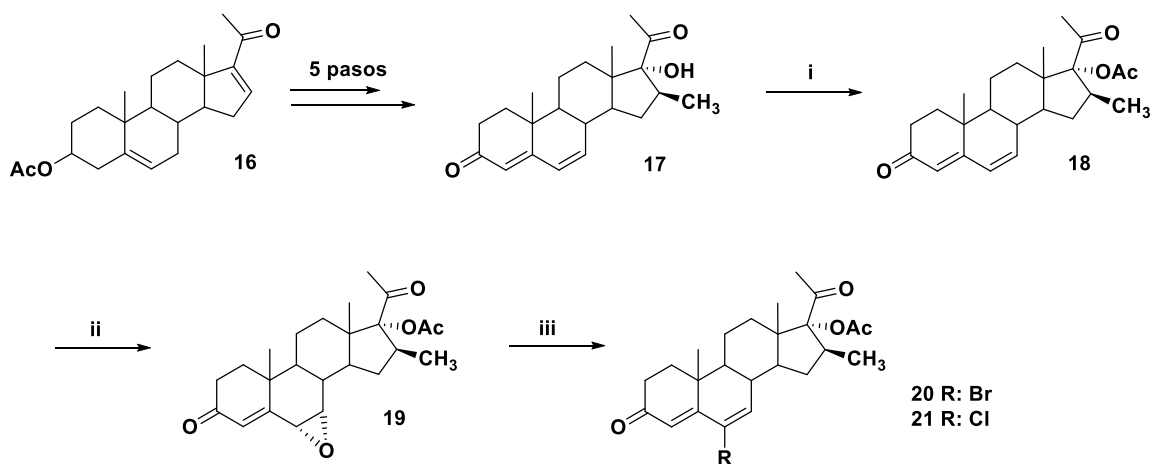
Esquema 1. Ejemplo de algunas reacciones químicas catalizadas con I_2 .²⁴⁻²⁵

El yodo es considerado un catalizador fuerte debido a su capacidad como ácido de Lewis, además, es importante mencionar la amplia gama de estados de oxidación que contienen los compuestos de yodo, desde yoduro (I^-) hasta el anión peryodato (IO_4^- , I^{+7}), confiriéndole al yodo un alto grado de flexibilidad como catalizador redox.²² En este contexto, también se le ha utilizado como catalizador alternativo en reacciones promovidas por metales, haciendo los procesos de transformación más eficientes, con mayores rendimientos, disminuyendo el uso de disolventes y el número de pasos de reacción.²⁶⁻²⁷

3. ANTECEDENTES

Los derivados esteroidales que contienen el sistema $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona son compuestos interesantes desde el punto de vista farmacológico debido a que han mostrado ser agentes inhibidores de la enzima aromatasa²⁸ y 5α -reductasa.¹²

Cabeza y colaboradores,²⁹ evaluaron la actividad inhibitoria específicamente en la conversión de testosterona a dehidrotestosterona (DHT) en órganos laterales y vesículas seminales, de una serie de compuestos derivados del acetato de 16-dehidropregnenolona conteniendo grupos halógenos en la posición C-6 del núcleo. La síntesis consistió en cinco pasos preliminares para obtener el compuesto (**17**) (**Esquema 2**), el cual no presentó actividad inhibitoria en las pruebas realizadas. Mientras que los compuestos halogenados en C-6 fueron los más activos. El derivado **20** inhibió la conversión de testosterona a DHT y el compuesto **21** aumentó la formación de DHT a dosis bajas. Sin embargo, a dosis altas este esteroide inhibe completamente la formación de DHT.³⁰



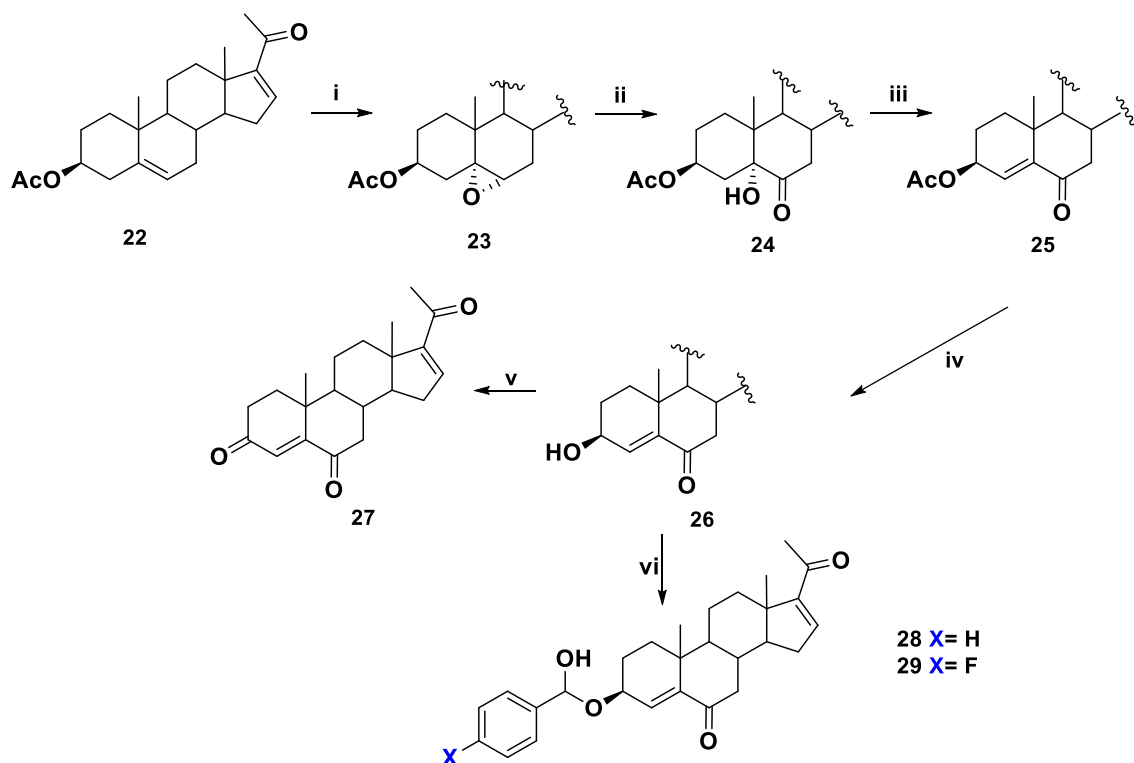
i) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_3COOH , APTS, t.a ii) MCPBA-reflujo iii) HCl o HBr, AcOH, t.a

Esquema 2. Síntesis de derivados de acetato de 16-pregnenolona.²⁹

La síntesis de derivados de pregna-4,16-dien-6,20-diona reportados por Pérez,³¹ se realizó mediante el siguiente procedimiento: primero, se llevó a cabo la epoxidación en el anillo B (C-5 y C-6) de **22** con ácido *m*-cloroperbenzoico en cloroformo, lo que generó el análogo **23**

(Esquema 3); posteriormente, con una solución de CrO_3 en acetona condujo a **24**; luego, se trató con SOCl_2 en piridina para dar el derivado 3 β -acetoxi **25**; cuya hidrólisis básica condujo al derivado 3 β -hidroxi (**26**). De este derivado se generaron dos productos, el primero se obtuvo luego de la oxidación del alcohol en C-3 para dar **27**; el segundo producto resultó de la esterificación del grupo alcohol del C-3 y posterior tratamiento con ácido benzoico, diciclohexilcarbodiimida y 4,4-dimetilaminopiridina en cloruro de metileno generando los derivados **28** y **29**.

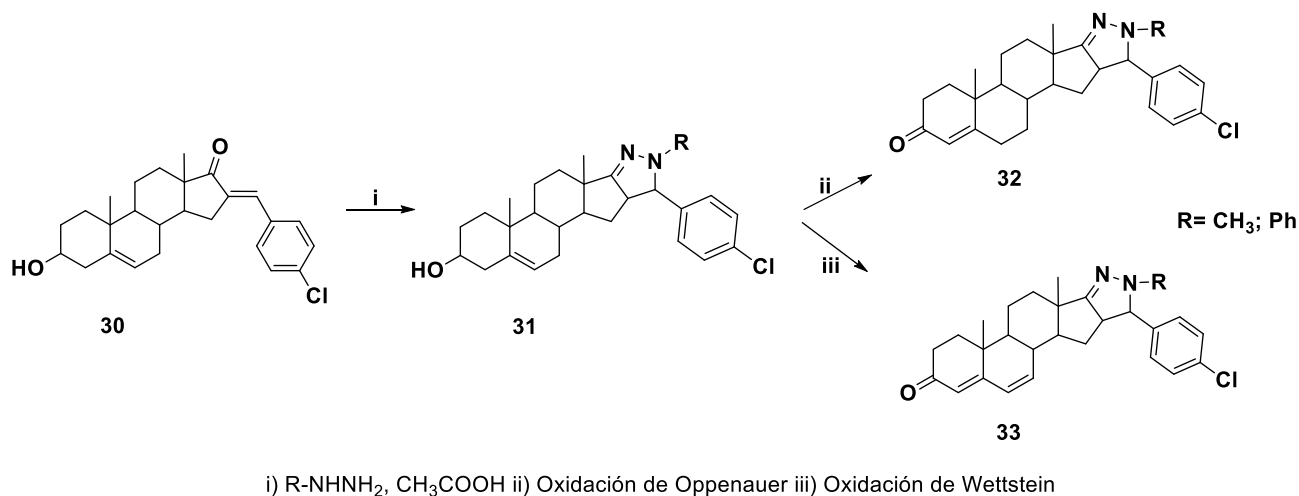
Los productos sintetizados se evaluaron como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa de hámster y próstata humana, los resultados obtenidos mostraron que los compuestos **23**, **25**, **27** y **28** son buenos inhibidores de esta enzima.



i) *m*-cloroperbenzoico, CHCl_3 ii) CrO_3 , acetona 0°C iii) SOCl_2 , piridina, t.a iv) NaOH , MeOH , rt v) CrO_3 , H_2O -acetona vi) BzOH ó 4-F-BzOH, DCC- CH_2Cl_2

Esquema 3. Síntesis de pregn-4,16-dien-6,20-diona (**27**) y los derivados **28** y **29**.³¹

En el 2006, Amr y colaboradores¹² sintetizaron una serie de compuestos que contienen un anillo de pirazolina derivados de testosterona con sistemas Δ^4 -3-ona y $\Delta^{4,6}$ -3-ona, mostrando excelentes actividades inhibitoras de la enzima 5 α -reductasa. Para obtener los derivados, partieron de **30**, que con tratamiento de hidrazina en ácido acético glacial a reflujo por 6 h generó el derivado pirazolina *N*-sustituida (**31**) (**Esquema 4**). De este derivado se obtuvieron dos productos interesantes de la siguiente manera: 1) oxidación de **31**, usando la reacción de Oppenauer, generando el producto Δ^4 -3-ona (**32**). 2) Deshidrogenación de **31** con la reacción de Wettstein para proporcionar análogos $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona (**33**).



Esquema 4. Ruta de síntesis para la obtención de derivados Δ^4 -eno-3-ona y $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona.¹²

En 1985, Marsh²⁸ describe la síntesis y evaluación de derivados Δ^4 , $\Delta^{1,4}$, $\Delta^{4,6}$, $\Delta^{1,4,6}$ de androstenediona como inhibidores de estrógenos. Especialmente, los derivados 4-hidroxi, **34**, **35**, **36** y **37** (**Figura 7**), mostraron ser potentes inhibidores. Estos compuestos mantienen la conjugación del sistema 3-ceto-4-eno en su estructura que beneficia la inactivación más rápida de la aromatasa en microsomas de rata.

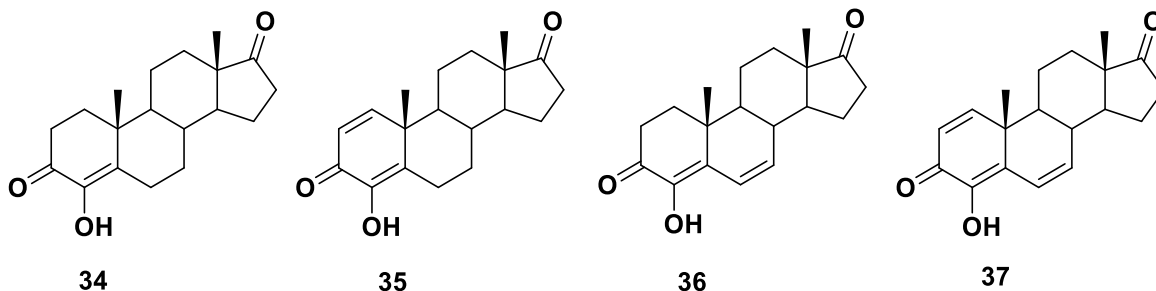
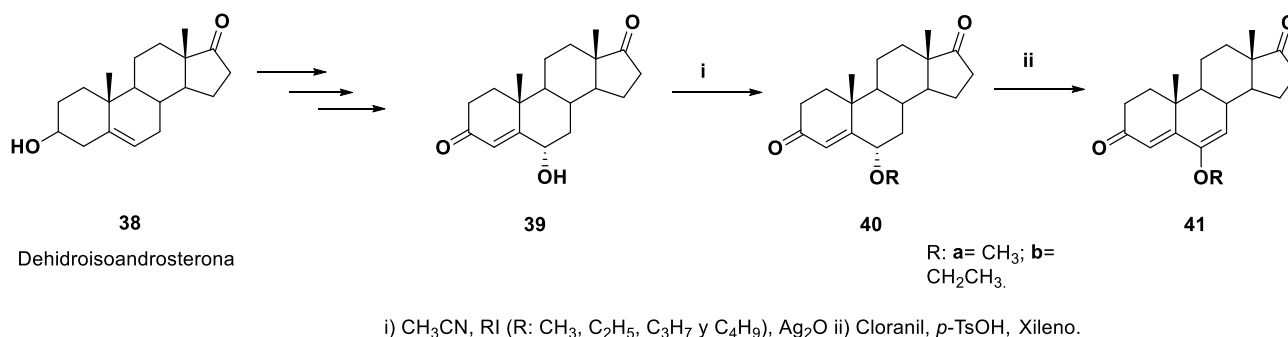


Figura 7. Derivados esteroidales con insaturaciones en el anillo A/B.²⁸

Numazawa y colaboradores,¹¹ describen la síntesis de análogos $\Delta^{1,4}$, $\Delta^{1,4,6}$ y $\Delta^{4,6}$ de androstenedionas sustituidas en el C-6 por ésteres y éteres. Dichos compuestos fueron evaluados por su actividad como inhibidores de la enzima aromatasas en las microsomas de la placenta humana. La síntesis consistió en una secuencia de varios pasos para obtener el derivado 3-ceto-4,6-dieno, tomando como materia prima a la 6-hidroxiandrost-4-en-3,17-diona (**39**) que fue sintetizada a partir de la dehidroisoandrosterona³² (**38**) (Esquema 5).

La síntesis también consistió en estudiar el efecto sobre la afinidad y la tasa de inactivación de la enzima aromatasas en la introducción de varios sustituyentes de 6-éster y 6-éter en los derivados de androstenediona. El esteroide que presentó un mejor resultado actuando como inhibidor de la 5α -reductasa fue el 6 α -metoxi (**40**) y 6 α -etoxi-4-eno (**41**), los cuales exhibieron una $IC_{50} = 0.70 \mu M$ para el derivado α -metoxi (**40a**) y una $IC_{50} = 0.75 \mu M$ para el derivado α -etoxi (**40b**).



Esquema 5. Ruta de síntesis del 6-metoxi o 6-etoxi-4,6-dieno.¹¹

Además, los compuestos 6 α -*n*-hexanoiloxi y 6 α -benciloxiandrostenedionas (**42** y **43**) (Figura 8) fueron los inhibidores más potentes presentando valores de $IC_{50} = 0.088$ y $0.085 \mu M$,

respectivamente. Haciendo énfasis en que la serie de esteroide con el sistema 4-eno y 1,4-dieno sustituidos en 6 α presentaron mayor afinidad por la enzima que sus isómeros 6 β . Por último, se concluyó que la introducción de los derivados de 6-éster y 6-éter aumenta la tasa de inactivación de la enzima aromatasa y que el átomo de oxígeno en la posición C-6 y su análogo $\Delta^{1,4}$ juega un papel importante en la unión de los compuestos esteroidales al sitio activo de la enzima aromatasa.

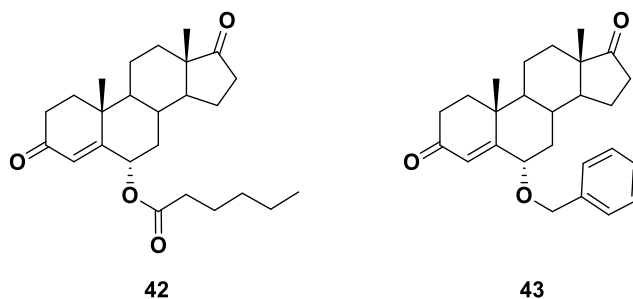
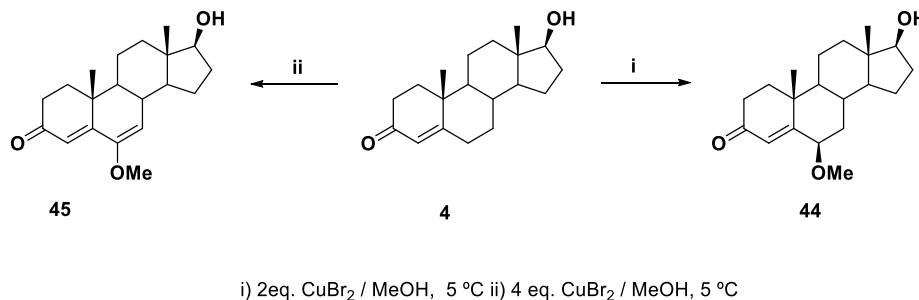


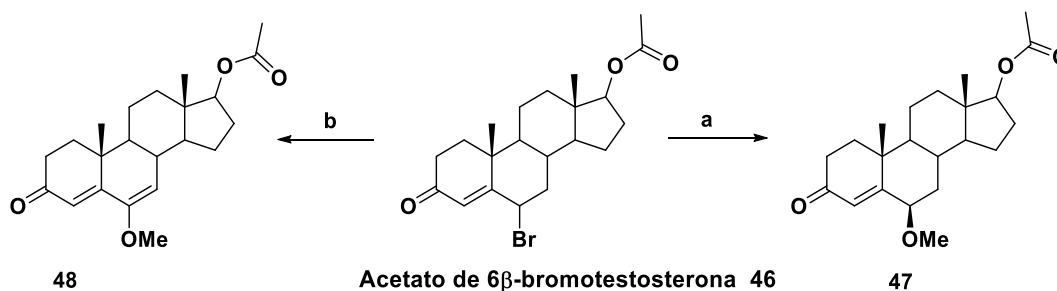
Figura 8. Derivados esteroidales con sistema 3-ceto-4-eno y 3-ceto-1,4-dieno sustituidos en 6 α .¹¹

Sollman y colaboradores,³³ reportaron una metodología para la preparación de derivados de testosterona (**4**) y progesterona con sistema 3-ceto-4,6-dieno sustituido en el C-6 con un grupo alcoxi (**Esquema 6**). La síntesis implicó el uso dos equivalentes de bromuro cúprico en metanol a 5 °C por 7 días, lo cual generó a la 6 β -metoxitestosterona (**44**), mientras que con el uso de un exceso de bromuro cúprico (4 equivalentes), en las mismas condiciones que el compuesto anterior, produjo a la 6-metoxi-6-dehidrotestosterona (**45**) con un rendimiento del 60%.



Esquema 6. Síntesis de derivados de testosterona con sistema Δ^4 -en-3-ona y $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona.³³

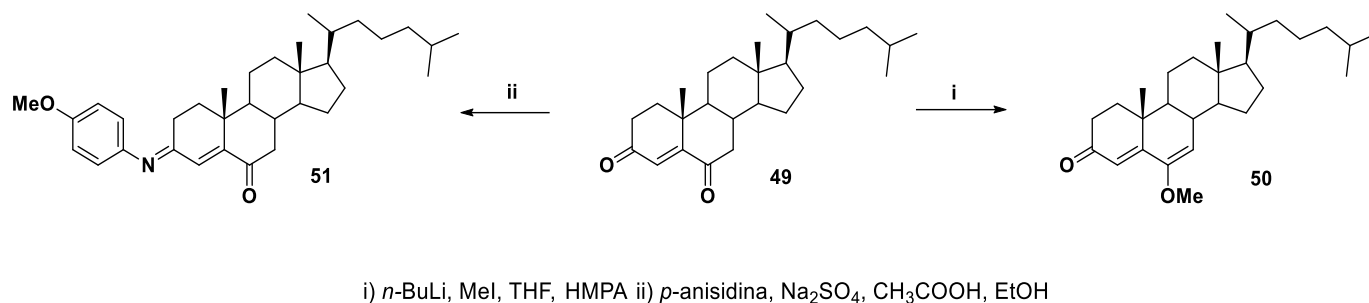
En este mismo trabajo, se menciona la obtención del derivado 6-metoxi- $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona (**48**) a partir del compuesto 6-bromo- Δ^4 -3-ona. En el **Esquema 7**, se muestra la reacción de acetato de 6 β -bromotestosterona (**46**) con dos equivalentes molares de CuBr₂ a reflujo en MeOH, en este caso con la presencia de un exceso de piridina generó el compuesto **47**. Sin embargo, cuando la reacción anterior se llevó a cabo a temperatura ambiente con CuBr₂ en MeOH, pero en ausencia de piridina se obtuvo el derivado 6-metoxi-6-dehidrottestosterona (**48**) con un 70% de rendimiento.



a) 2 eq. CuBr₂, MeOH, 5 eq. Piridina, reflujo b) 2 eq. CuBr₂, MeOH, t.a

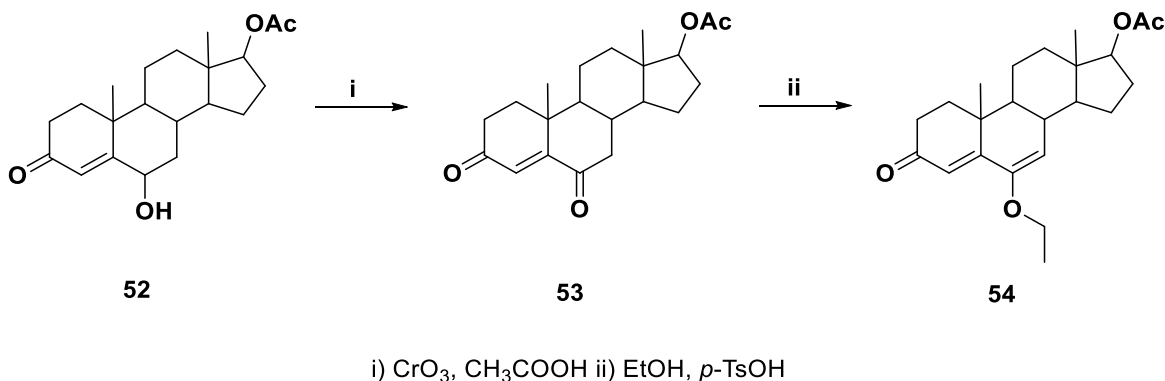
Esquema 7. Reacción de acetato de 6 β -bromotestosterona en presencia y ausencia de piridina.³³

Geng y col.,³⁴ describen una metodología para la síntesis de derivado de 3-arilimino (**51**). En el **Esquema 8** se muestra dos rutas de síntesis a partir del colest-4-en-3,6-diona (**49**), para obtener el derivado 6-metoxicolesta-4,6-dien-3-ona (**50**) usando *n*-BuLi, MeI en THF/HMPA a -78 °C por 2 h, mientras que en presencia de *p*-anisidina sufre una reacción de condensación acoplándose en C-3 para dar el compuesto **51**, al cual se le realizó un cálculo de la energía y rotación específica de cada una de las conformaciones que forma debido a la mutarrotación o una mezcla en equilibrio de isómeros-(*E*)- y (*Z*) del compuesto **51**.



Esquema 8. Síntesis para obtener el derivado 6-metoxicolesta-4,6-dien-3-ona.³⁴

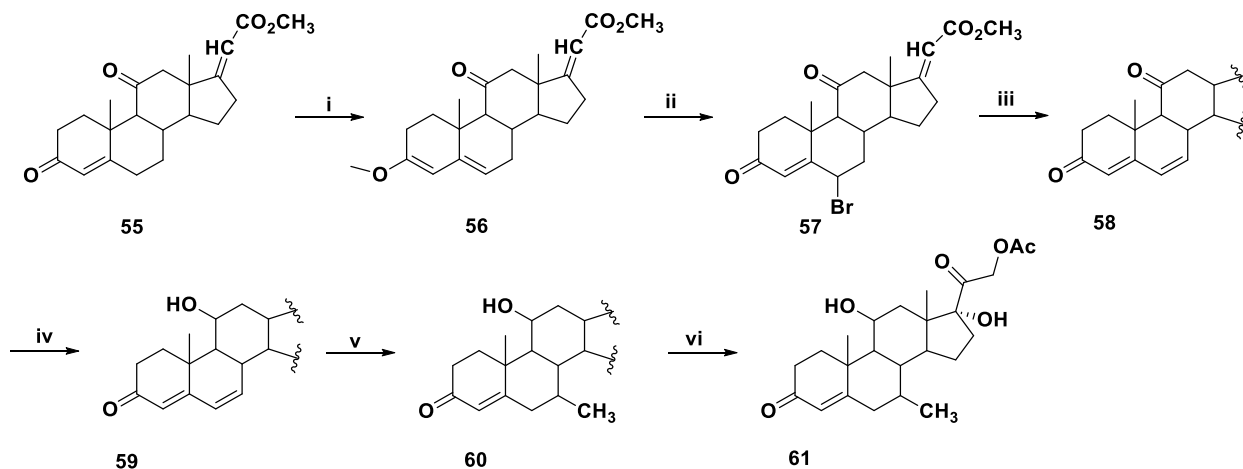
Mori y col.,³⁵ mencionan la síntesis de las hormonas esteroidales 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona a partir de la 6 β -hidroxi-17 β -acetoxiandrosta-4-en-3-ona (52), la síntesis consistió en realizar primero una oxidación con CrO₃ y CH₃COOH para obtener el compuesto 17 β -acetoxiandrosta-4-en-3,6-diona (53), seguido de la reacción de la dicetona en EtOH con un exceso de *p*-TsOH, obteniendo el enol etil éter deseado (54) (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis de enol etil éter con *p*-TsOH.³⁵

Por otro lado, los derivados 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona han servido de material de partida para la introducción de residuos alquílicos en el C-7 del esqueleto esteroide. Como es el caso de Campbell y col.,³⁶ que reporta la síntesis de una serie de estos derivados en varios pasos. En el **Esquema 10** se muestra la síntesis de 61 que inició a partir del 3,11-diceto-4,17(20)-*cis*-pregnadien-21-oato (55), con *O*-formiato de metilo en MeOH generando el correspondiente enol éter, 3-metoxi-11-ceto-3,5,17(20)-*cis*-pregnatrien-21-oato (56). Posteriormente, se introdujo un grupo halogenuro en el C-6 con HBrO obteniendo el compuesto 6-bromo- Δ^4 -3-cetona (57), el cual sufrió una eliminación para dar el compuesto 6-dehidro (58). El tratamiento de 58 con

pirrolidina y la reducción del grupo ceto en C-11 a un grupo hidroxilo con LiAlH_4 condujo al intermediario clave de la reacción **59**; este compuesto se trató con CH_3BrMg y CuCl seguido de una acetilación en C-7, sin afectar el grupo hidroxilo en C-11, generando el derivado 7β -metil- Δ^4 -3-cetona (**60**). Finalmente, con el cambio de la cadena lateral se obtuvo el compuesto 7β -metilcortisona (**61**).



i) O-formiato de metilo, MeOH ii) HBrO iii) colidina iv) $p\text{-TsOH}$, CH_2Cl_2 , pirrolidina, LiAlH_4 v) CH_3BrMg , CuCl , THF
vi) *tert*-butanol, piridina, yodosodiacetato de fenilo, OsO_4 , 6°C

Esquema 10. Síntesis de 7β -metilcortisona propuesta por Campbell y col.³⁶

El sistema 4,6-dien-3-ona también se ha observado en metabolitos secundarios (**62**),³⁷⁻³⁸ y formando parte de derivados con actividad androgénica (**63** y **64**)³⁹ y progestogénica (**65**)⁴⁰ (Figura 9).

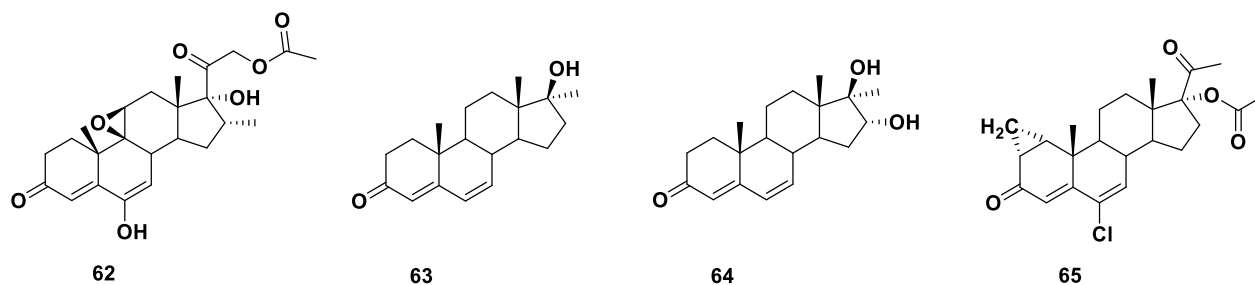
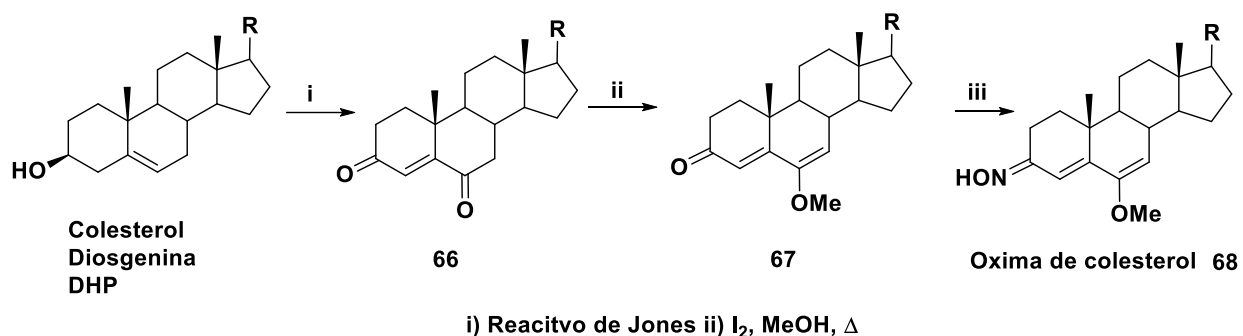


Figura 9. Diversos metabolitos secundarios con sistema $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona.⁴¹

Recientemente en nuestro grupo de investigación, desarrollamos un método sencillo para generar el sistema $\Delta^{4,6}$ con un grupo $-\text{OR}$ en el C-6, en dos pasos a partir de colesterol, diosgenina y de la 16-DHP.⁴¹ Posteriormente, se introdujeron grupos oxima en el C-3. El derivado **68** exhibió los mejores resultados como agente citotóxico, con un valor de $\text{IC}_{50} = 20 \text{ } \mu\text{M}$ contra células cancerígenas humanas MFC-7 (**Esquema 11**).



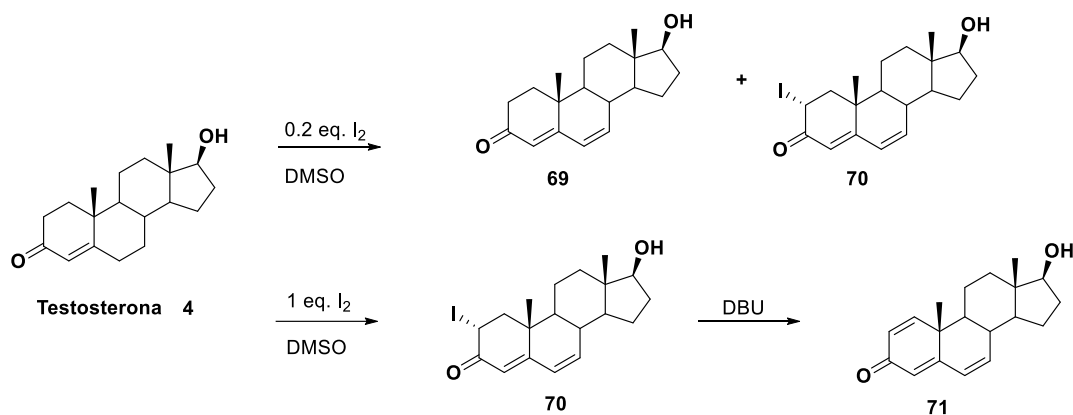
Esquema 11. Síntesis para la obtención de los derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$.

3.1 Reacciones efectuadas con I_2

El yodo es considerado un agente oxidante universal, menos costoso, así como también menos tóxico. Debido a su buena capacidad oxidante también posee una gran capacidad funcional como desinfectante o biocida. Diversos compuestos orgánicos e inorgánicos que contienen yodo frecuentemente se utilizan en las reacciones de síntesis orgánica para la modificación de compuestos, especialmente se han descrito reacciones para la oxidación de alcoholes y aldehídos a ésteres, nitrilos y amidas, formación de enlaces C-C,⁴² aromatización de cetonas α , β -insaturadas, entre otras.²⁵ El yodo posee ventajas sobre la mayoría de otros catalizadores metálicos como el negro de Pd, $\text{CuBr}_2\text{--LiBr}$, MnO_2 , KMnO_4 , CuCl_2 y FeCl_3 por mencionar algunos,⁴³ ya que es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos y ligeramente soluble en agua; además de que es amigable con el medio ambiente.⁴⁴⁻⁴⁵

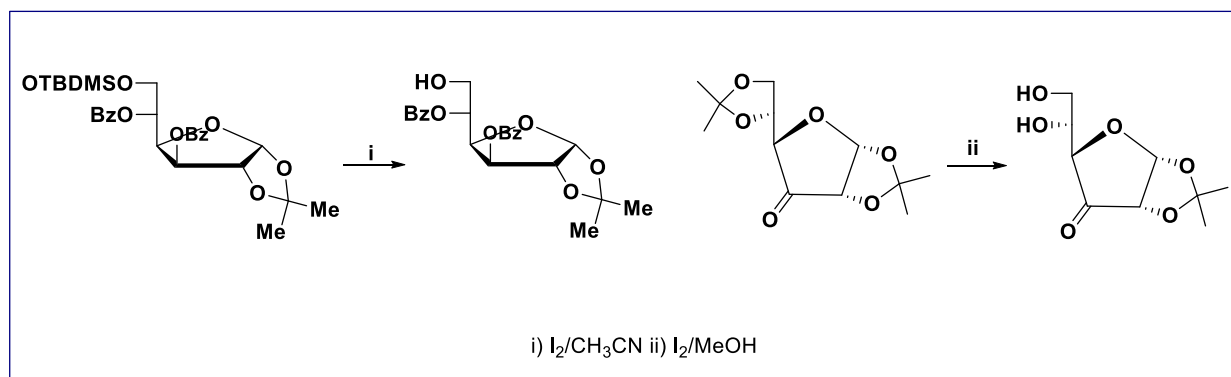
Domingo y col.,⁴³ describen un método amigable con el medioambiente utilizando I_2 para la reacción de deshidrogenación de esteroides para formar derivados con el sistema $\Delta^{4,6}$ -3-ona. El tratamiento consistió en reaccionar a la testosterona (**4**) con $\text{I}_2\text{--DMSO}$, obteniéndose en un mayor rendimiento el derivado $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona (**69**) sin afectar al grupo hidroxilo ubicado en el C-17, y como subproducto el compuesto **70**. Este nuevo derivado (**70**) se obtuvo en mayor rendimiento

cuando se modificó el tratamiento de **4** con 1 equivalente de I_2 en DMSO, que finalmente con el tratamiento DBU se observó la formación del compuesto **71**. (**Esquema 12**)



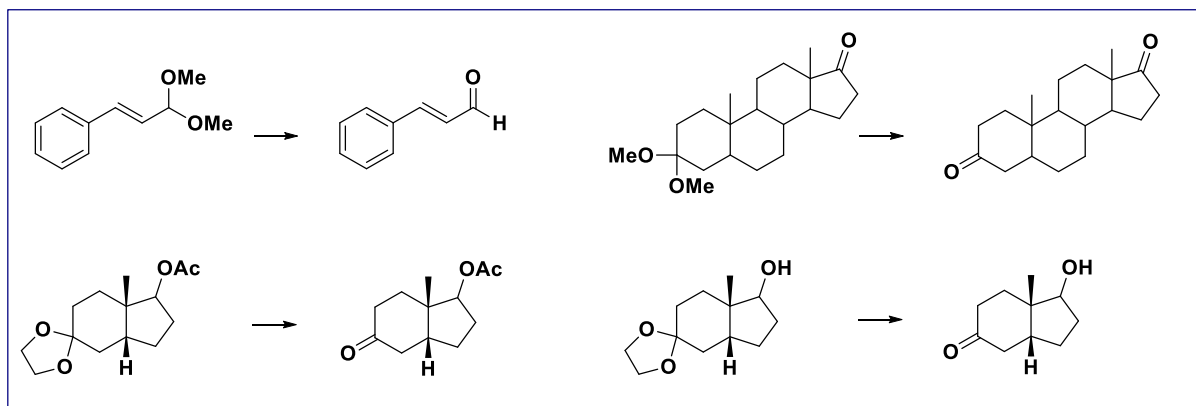
Esquema 12. Reacción de deshidrogenación de testosterona utilizando yodo.⁴³

Se ha descrito en la literatura una metodología quimioselectiva para la desprotección de grupos *O,O*-acetales y *O,O*-cetales acíclicos y cíclicos catalizada por yodo molecular (10% en mol) utilizando acetona como disolvente, obteniendo excelentes rendimientos en poco tiempo y en condiciones neutras.⁴⁶ Además de la desprotección de alcoholes catalizada por I_2 en MeOH o la desprotección del grupo isopropilideno terminal en CH_3CN (**Esquema 13**).⁴⁷⁻⁴⁸



Esquema 13. Reacciones catalizadas por I_2 en MeOH y CH_3CN .⁴⁷⁻⁴⁸

Una ventaja del uso de yodo es que los distintos grupos funcionales como dobles enlaces, grupo hidroxilo o grupo acetato que se encuentran presentes en la estructura de la molécula no sufren ninguna modificación (**Esquema 14**).



Esquema 14. Ejemplos de desprotección de acetales y cetales catalizada por yodo molecular en acetona.

4. JUSTIFICACIÓN

Los esteroides son moléculas lipofílicas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza como metabolitos secundarios, además de que poseen diversas funciones fisiológicas. Asimismo, sus derivados como los que presentan sistemas 4,6-dien-3-ona han sido objeto de estudio debido a sus actividades biológicas tales como: androgénica, progestogénica, inhibidores de las enzimas 5α -reductasa o aromatasa. Estas estructuras son muy interesantes en el área de la síntesis orgánica debido que a partir de ellas se pueden hacer modificaciones en su estructura para que posean un potencial biológico y ser utilizados como inhibidores enzimáticos en líneas celulares de cáncer.

5. HIPÓTESIS

Los esteroides con sistema 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona sintetizados a partir de la 5-pregnen-3 β -ol-20-ona y β -sitosterol presentarán actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de mama MCF-7.

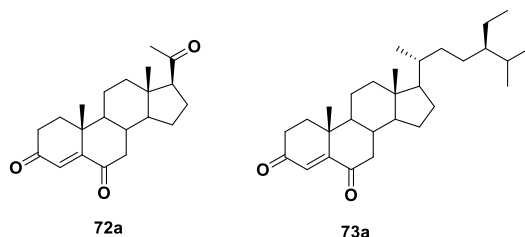
6. OBJETIVOS

Objetivo general

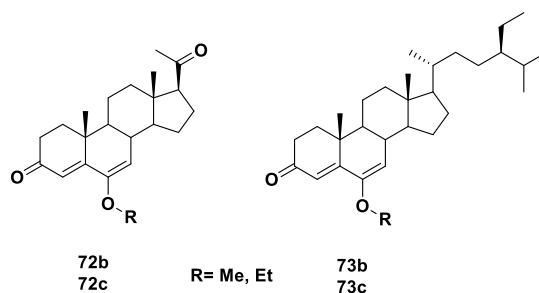
Sintetizar 4 derivados esteroidales con el sistema 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona y evaluar su capacidad citotóxica utilizando el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Estudiar la reactividad del sistema 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona con semicarbazida en medio básico.

Objetivos particulares

- 1) Oxidar los esteroides 5-pregnen-3 β -ol-20-ona (72) y β -sitosterol (73), utilizando el reactivo de Jones hacia los compuestos Δ^4 -3,6-dionas (72a y 73a).



- 2) Sintetizar los derivados $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona 72b, 72c y 73b, 73c a partir de las Δ^4 -3,6-dionas mediante tratamiento catalítico de I_2 y ROH a reflujo.



- 3) Caracterizar los productos mediante Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de masas.
- 4) Estudiar la reactividad del sistema 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona con semicarbazida en medio básico.

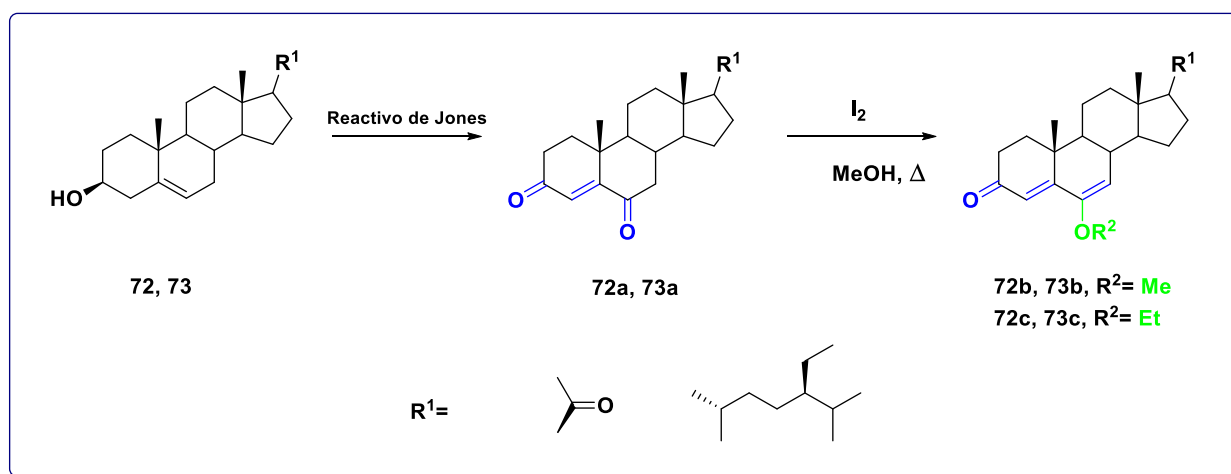
- 5) Efectuar la evaluación citotóxica frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7 de todos los productos por el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se mencionó en el capítulo de los antecedentes, se encuentran reportados en la literatura diversos trabajos sobre la síntesis de compuestos con el sistema 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -3-ona, sin embargo, todas las metodologías implican una serie de pasos o condiciones de reacción drásticas. En este trabajo se propuso sintetizar los derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -3-ona de dos familias de esteroides en dos pasos de reacción usando I_2 como catalizador.

La metodología empleada en este trabajo consistió en dos etapas: la primera, es en la síntesis de los compuestos derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -3-ona (**Esquema 15**) y la segunda etapa consistió en la evaluación citotóxica de dichos compuestos obtenidos por el método MTT.

La síntesis inició con la oxidación de los esteroides pregn-5-en-3 β -ol-20-ona (**72**) y β -sitosterol (**73**) con el reactivo de Jones para obtener los intermediarios 3,6-diona-4,6-dieno (**72a** y **73a**), la reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina y purificada por cromatografía en columna. Una vez obtenidos estos intermediarios se prosiguió a la segunda reacción que consistió en el uso de I_2 en MeOH o EtOH a reflujo según corresponda, así como su posterior purificación. Por último, tanto los intermediarios como los productos obtenidos se caracterizaron mediante RMN, IR y MS. Finalmente, se evaluó la actividad citotóxica de los productos frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7 por el método MTT.



Esquema 15. Síntesis general para la obtención de los derivados esteroidales 6-alcoxi-4,6-dien-3-ona.

7.1. Síntesis para la obtención de dicetonas (73a y 74a)

Como primer paso, utilizando **72** y **73** como material de partida se llevó a cabo la reacción de oxidación con el reactivo de Jones 2.5 mL, para obtener las endionas correspondientes en un tiempo de 3 h, sin embargo, cuando se realizó una CCF se observó que la materia prima no se había consumido en su totalidad, por ello se añadieron 2 mL más del reactivo de Jones, dejándolo en agitación por un total de 5 h. La CCF mostró además otra mancha más tenue que correspondía al subproducto Δ^4 -3-ona. En esta reacción, el tiempo es un factor importante debido a que, entre más tiempo de reacción, mayor es el rendimiento obtenido de la endiona. Cabe destacar que el esteroide que se oxidó más rápidamente fue β -sitosterol, obteniendo un mayor rendimiento de la endiona **74a** (Tabla 1). La estructura de cada endiona obtenida se elucidó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , así como en experimentos en 2D (COSY, HMBC).

Tabla 1. Rendimientos de las endionas 72a y 73a.			
Materia prima	Reactivo de Jones (mL)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
Pregn-5-en-3 β -ol-20 (72)	4.5	5	65
β -sitosterol (73)	4.5	5	80

7.1.1. Análisis del espectro de ^1H y ^{13}C del Pren-4-en-3,6,20-triona (**72a**)

En la **Figura 10**, se muestra el espectro de ^1H de la dicetona **72a**, destaca una señal que integra para un protón en 6.16 ppm que corresponde al protón vinílico H-4. En 2.14 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones y que corresponden a los protones α de C-21; a campos altos (0.69 y 1.18 ppm) se observan dos señales simples que integran para tres protones cada una y que corresponden a los metilos 18, 19, respectivamente.

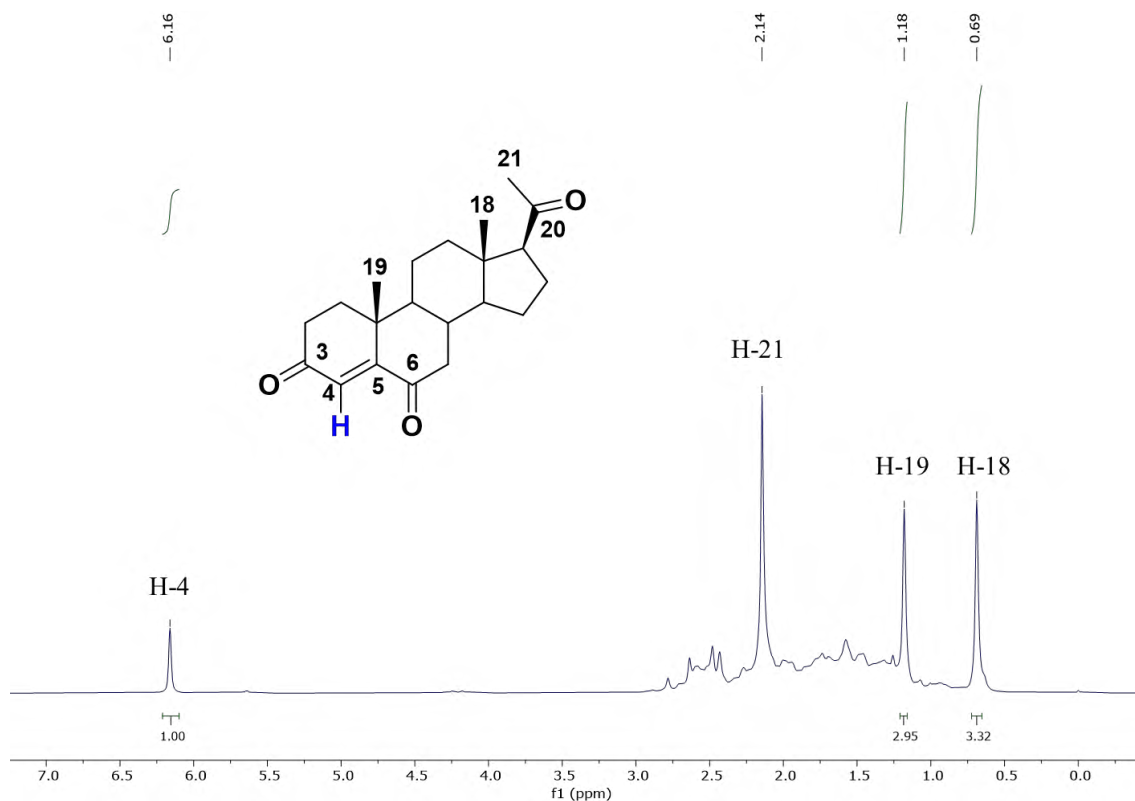


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H del compuesto Pren-4-en-3,6,20-triona (**72a**).

En el espectro de ^{13}C (**Figura 11**) se observan las 21 señales que se esperan para el compuesto **72a**. En 208.8 ppm se encuentra la señal para el carbonilo de cetona en C-20, mientras que en 201.6 y 199.2 ppm aparecen las señales de los carbonilos de la endiona C-3 y C-6, respectivamente. En 160.5 y 125.6 ppm se encuentran las señales para los dos carbonos vinílicos C-5 y C-4, respectivamente. Todas las señales se asignaron con ayuda de experimentos bidimensionales (HSQC y HMBC), cabe destacar que el número de señales y los desplazamientos químicos son consistentes con lo reportado en la literatura.⁴⁹

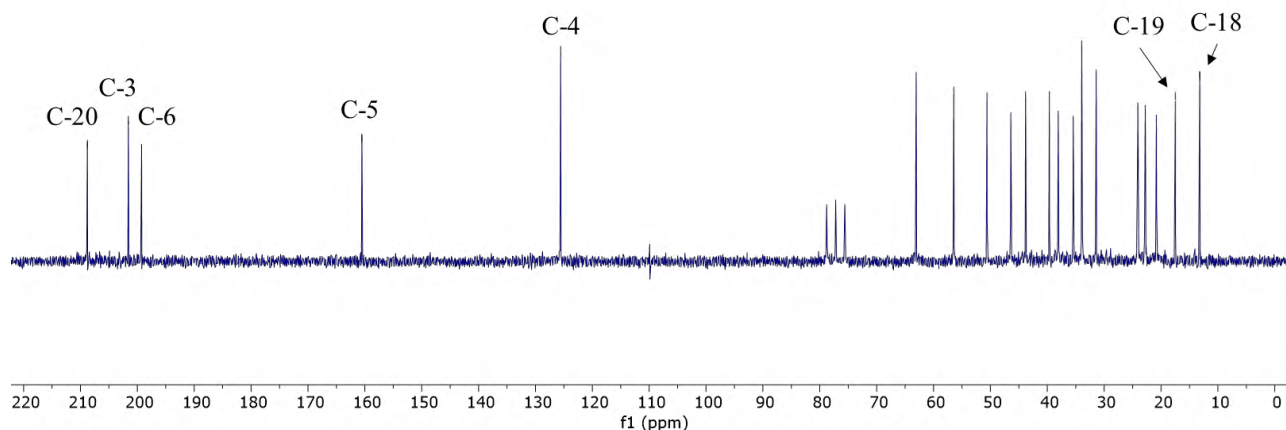


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto Pren-4-en-3,6,20-triona (**72a**).

De igual manera, se llevó a cabo la caracterización de la endiona **73a**. En la **Tabla 2** se muestran los desplazamientos químicos característicos de ^1H y ^{13}C de las dos endionas sintetizadas, **72a** y **73a**. Se destacan los patrones de desplazamiento para el sistema conjugado $\text{CO-C}=\text{C-CO}$.

Se puede observar que el patrón de desplazamiento químico del protón H-4 en los derivados **72a** y **73a** se encuentra entre 6.16 y 6.17 ppm. Mientras que para los protones de los grupos metilos 18 y 19, el rango de desplazamiento químico se encuentra entre 0.73-1.18 ppm. Los desplazamientos químicos de los carbonos del grupo carbonilo en C-3 se encuentran entre los valores de 201.6 y 199.4 ppm, mientras que para el grupo carbonilo presente en C-6 se observaron entre valores cercanos a 199.2 y 202.2 ppm. Las señales asignadas a los carbonos vinílicos se observaron entre valores de desplazamientos químicos para el carbono en C-4 (cercanos a 125 ppm), en C-5 (cercanos a 160 ppm), respectivamente. Asimismo, para el caso de la endiona **72a** que presenta un grupo carbonilo de cetona en C-20, su desplazamiento químico se encuentra a 208.8 ppm. Los datos observados son consistentes con los descritos en la literatura.⁵⁰

Tabla 2. Desplazamientos químicos δ (ppm) seleccionados para las endionas 72a y 73b.					
	72a	73a		72a	73a
^1H	δ (ppm)	δ (ppm)	^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm)
H-4	6.16	6.17	C-3	201.6	199.4
H-18	0.69	0.73	C-4	125.6	125.4
H-19	1.18	1.17	C-5	160.5	161.0
H-21	2.14	0.95	C-6	199.2	202.2
H-27		0.86	C-20	208.8	

7.1.2 Análisis de la caracterización de Pren-4-en-3,6,20-triona (72a) de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

En la **Figura 12** se muestra el espectro de IR en el cual se muestran las bandas características correspondiente al compuesto **72a**. A 1700 cm^{-1} se observa la banda de vibración de tensión del enlace C=O que corresponde a C-20, mientras que a 1681 cm^{-1} se observa la banda de tensión del enlace carbonilo insaturado (C=O α , β , γ , δ) en C-3, y en 1658 cm^{-1} se observa la banda de vibración de tensión del grupo C=O en C-3. De igual manera, en 1265 cm^{-1} se aprecia la banda de flexión que corresponde al enlace carbonilo-carbono (C-CO-). Asimismo, se observan la banda de vibración de tensión del enlace C=C en 1585 cm^{-1} , en 731 y 701 cm^{-1} se observa la banda de flexión fuera del plano (Out of plane) perteneciente al enlace C=C-H. Finalmente en 3056 cm^{-1} se observa la banda de tensión para los enlaces C(sp^2)-H y por debajo de 3000 cm^{-1} se observan las bandas de vibraciones de tensión de los enlaces C-H.

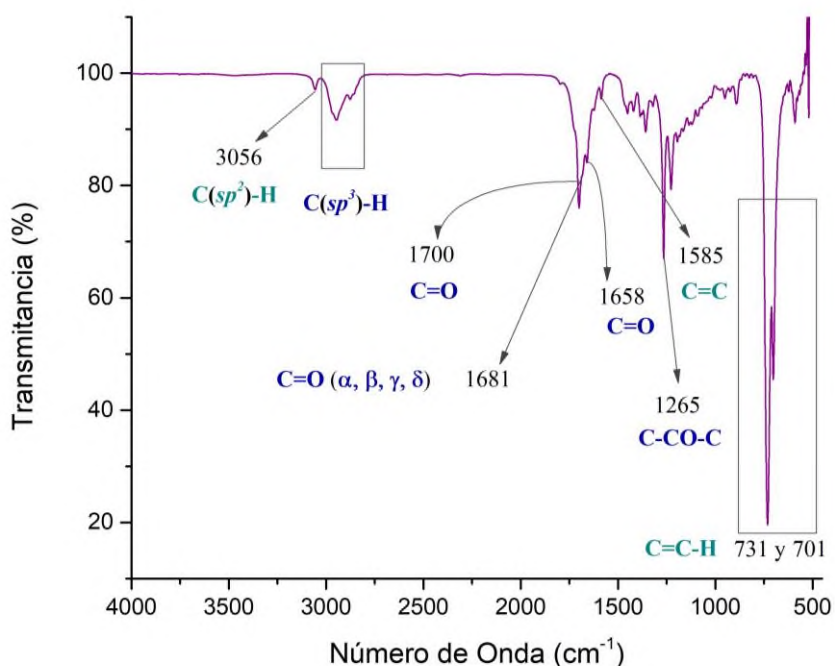
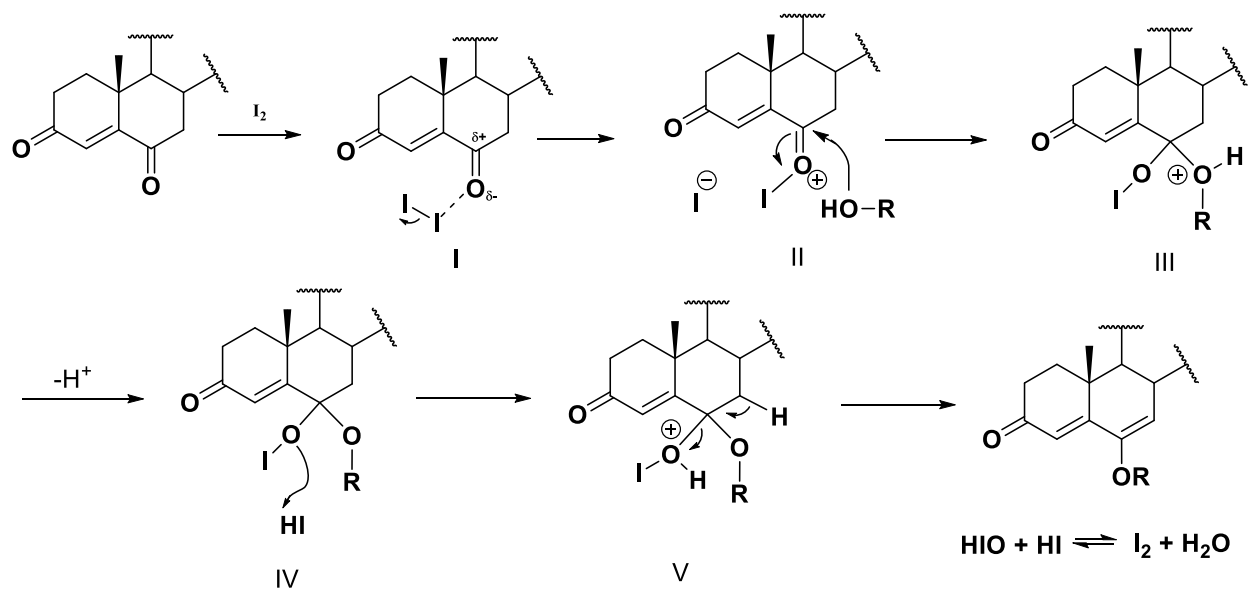


Figura 12. Espectro de IR del compuesto **72a**.

7.2. Síntesis para la obtención de los enol éteres (**72b**, **c** y **73b**, **c**)

Las endionas obtenidas **72a** y **73a** se trataron con I_2 (10 mg) en MeOH para dar los derivados 6-metoxi (**72b** y **73b**) y en EtOH, para obtener los análogos 6-etoxi (**72c** y **73c**) por un tiempo de reacción de 5 h para **72b**, mientras que para **73b** de 6 h, ambos a reflujo. La reacción se monitoreó cada hora por cromatografía en capa fina, observándose en la lámpara UV (254 nm y a 365 nm) y revelándolas en una solución de H_2SO_4 al 50%. El producto se observa muy bien a una longitud de 365 nm debido a la conjugación ceto enol éter, mientras que la diona correspondiente no revela a esa longitud. Pasado un cierto tiempo se volvió a realizar una segunda CCF y se observó que la materia prima no se había consumido en su totalidad, por lo que se eligió en agregar 12 mg más de yodo. Pasado el tiempo de reacción, se notó que la endiona no se consumió en su totalidad, por lo que al purificar el producto por cromatografía en columna se recuperó la materia prima correspondiente. Por último, para corroborar que se obtuvo los derivados enoles éteres objetivos se analizó por RMN de 1H y ^{13}C .

Con respecto al mecanismo de reacción, algunas reacciones catalizadas por I_2 se explican con base en la habilidad que tiene el enlace I-I de interactuar con bases de Lewis⁵¹ debido a la presencia de una región electropositiva. En este caso, la acción catalítica del yodo se puede atribuir a un proceso de complejación con el oxígeno del grupo carbonilo en el C-6 (**I**, **Esquema 16**). Como resultado, dicho carbono se vuelve un sitio más electrofílico y susceptible al ataque nucleofílico por ROH (**II**). Una transferencia de protón en los intermediarios **III** y **IV** generan el intermediario **V**, el cual puede sufrir una eliminación del protón β para liberar el grupo saliente (HIO).



Esquema 16. Mecanismo hipotético para la transformación de los esteroides $\Delta^{4,6}$ -3-ona hacia los derivados 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -3-ona con yodo en ROH.

7.2.1 Análisis del espectro de 1H y ^{13}C del 6-metoxi-4,6-dieno-3,20-diona (72b)

En la **Figura 13** se muestra el espectro de 1H del enol éter **72b**, destacan dos señales que integran para un protón en 6.26 y 5.15 ppm y que corresponden a los protones vinílicos H-4 y H-7, respectivamente. En 3.59 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones y que corresponde a los protones base de oxígeno del grupo metoxi (MeO-) en C-6; a campos altos (0.7, 1.1 y 2.4 ppm) se observan tres singuletes que corresponden a los metilos 18, 19, 21.

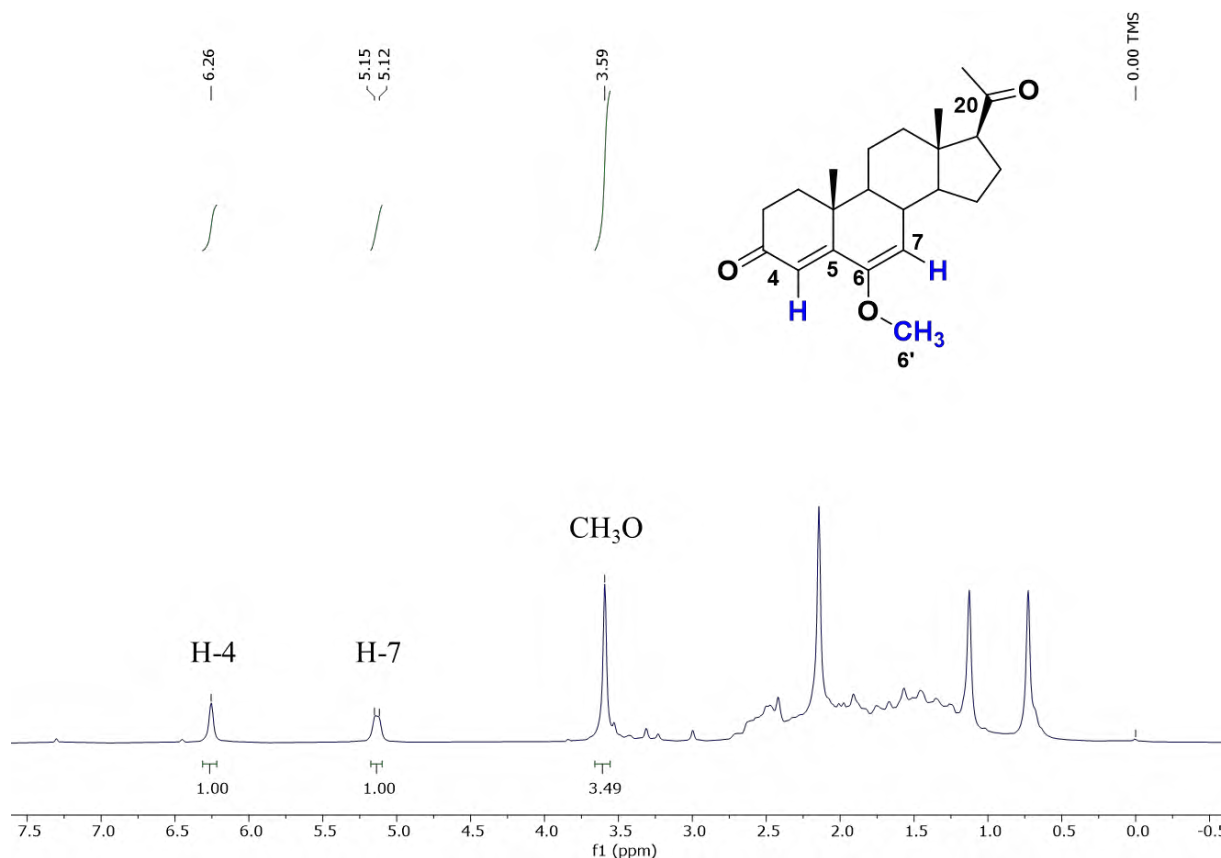


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **72b**.

En el espectro de ^{13}C (**Figura 14**) se observan las 22 señales que se esperan para el compuesto **72b**. En 209.1 ppm se destaca la señal para el grupo carbonilo de cetona en C-20, mientras que en 199.6 ppm se observa una señal para el carbonilo de cetona insaturada en C-3. En 158.9, 150.3, 119.7 y 108.2 ppm se observan las señales para los cuatros carbonos vinílicos presentes en C-5, C-6, C-4 y C-7, respectivamente. Todas las señales se asignaron con ayuda de experimentos bidimensionales (HSQC y HMBC).

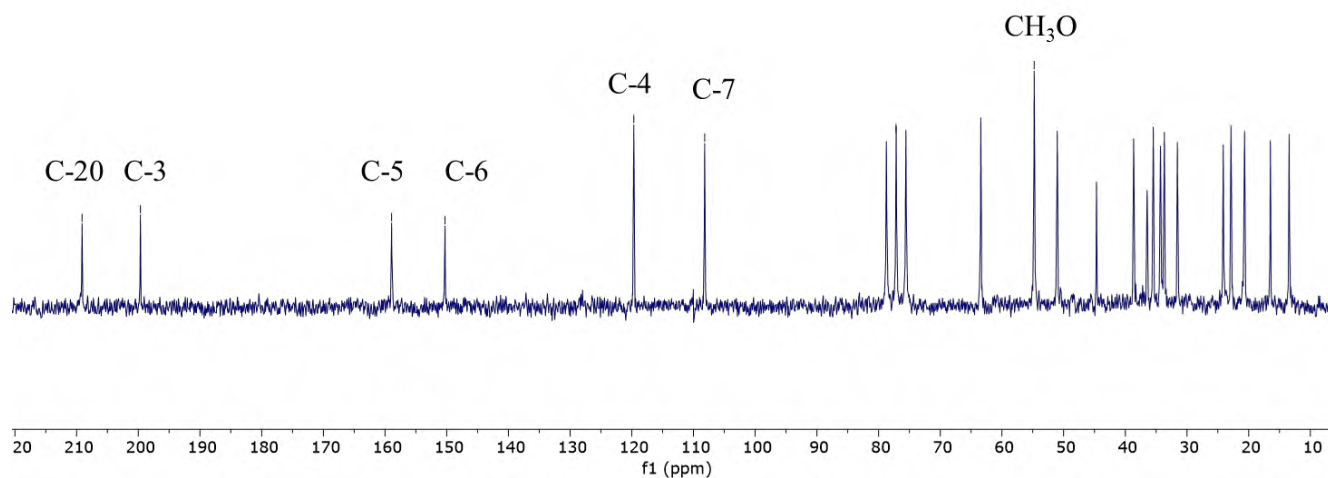


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **72b**.

7.2.2 Análisis de la caracterización de 6-metoxi-4,6-dieno-3,20-diona (**72b**) de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

En el espectro de IR (**Figura 15**) que corresponde al compuesto **72b**, se observa la banda de vibración de tensión a 1699 cm^{-1} que pertenece grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) en C-20, mientras que en 1655 cm^{-1} se observa la banda de tensión del carbonilo insaturado ($\text{C}=\text{O}$ α , β , γ , δ) en C-3. De igual manera en 1584 cm^{-1} se observa la banda de tensión correspondiente a los carbonos vinílicos $\text{C}=\text{C}$. En la región espectral de 1225 cm^{-1} se observa la banda de tensión para enlace C-O y en un rango menor de 3000 cm^{-1} , se observa la banda de tensión correspondiente al enlace C-H presente en la molécula.

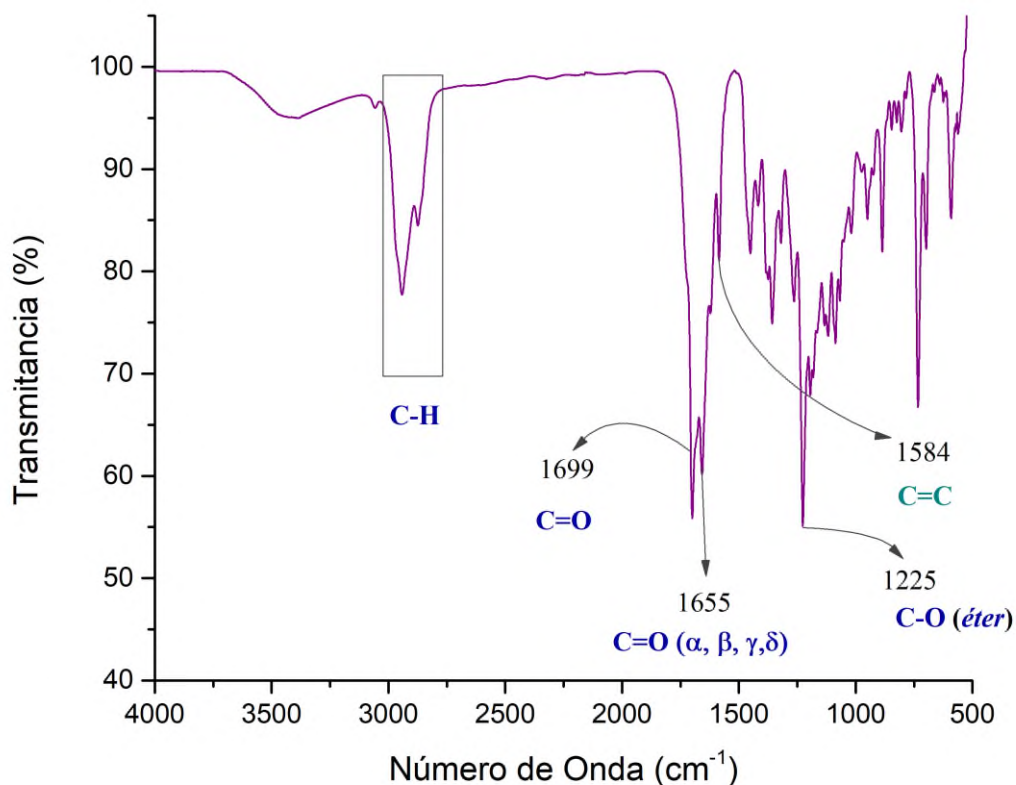


Figura 15. Espectro de IR del compuesto **72b**.

7.2.3 Análisis del espectro de ^1H y ^{13}C del 6-etoxi-4,6-dieno-3,20-diona (**72c**)

De igual manera se analizaron los espectros de ^1H y ^{13}C del compuesto **72c**, en el cual se observaron señales características que corresponden con la estructura propuesta. En la **Figura 16** se muestra el espectro que corresponde al derivado 6-etoxi-4,6-dien-3,20-diona, en el cual se puede observar una señal simple a 6.31 ppm que corresponde al protón vinílico H-4 y en 5.12 ppm destaca una señal doble que pertenece al protón vinílico H-7. En 3.74 ppm, se observó una señal cuádruple que corresponde a los protones bases de oxígeno del grupo etoxi ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), mientras que a campos altos (1.32 ppm) se observó un triplete que corresponde a los protones del metilo del mismo grupo.

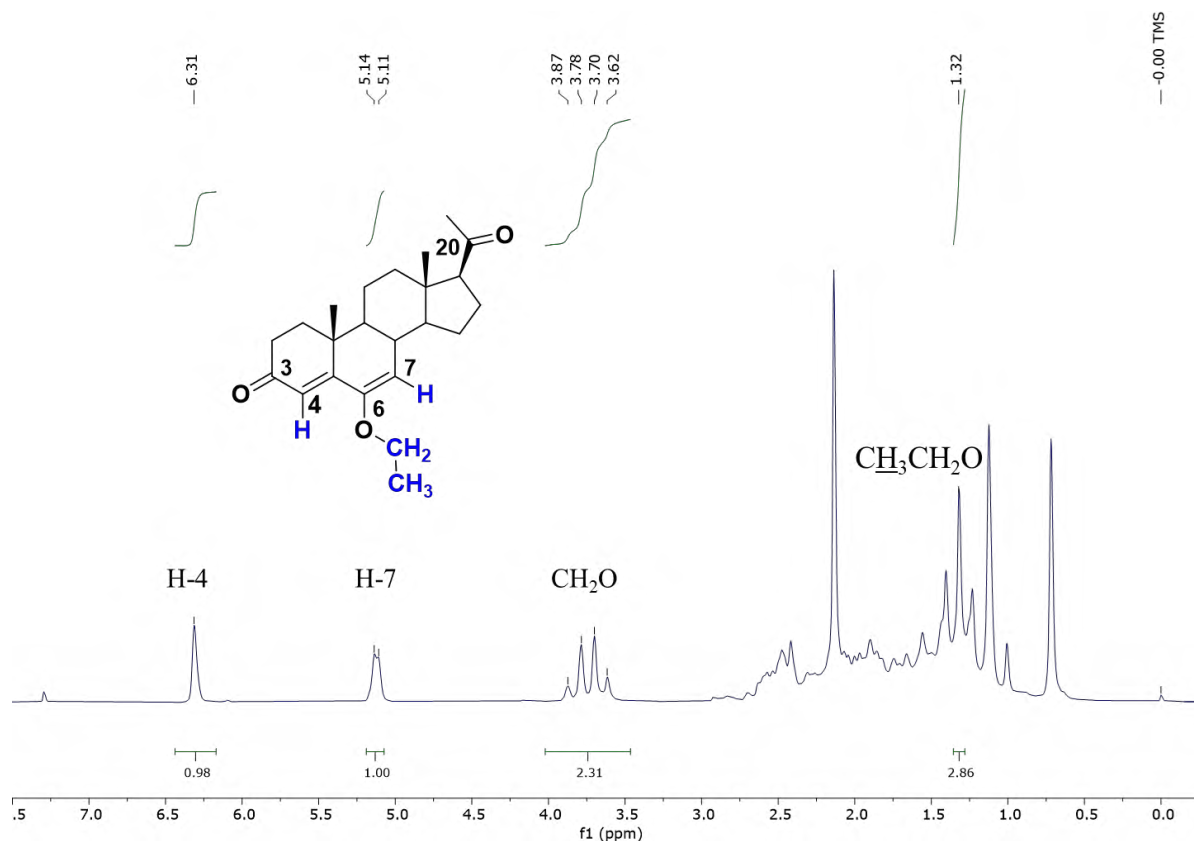


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **72c**.

En el espectro de ^{13}C (**Figura 17**), en 209.0 y 199.7 ppm se observaron las señales asignadas a los grupos carbonilos de cetona en C-20 y C-3, respectivamente. En un rango de 159.1-108.9 ppm se observaron las señales que corresponden a los carbonos vinílicos en C-5, C-6, C-4 y C-7. Adicionalmente, se observó en 62.9 ppm una señal que corresponde a la fracción base de oxígeno (CH_2O), mientras que en 14.4 ppm se confirmó la señal perteneciente al grupo metilo base de oxígeno ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) presente en C-6. Todas las señales se asignaron con ayuda de los experimentos bidimensionales (HSQC y HMBC).

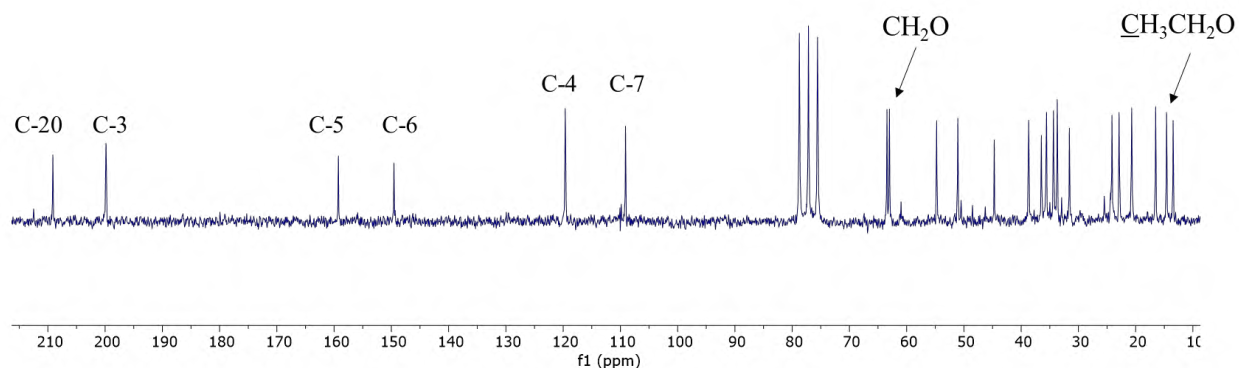
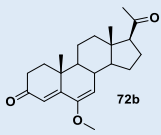
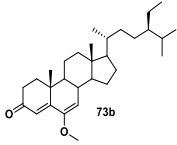
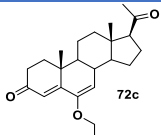
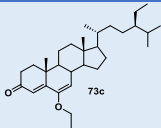


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **72c**.

En la **Tabla 3** se resumen los desplazamientos químicos seleccionados de ^1H y ^{13}C de las dos familias de enoles éteres sintetizados. Se puede observar que el patrón de desplazamiento químico del protón H-4 en los derivados metoxi y etoxi está entre 6.24-6.31 ppm, mientras que para el protón H-7 los desplazamientos químicos se encuentran entre 5.12-5.17 ppm. De igual manera se pueden observar los desplazamientos químicos de los protones base de oxígeno ($6'\text{CH}_3\text{O}$), en este caso en los derivados **72b** y **73b**, se encuentran entre 3.58 ppm y 3.59 ppm, respectivamente. Por otro lado, para los derivados etoxi, los desplazamientos químicos de los protones del grupo CH_2O para ambos compuestos se observó a 3.74 ppm, en el caso de los protones del metilo del grupo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ aparecieron a campos altos a 1.31 ppm para **73c** y para el compuesto **72c** a 1.32 ppm. Las señales de los carbonos correspondientes al grupo cetona en C-3 de los derivados metoxi y etoxi se encuentran cercanos a 199 ppm. Las señales asignadas a los carbonos vinílicos se observaron entre valores de desplazamientos químicos para el carbono en C-4 (entre 119.2-119.5 ppm), en C-5 (158.3-159.6 ppm), en C-6 (149.2-150.0) y en C-7 (108.0-110.0 ppm), respectivamente. También se observó las señales correspondientes a los grupos metilos base de oxígeno de los derivados metoxi (**72b** y **73b**) que ambos desplazamientos químicos están cercanos a 54.6 ppm. Mientras para los derivados etoxi las señales asignadas a los grupos CH_2O se observan cercano a 62.8 ppm, y para el grupo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ alrededor de 14 ppm.

Tabla 3. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C δ (ppm) seleccionados para los derivados metoxi (72b, 73b) y etoxi (72c, 73c).										
	^1H					^{13}C				
Derivados metoxi	H-4	H-7	6' CH_3O	H-18	H-19	C-3	C-4	C-5	C-6	C-6' OCH_3
	6.25	5.14	3.59	0.72	1.12	199.5	119.5	158.8	150.1	54.6
	6.24	5.12	3.58	0.77	1.12	199.7	119.3	159.3	150.0	54.6
Derivados etoxi	H-4	H-7	CH_2O	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$	C-3	C-4	C-5	C-6	6' CH_2O	6'' $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$
	6.31	5.12	3.74	1.32	199.7	119.5	159.1	149.4	62.9	14.4
	6.31	5.17	3.74	1.31	199.9	119.2	159.6	149.2	62.8	14.5

7.2.4 Análisis de la caracterización de 72c de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

En la **Figura 18** se muestra el espectro de IR donde se observan las bandas de absorción características que corresponde al compuesto **72c**. En la región de 1701 cm^{-1} se observa la banda de vibración de tensión del enlace de carbonilo de cetona $\text{C}=\text{O}$ en C-3, mientras que, en 1658 cm^{-1} se observa una señal de vibración de tensión para el carbonilo insaturado ($\text{C}=\text{O}$ α , β , γ , δ).

Igualmente, se observa en 1224 cm^{-1} la banda de vibración de estiramiento que pertenece al enlace C-O. En 1584 cm^{-1} se observa la banda de tensión que corresponde al enlace C=C, y en 2943 cm^{-1} se observan una banda de tensión del enlace $C(sp^3)\text{-H}$.

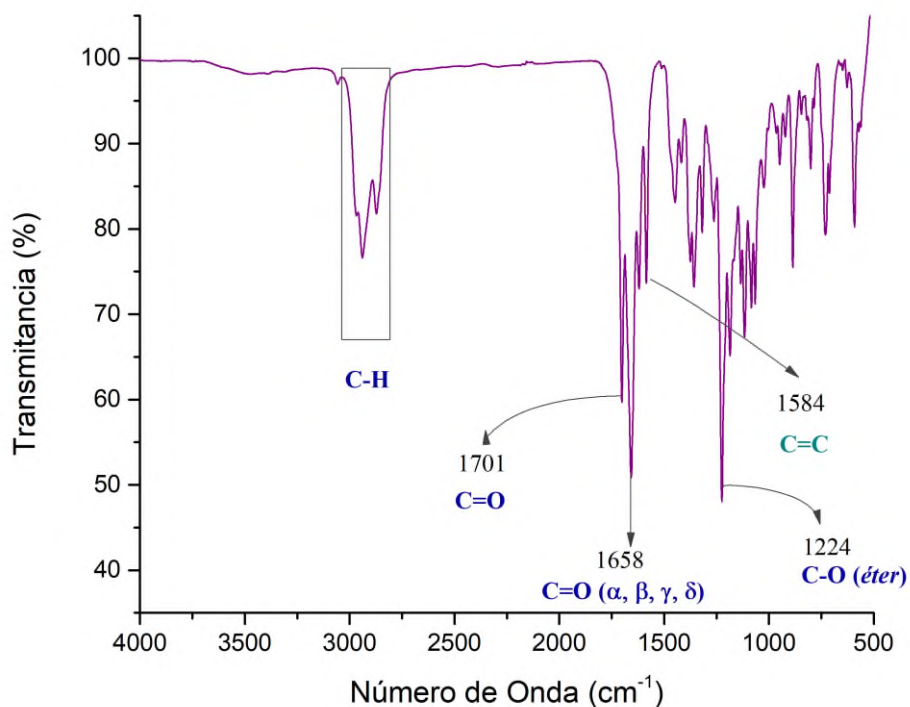
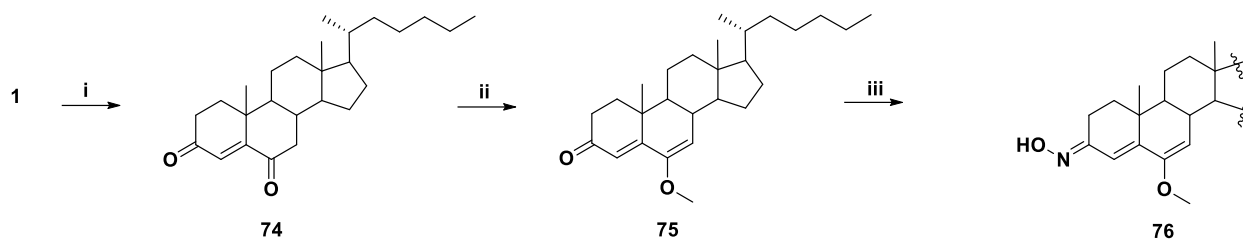


Figura 18. Espectro de IR del compuesto **72c**.

7.3. Reactividad de los derivados de enol éteres

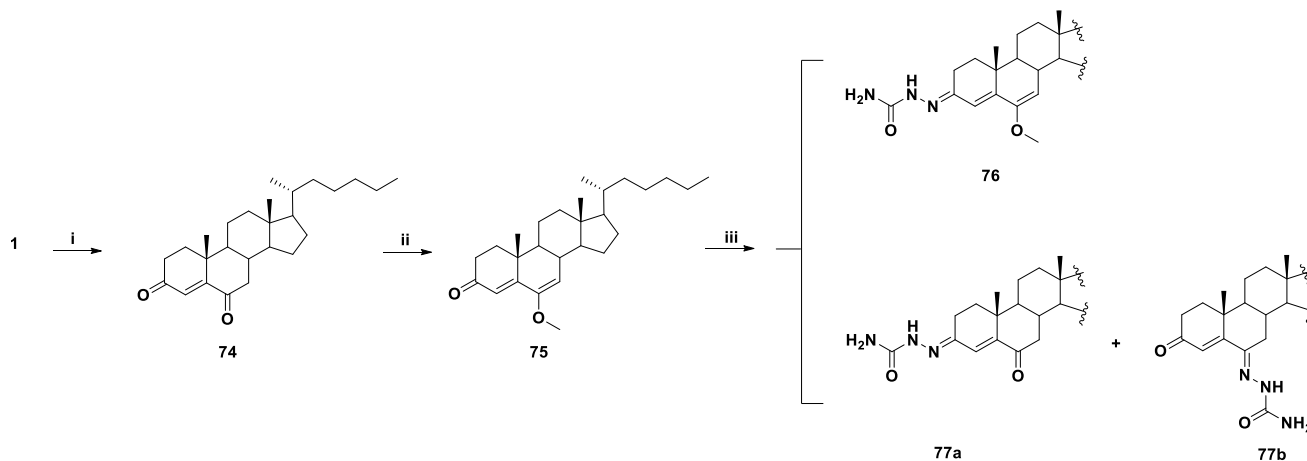
Para evaluar la estabilidad de los enol éteres, y considerando que, en un trabajo previo hecho por nuestro equipo de investigación,⁵² en el cual el derivado 6-metoxicolesta-4,6-dien-3-ona (**75**) se hizo reaccionar con hidroxilamina para obtener la correspondiente oxima (**76**) (**Esquema 17**); se planteó hacer reaccionar **75** con semicarbazida para generar la semicarbazona correspondiente en el C-3.



i) Reactivo de Jones ii) $I_2/MeOH$ iii) $NH_2OH \cdot HCl$, $EtOH$, $AcONa$.

Esquema 17. Trabajo previo, reacción del 6-metoxicolesta-4,6-dien-3-ona (**76**) con hidroxilamina.

Cabe mencionar que se tomó como modelo al colesterol debido a que es una materia prima accesible, y no posee otro grupo funcional que interfiera en la reacción de condensación. Una vez transformado el colesterol (**1**) en el enol-éter **75**, ésta se hizo reaccionar con clorhidrato de semicarbazida y acetato de sodio a reflujo de etanol.



i) Reactivo de Jones ii) $I_2/MeOH$ iii) $H_2NNHCNH_2 \cdot HCl$, $EtOH$, $AcONa$.

Esquema 18. Ruta de síntesis para obtener el derivado imino.

Con esta reacción se esperaba obtener el compuesto **76** sin embargo, se obtuvo el compuesto **77**, cuya formación se puede explicar considerando que en el medio de la reacción ocurrió una hidrólisis favoreciendo la transformación enol-éter/ceto regenerando el derivado **74**, el cual sufrió una condensación en C-3 y en C-6, obteniendo una mezcla de ambos isómeros (**77a** y **77b**) (**Esquema 18**).

En la **Figura 19** se muestra una expansión del espectro de ^{13}C que se obtuvo para dicha mezcla, sin embargo, no fue posible separar los compuestos puros. En el espectro se puede observar una señal intensa en 201.4 ppm que corresponde a una señal del grupo carbonilo de cetona, lo que descartó que el grupo metoxi siguiera presente en la estructura. Mientras que en 158.0 ppm se observaron dos picos característicos del carbonilo de fracción de la semicarbazida; y entre 149.7 a 105.0 ppm se observan señales que corresponde a los carbonos vinílicos y a las señales del enlace C=N.

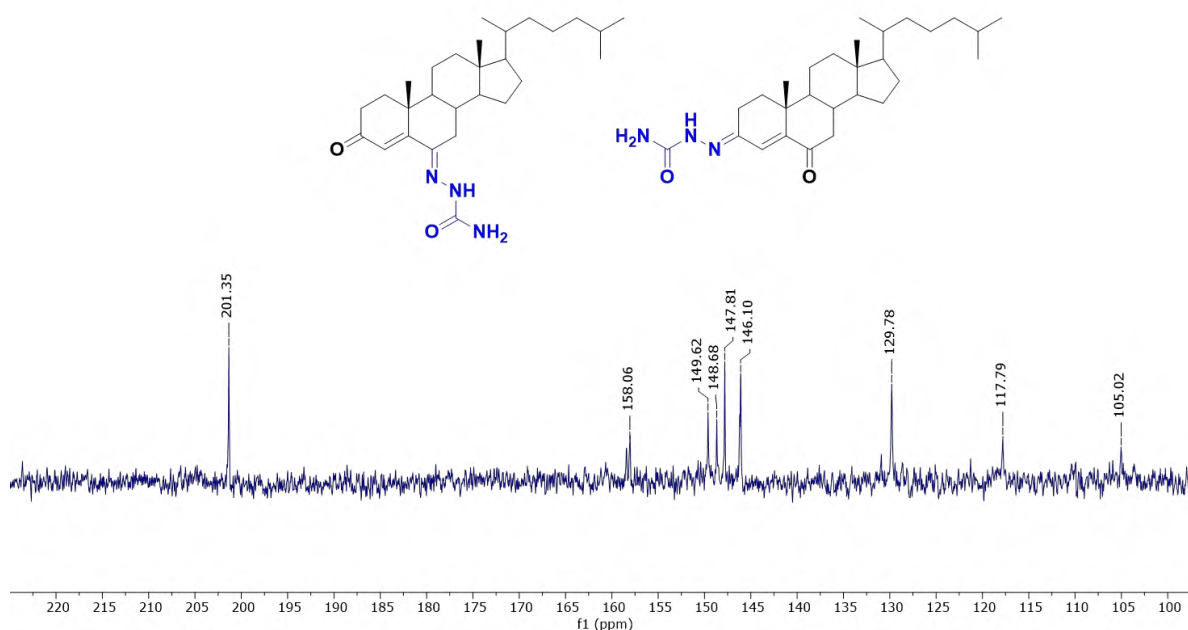
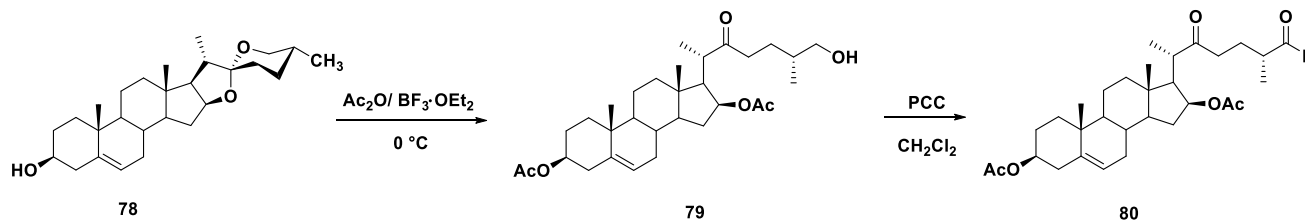


Figura 19. Espectro de ^{13}C del compuesto **79**.

7.4. Reacción de condensación entre un derivado de diosgenina 22,26-dioxocolestánico y *p*-anisidina

Dado que no se formó el iminoesteroide en el C-3, se intentó formar un imino esteroide en el C-26 mediante la reacción de condensación de un aldehído derivado de diosgenina y la *p*-anisidina. Los aldehídos, al poseer en su estructura un átomo pequeño de hidrógeno, el carbono del grupo carbonilo tiene una carga ligeramente más positiva que las cetonas provocando que el nucleófilo,

que en este caso se utilizó el grupo amino de la *p*-anisidina, no tenga impedimento y pueda atacar más efectivamente al grupo carbonilo. Para llevar a cabo esta reacción, se tomó como materia prima a la diosgenina (**78**), a la cual se le realizó una apertura de anillo en medio ácido para formar el derivado 26-hidroxi-22-oxocolestánico **79**. Posteriormente, se efectuó una oxidación del grupo alcohol de **79** con un agente oxidante suave para acceder al aldehído **80** (**Esquema 19**).

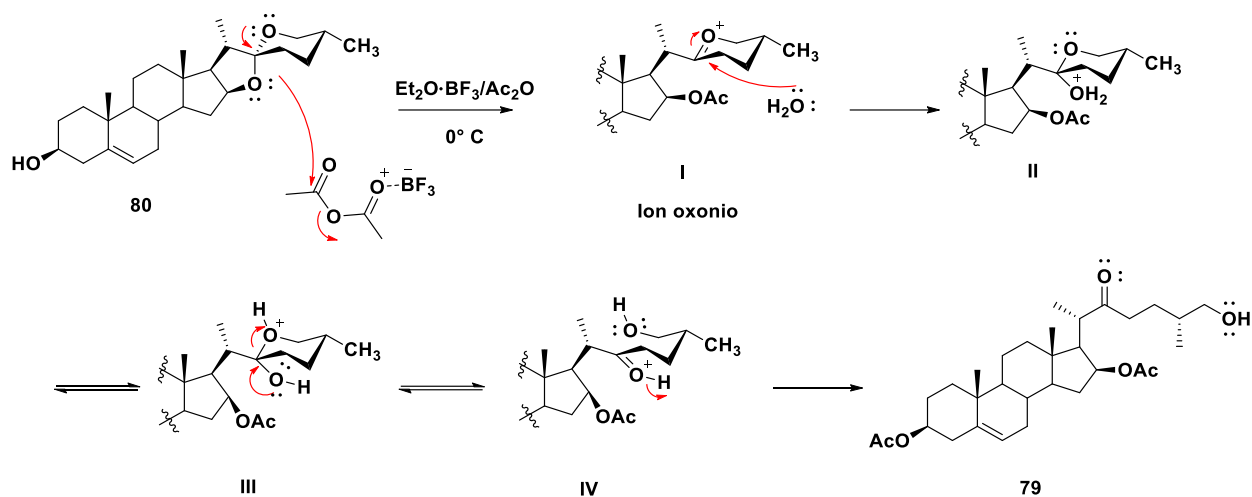


Esquema 19. Reacción general para la obtención del compuesto **80**.

7.4.1. Apertura de los anillos E y F de la diosgenina

La reacción de apertura de la diosgenina se llevó a cabo usando el $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ como ácido de Lewis, en presencia de anhídrido acético a 0°C .⁵³ Es importante mantener la temperatura en esta reacción, ya que si se eleva se generan otros productos indeseables.

Bajo estas condiciones de reacción, uno de los grupos carbonilos del Ac_2O es activado por el ácido de Lewis (**Esquema 20**), mientras que el otro grupo carbonilo es atacado por el par electrónico del átomo de oxígeno presente en el anillo E, este ataque es promovido a la vez por el par electrónico del átomo de oxígeno del anillo tetrahidropiránico, formando como intermediario el ion oxonio **I**. Posteriormente, **I** sufre el ataque de una molécula de agua sobre el C-22 formando el intermediario **II**; así el átomo de oxígeno tetrahidropiránico recupera su par electrónico. A continuación, ocurre una desprotonación de **II** seguido de la protonación del átomo de oxígeno tetrahidropiránico que conduce a la formación del intermediario hemiacetalico **III**. Después la apertura del anillo F de este intermediario se obtiene mediante la participación de un par electrónico del átomo de oxígeno del alcohol para generar una cetona protonada **IV**, cuya desprotonación conduce al compuesto 22-oxo-26-hidroxilado (**79**).



Esquema 20. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto **79**.

7.4.1.1. Análisis del espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (**79**)

En el espectro de RMN de ^1H para el compuesto **79** (**Figura 20**), en 5.34 ppm se observa la señal del protón vinílico H-6, como una señal doble ancha que integra para un protón en C-6. En 4.96 y 4.57 ppm se encuentran señales múltiples que pertenecen a los protones C-3 y C-16, respectivamente. En 3.41 ppm se observa una señal doble debido al acoplamiento con el protón de H-25 ($J = 6.0\text{ Hz}$). Mientras que a campos altos (2.02 y 1.96 ppm) se observan los protones de los metilos que pertenecen a los grupos acetatos en las posiciones C-3 y C-16, respectivamente.

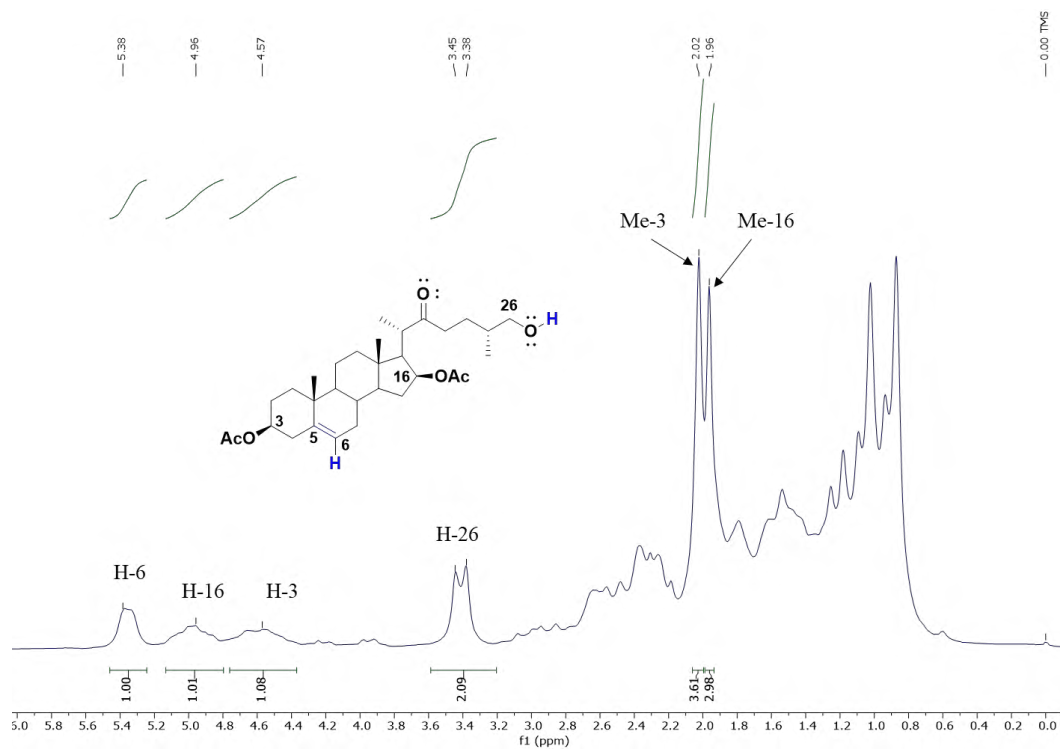


Figura 20. Espectro de ^1H de RMN del compuesto **79**.

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **79** (**Figura 21**), en 213.6 ppm se observa la señal característica al carbono de cetona en C-22, mientras que la señal de los carbonilos de los grupos acetatos en C-3 y C-16, se distinguen en 170.4 y 169.8 ppm, respectivamente. Asimismo, en 139.6 y 122.2 ppm se observan las señales de los carbonos vinílicos presentes en C-5 y C-6, respectivamente. Cabe destacar que el número de señales y los desplazamientos químicos son consistentes con lo reportado en la literatura.⁵³

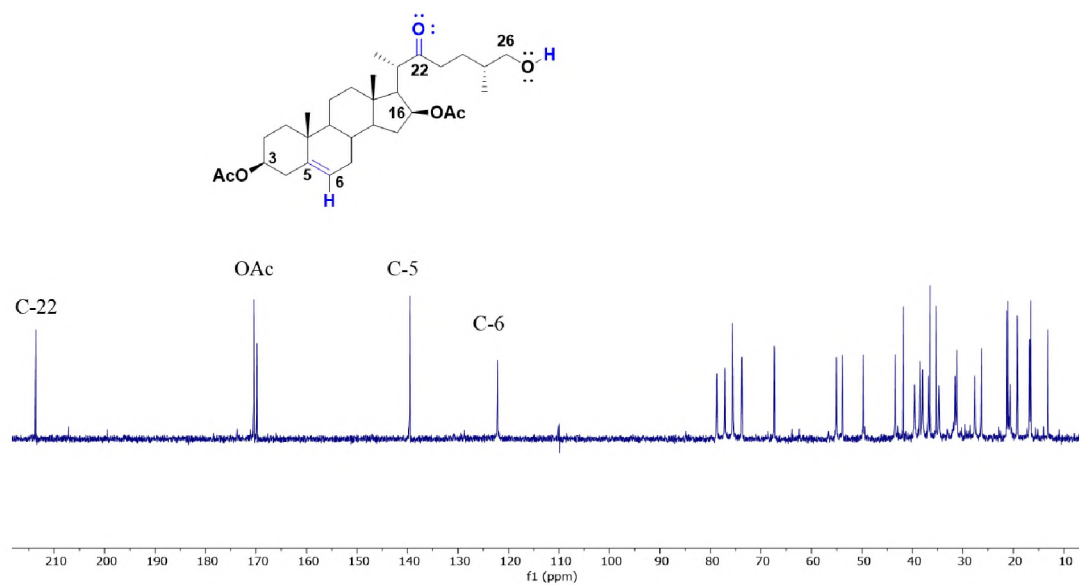


Figura 21. Espectro de ^{13}C de RMN del compuesto **79**.

7.4.1.2. Análisis de la caracterización de 79 de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

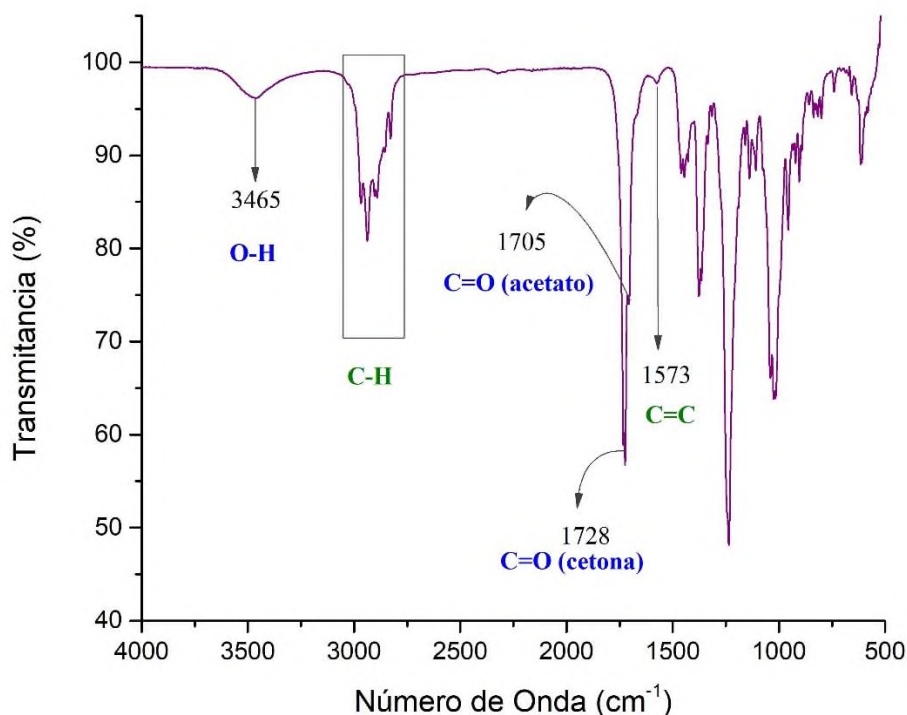
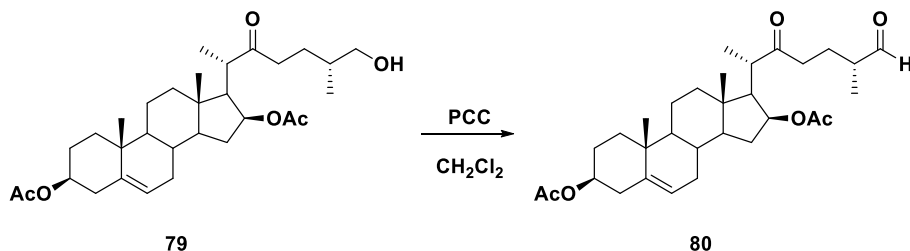


Figura 22. Espectro de IR del compuesto **79**.

En la **Figura 22** se muestra el espectro de IR donde se observan las bandas de absorción características correspondientes al compuesto **79**. En la región de 3465 cm^{-1} se observa la banda de tensión ancha que corresponde al enlace O-H, en la región de 2928 cm^{-1} se observa la banda de tensión del enlace C-H. Asimismo, se observa que en la región de 1705 cm^{-1} aparece la banda de vibración de tensión del enlace de carbonilo (C=O) de los grupos acetatos presentes en C3 y C-16, respectivamente. Mientras que en 1728 cm^{-1} se observa una señal de vibración de tensión que corresponde al carbonilo de cetona (C=O) en C-22. Igualmente, se observa en 1573 cm^{-1} la banda de tensión que corresponde al enlace C=C.

7.4.2. Oxidación del diacetato de 25(R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (79) con PCC

Una vez obtenido el derivado **79**, se prosiguió a la oxidación del grupo alcohol presente en C-26 con PCC (**Esquema 21**) para generar el correspondiente aldehído (**80**).



Esquema 21. Síntesis para la obtención del compuesto **80**.

7.4.2.1. Análisis del espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del diacetato de (25R)-22,26-dioxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (**80**)

En la **Figura 23** se muestra el espectro de ^1H del 26-aldehído (**80**), destaca una señal doble que integra para un protón en 9.6 ppm que corresponde al protón del aldehído en C-26. En 5.3 ppm se observa una señal doble que corresponde al protón vinílico H-6. En un rango de 5.15-4.35 ppm, se observan un paquete de señales traslapadas que corresponden a los protones C-3 y C-16, respectivamente. A campos altos (2.03 y 1.96 ppm) destacan dos señales simples que integran para tres protones cada una y que corresponden a los metilos de los grupos acetatos en las posiciones C-3 y C-16, respectivamente.

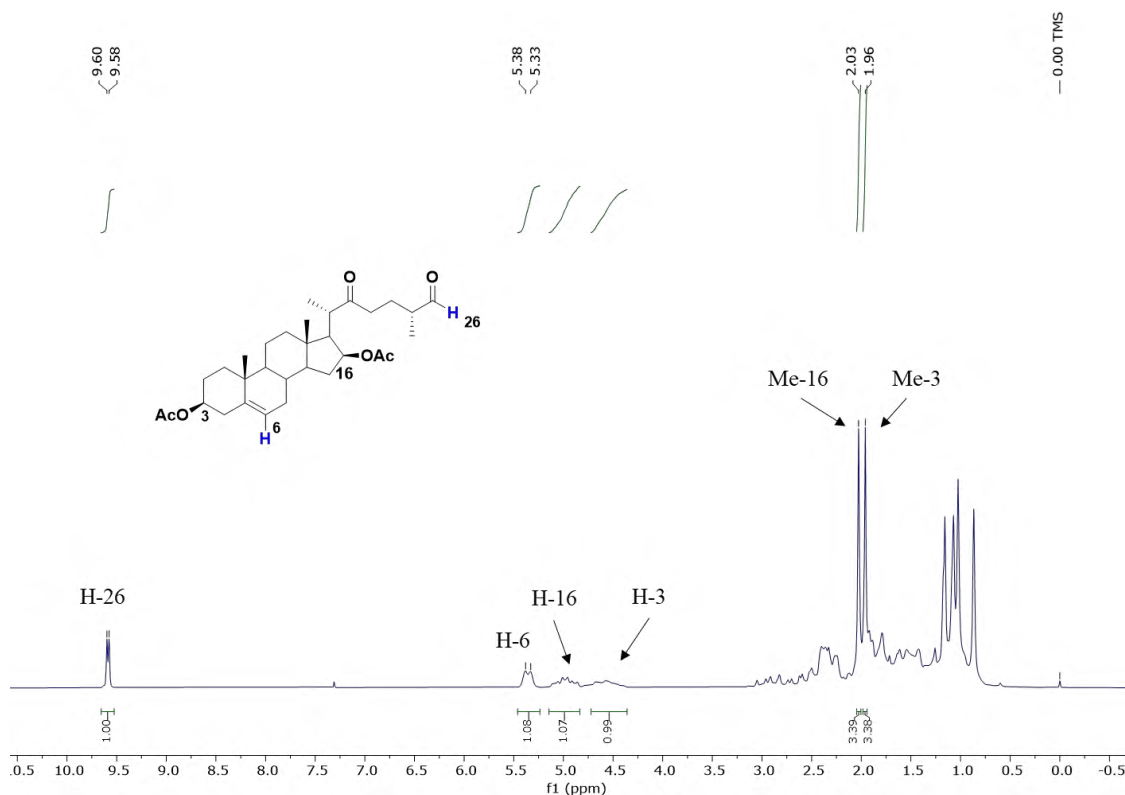


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **80**.

En el espectro de ^{13}C (**Figura 24**) se observan las 31 señales que se esperan para el compuesto **80**. En 212.3 ppm se aprecia la señal característica de C-22 que pertenece al carbonilo de cetona, mientras que a 204.5 ppm se observa la señal que pertenece al carbonilo de aldehído en C-26. En 170.6 y 170.01 ppm se observan las señales características de los carbonilos de los grupos acetatos en C-3 y C-16, respectivamente. Las señales para los carbonos vinílicos C-5 y C-6 se observan a 140.0 y 122.3 ppm. Asimismo, en 75.8 y 74.0 ppm se observan las señales que corresponden a C-16 y C-3, respectivamente. Cabe destacar que el número de señales y los desplazamientos químicos son consistentes con lo reportado en la literatura.⁵⁴

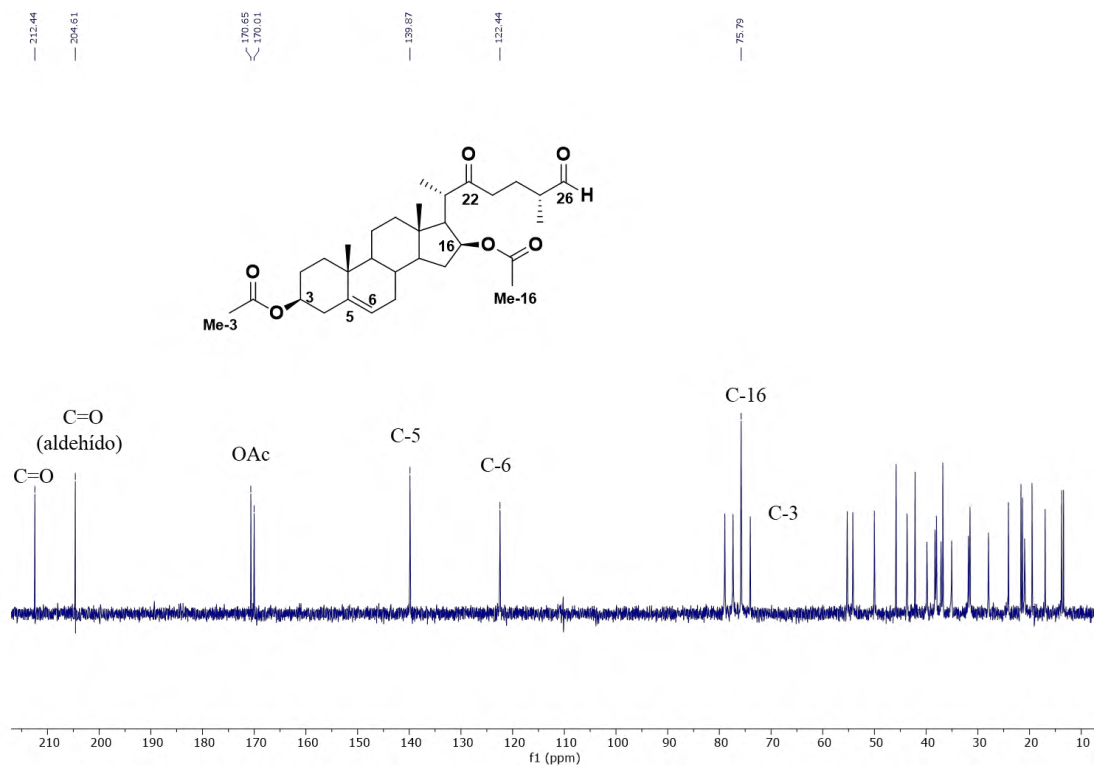


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **80**.

7.4.2.2. *Análisis de la caracterización de 80 de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)*

En el espectro de IR correspondiente al compuesto **80** (**Figura 25**), se pueden observar las bandas de absorción esperadas más importantes, en la región de 2936 cm^{-1} se aprecia la banda de vibración de tensión que corresponde al enlace C-H. Mientras que se observa una banda de vibración de tensión débil a 2826 cm^{-1} que corresponde al enlace C-H del carbonilo de aldehído. De igual manera se pueden observar que los grupos carbonilos ($\text{C}=\text{O}$) de los grupos acetatos, cetona y aldehído comprenden en la región de 1705 , 1720 y 1726 cm^{-1} , respectivamente. Por otro lado, se observa una banda de flexión de los carbonos alfa al grupo carbonilo ($\text{C}-\text{CO}-\text{C}$) en 1250 cm^{-1} .

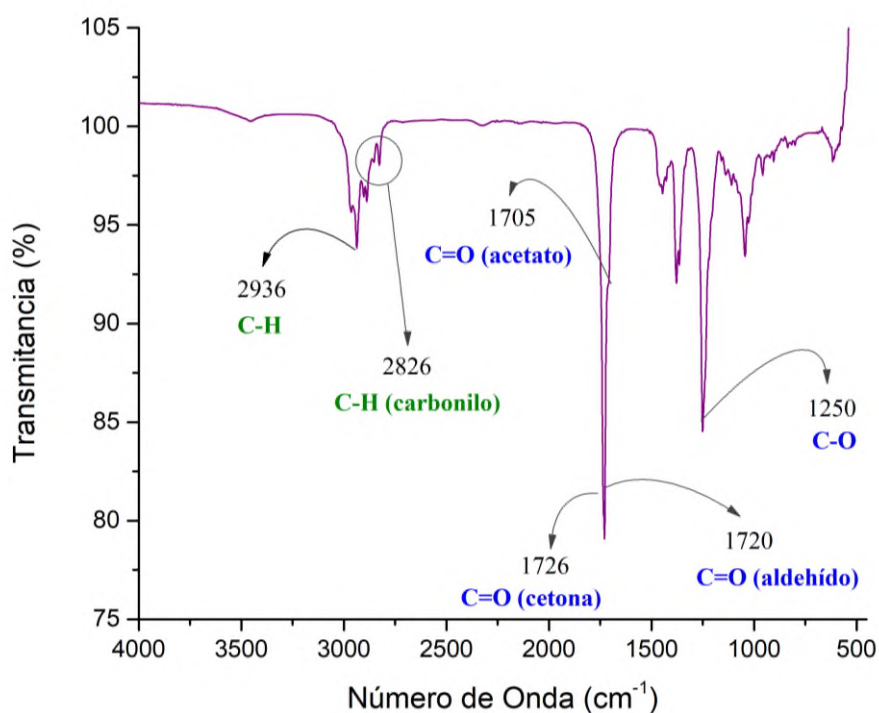
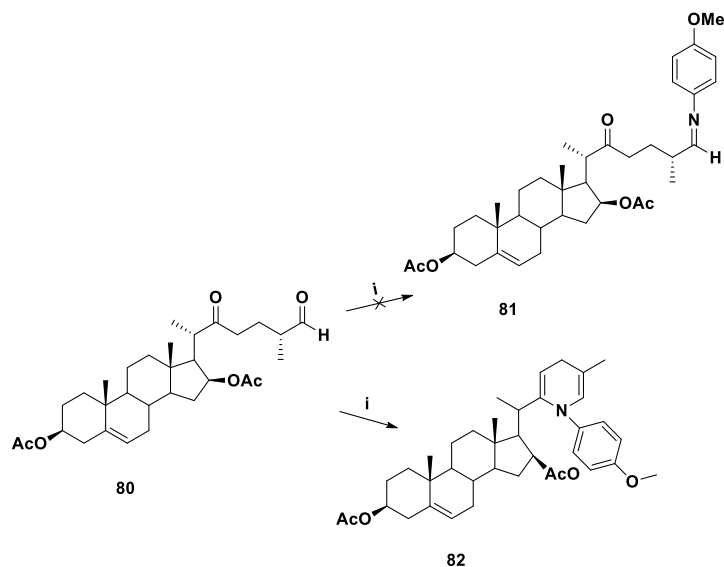


Figura 25. Espectro de IR del compuesto **80**.

7.4.3. Reacción de condensación de 26-aldehído con *p*-anisidina

Una vez obtenido el compuesto **80** planteamos realizar la reacción de condensación con *p*-anisidina. Con esta reacción se esperaba obtener el compuesto **81**, sin embargo, se obtuvo el compuesto **82**. De acuerdo con el **Esquema 22** se puede observar que con en estas condiciones de reacción se favoreció la condensación 1,5-dicarbonílica con el grupo amino de la *p*-anisidina. Cabe resaltar que el rendimiento de reacción fue bajo (7.5%), sin embargo, fue interesante el producto ya que no hay reportes en la literatura de este compuesto y resultó ser una nueva forma de generar un anillo de tipo 1,4-dihidropiridina en la cadena lateral de la diosgenina.



i) Tolueno, *p*-TsOH

Esquema 22. Reacción de condensación de **82** con *p*-anisidina.

7.4.3.1. *Análisis del espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 82*

En el espectro de ^1H (**Figura 26**) se observan las señales correspondientes al compuesto **82**, a campos bajos (7.24-6.76 ppm) destacan las señales que pertenecen a los protones del grupo aromático, en 5.84 ppm se observa una señal simple que corresponden a los protones H-23 y H-26, mientras que a 5.35 ppm destaca una señal doble que integra para un protón que pertenece al protón vinílico H-6. En 3.87 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones y que corresponde a los protones del grupo metoxi (ArOMe). Por otro lado, en 2.02 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones que pertenecen a los metilos de los grupos acetatos en C-3 y C-16, respectivamente. Asimismo, a campos altos 1.93 y 1.87 ppm se observan las señales que integran para tres protones y que corresponden a los protones de los grupos metilos presentes en C-27 y C-21, respectivamente.

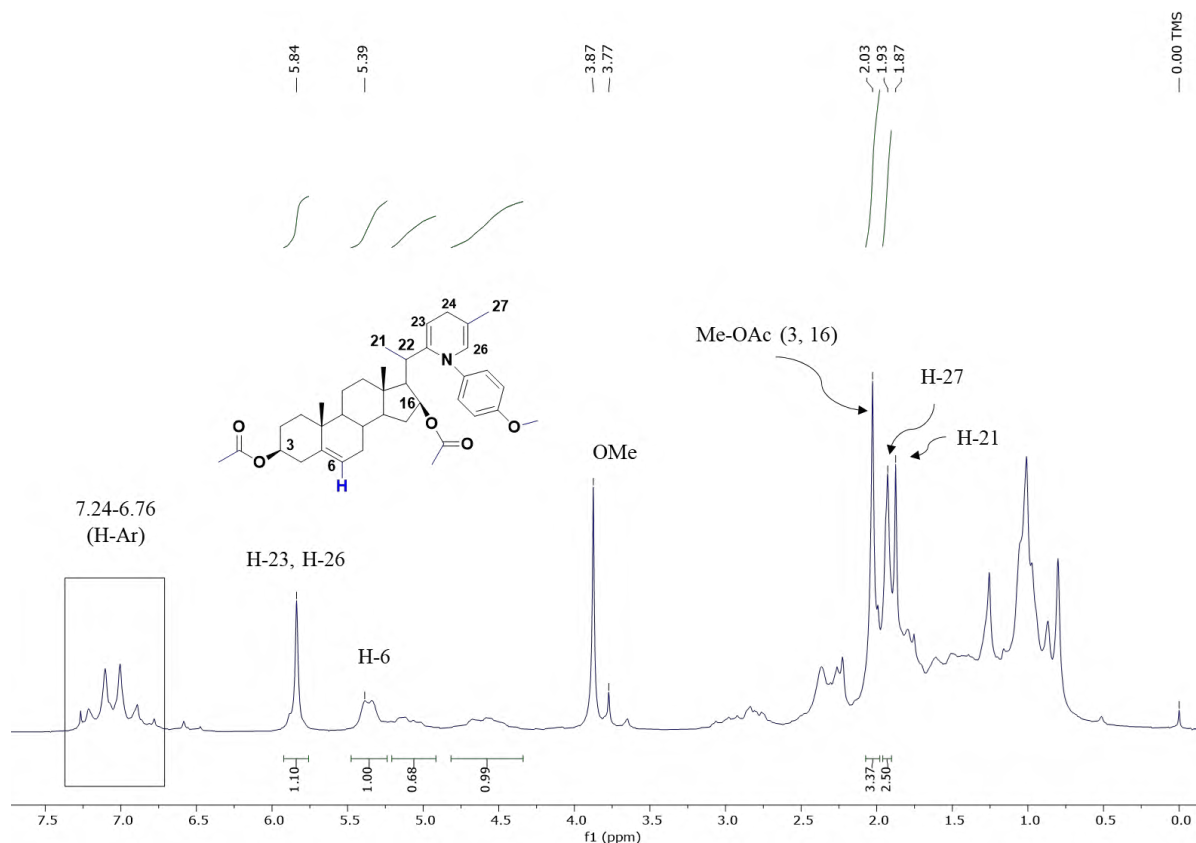


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **82**

En el espectro de ^{13}C (**Figura 27**) se observan las señales que se esperan para el compuesto **82**. En 170.7 y 170.4 ppm se aprecian las señales características del carbonilo de los grupos acetatos que pertenecen a C-3 y C-16, respectivamente. En 158.7 ppm se observa la señal característica para el carbono *ipso* (Ar-O-Me). Mientras que la señal para el carbono unido al nitrógeno (C-23) se aprecia en 139.6 ppm. Las señales para los carbonos vinílicos C-5 y C-4 se observan a 138.6 y 122.3 ppm, respectivamente. Por último, en un rango de 114.0 a 129.6 se aprecian las señales de los carbonos del grupo aromático.

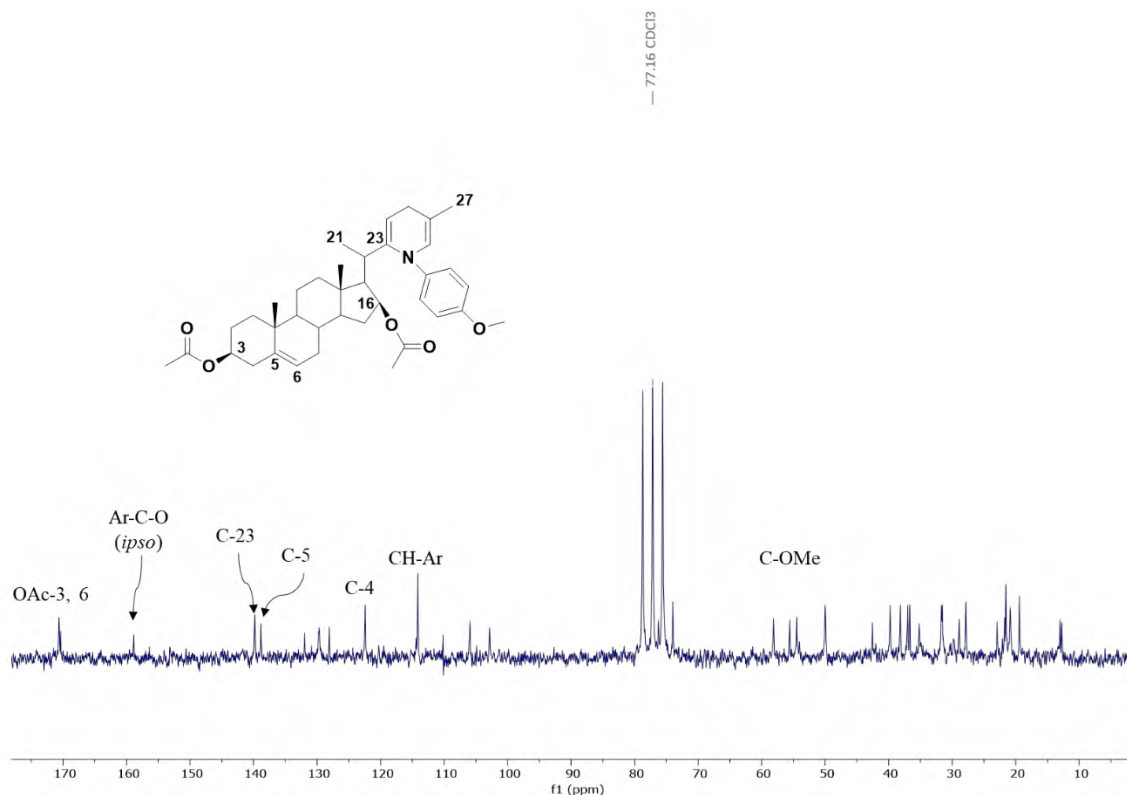


Figura 27. Espectro de ^{13}C de RMN del compuesto **82**.

7.4.3.2. *Análisis de la caracterización de 82 de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)*

A continuación, se muestra el espectro de IR que corresponde al compuesto **82** (**Figura 28**). En 3059 cm^{-1} se observa una banda de tensión del enlace $=\text{C}-\text{H}$ que corresponde al anillo aromático, mientras que la banda de tensión del enlace $\text{C}=\text{C}$ se observa alrededor de 1514 cm^{-1} . Por otro lado, se observan la banda perteneciente al carbonilo de los grupos acetatos que caen en un rango de 1725 cm^{-1} . Finalmente, para el grupo alquil aril éter (metoxi benceno) se aprecian dos bandas de tensión o estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}$, las cuales están entre 1257 cm^{-1} correspondiente al enlace $\text{Ar}-\text{O}-\text{Me}$, mientras que en 732 cm^{-1} se observa la banda de flexión *oop* del anillo aromático *p*-sustituido.

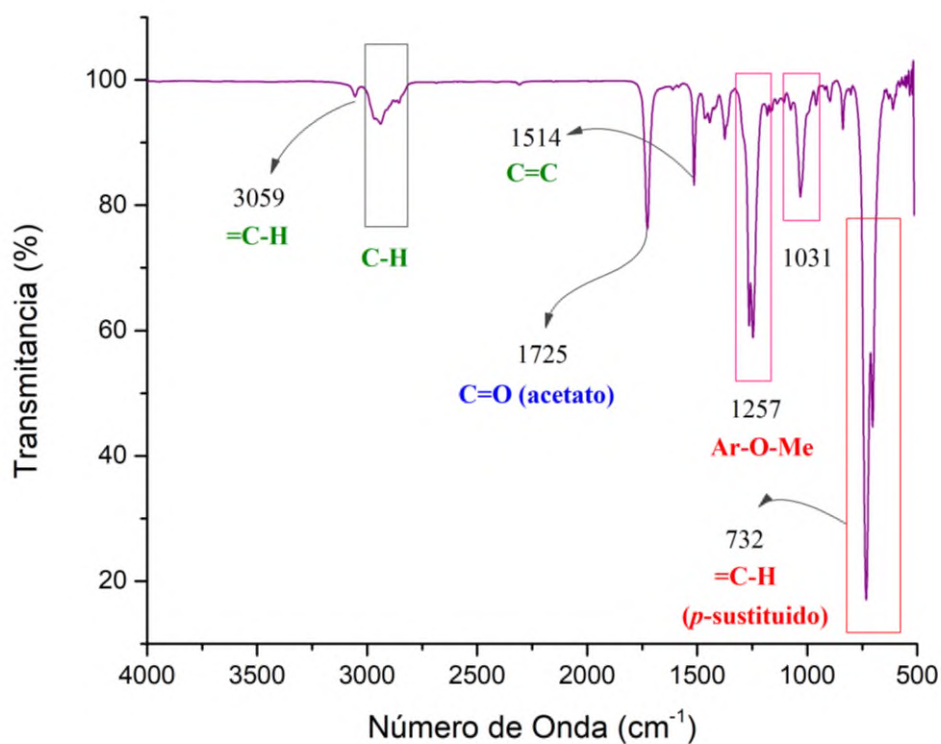


Figura 28. Espectro de IR del compuesto **82**.

7.5. Evaluación biológica de los derivados esteroidales

Como se mencionó en los objetivos, se llevó a cabo la evaluación citotóxica de los compuestos **72b-73b**, **72c-73c**, **82** por el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).⁵⁵ Se utilizó la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se aplicaron diferentes concentraciones de los compuestos a 2×10^4 células utilizando como grupo control las células sin ningún tratamiento (**Tabla 4**).

Tabla 4. Concentración de los compuestos sintetizados en diferentes porcentajes de DMSO.			
Compuestos	Concentración de compuestos en DMSO		
	0.5 % DMSO	0.75 % DMSO	1% DMSO
72b	275 µg /mL	412.5 µg /mL	550 µg /mL
73b	71.25 µg /mL	106.9 µg /mL	142.5 µg /mL
72c	260 µg /mL	390 µg /mL	520 µg /mL
73c	68.75 µg /mL	103.125 µg /mL	137.5 µg /mL
82	250 µg /mL	375 µg /mL	500 µg /mL

En la **Figura 29** se muestra el gráfico del grupo control negativo y el porcentaje del disolvente DMSO sin tratamiento que se utilizó para la preparación de las diferentes concentraciones de compuestos, donde se puede observar que el disolvente DMSO por sí solo a un porcentaje de 0.5, 0.75 y 1 % muestra actividad frente a las células inhibiendo el 25% de ellas.

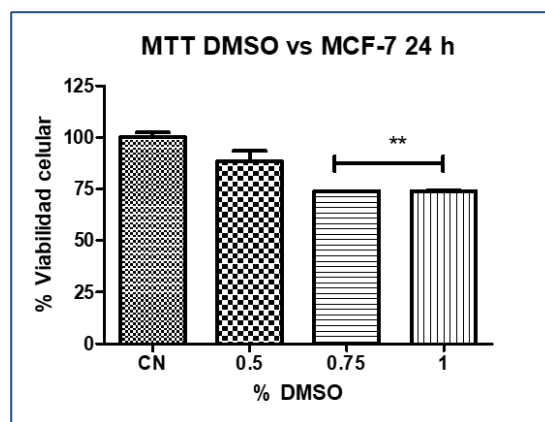


Figura 29. Ensayo MTT de distintos porcentajes de DMSO contra células MCF-7 con 24 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control negativo (CN). Los datos se expresan como valores $\pm$ de desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett. Los valores con $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significantes. Siendo ** $p < 0.01$.

Mientras que los resultados para los compuestos se pueden observar en la **Figura 30** que muestra que los productos no inhibieron de manera dosis dependiente el porcentaje de células. En el gráfico de los compuestos **73b**, **73c** y **82**, se observó inhibición a partir de las concentraciones

142.5, 137.5 y 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Mientras que para los compuestos **72b** y **72c** se puede observar que sí hubo inhibición y que el porcentaje de células vivas está en un rango del 25-30%. Como conclusión de este ensayo se predijo que posiblemente la actividad mostrada en los datos no se debía a los compuestos sintetizados si no que el DMSO pudo influir en la inhibición de las células.

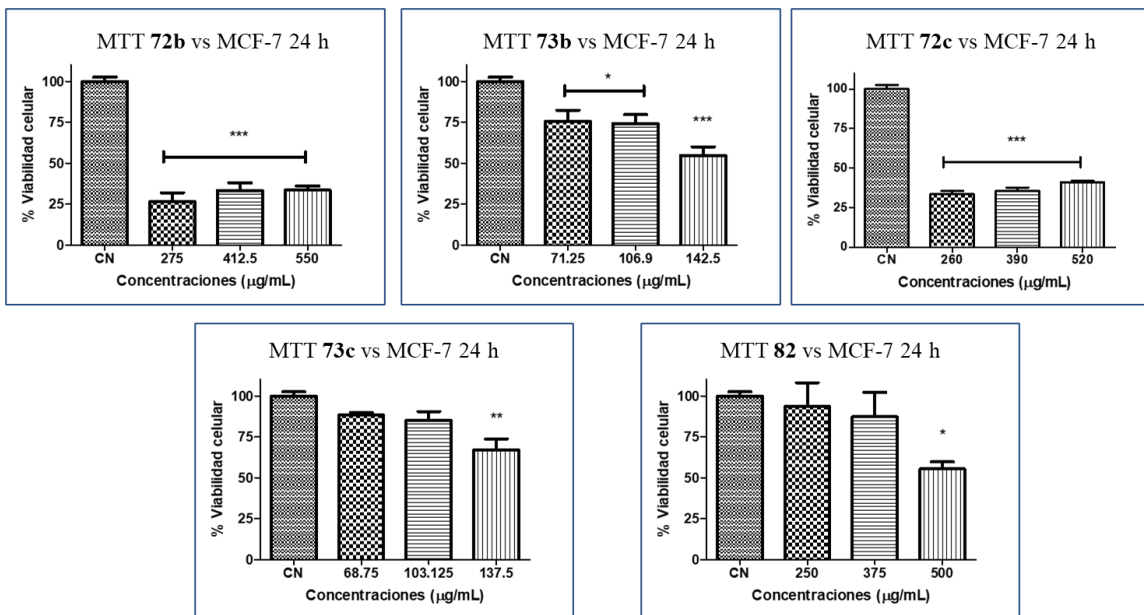


Figura 30. Ensayos MTT de los compuestos esteroidales sintetizados (derivados metoxi: **72b** y **73b**., derivados etoxi: **72c** y **73c**., y **82**) contra células de cáncer de mama MCF-7 con 24 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control negativo (CN). Los datos se expresan como valores $\pm$ de desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett. Los valores con $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significantes. Siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Por ello se optó por repetir el ensayo, esta vez preparando 5 mg/ 100 μL del compuesto en DMSO, cabe recalcar que ciertos compuestos no se disolvieron completamente por lo que se le agregó más volumen del disolvente (**Tabla 5**).

Tabla 5. Concentración estándar de los compuestos sintetizados.				
Compuesto	Cantidad del compuesto (mg)	DMSO (μL)	Concentración final (mg/mL)	Concentración final (M)
72b	5.5	100	55	0.18
72c	5.2	100	52	0.16
73b	5.7	400	14.2	0.034
73c	5.5	400	13.7	0.031
82	5.0	100	50	

A partir de las soluciones estándar mostradas en la tabla anterior, se realizaron cálculos para obtener las concentraciones de los compuestos a un porcentaje de 0.25-1% de DMSO. Es importante mencionar que como no todos los compuestos presentaron un porcentaje de viabilidad considerado en el ensayo anterior, para esta prueba se tomó como referencia el porcentaje de viabilidad de las pruebas anteriores mostradas en la **Figura 30**. En el primer ensayo, se preparó una solución de **72b** a una concentración de 275 μg/mL, observándose un porcentaje de viabilidad cercano al 25%. Por lo anterior, se esperaba que a una concentración menor (135.5 μg/mL), el porcentaje de inhibición fuera mayor, sin embargo, como se observa no fue el caso, por el contrario, se observó un porcentaje de viabilidad de 50%. De igual manera para el derivado **72c**, a una concentración de 130 μg/mL, mostró una inhibición del 50% de manera dosis dependiente de células. En el caso de los compuestos derivados de β-sitosterol (**73b** y **73c**) se observa que el porcentaje de viabilidad se mantiene en un rango de 70-100%. Mientras que para el compuesto **82**, a una concentración de 375 μg/mL, presentó un porcentaje <50% de viabilidad y a una concentración de 260 μg/mL se observó alrededor de 50% de células vivas (**Figura 31**).

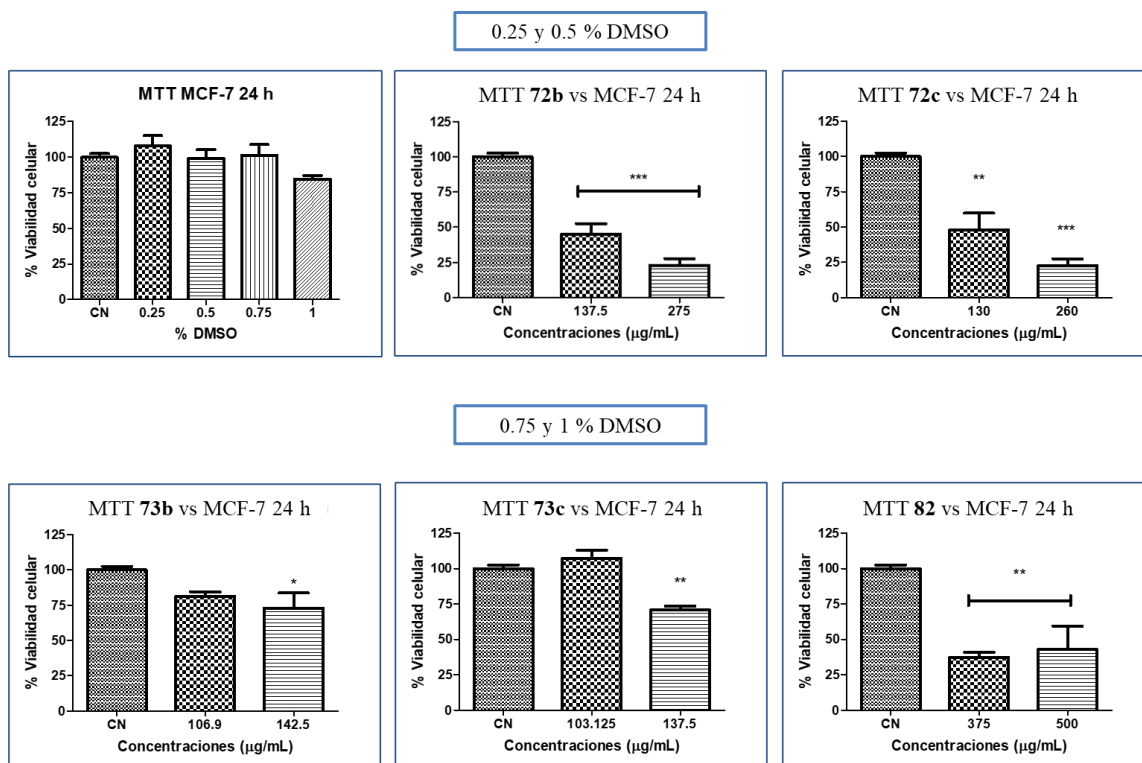


Figura 31. Ensayos MTT de los compuestos esteroidales sintetizados (derivados metoxi: **72b** y **73b**., derivados etoxi: **72c** y **73c**., y **82**) contra células de cáncer de mama MCF-7 con 24 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control negativo (CN). Los datos se expresan como valores $\pm$ de desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc Dunnett. Los valores con $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Con base a estos datos se calculó la concentración letal media (LC_{50}) de cada compuesto, como se observa en la **Tabla 6** en el que se pueden observar que no inhibieron de manera dosis dependiente el porcentaje de células, observándose que las concentraciones exceden por arriba de 300 μ M.

Tabla 6. Actividad citotóxica (LC₅₀) contra la lineal celular MCF-7.		
	Compuesto	LC₅₀ (μM)
1	72b	~400
2	72c	~364
3	73b	>333
4	73c	>300
5	82	<623

De acuerdo con la información de la **Tabla 6**, se concluye que los compuestos sintetizados no se consideran buenos agentes citotóxicos para la línea celular estudiada.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Reactivos y disolventes

Las materias primas y los reactivos utilizados son de marca Sigma-Aldrich, fueron usados sin purificación previa. Los disolventes de grado analítico empleados fueron metanol (MeOH) y etanol (EtOH).

8.2 Cromatografía

Se empleó el uso de la cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas comerciales de gel de sílice ALUGRAM® SIL G/UV254. El revelado de las placas se empleó luz ultravioleta (254 nm y 365 nm) o por calcinación de las placas sumergidas en ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 50%. Las columnas cromatográficas (CC) se realizaron en gel de sílice Davisil™ grado 633 (malla 200–425), usando como eluyente un sistema de hexano / acetato de etilo (AcOEt).

8.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron en un espectrómetro Spinsolve, Magritek 80 NMR (80 MHz para ¹H, 20 MHz para ¹³C). Se usó cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como señal estándar interna. Se realizaron experimentos para una elucidación completa y se obtuvieron espectros de ¹H, ¹³C, DEPT, así como espectros de experimentos bidimensionales (COSY, HMBC y HSQC). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hertz y la multiplicidad se indicó de la siguiente manera: s = singulete, d = doblete, t = triplete, dd = dobles de dobles, td = triplete de dobles, q = cuarteto y m = multiplete.

8.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se obtuvieron los espectros infrarrojos de los intermediarios y productos en un instrumento de FTIR Perkin Elmer Spectrum 100 (rango: 4000-600 cm⁻¹). Los datos se expresaron en función del número de onda (cm⁻¹).

8.5 Espectrometría masas (EM)

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) de los intermediarios y productos se obtuvieron en un espectrómetro Synapt G2-Si (Waters) equipado con una fuente de iones por electropulverización (ESI), un filtro de masas de cuadrupolo único y un analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF).

8.6 Preparación del reactivo de Jones

En un vaso de precipitado se agregaron 5 g de CrO_3 , seguido de 14.3 mL de H_2O posteriormente se añadieron gota a gota 4.51 mL de H_2SO_4 , la mezcla se mantuvo en agitación constante en un baño de hielo durante 30 minutos.

8.7 Ensayo por el método MTT

Para determinar la citotoxicidad de las proteínas elegidas en las líneas celulares de origen canceroso se realizó mediante la transformación del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a formazán (MTT) por las deshidrogenasas mitocondriales.

El principio del ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido. La técnica sigue los criterios determinados por (Mosmann, 1983).⁵⁵ Para esto se retaron a las células con diferentes concentraciones de las proteínas seleccionadas durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 5 mg/mL de MTT y se incubó por 4 h a las condiciones de cultivo. Finalmente, se retiró el medio y se agregaron 100 μL de isopropanol o DMSO, para disolver los cristales de formazan formados. Se realizó una lectura de absorción a 595 nm y por último se realizó una gráfica de absorbancia contra concentración celular para determinar la LC_{50} .

8.7.1 Líneas celulares

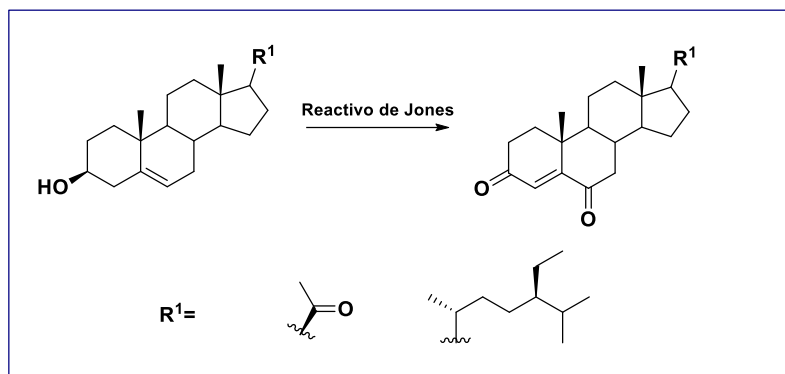
La evaluación de la citotoxicidad se realizó en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7.

8.7.2 Condiciones del medio:

Las condiciones fueron: medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina. Las células fueron mantenidas a una atmósfera de 5 % de CO₂ y humedad saturada (95 %) a 37 °C. Para los ensayos se utilizaron 2.0x10⁴ células.

9. PARTE EXPERIMENTAL

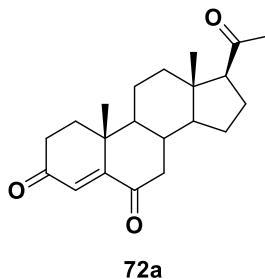
9.1. Procedimiento para la síntesis de derivados 4-en-3,6-endionas



Esquema 23. Síntesis de derivados de 4-en-3,6-endionas.

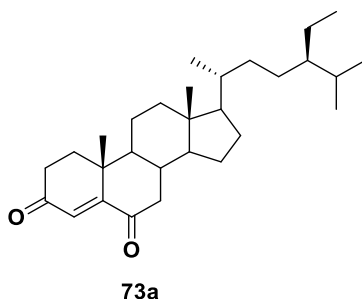
En un matraz de bola de 100 mL se añadió una solución del esteroide (1 g, 2.92 mmol para pregn-5-en-3 β -ol-20-ona, 2.41 mmol para β -sitosterol), en una mezcla de CH₂Cl₂/Acetona (25 mL/10 mL), después fue añadido lentamente el reactivo de Jones 4.5 mL (2.8 M), la reacción se dejó 6 h en agitación magnética a temperatura ambiente (**Esquema 23**). Una vez terminado el tiempo de reacción se procedió a inactivar la reacción añadiendo poco a poco (5.0 mL) isopropanol hasta que se observó un cambio de color de naranja a verde. El crudo de reacción se pasó por una percolativa que contenía gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con AcOEt (150 mL). Por último, el disolvente se concentró a presión reducida. El residuo se purificó como se indica para cada derivado del esteroide.

Pregna-4-eno-3,6,20-triona (72a)



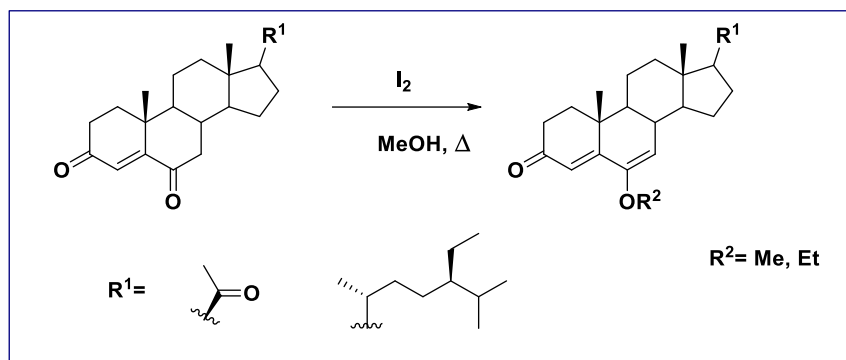
El residuo se purificó por CC (80-20 hexano-AcOEt) obteniéndose **72a** como un sólido (680 mg, 65 % de rendimiento). IR: 1700 (C=O), 1658 (C=O), 1681 (C=O α , β , γ , δ insaturado), 1585 (C=C) cm^{-1} . RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ : 6.16 (1H, s, H-4), 2.14 (3H, s, H-21), 1.18 (3H, s, H-19) 0.69 (3H, s, H-18); RMN ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) δ : 208.6 (C-20), 201.4 (C-3), 199.0 (C-6), 160.3 (C-5), 125.4 (C-4), 62.9 (C-9), 56.2 (C-14), 50.4 (C-17), 46.2 (C-7), 43.6 (C-13), 39.4 (C-10), 37.9 (C-12), 35.2 (C-1), 33.7 (C-2), 33.7 (C-8), 31.2 (C-21), 23.9 (C-16), 22.6 (C-15), 20.6 (C-11), 17.3 (C-19), 13.0 (C-18). HRMS ESI: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 328.2038, encontrado: 328.2117.

24-Etilcolest-4-eno-3,6-diona (**73a**)



El residuo se purificó por CC (90:10 Hexano-AcOEt), obteniéndose **73a** como un sólido (820 mg, 80% de rendimiento). IR: 1678 (C=O), 1686 (C=O α , β , γ , δ insaturado), 1602 (C=C) cm^{-1} . RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ : 6.17 (1H, s, H-4), 1.17 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 0.87 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-26), 0.86 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-27), 0.73 (3H, s, H-18). RMN ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) δ : 202.2 (C-6), 199.4 (C-3), 161.0 (C-5), 125.4 (C-4), 56.5 (C-17), 55.8 (C-14), 50.9 (C-9), 46.7 (C-7), 45.7 (C-24), 42.5 (C-13), 39.7 (C-12), 39.1 (C-8), 36.0 (C-20), 35.5 (C-1), 34.1 (C-10), 33.9 (C-22), 33.8 (C-2), 29.1 (C-25), 28.0 (C-16), 26.0 (C-23), 23.9 (C-15), 23.0 (C-28), 20.8 (C-11), 19.8 (C-26), 19.0 (C-21), 18.6 (C-27), 17.4 (C-19), 11.9 (C-18), 11.8 (C-29). HRMS ESI: calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 427.3498, encontrado: 427.3576.

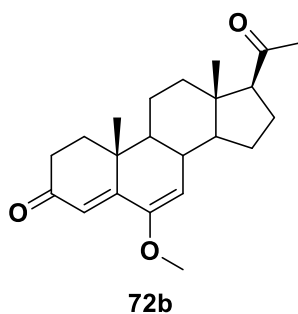
9.2. Procedimiento para la síntesis de los derivados 6-alcoxi-4,6-dien-3-onas



Esquema 24. Ruta de síntesis para la obtención de enol éter derivados de pregn-5-en-3 β -ol-20-ona y β -sitosterol

En un matraz de bola de 100 mL se añadió la dicetona correspondiente (0.5 g, 1.52 mmol pregn-4-eno-3,6,20-triona, 1.17 mmol 24-etilcolest-4-eno-3,6-diona) y se disolvió en MeOH o EtOH grado ACS (30 mL), se añadieron cantidades catalíticas de I_2 (22 mg) y se dejó en agitación magnética a reflujo por 5 h (**Esquema 24**). Posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida y al crudo de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con una solución acuosa de NaHSO_3 al 5% (15 mL), salmuera (2 x 30 mL) y agua (3 x 30 mL). Por último, la fase orgánica resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó como se indica en cada caso.

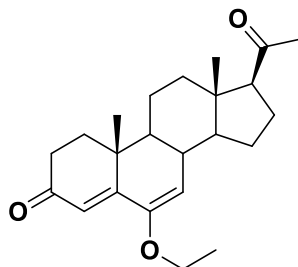
6-Metoxipregna-4,6-dieno-3,20-diona (72b)



El residuo se purificó por columna cromatográfica (75:25 $\rightarrow$ 7:3 Hexano/ AcOEt) obteniéndose **72b** con característica aceitosa (130 mg, 25% de rendimiento). IR: 1699 ($\text{C}=\text{O}$), 1657 ($\text{C}=\text{O}$ α , β , γ , δ insaturado), 1584 ($\text{C}=\text{C}$), 1225 ($\text{C}-\text{O}$) cm^{-1} . RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ : 6.25 (1H, s, H-4), 5.14 (1H, d, $J_{7-8} = 1.6$ Hz, H-7), 3.59 (3H, s, CH_3O), 2.14 (3H, s, CH_3 -21), 1.12 (3H, s, H-19), 0.72 (3H, s, H-18). RMN ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) δ : 209.0 (C-20), 199.5 (C-3), 158.8 (C-5), 150.1

(C-6), 119.5 (C-4), 108.0 (C-7), 63.3 (C-17), 54.6 (CH₃O), 54.6 (C-14), 50.9 (C-9), 44.5 (C-13), 38.5 (C-12), 36.3 (C-10), 35.3 (C-8), 34.2 (C-1), 33.5 (C-2), 31.4 (C-21), 24.0 (C-16), 22.7 (C-15), 20.5 (C-11), 16.3 (C-19), 13.3 (C-18). HRMS ESI: calculado para C₂₂H₃₁O₃ ([M+H]⁺): 343.2273, encontrado: 343.2277.

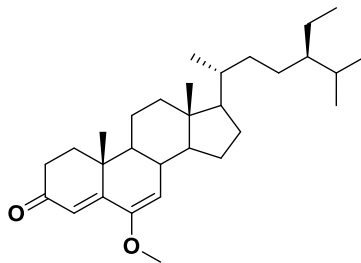
6-Etoxipregna-4,6-dieno-3,20-diona (72c)



72c

El residuo se purificó por columna cromatográfica (85:15, Hexano/AcOEt) obteniéndose **72c** con característica aceitosa (310 mg, 57% de rendimiento). IR: 1701 (C=O), 1657 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado), 1584 (C=C), 1224 (C-O) cm⁻¹. RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ : 6.31 (1H, s, H-4), 5.12 (1H, d, J_{7-8} = 1.6 Hz, H-7), 3.74 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH₂O), 2.14 (3H, s, CH₃-21), 1.32 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH₃CH₂O), 1.12 (1H, s, H-19), 0.72 (1H, s, H-18). RMN ¹³C (20 MHz, CDCl₃) δ : 209.0 (C-21), 199.7 (C-3), 159.1 (C-5), 149.4 (C-6), 119.5 (C-4), 108.9 (C-7), 63.3 (C-17), 62.9 (CH₂O), 54.6 (C-14), 50.9 (C-9), 44.6 (C-13), 38.5 (C-12), 36.3 (C-10), 35.4 (C-8), 34.2 (C-1), 33.5 (C-2), 31.4 (C-21), 24.0 (C-16), 22.7 (C-15), 20.5 (C-11), 16.4 (C-19), 14.4 (CH₃CH₂O), 13.3 (C-18). HRMS ESI: calculado para C₂₃H₃₃O₃ ([M+H]⁺): 357.2430, encontrado: 357.2420.

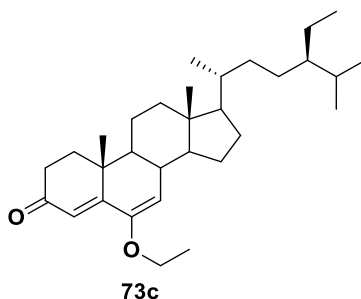
6-Metoxi-24-etilcolest-4,6-eno-3-ona (73b)



73b

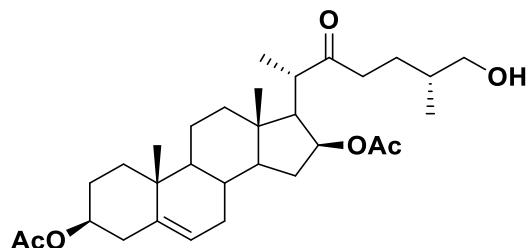
El residuo se purificó por columna cromatográfica (92:08, Hexano/AcOEt) obteniéndose **73b** con característica aceitosa (310 mg, 59% de rendimiento). IR: 1661 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado), 1586 (C=C), 1226 (C-O) cm^{-1} . RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ : 6.24 (1H, s, H-4), 5.12 (1H, d, $J_{7-8} = 1.9$ Hz, H-7), 3.58 (3H, s, CH_3O), 2.53 (1H, m, H-2 β), 1.12 (3H, s, H-19), 0.77 (3H, s, H-18), 0.75 (3H, t, $J_{29-28} = 7$ Hz, H-29). RMN ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) δ : 199.7 (C-3), 159.3 (C-5), 150.0 (C-6), 119.3 (C-4), 109.1 (C-7), 56.0 (C-17), 54.6 (CH_3O), 54.4 (C-14), 51.1 (C-9), 45.8 (C-24), 43.3 (C-13), 39.5 (C-12), 36.4 (C-10), 36.1 (C-20), 35.5 (C-8), 34.2 (C-1), 33.8 (C-22), 33.6 (C-2), 29.1 (C-25), 28.1 (C-16), 26.1 (C-23), 23.9 (C-15), 23.0 (C-28), 20.6 (C-11), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 18.7 (C-21), 16.4 (C-19), 11.9 (C-18), 11.9 (C-29). HRMS ESI: calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 441.3733, encontrado: 441.3727.

6-Etoxi-24-etilcolest-4,6-dieno-3-ona (73c)



El residuo se purificó por columna cromatográfica (92:08, Hexano/AcOEt) obteniéndose **73c** con característica aceitosa (340 mg, 64% de rendimiento). IR: 1655 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado), 1586 (C=C), 1226 (C-O) cm^{-1} . RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ : 6.31 (1H, s, H-4), 5.17 (1H, d, $J_{7-8} = 1.6$ Hz, H-7), 3.74 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, CH_2O), 1.31 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 0.93 (3H, d, $J_{21-20} = 6.5$ Hz, CH_3 -21), 1.12 (1H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.76 (3H, t, $J_{29-28} = 6.5$ Hz, H-29). RMN ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) δ : 199.9 (C-3), 159.6 (C-5), 149.2 (C-6), 119.2 (C-4), 110.0 (C-7), 62.8 (CH_2O), 56.0 (C-17), 54.4 (C-14), 51.1 (C-9), 45.8 (C-24), 43.3 (C-13), 39.5 (C-12), 36.4 (C-10), 36.1 (C-20), 35.5 (C-8), 34.2 (C-1), 33.8 (C-22), 33.6 (C-2), 29.1 (C-25), 28.1 (C-16), 26.1 (C-23), 23.9 (C-15), 23.0 (C-28), 20.6 (C-11), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 18.7 (C-21), 16.4 (C-19), 14.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 11.9 (C-18), 11.9 (C-29). HRMS ESI: calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 455.3889, encontrado: 455.3889.

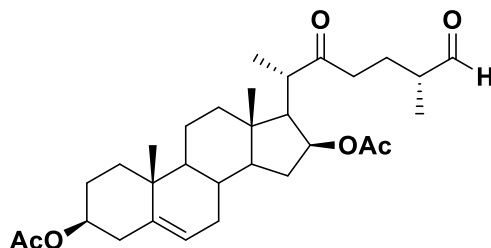
9.3. Procedimiento para la formación del diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (79)



79

En un matraz de bola de 150 mL se disolvieron 2 g de diosgenina (**78**) (4.82 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL) y anhídrido acético glacial (4.3 mL). La mezcla se enfrió a 0 °C, luego se agregó gota a gota BF₃•OEt₂ (4.3 mL) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos, transcurrido ese tiempo se vertió en un matraz Erlenmeyer que contenía agua fría. Posteriormente, se añadió poco a poco una solución saturada de NaHCO₃ y se dejó toda la noche en agitación magnética para favorecer la hidrólisis del anhídrido acético excedente. La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL), se lavó con salmuera (3 x 50 mL) y agua destilada (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 6:4, obteniéndose **79** como un sólido blanco (832 mg, 41.6% de rendimiento). IR: 3465 (O-H), 2937 (C-H, alifático), 1728 (C=O, cetona), 1705 (C=O, acetato), 1573 (C=C) cm⁻¹. RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ : 5.38 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-6), 5.18-4.81 (1H, m, H-16), 4.80-4.34 (1H, m, H-3), 3.41 (2H, d, *J*=5.6 Hz, CH₂-26), 2.72-2.51 (1H, m, H-23a), 2.43-2.30 (1H, m, H-23b), 2.02 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.96 (3H, s, CH₃CO₂-16), 1.14 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH₃-21), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH-27), 0.87 (3H, s, CH-18). RMN ¹³C (20 MHz, CDCl₃) δ : 213.7 (C-22), 170.4 (CH₃CO₂-3), 169.8 (CH₃CO₂-6), 139.6 (C-5), 122.2 (C-6), 75.6 (C-16), 73.7 (C-3), 67.4 (C-26), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.7 (C-9), 43.4 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 38.5 (C-23), 38.0 (C-4), 36.8 (C-1), 36.5 (C-10), 35.3 (C-25), 34.8 (C-15), 31.6 (C-7), 31.2 (C-8), 27.7 (C-2), 26.4 (C-24), 21.4 (CH₃CO₂-3), 21.1 (CH₃CO₂-16), 20.7 (C-11), 19.3 (C-19), 16.8 (C-27), 16.6 (C-21), 13.2 (C-18). HRMS ESI: calculado para C₃₁H₄₈O₆ ([M+H]⁺): 517.3451, encontrado: 517.3524.

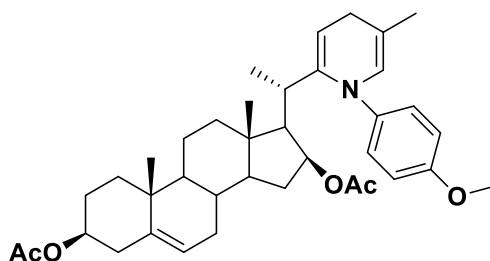
9.4. Procedimiento para la obtención de diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo. (80)



80

En un matraz de bola de 100 mL se disolvió el compuesto **79** (0.832 g, 1.61 mmol) en 30 mL de CH₂Cl₂ y posteriormente se agregó PCC (0.5124 g, 2.37 mmol). La mezcla de reacción se dejó 3 h en agitación magnética a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo, el crudo se pasó por una percolativa que contenía gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó utilizando un sistema hexano/AcOEt (5:5, 175 mL). Por último, el disolvente se concentró a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 75:25, obteniéndose **80** como un sólido blanco. (832 mg, 100% de rendimiento). IR: 2936 (CH alifático), 1720 (C=O, aldehído), 1728 (C=O, cetona), 1705 (C=O, acetato), 1596 (C=C) cm⁻¹. RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ : 9.59 (1H, d, J =1.6 Hz, H-26), 5.35 (1H, d, J =4 Hz, H-6), 5.14-4.82 (1H, m, H-16), 4.72-4.35 (1H, m, H-3), 2.03 (3H, s, CH₃CO₂-16), 1.96 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.16 (3H, d, J =7.2 Hz, CH₃-21), 1.07 (3H, d, J =4.0 Hz, CH₃-27), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.87 (3H, s, CH₃-18). RMN ¹³C (20 MHz, CDCl₃) δ : 212.3 (C-22), 204.4 (C-26), 170.5 (CH₃CO₂-16), 169.8 (CH₃CO₂-3), 139.7 (C-5), 122.5 (C-6), 75.6 (C-16), 74.0 (C-3), 55.1 (C-17), 54.0 (C-14), 49.8 (C-9), 43.5 (C-20), 42.0 (C-13), 39.7 (C-12), 38.7 (C-23), 38.1 (C-4), 36.9 (C-10), 36.7 (C-25), 36.6 (C-1), 34.8 (C-15), 31.8 (C-7), 31.5 (C-8), 27.8 (C-2), 26.3 (C-24), 21.5 (CH₃CO₂-16), 21.2 (CH₃CO₂-3), 20.8 (C-11), 19.3 (C-19), 16.8 (C-27), 13.6 (C-21), 13.2 (C-18). HRMS ESI: calculado para C₃₁H₄₆O₆ ([M+H]⁺): 515.70, encontrado: 517.69.

9.5. Procedimiento de la reacción de condensación del 26-aldehído (80) con *p*-anisidina



82

En un matraz de bola de 100 mL se disolvió **80** (370 mg, 0.71 mmol) y *p*-anisidina (176 mg, 1.43 mmol) en tolueno (15 mL) y se añadieron cantidades catalíticas de *p*-TsOH. La mezcla de reacción se dejó 5 h en agitación magnética a reflujo usando la trampa de Dean-Stark para recolectar el agua formada en la reacción. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 7:3, obteniéndose **82** como un sólido blanco (60 mg, 7.3% de rendimiento). IR: 1725 (C=O acetato), 1514 (C=C), 1257 (Ar-O-Me) cm⁻¹. RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ: 7.24-6.76 (H-Ar), 5.83 (1H, s, H-23, H-26), 5.35 (1H, d, *J*=4.0 Hz, H-6) 5.18-4.98 (1H, m, H-16), 4.81-4.33 (1H, m, H-3), 3.87 (3H, s, CH₃O), 2.02 (3H, s, CH₃-AcO-3,16), 1.92 (3H, s, H-27), 1.89 (3H, d, *J* = 4.0 Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 0.79 (3H, s, H-18). RMN ¹³C (20 MHz, CDCl₃) δ: 170.6 (OAc-3), 170.4 (OAc-16), 158.9 (Ar-C-O-*ipso*), 139.8 (C-23), 138.8 (C-5), 131.9 (C-22), 129.7 (CH-Ar), 128.10 (C-25), 122.4 (C-6), 114.2 (CH-Ar), 105.9 (C-26), 102.8 (C-23), 76.2 (C-16), 73.9 (C-3), 58.1 (C-17), 55.6 (C-OMe), 54.5 (C-14), 50.0 (C-9), 42.6 (C-13), 39.8 (C-12), 38.2 (C-4), 37.0 (C-10), 36.7 (C-1), 35.2 (C-15), 31.7 (C-7), 31.6 (C-8), 28.9 (C-24), 27.9 (C-2), 23.0 (C-20), 21.5 (C-12), 21.2 (C-27), 20.9 (C-11, OAc-3, OAc-16), 19.4 (C-19), 13.0 (C-21), 12.8 (C-18).

10. CONCLUSIONES

Se sintetizaron 4 derivados con el sistema 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona (**72b**, **72c**, **73b**, **73c**) mediante una secuencia de dos pasos a partir de los esteroides 5-pregnen-3 β -ol-20-ona y β -sitosterol con buenos a moderados rendimientos (25-64%). Dicho protocolo permite obtener el sistema insaturado en un menor número de pasos y mediante una metodología y tratamiento de reacción sencillo con respecto a las técnicas reportadas en la literatura. Adicionalmente, se confirmó la versatilidad del yodo, en este caso como un catalizador para favorecer la transformación ceto-etol éter en el esqueleto esteroideal.

Se estudió la estabilidad del sistema 6-alcoxi- $\Delta^{4,6}$ -dien-3-ona, el cual resultó ser lábil, ya que en presencia de un medio básico se promovió la forma ceto sobre la enólica.

Se encontró la formación de una 1,4-dihidropiridina en la cadena lateral, la cual se generó mediante una reacción de condensación 1,5-dicarbonílica con *p*-anisidina catalizada con *p*TsOH. Los compuestos **72b**, **72c**, **73b**, **73c** y **82** se evaluaron para determinar su actividad citotóxica en células de cáncer de mama MCF-7 mostrando una incipiente actividad citotóxica.

Las estructuras de todos los intermediarios y productos obtenidos se caracterizaron mediante RMN, IR y espectrometría de masas (MS).

11. ANEXO

11.1. 24-Etilcolest-4-eno-3,6-diona (73a)

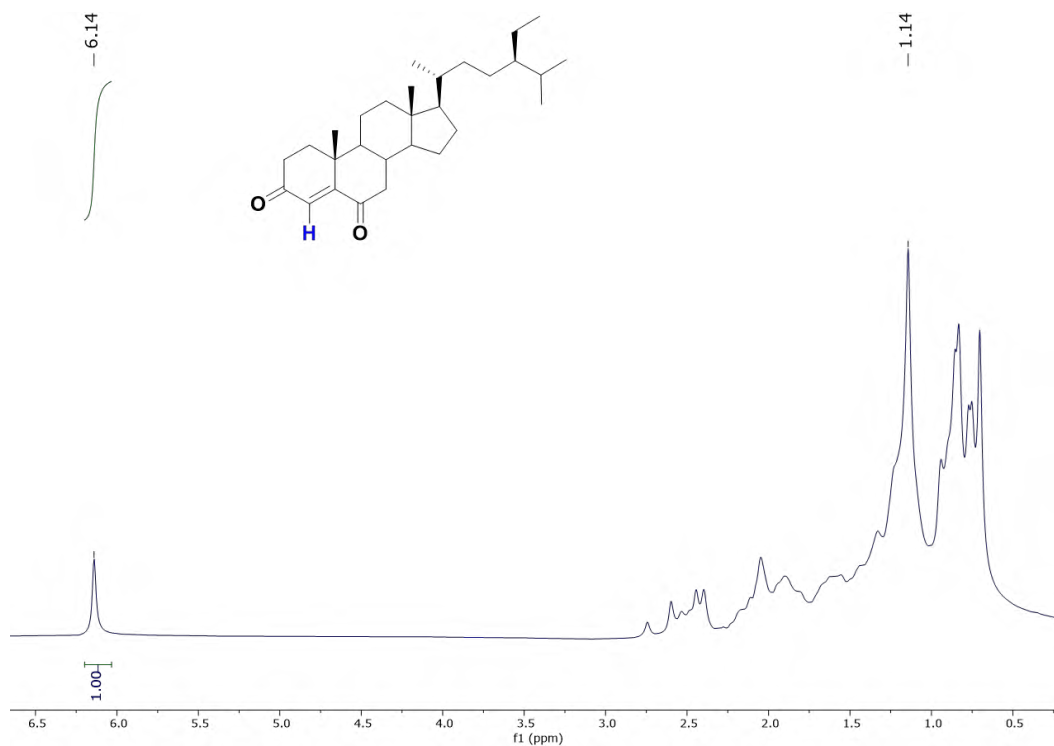


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H de 24-Etilcolest-4-eno-3,6-diona **73a**.

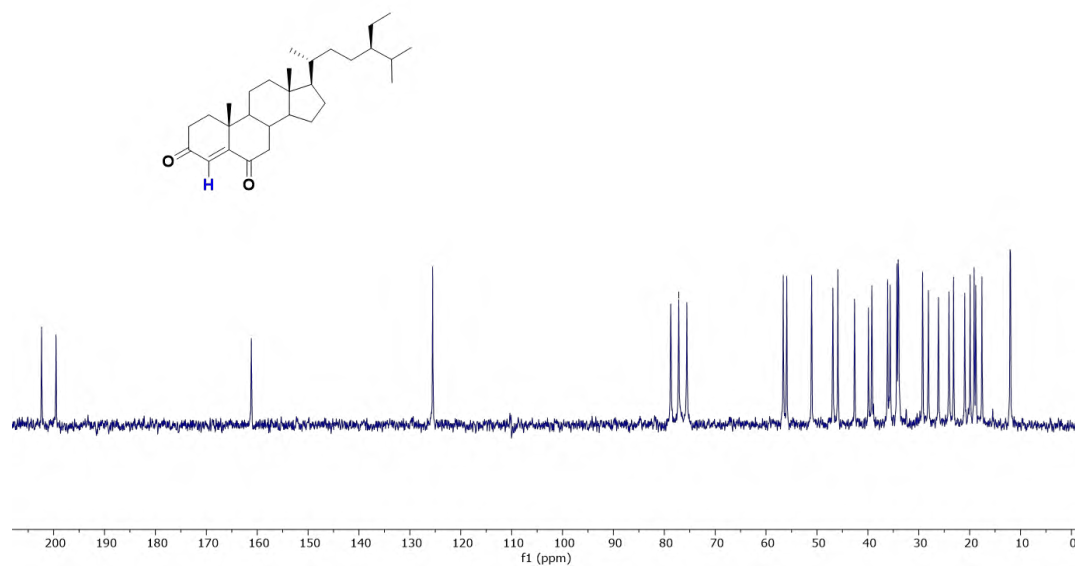


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C de 24-Etilcolest-4-eno-3,6-diona **73a**.

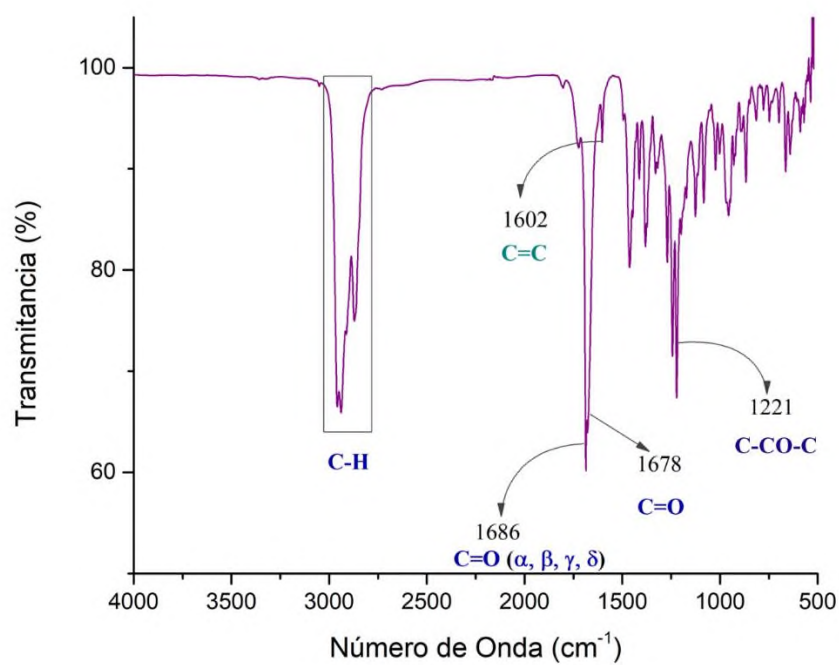


Figura 34. Espectro de IR del compuesto **73a**.

11.2. 6-Metoxi-24-Etilcolest-4,6-eno-3-ona (73b)

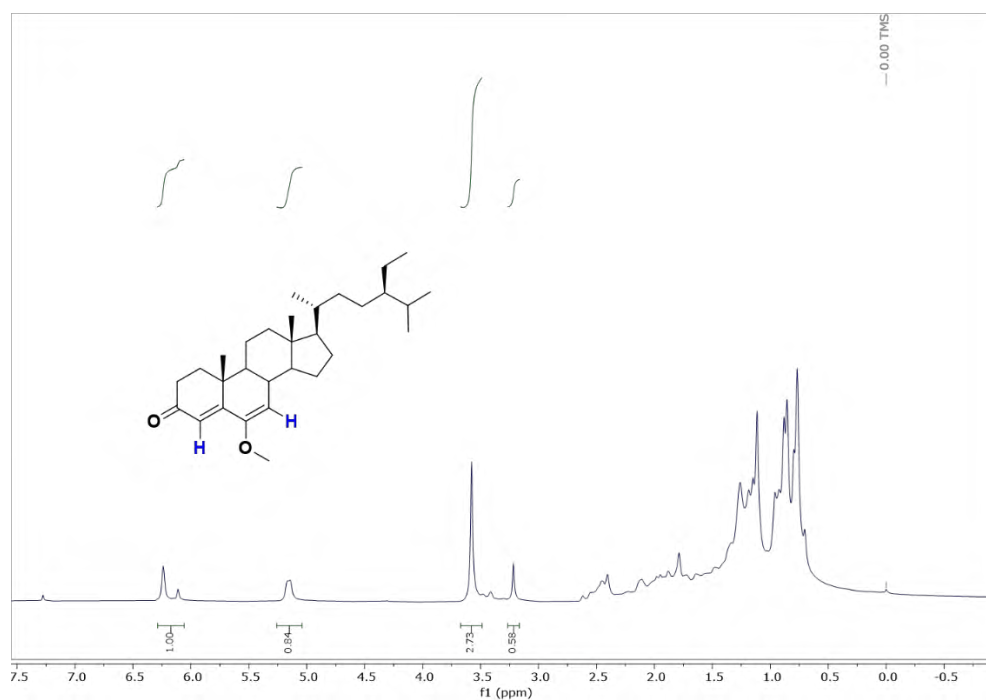


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 73b.

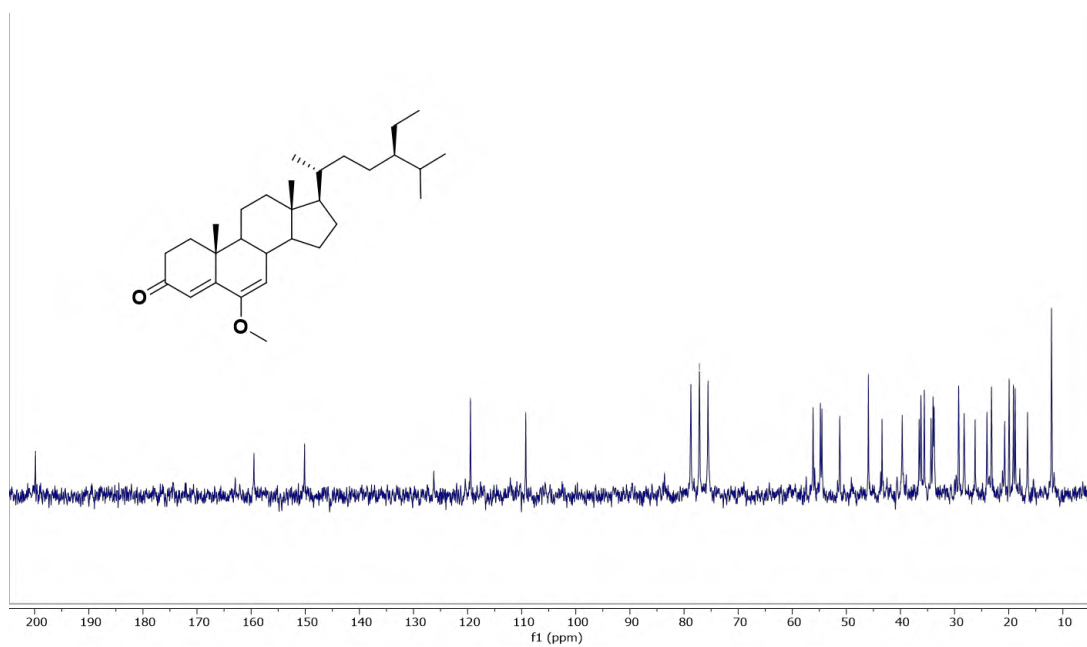


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 73b.

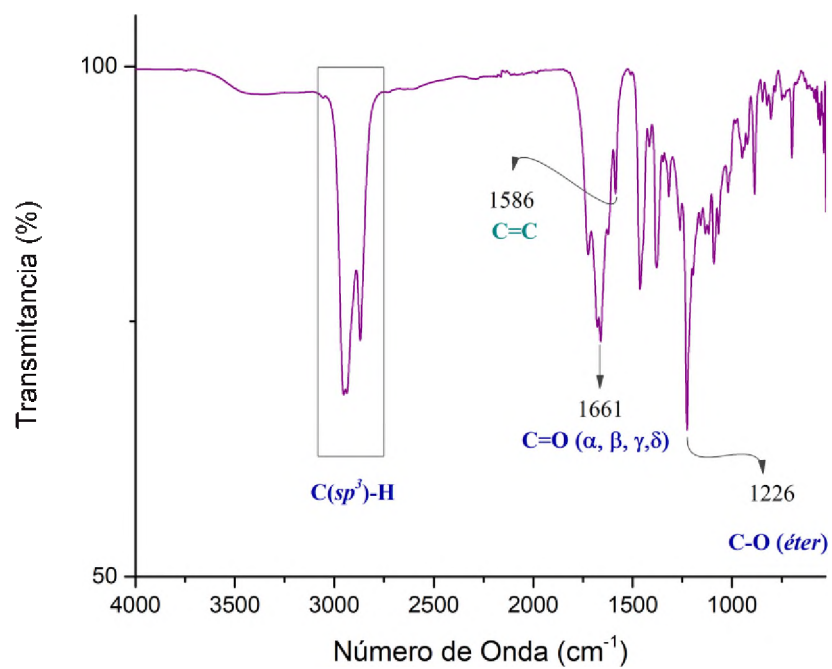


Figura 37. Espectro de IR del compuesto **73b**.

11.3. 6-etoxi-24-Etilcolest-4,6-eno-3-ona (73c)

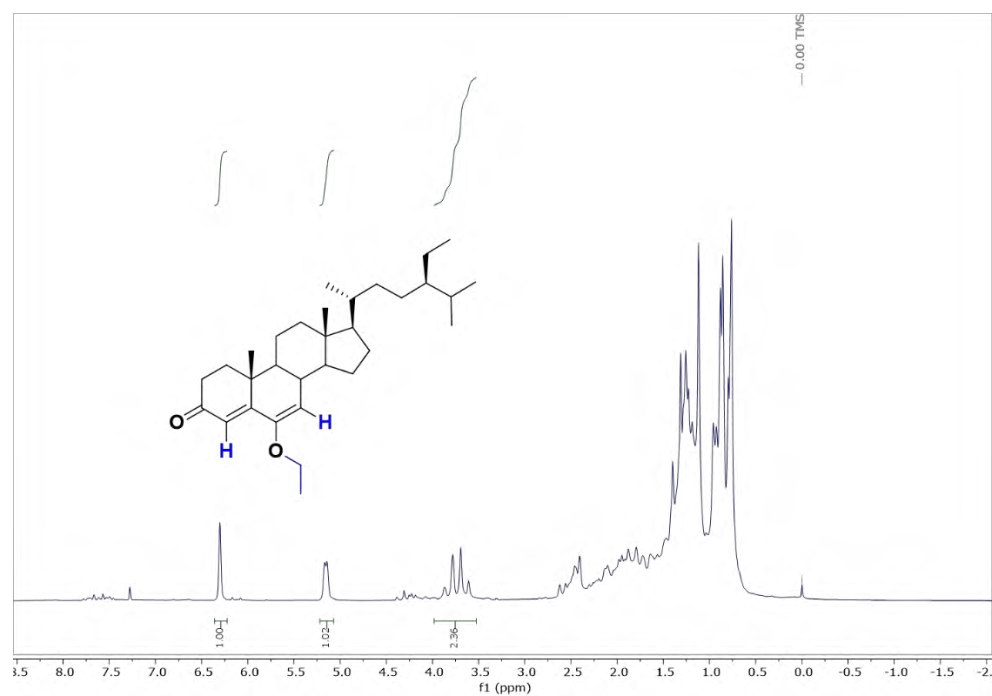


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 73c.

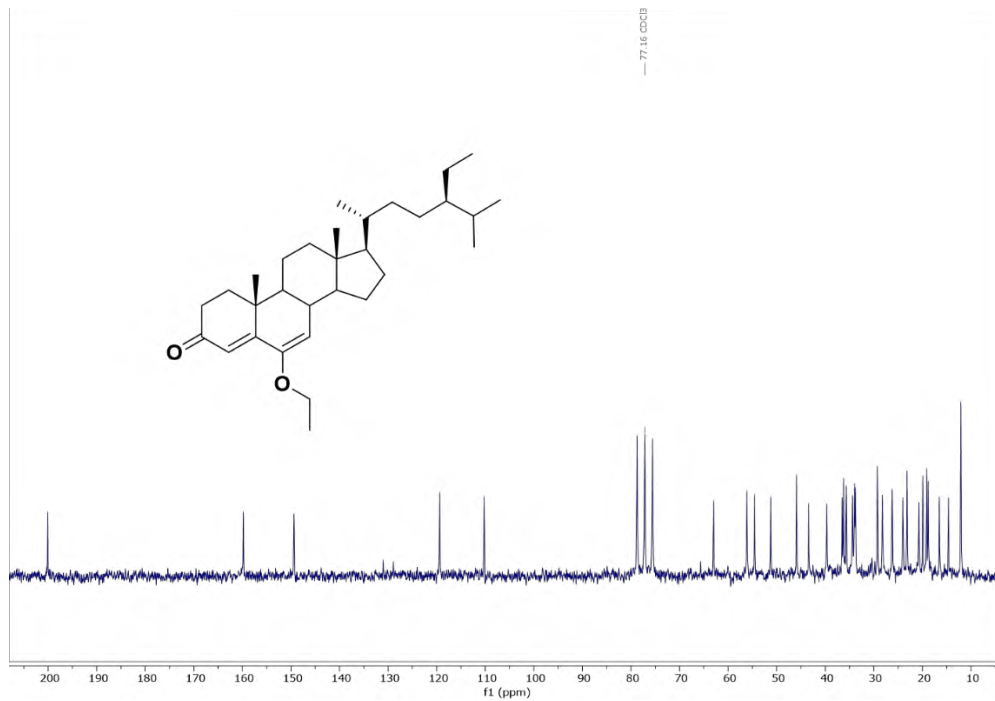


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 73c.

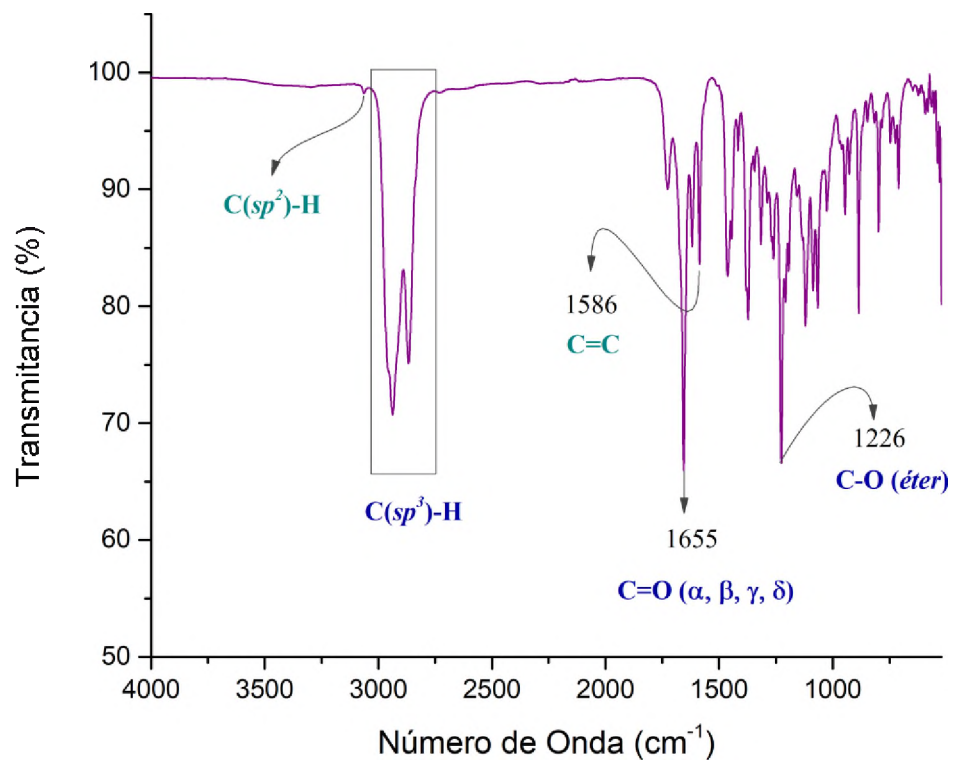


Figura 40. Espectro de IR del compuesto **73c**.

12. REFERENCIAS

-
- [1] Reynoso-Noverón, N.; Torres-Domínguez, J. A. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Journal of Behavioral Medicine*. **2018**, *8*, 9-15. <https://www.redalyc.org/pdf/2830/283059952003.pdf>
- [2] World health organization. International agency for research on cancer. Global cancer observatory (GLOBOCAN) Available from URL: <https://gco.iarc.fr/>
- [3] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. **2021**, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [4] Revisado en: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/guia-actualizada/163-informacion-al-publico-guia-de-tratamientos/hormonoterapia/1031--el-cancer-es-una-enfermedad-hormonodependiente>
- [5] Goldman, A. Manual de enfermería oncológica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: *Instituto Nacional del Cáncer*. 2014, 85.
- [6] Poirier. New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens. *Drug Devel. Res*. **2008**, *69*, 304-318. <https://doi.org/10.1002/ddr.20263>
- [7] Padma, V. V. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*. **2015**, *5*, 1-6. doi:10.7603/s40681-015-0019-410.7603/s40681-015-0019-4
- [8] Roleira, F. M.F.; Costa, S. C.; Gomes, A. R.; Varela, C. L.; Amaral, C.; Augusto, T. V.; Correia-da-Silva, G.; Romeo, I.; Costa, G.; Alcaro, S.; Teixeira, N.; Tavares-da-Silva, E. J. Design, synthesis, biological activity evaluation and structure-activity relationships of new steroidal aromatase inhibitors. The case of C-ring and 7 β substituted steroids. *Bioorg. Chem*. **2023**, *131*. 106-286. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106286>.
- [9] Aggarwal, S.; Thareja, S.; Verma, A.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. An overview on 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*. **2010**, *75* (2), 109-153. doi: 10.1016/j.steroids.2009.10.005. PMID: 19879888.
- [10] Salvador, J. A.; Carvalho, J. F.; Neves, M. A.; Silvestre, S. M.; Leitão, A. J.; Silva, M. M.; Sá e Melo, M. L. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Natural product reports*. **2013**, *30*(2), 324–374. <https://doi.org/10.1039/>.
- [11] Numazawa, M.; Shelangouski, M.; Nagasaka, M. Probing the binding pocket of the active site of aromatase with 6-ether or 6-ester substituted androst-4-ene-3,17-diones and their diene and triene analogs. *Steroids*. **2000**, *65*(12), 871–882. doi:10.1016/s0039-128x(00)00169-0
- [12] Amr, Ael-G.; Abdel-Latif N.A.; Abdalla, M. M. Synthesis of some new testosterone derivatives fused with substituted pyrazoline ring as promising 5 α -reductase inhibitors. *Acta Pharmaceutica*. **2006**, *56*(2), 203-218. PMID: 16613726.
- [13] Adhya, D.; Annuario, E.; Lancaster, M. A.; Price, J.; Baron-Cohen, S.; Srivastava, D. P. Understanding the role of steroids in typical and atypical brain development: Advantages of using a “brain in a dish” approach. *Journal of Neuroendocrinology*. **2018**, *30*(2). <https://doi:10.1111/jne.12547>
- [14] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. "Steroid hormone." *Encyclopedia Britannica*. **2022**. <https://www.britannica.com/science/steroid-hormone>.
- [15] Kime, D. E. The steroids. fundamentals of comparative vertebrate endocrinology. *Springer Science*. **1987**, 3–56. https://doi:10.1007/978-1-4899-3617-2_1
- [16] McKay L.I.; Cidlowski J.A. Physiologic and pharmacologic effects of corticosteroids. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): *BC Decker*. **2003**. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13780/>

- [17] Moss, G. P. Nomenclature of steroids (Recommendations 1989). *Pure and Applied Chemistry*. **1989**, 61(10), 1783–1822. <https://doi:10.1351/pac198961101783>
- [18] Verkade, P. E.; Hoffmann-Ostenhof, O. IUPAC-IUB revised tentative rules for nomenclature of steroids. *Journal of Organic Chemistry*. **1969**, 34(6), 1517–1532. <https://doi:10.1021/jo01258a001>
- [19] Kumar, D.; Kumar, V.; Jalwal, P. Systemic nomenclature of Steroids [Cyclopentaphenanthrene ring] their derivatives -An Overview. *International Journal of Chemical Studies*. **2016**, 4(3), 124-132.
- [20] Kasal, A. Structure and nomenclature of steroids. *Steroid Analysis*. **2010**, 1–25. https://doi:10.1023/b135931_1
- [21] Courtois, B. *Ann. Chim.* **1813**, 88, 304.
- [22] Nguyen, T. B. Elemental sulfur and molecular iodine as efficient tools for Carbon-Nitrogen bond formation through Redox reactions. *Asian Journal of Organic Chemistry*. **2017**, 6(5), 477–491. <https://doi:10.1002/ajoc.201700011>
- [23] Togo, H.; Iida, S. Synthetic use of molecular iodine for organic synthesis. *Synlett*. **2006**, (14), 2159–2175. <https://doi:10.1055/s-2006-950405>
- [24] U-Tekale, S.; S-Kauthale, S.; A-Dake, S.; R-Sarda, S.; P-Pawar, R. Molecular iodine: an efficient and versatile reagent for organic synthesis. *Current Organic Chemistry*. **2012**, 16(12), 1485-1501. <https://doi:10.2174/138527212800672574>
- [25] Banerjee, A.; Vera, W.; Mora, H.; Laya, M. S.; Bedoya, L.; Cabrera, E. V. Iodine in organic synthesis. *Journal of Scientific & Industrial Research*. **2006**, 65, 293–308.
- [26] Mphahlele, M. J. Molecular Iodine—An expedient reagent for oxidative aromatization reactions of α,β -unsaturated cyclic compounds. *Molecules*. **2009**, 14(12), 5308–5322. <https://doi:10.3390/molecules14125308>
- [27] Phukan, P. Iodine as an extremely powerful catalyst for the acetylation of alcohols under solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters*. **2004**, 45(24), 4785–4787. <https://doi:10.1016/j.tetlet.2004.04.076>
- [28] Marsh, D. A.; Brodie, H. J.; Garrett, W.; Tsai-Morris, C. H.; Brodie, A. M. H. Aromatase inhibitors. Synthesis and biological activity of androstenedione derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1985**, 28(6), 788–795. <https://doi:10.1021/jm00383a017>
- [29] Cabeza, M.; Gutiérrez, E.; Miranda, R.; Heuze, I.; Bratoeff, E.; Flores, G.; Ramírez, E. Androgenic and anti-androgenic effects of progesterone derivatives with different halogens as substituents at the C-6 position. *Steroids*. **1999**, 64(6), 413–421. [https://doi:10.1016/s0039-128x\(99\)00018-5](https://doi:10.1016/s0039-128x(99)00018-5)
- [30] Ramirez, E.; Cabeza, M.; Heuze, I.; Gutiérrez, E.; Bratoeff, E.; Membrillo, M.; Lira, A. Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-Methyl Pregnane derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2002**, 50(1), 15–20. <https://doi:10.1248/cpb.50.15>
- [31] Pérez-Ornelas V.; Cabeza M.; Bratoeff E.; Heuze I.; Sánchez M.; Ramírez E.; Naranjo-Rodríguez E. New 5 α -reductase inhibitors: in vitro and in vivo effects. *Steroids*. **2005**, 70(3), 217-224. <https://doi:10.1016/j.steroids.2004.11.008>. PMID: 15763601.
- [32] Ehrenstein, M. Acetolysis of the stereoisomeric 5,6-oxides and preparation of the acetates of 4-androstene-3, 17-dione-6(α)-ol and 6(α)-hydroxy-11-desoxycorticosterone. *Journal of Organic Chemistry*. **1941**, 06(4), 626–646. <https://doi:10.1021/jo01204a016>.
- [33] Sollman, P.; Dodson, R. Alkoxylation of steroids with cupric bromide: Alcohol. *Journal of Organic Chemistry*. **1961**, 26(10), 4180–4181. <https://doi:10.1021/jo01068a650>
- [34] Geng, X.; Mague, J. T.; Pascal, R. A. Synthesis and chiroptical properties of arylimines of cholest-4-ene-3,6-dione. *Journal of Organic Chemistry*. **2012**, 77(23), 10920–10924. <https://doi:10.1021/jo301591g>
- [35] Mori, H. Synthesis of 6-alkoxy-3-Oxo-4,6-diene steroidal hormones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1961**, 9, 328-332. <https://doi.org/10.1248/cpb.9.328>
- [36] Campbell, A.; Babcock, J. C. The synthesis of some 7 α - and 7 β -methyl steroid hormones. *Journal of the American Chemical Society*. **1959**, 81, 4069–4074. <https://doi.org/10.1021/ja01524a063>.

- [37] Ran, H. L.; Huang, S. Z.; Wang, H.; Yang, L.; Gai, C. J.; Duan, R. J.; Dai, H. F.; Guan, Y. L.; Mei, W. L. Cytotoxic steroids from the stems of *Strophanthus divaricatus*. *Phytochemistry*. **2023**, *210*, 113–668. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113668>
- [38] Li, J.; Tao, H.; Lei, X.; Zhang, H.; Zhou, X.; Liu, Y.; Yang, B. Arthriniosteroids A–D, four new steroids from the soft coral-derived fungus *Simplicillium lanosoniveum* SCSIO41212. *Steroids*. **2021**, *171*, 108831, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108831>
- [39] Pranata, A.; Yamada, S.; Weththasinghe, S.; Caldwell, K.; Zahra, P. W.; Karamatic, S. L.; Gardiner, M. G.; McLeod, M. D. The in vivo metabolism of Jungle Warfare in greyhounds. *Steroids*. **2023**, 109–150. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109150>.
- [40] Barradell, L. B.; Faulds, D. Cyproterone. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in prostate cancer. *Drugs & Aging*. **1994**, *5*(1), 59–80. <https://doi.org/10.2165/00002512-199405010-00006>.
- [41]. Núñez-López, S. Tesis de maestría UNPA **2022**.
- [42] Togo, H.; Iida, S. Synthetic use of molecular iodine for organic synthesis. *Synlett*. **2006**, (14), 2159–2175. <https://doi.org/10.1055/s-2006-950405>
- [43] Domingo, V.; Prieto, C.; Silva, L.; Rodilla, J. M. L.; Quílez del Moral, J. F.; Barrero, A. F. Iodine, a mild reagent for the aromatization of terpenoids. *Journal of Natural Products*. **2016**, *79*(4), 831–837. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00914>
- [44] Küpper, F. C.; Feiters, M. C.; Olofsson, B.; Kaiho, T.; Yanagida, S.; Zimmermann, M. B.; Kloo, L. Commemorating two centuries of iodine research: An interdisciplinary overview of current research. *Angewandte Chemie International Edition*. **2011**, *50*(49), 11598–11620. <https://doi.org/10.1002/anie.201100028>
- [45] Jereb, M.; Vražič, D.; Zupan, M. Iodine-catalyzed transformation of molecules containing oxygen functional groups. *Tetrahedron*. **2011**, *67*(7), 1355–1387. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.11.086>
- [46] Sun, J.; Dong, Y.; Cao, L.; Wang, X.; Wang, S.; Hu, Y. Highly efficient chemoselective deprotection of *O,O*-acetals and *O,O*-ketals catalyzed by molecular iodine in acetone. *Journal of Organic Chemistry*. **2004**, *69*(25), 8932–8934. <https://doi.org/10.1021/jo0486239>
- [47] Vaino, A. R.; Szarek, W. A. A mild and efficient method for the deprotection of tert-butyltrimethylsilyl ethers using iodine in methanol. *Chemical Communications*. **1996**, *20*, 2351. <https://doi.org/10.1039/cc9960002351>
- [48] Yadav, J. S.; Satyanarayana, M.; Raghavendra, S.; Balanarsaiah, E. Chemoselective hydrolysis of terminal isopropylidene acetals in acetonitrile using molecular iodine as a mild and efficient catalyst. *Tetrahedron Letters*. **2005**, *46*(50), 8745–8748. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.10.043>
- [49] Hunter, A. C.; Priest, S.-M. An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3,6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3 β -ols using a modified Jones oxidation methodology. *Steroids*. **2006**, *71*(1), 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.07.007>
- [50] Xiao, T.; Cheng, X.; Huang, J.; Guo, Z.; Tao, L.; Shen, X. Bioactive substances inhibiting COX-2 and cancer cells isolated from the fibrous roots of *Alangium chinense* (Lour.) Harms. *RSC Adv*. **2023**, *26*;13(5), 3346–3363. <https://doi.org/10.1039/d2ra06931h>. PMID: 36756416.
- [51] Laurence, C.; Graton, J.; Berthelot, M.; El Ghomari, M. J. The diiodine basicity scale: Toward a general halogen-bond basicity scale. *Chemistry - A European Journal*. **2011**, *17*(37), 10431–10444. <https://doi.org/10.1002/chem.201101071>
- [52] Núñez-López, Samuel. Tesis de maestría UNPA **2019**.
- [53] Fernández-Herrera, M. A.; López-Muñoz, H.; Hernández-Vázquez, J. M. V.; López-Dávila, M.; Escobar-Sánchez, M. L.; Sánchez-Sánchez, L.; Pinto, B.M.; Sandoval-Ramírez, J. Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, *18*(7), 2474–2484. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.051>
- [54] Zeferino-Díaz, R.; Olivera-Castillo, L.; Dávalos, A.; Grant, G.; Kantún-Moreno, N.; Rodríguez-Canul, R.; Bernès S; Sandoval-Ramírez J.; Fernández-Herrera, M. A. 22-Oxcholestan oximes as

potential anti-inflammatory drug candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2019**, 68, 78-86.
doi: [https://10.1016/j.ejmech.2019.02.035](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.035).

[55] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. **1983**, 65(1-2), 55-63.
[https://doi:10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)