



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**“Síntesis de compuestos esteroidales espirostánicos y
colestánicos con actividad anabólica”**

que para obtener el título de
Licenciado en Biotecnología
presenta:

ABRAHAM CANELLA ZALETA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Guadalupe Hernández Linares

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gabriel Guerrero Luna

PUEBLA, PUEBLA. MARZO DE 2023.

ÍNDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Las oximas y su influencia en la actividad biológica.	14
2.2 Reactividad y actividad de oximas esteroidales.	15
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
5.1 Equipos y técnicas utilizadas	20
5.2 Disolventes y materias primas	22
5.3 Procedimientos generales. Preparación y elucidación de los derivados dicetónicos a partir de diosgenina	22
5.3.1 Oxidación selectiva de diosgenina	23
5.3.2 Formación de la Dioxima de la (25 <i>R</i>)-spirost-4-en-3,6-diona	25
5.3.2.1 Elucidación de (25 <i>R</i> , 3 <i>Z</i> , 6 <i>Z</i>)-dihidroxiiminoespirost-4-eno (3)	25
5.3.3 Apertura de cadena lateral de diosgenin-3,6-diona y purificación de productos 22-oxocolestánicos	26
5.3.3.1 Elucidación del derivado 22-oxocolest-4-en-26OH-3,6-diona 5a	27
5.3.3.2 Elucidación del derivado 22-oxocolest-2-en-26OAc-3,6-diona 5b	28
5.3.4 Apertura de la cadena lateral de diosgenin-3,6-diona (2) para conducir a derivados Pseudocolestánicos con Anhídrido Mixto (AATFA)	29
5.3.4.1 Elucidación del derivado Pseudodiosgenin-3,6-diona (6)	30
5.3.5 Formación de la Dioxima de la Pseudodiosgenin-3,6-diona	30
5.3.5.1 Elucidación de (3 <i>Z</i> , 6 <i>Z</i>)-Pseudodihidroxiiminoespirost-4-eno (7)	31

5.3.6	Apertura tipo Pseudo de la cadena lateral de la dioxima de la diosgenin-3,6-diona	32
5.3.6.1	Elucidación de (3Z, 6Z)-Pseudodihidroxiiminoespirost-4-eno (7)	33
5.4	Procedimiento general. Reacciones en Microrreactor de Flujo Continuo Syrris	33
5.4.1	Apertura de cadena lateral de 3,6 diona de diosgenina mediante reacción de flujo continuo y purificación de productos	33
5.4.1.1	(25R)-22-oxocolest-4-en-26-hidroxi-3,6-diona (5a)	35
5.4.1.2	Diacetato de 22-oxocolest-26OH-3b,16b-diil-2,4-dien-6-ona (8)	35
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
6.1	Formación de oximas en posiciones 3 y 6	39
6.2	Apertura del espiroacetal de derivados 3,6-oxidados	43
6.3	Reacción de condensación para la obtención de la dioxima de la 16,26-diacetoxi-22-oxocolest-4-en-3-ona (4)	50
6.4	Uso de flujo continuo para la apertura de la cadena lateral de 3,6-dioxoespirostanos	56
6.5	Apertura de la cadena lateral de diosgenin-3,6-diona (2) y diosgenin-3,6-dioxima (3) para conducir a derivados Pseudocolestánicos con Anhídrido Mixto (AATFA)	60
7.	CONCLUSIONES	65
8.	REFERENCIAS	67

El presente trabajo de tesis de licenciatura ha sido llevado a cabo en el Laboratorio de Investigación del Jardín Botánico Universitario de la BUAP, con la dirección de la Dra. María Guadalupe Hernández Linares y la codirección del Dr. Gabriel Guerrero Luna. Agradezco al CONACyT el apoyo como asistente de investigación nivel I (No. de becario: 31823) del proyecto Ciencia de Frontera 2019 No.171508, y al ICUAP las facilidades para llevar a cabo esta tesis.



El trabajo de tesis que a continuación se describe, se presentó en los siguientes foros académicos:

1. **RSCPoster Twitter Conference 2023** que tuvo lugar en la plataforma Twitter el 28 de febrero, con el poster titulado:
Heterosteroids and precursors: *in silico* approach and evaluation of their anabolic activity. Autores: Gabriel Guerrero Luna, Linda Fabiola Pérez Pérez, Abraham Canella, Edgar Limón, Adrián Mendoza, Raisa Oves, Amairani Domínguez, Pedro Pablo González, Maura Cardenas García, Sylvain Bernès, Ma. Guadalupe Hernández Linares.
2. **LatinXChem Twitter Conference 2022** que se llevó a cabo el 28 de noviembre, con el poster titulado:
Apertura selectiva del espirocetal sapogenínico por flujo continuo.
Autores: Abraham Canella Zaleta, Gabriel Guerrero Luna, María Guadalupe Hernández Linares.
3. **XVII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica (AMQO)**, en modalidad presencial en la ciudad de Puebla, del 23 al 26 de agosto de 2022, con la presentación del siguiente trabajo:
Obtención de 22-oxoesteroides por química de flujo continuo.
Autores: Abraham Canella Zaleta, Gabriel Guerrero Luna, María Guadalupe Hernández Linares.

Resumen.

Las saponinas y las sapogeninas que se obtienen por hidrólisis de los carbohidratos, han sido ampliamente estudiadas debido a que demuestran tener diversas aplicaciones biológicas de interés, con un alto valor agregado al ser el material de partida en la creación de productos con diversas aplicaciones en ramas de medicina y la agroindustria, como los promotores de crecimiento vegetal conocidos como brasinoesteroides, hormonas de crecimiento vegetal cuya actividad primordial es hacer resistentes a las plantas ante el estrés biótico y abiótico. A partir de la estructura de la brasinólida se ha buscado continuamente la síntesis de análogos estructurales a fin de igualar o acercarse a la actividad que tiene la brasinólida como promotor del crecimiento vegetal. Las sapogeninas como la diosgenina, cuentan con la funcionalidad idónea para ser materia prima de partida en la síntesis parcial de brasinoesteroides y análogos con amplio potencial biológico, por lo que seguimos planificando la modificación a través de la síntesis química para obtener estructuras que presenten mayor especificidad en la acción farmacológica, a través de cambios en la estructura base de la molécula sin perder de vista la necesidad de la presencia de grupos funcionales en posiciones claves de los compuestos diana. De manera homóloga a la actividad biológica que presentan los brasinoesteroides en plantas, se ha encontrado mediante pruebas *in vivo* en animales que estos compuestos pueden propiciar aumento de la masa muscular. Esposito y col. demostraron que 28-homobrasinólida (**HB**) (Figura A), tiene baja o ninguna unión significativa al receptor de andrógenos, y al no modular los niveles de testosterona en plasma sugieren que **HB** puede ejercer su efecto anabólico través de un mecanismo independiente de andrógenos. (1)

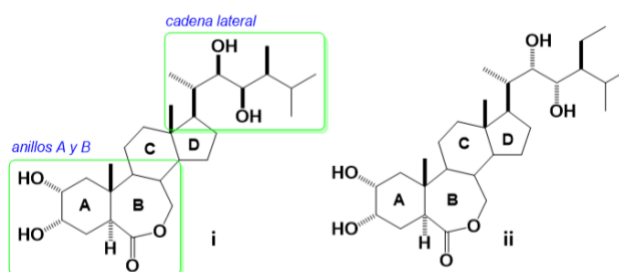


Figura A. Estructura de la 28-homobrasinólida

En este trabajo de tesis se aborda la obtención de análogos de brasinoesteroides (moléculas relacionadas estructuralmente) con potencial actividad anabólica. Realizamos la oxidación de la diosgenina para generar dicetonas y tricetonas tanto en el esqueleto como en la cadena lateral esteroidal, y concluir con la formación de las oximas en dichas posiciones (Figura B), en cantidades suficientes para el envío de muestras para la evaluación de la actividad en la síntesis y degradación de proteínas en líneas celulares de músculo esquelético, para registrar su actividad anabólica.

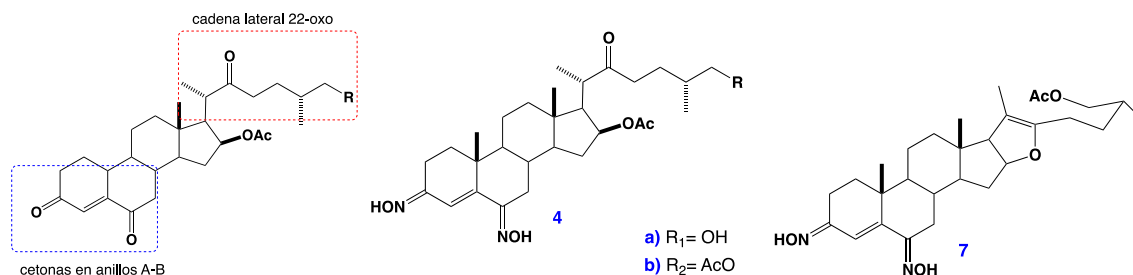


Figura B. Dicetona y dioximas generadas a partir de diosgenina

1. Introducción

Los esteroides son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza, donde se encuentran realizando diversas funciones biológicas y cuya estructura tridimensional es una fuente inagotable de una gran variedad de derivados de interés a diversos niveles. Los esteroides, por definición, son compuestos con un núcleo *ciclopenta[a]fenantreno* o un esqueleto derivado de éste que presenta modificaciones que provienen de alargamientos, rupturas o contracciones-expansiones de los anillos A-F.

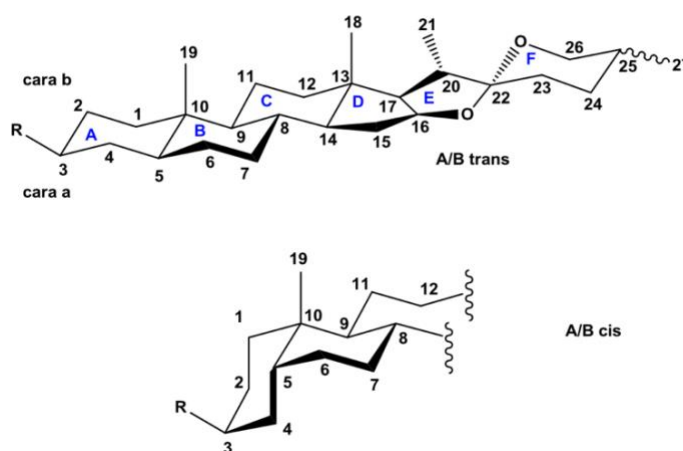


Figura 1. Numeración y fusión de anillos A-B de las sapogeninas esteroidales.

Los esteroides muy frecuentemente contienen grupos metilo en las posiciones C-10 y C-13 y un resto alquílico en la posición C-17 conocido como cadena lateral. ⁽²⁾ En la Figura 1, se aprecia la numeración sistemática para los esteroides dictada por la IUPAC; ⁽³⁾ donde es frecuente que estén presentes oxígenos en forma de cetonas o hidroxilos. ⁽⁴⁾ De las familias de esteroides (Figura 2), destacan por su importancia histórica las hormonas sexuales, y los antiinflamatorios esteroideos como la cortisona o la dexametasona, tan útil en la enfermedad pulmonar grave en COVID-19. ⁽⁵⁾

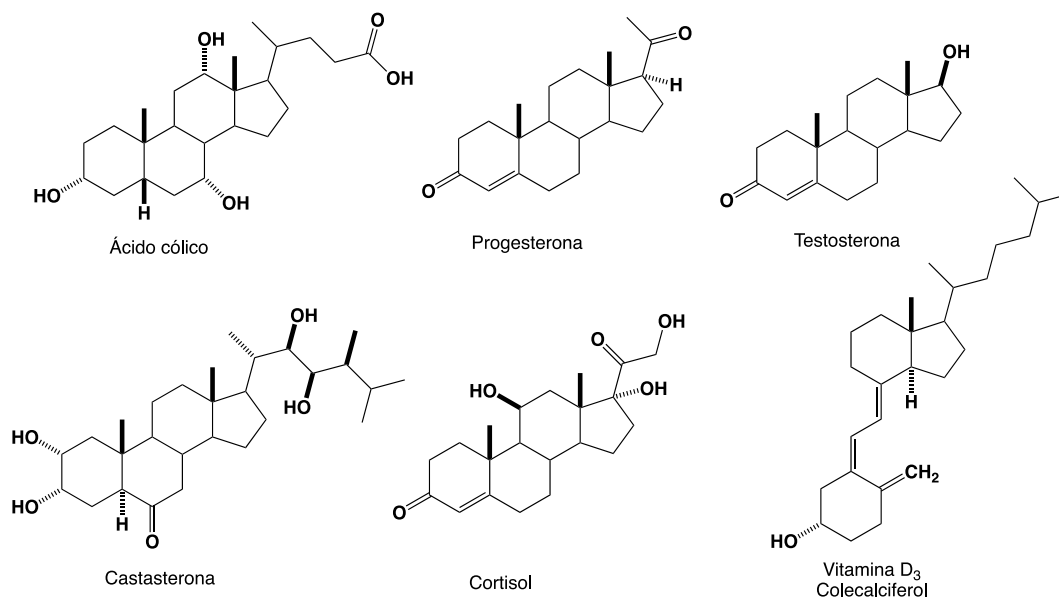
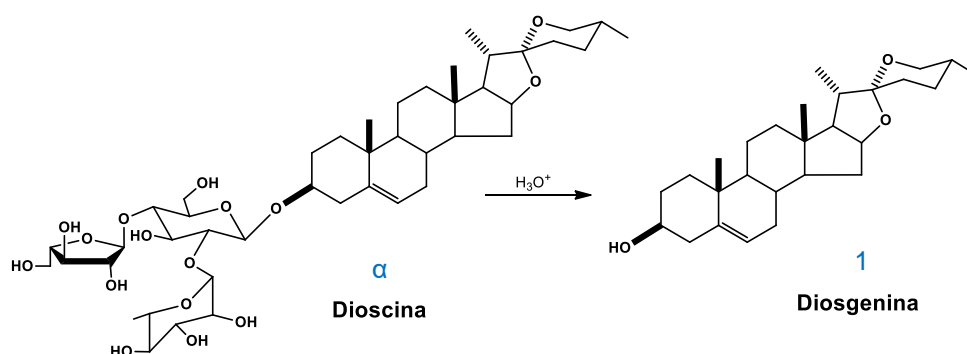


Figura 2. Principales familias de esteroides.

Sin embargo, dentro los esteroides más relevantes y útiles se encuentran las sapogeninas, conformadas por 27 átomos de carbono y se encuentran naturalmente en forma de glucósidos en plantas.⁽⁶⁾⁽⁷⁾ Las saponinas están conformadas una parte sacárida o glucosídica y otra sapogenínica llamada aglicona, de naturaleza triterpénica o esteroidal. En el Esquema 1 se muestra un ejemplo de saponinas esteroidales (dioscina, **1**), cuya hidrólisis ácida conduce a la obtención de diosgenina (**2**) (Esquema 1).



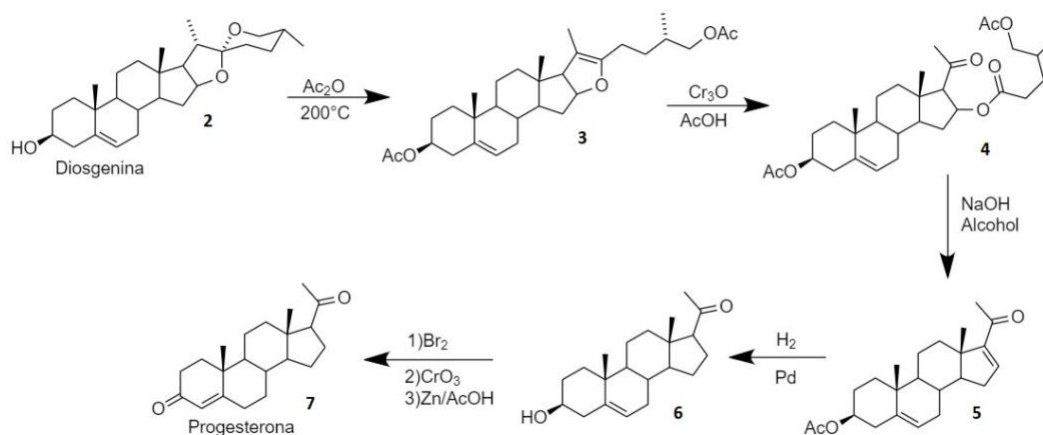
Esquema 1. Degradación de los carbohidratos de dioscina para obtener diosgenina.

Las saponinas y las sapogeninas que se obtiene por hidrólisis de los carbohidratos, han sido ampliamente estudiadas debido a que demuestran tener diversas aplicaciones biológicas de interés, con un alto valor agregado al ser el material de partida en la creación de productos con diversas aplicaciones en ramas de medicina y la agroindustria, como los promotores de crecimiento vegetal conocidos como brasinoesteroides (Castasterona, Figura 2). En este trabajo de tesis se abordará la obtención de análogos de brasinoesteroides (moléculas relacionadas estructuralmente) que se presumen tendrán actividad anabólica muscular, tópico que se aborda en los antecedentes.

2. Antecedentes.

La importancia de México en la química de los esteroides se remonta al siglo pasado, tuvo gran auge en los años 50's con la aparición de la empresa Syntex, la cual se creó y especializó en la producción de hormonas esteroidales, convirtiéndose en líder de la producción y exportación de estos compuestos.⁽⁸⁾ El problema al que se enfrentaba la industria química mundial en los años 1930's para obtener esteroides en cantidades suficientes fue clave; el costo de la progesterona a finales de esa década era de 80 dólares el gramo, un costo muy fuera del alcance de la población; era imperativo la necesidad de obtención de hormonas en cantidades suficientes y de buena calidad, pero los procesos de producción -que estaban poco desarrollados- favorecían los costos muy elevados, con procesos complejos de rendimientos bajos que ocupaban las compañías europeas.⁽⁹⁾

Al final de 1939, Russel Marker, emprendió la búsqueda de un tubérculo de la familia *Dioscorea* para la obtención de esteroides que sirvieran de precursores para la síntesis de progesterona. En el sureste de México, encontró y se dedicó a recolectar un tubérculo llamado "cabeza de negro", el cual tiene un alto contenido de diosgenina, que usó como precursor para la producción de progesterona, mediante la llamada "Degradación de Marker" (Esquema 2). La generación de progesterona a través de esa estrategia sintética resultó ser un éxito, redujo el costo de producción, aumentando la disponibilidad y ocasionó una revolución en la industria farmoquímica dando paso al auge de la química de los esteroides; de esta forma y con la colaboración de científicos mexicanos del Instituto de Química de la UNAM, se conformó la empresa Syntex en México.⁽¹⁰⁾



Esquema 2. Degradación de la cadena lateral de diosgenina ideada por R. Marker para obtener progesterona.

La empresa Syntex es un ejemplo de casos industriales donde los esteroides tuvieron un papel preponderante a nivel industrial y en la investigación, con una gran influencia en el área de la salud, investigaciones tan importantes que sirvieron de inspiración para ampliar los conocimientos sobre compuestos esteroidales, que como es sabido, han tenido aplicaciones en diversos rubros.

Otros esteroides de gran interés son los brasinoesteroides (BS), que son derivados polihidroxiados que producen en pequeñas cantidades las plantas, con un esqueleto 5α -colestano, similares en su estructura a las hormonas esteroidales animales derivadas del colesterol, y ecdisteroides en insectos. Son capaces de regular los fenómenos fisiológicos de crecimiento, estimulación de la elongación y división celular y cambios en los potenciales de las membranas.⁽¹¹⁾ Se encuentran en niveles bajos en el polen, semillas, hojas, y los tejidos vegetativos jóvenes de todo el reino vegetal. En 1979, científicos estadounidenses lograron el aislamiento de la lactona esteroidal brasinólida (Figura 3), obteniendo tan solo 4 mg a partir de 40 kg de polen de *Brassica napus* L. que conocemos como canola.⁽¹²⁾

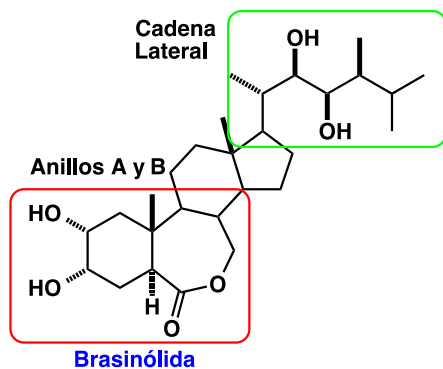
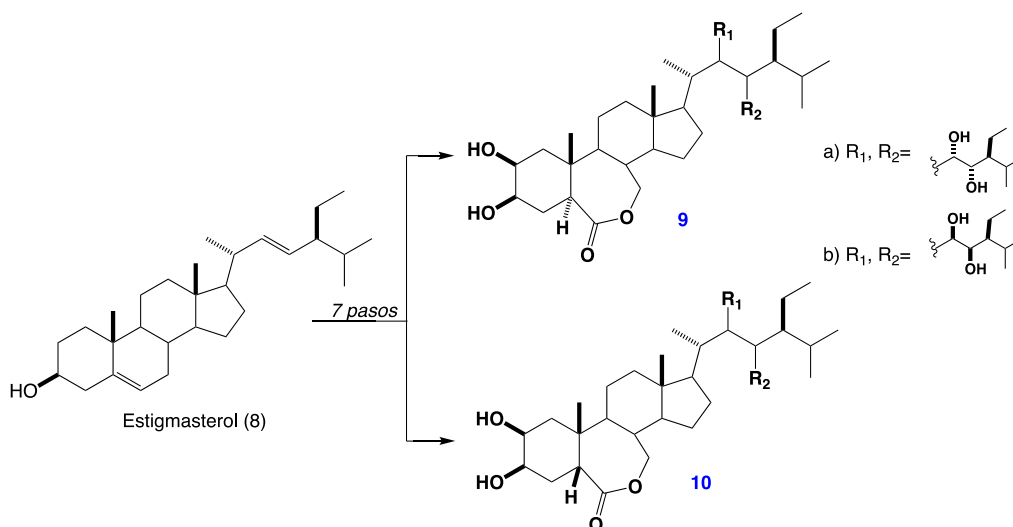


Figura 3. Grupos funcionales importantes para la bioactividad de los Brasinoesteroides (BS) (izquierda). Flor de *Brassica napus*, canola (derecha).

Hasta la fecha se han aislado de fuentes naturales, poco más de setenta esteroides funcional y estructuralmente relacionados con la brasinólida. La función de los BS en la elongación celular es similar a las hormonas esteroidales en los animales, activan la expresión de genes específicos cuyos productos proteicos regulan las respuestas fisiológicas complejas involucradas en el crecimiento, generalmente a través de interacciones con otras hormonas.

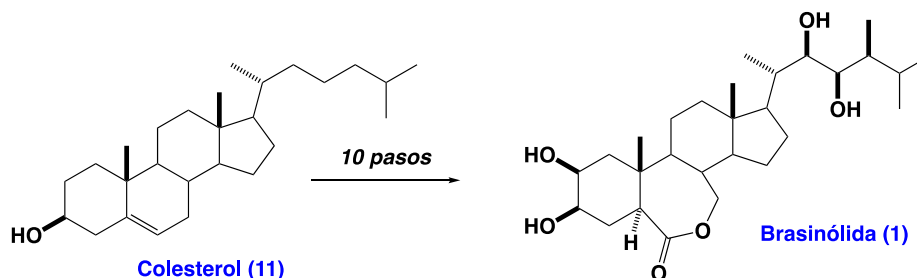
A partir de la estructura de la brasinólida se ha buscado continuamente la síntesis de análogos estructurales a fin de igualar o acercarse a la actividad que tiene la brasinólida como promotor del crecimiento vegetal. Las sapogeninas como la diosgenina, cuentan con la funcionalidad idónea para ser materia prima de partida en la síntesis parcial de brasinoesteroides y análogos con amplio potencial biológico.

De los primeros reportes en la literatura, se encuentra el de Carme Brosa y colaboradores, un grupo pionero en la obtención de brasinoesteroides sintéticos, que en 1996 sintetizaron análogos a la brasinólida a partir de estigmasterol (**8**), los cuales contrastaron con la brasinólida usando la prueba de lámina de arroz (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de homólogos de brasinólida a partir de estigmasterol.

Fujioka y col. ⁽¹³⁾ reportaron estrategias sintéticas para la obtención de la brasinólida a partir de colesterol para obtener cantidades suficientes y evitar la extracción de fuentes naturales, mediante la ruta de síntesis que se observa en el Esquema 4. Realizaron además la evaluación de los intermediarios con la prueba de la lámina de arroz, observando una mayor actividad conforme los precursores se asemejan estructuralmente a la brasinólida (**32**), sin poder superar el efecto de ésta.



Esquema 4. Síntesis de la brasinólida por Fujioka y colaboradores.

La transformación de la cadena espirocetálica para obtener análogos de brasinoesteroides ha sido una de las primordiales estrategias en la obtención de novedosos compuestos con gran potencial de actividad biológica como promotor de crecimiento vegetal. En nuestro grupo hemos reportado los resultados para generar nuevos análogos con potencial actividad biológica, conduciendo a la obtención de nuevos promotores de crecimiento vegetal (nPCV) a partir de diosgenina (**2**) ⁽¹⁴⁾ y

otras sapogeninas ⁽¹⁵⁾ en rendimientos moderados, que han dado excelentes resultados *in vitro* y en campo (Figura 4).

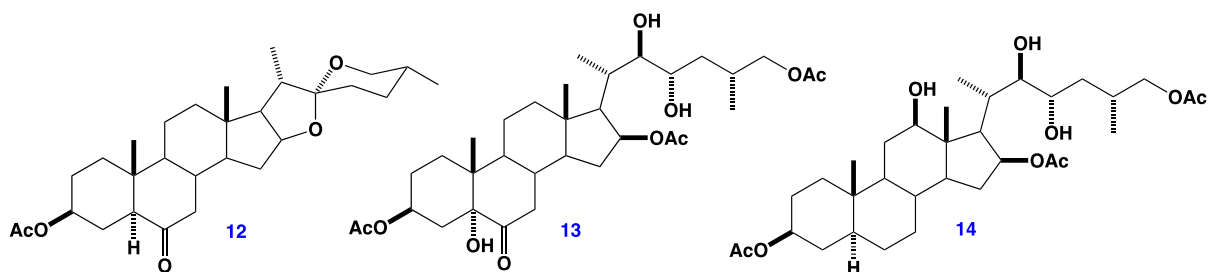


Figura 4. Análogos de brasinoesteroides y nPVC sintetizados.

Un gran número de compuestos actualmente reportados en la literatura poseen actividad promotora del crecimiento vegetal, pero su preparación involucra largos caminos sintéticos, lo cual limita su disponibilidad.

2.1 Las oximas y su influencia en la actividad biológica.

Las oximas son un intermediario sintético importante para acceder a otros grupos funcionales de relevancia biológica, como carbonilo, amino, nitro y ciano; además, son ideales para la obtención de compuestos heterocíclicos, explotando su transformación a óxidos de nitrilo o nitrosoalquenos, intermediarios reactivos que junto con alquenos o alquinos conducen a isoxazoles y 1,2-oxazinas.⁽¹⁶⁾ Gran variedad de compuestos que contienen el fragmento oxima o la función éter de oxima muestran gran variedad de actividades biológicas como la antiinflamatoria,⁽¹⁷⁾ antifúngica (Figura 5), antibacteriana, anticancerígena¹⁸ y antiviral por mencionar las más relevantes.⁽¹⁹⁾

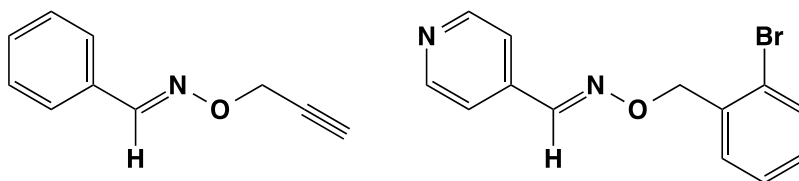


Figura 5. Oximas aromáticas con actividad antifúngica.⁽²⁰⁾

2.2 Reactividad y actividad de oximas esteroidales.

La influencia de las oximas en moléculas biológicamente activas se ha aprovechado en los últimos años por diversos grupos de investigación;⁽²¹⁾ las oximas esteroidales se han utilizado en la generación de rearrreglos moleculares y para generar amidas y nitrilos.⁽²²⁾ La introducción de oximas en los esteroides ha demostrado ser responsable de la actividad biológica, como en la oxima **16** obtenida a partir del β -sitosterol (**15**), que presenta actividad citotóxica y actividad potencial contra el virus de la hepatitis B al inhibir a la retrotranscriptasa (pol/RT) viral⁽²³⁾ (Figura 6).

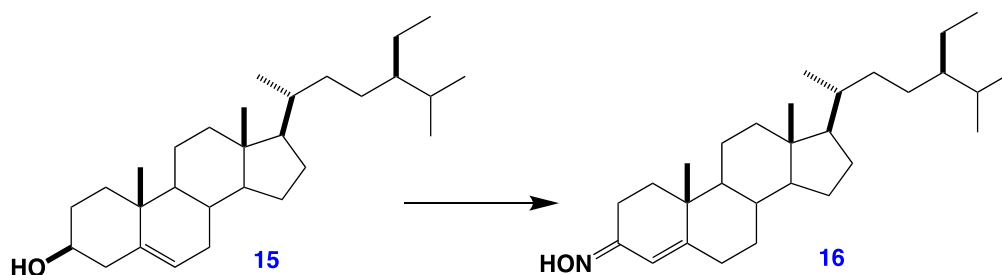
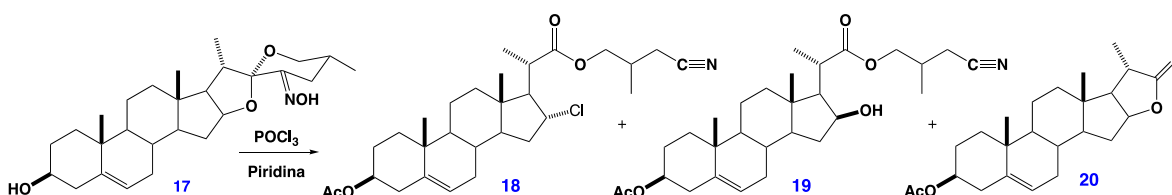


Figura 6. Obtención de la oxima del β -sitosterol.

Está reportado que cetoximas tratadas con POCl_3 para obtener el rearrreglo de Beckmann, conducen a la amida o la lactama, y generan subproductos que dan lugar a una fisión generando compuestos nitrilo y una imina; esta reacción secundaria es conocida como Reordenamiento Anormal de Beckmann (RAB). La fragmentación puede ser la reacción principal en los casos donde se forme un carbocatión estable,⁽²⁴⁾ como se puede analizar en el mecanismo propuesto incluido en el reporte de Sandoval⁽²⁵⁾ y colaboradores, donde reportan la modificación del espirocetal de diosgenina (**2**), obteniendo la 23-hidroxiiminodiosgenina (**17**), la cual reaccionó con POCl_3 con piridina dando el RAB por escisión del espirocetal generando derivados 23, 24-bisnorcolánicos (**18-20**, Esquema 5).



Esquema 5. Derivados 23, 24-bisnorcol-5-énicos obtenidos por RAB de 23-hidroxiiminodiosgenina

Son diversos los grupos de investigación que han explorado la síntesis y evaluación de los efectos de los BS y sus análogos en modelos animales ⁽²⁶⁾, y han reportado que algunos BS naturales poseen actividad antiviral ⁽²⁷⁾ y anticancerígena ⁽²⁸⁾ importante. De forma similar a la actividad biológica que muestran los BS en las plantas, se han revelado efectos muy similares en animales en pruebas *in vivo*, en el aumento de la masa muscular *in vitro e in vivo*; la Figura 6 nos muestra una comparación de estructuras de brasinoesteroides naturales y la testosterona.

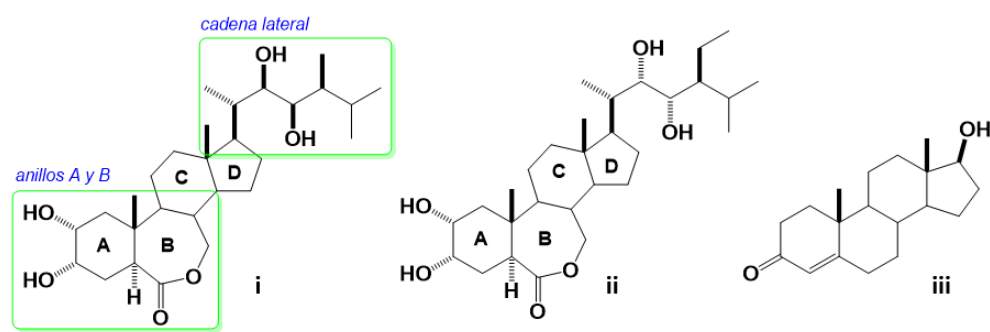


Figura 6. Comparativa de estructuras de brasinoesteroides naturales (i-ii) y testosterona (iii).

En relación a esto, es sabido del efecto promotor del crecimiento en plantas por la 28-homobrasinólida (ii), y que éste se asocia con el aumento de la síntesis de péptidos de ácidos nucleicos y como consecuencia, de proteínas. Además, el brasinoesteroide ii activa la vía de la síntesis total de proteínas, inducida por la polisíntesis de nuevos ácidos nucleicos, y el aumento de la termotolerancia de la síntesis total de proteínas en plantas sometidas a choque térmico.⁽²⁹⁾ Es importante subrayar que todos los esteroides anabólicos reportados hasta ahora, tienen efecto androgénico, debido a que estimulan el crecimiento y la función del sistema reproductivo, aunque éstos varían en el balance anabólico/androgénico, puntualizando que ninguno de los fármacos disponibles comercialmente es puramente anabólico.⁽³⁰⁾

Sin embargo, Exposito y col. demostraron que **ii** tiene baja o ninguna unión significativa al receptor de andrógenos, y al no modular los niveles de testosterona en plasma sugieren que **ii** puede ejercer su efecto anabólico través de un mecanismo independiente de andrógenos. A pesar de que tanto **ii** y los andrógenos contienen el esqueleto básico esteroidal, existen importantes diferencias estructurales que distinguen a las dos clases de compuestos, incluyendo la lactona en C-6/C-7, los 2 hidroxilos en C-2 y C-3, y la sustitución del metilo en C-24. Estas diferencias químicas pueden restringir a **ii** de la activación del receptor de andrógenos nuclear y explicar la diferencia en las respuestas farmacológicas.

En la mayoría de los reportes de síntesis de brasinoesteroides, el trabajo está centrado en la funcionalización del esqueleto o la cadena lateral; en este tema de tesis se abordarán ambos caminos sintéticos en pocos pasos, para dar alternativas de obtención en cantidades suficientes para su aplicación en estudios *in vitro*. Dada la importancia de la identificación de nuevos agentes que actúan en el crecimiento muscular, el desarrollo y/o regeneración ⁽³¹⁾ con posible aplicación terapéutica, estamos tratando de explorar los efectos de los análogos de BS obtenidos a partir de diosgenina en cantidades suficientes para su evaluación en la síntesis y la degradación de las proteínas en líneas celulares de cultivo primario humano.

3. Hipótesis

- La implementación de oxidaciones controladas permitirá obtener cetonas en sitios estratégicos del esteroide, que serán la materia prima en la obtención de oximas.
- El uso de química de flujo continuo afectará positivamente la selectividad de en la apertura del espirocetal y, por consecuencia, reducirá la formación de subproductos.
- La solubilidad de los productos e intermediarios será afectada por la presencia de los grupos polares que se incluyen en la molécula.
- La presencia de cetonas y oximas en las moléculas promoverá el aumento de la actividad biológica, generando efectos similares en el aumento de biomasa en mamíferos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Diseñar y sintetizar nuevos derivados cetónicos e hidroximínicos por modificación de los anillos A-B y la cadena lateral de diosgenina.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Transformar de forma selectiva la cadena lateral de diosgenina para obtener nuevos derivados cetónicos 22-oxo, pseudo y espirocetálicos.
- 2) Transformar de forma selectiva los anillos A-B de diosgenina para conducir a nuevos derivados cetónicos en posiciones estratégicas con buenos rendimientos.
- 3) Realizar la transformación de los derivados cetónicos en las oximas y dioximas correspondientes.
- 4) Optimizar las metodologías propuestas mediante el uso de química de flujo continuo.
- 5) Elucidar las estructuras de los nuevos derivados esteroidales obtenidos mediante el empleo de los diferentes métodos espectroscópicos (RMN, IR).

5. Desarrollo Experimental

5.1 Equipos y técnicas utilizadas.

Puntos de Fusión

Los puntos de fusión fueron determinados por la técnica de capilar abierto en un equipo Melt Temp, utilizando la escala de grados Celsius y no fueron corregidos.

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se obtuvieron con un aparato Bruker Advance de 500 MHz para los espectros de ^1H y de ^{13}C . El disolvente que se utilizó fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y Metanol deuterado (CD_3OD) con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm (δ); las constantes de acoplamiento (J) están indicadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales de espectros de ^1H se abrevia de la siguiente manera: s: señal simple, sa: simple ancha, d: señal doble, t: señal triple, dc: doble de cuádruples y m: señal múltiple.

Espectroscopía de Infrarrojo

Fue utilizado un espectrofotómetro de Infrarrojo Agilent Cary 630 FTIR. Fueron empleadas las interfaces ATR con punta de diamante y DIAL PATH. La presencia de las bandas de transmitancia son expresadas en números de onda ν (cm^{-1}).

Polarimetría

La rotación óptica fue determinada en un polarímetro Perkin-Elmer 241 empleando soluciones clorofórmicas en una celda de 10 cm de longitud con la línea de emisión D del Na (= 589 nm) como referencia a temperatura ambiente. Las desviaciones levo- y dextrógiras se reportan con el valor de la concentración utilizada.

Microondas Focalizado

La síntesis asistida por irradiación de microondas focalizado (SIMF) se llevó a cabo en un microondas Anton Paar modelo Monowave 300 en un vial cerrado neumáticamente a presión, la presión y la potencia de salida entregada fueron monitoreados y graficados. La temperatura interna se midió con un sensor de infrarrojo. El enfriamiento del vial se llevó a cabo con aire seco comprimido. Los viales utilizados fueron de 10 y 30 mL de vidrio borosilicato con septa y fritas. Se examinaron diversos disolventes polares grado reactivo transparentes a las MW.

Micro-reactor de Flujo Continuo.

Las reacciones de química de flujo continuo fueron realizadas en un Microrreactor de Flujo Continuo modelo Asia marca Syrris con N₂ extraseco como gas acarreador y como atmósfera inerte.

Cromatografía

Para la cromatografía analítica en capa fina (CCF) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ de Macherey-Nagel, Alemania y como fase móvil sistemas de elución de acetato de etilo – éter de petróleo. Para su revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara de UV-GL-58) y por calcinación de las placas, previo tratamiento con ácido sulfúrico al 50%.

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, Alemania, de acuerdo a la técnica “flash” utilizando un sistema de eluyente de acetato de etilo – éter de petróleo en diversas proporciones.

La cromatografía automatizada se realizó en un equipo Selekt marca Biotage con detector de UV, con 2 canales de columna, con columnas precargadas de gel de

sílice de 200 a 400 mallas de 25 g. Se usaron sistemas de eluyente de acetato de etilo/ éter de petróleo en diversas proporciones.

5.2 Disolventes y Materias Primas.

Se partió de diosgenina (**1**) obtenida comercial mente de marca Sigma Life Science lote 129K1800V, a la cual se analizó a través de punto de fusión, cromatografía de placa fina (CCF), resonancia magnética nuclear (RMN) para demostrar la pureza, no fue necesaria su purificación posterior. Los reactivos fueron grado analítico y se utilizaron tal cual por no requerir purificación. Los disolventes se purificaron y secaron de acuerdo con las metodologías descritas en la literatura.
(32)

5.3 Procedimientos generales. Preparación y elucidación de los derivados dicetónicos a partir de diosgenina.

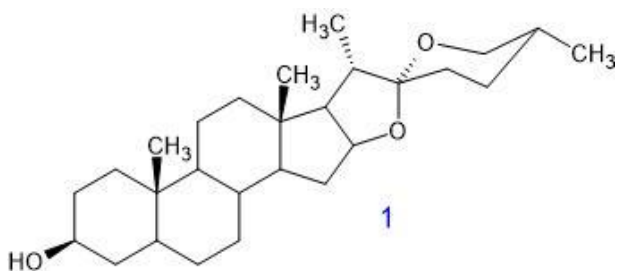
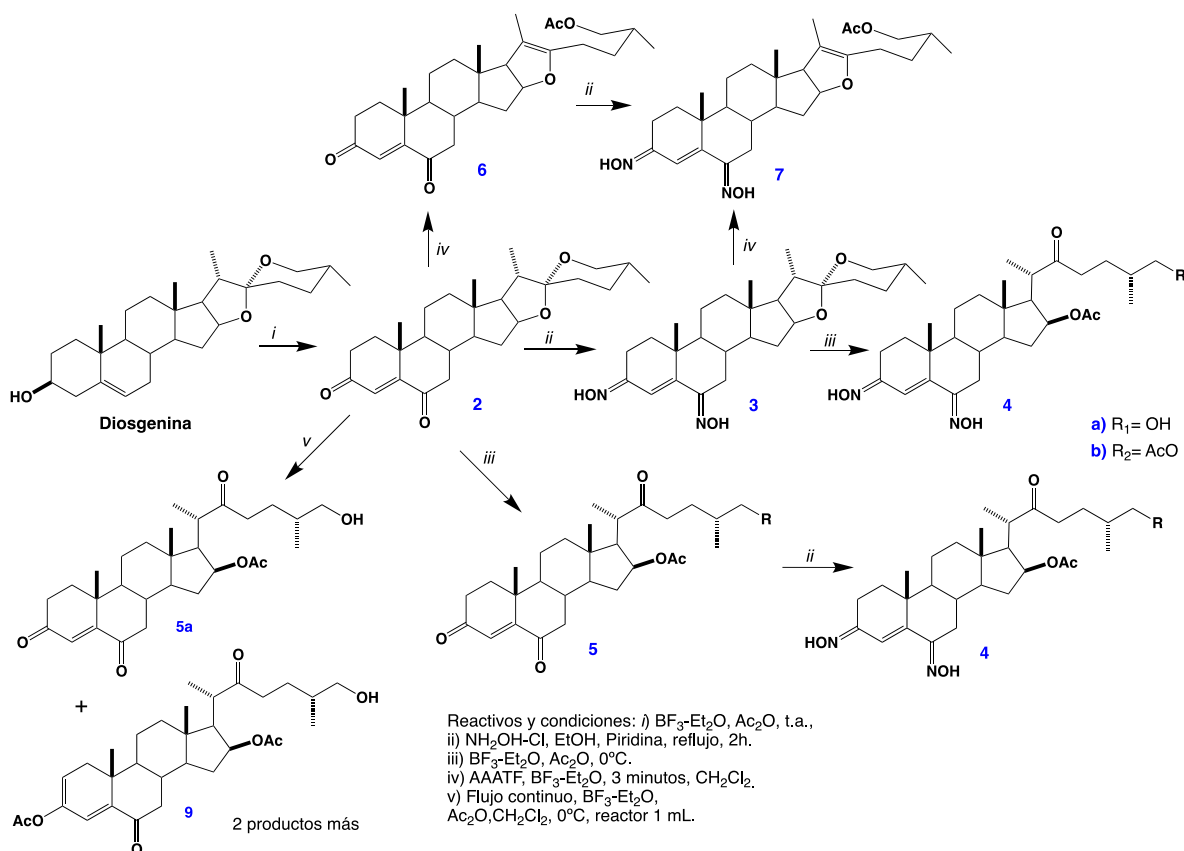


Figura 7. Estructura de diosgenina (**1**).

La diosgenina (**1**), Figura 7, fue utilizada la adquirida de forma comercial como la extraída del barbasco a través de soluciones alcohólicas; se caracterizó y los datos fueron comparados con los de la literatura coincidiendo totalmente. Polvo amorfo, p.f. = 199-202 °C.⁽³³⁾

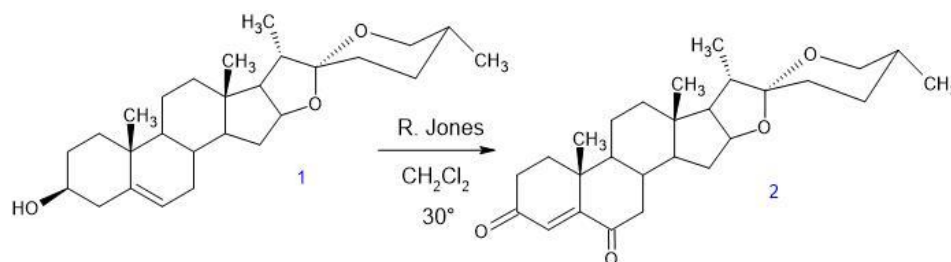
El esquema general de síntesis se muestra a continuación:



Esquema 6: Ruta de síntesis general para la obtención de compuestos de interés.

El esquema 6 ilustra la ruta de síntesis propuesta para la síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides a partir de diosgenina. Dichos esquemas involucran reacciones de hidrólisis, oxidación y obtención de oximas, que se realizarán una vez puestas a punto las metodologías siguiendo lo reportado en la literatura. Una vez obtenidos los compuestos, estos fueron caracterizados mediante los diferentes métodos espectroscópicos como RMN, IR, y métodos físicos como el punto de fusión y el $[\alpha]_D$, tal como se describe a continuación.

5.3.1 Oxidación selectiva de diosgenina.



Esquema 7. Formación de diosgenin-3,6-diona

Se disuelven 2.0 g (4.8 mmol) de diosgenina (**1**) en 40 ml de CH₂Cl₂ y 132 mL de acetona, la reacción se enfría a -10°C en agitación, posteriormente se agrega el reactivo el Jones gota a gota durante de 10 minutos, con cuidado de no rebasar los 10°C; ya que fue agregado el reactivo, la reacción se mantiene en agitación magnética y se lleva a temperatura ambiente, El avance de la reacción es monitoreado con CCF, registrando un cambio de color (naranja a verde) y entonces se agrega isopropanol para matar el oxidante. La mezcla de reacción se vacía a un embudo de separación y se realizan extracciones con acetato de etilo, lavados con agua destilada, la fase orgánica se seca con Na₂SO₄. Se obtuvo un producto menos polar que diosgenina, el cual se purificó en columna cromatográfica con gel de sílice con un sistema 9:1 (hexano y AcOEt) obteniendose 1.63 g con un rendimiento del 80% del producto **2** (Esquema 7).

Fórmula condensada: C₂₇H₃₈O₄, P.M= 426.6, p.f. 193-194°C (AcOEt/ acetona), Rendimiento del 80%.

IR ν (cm⁻¹) 2949 (C-H),1685. (C=O)

EMAR: C₂₇H₃₈O₄, Calculado: 426.6988, Observado: 426.6982.

¹H RMN

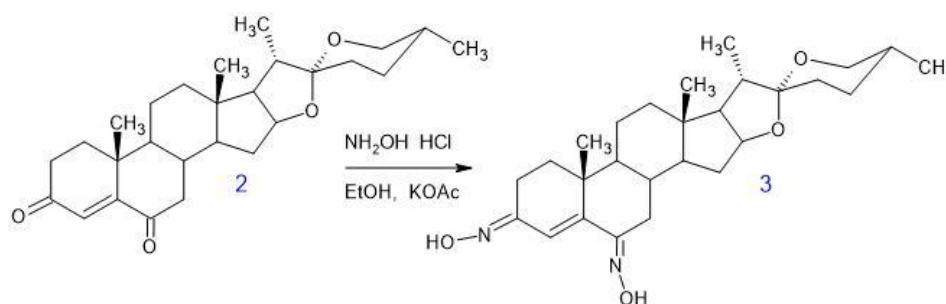
δ ¹H: 6.18 (1H, s, H-4), 4.43 (1H, m, H-16), 3.48 (1H, m, H-26e), 3.36 (1H, dd, $J_{26-26} = J_{26a-25a} = 10.4$ Hz, H-26a), 2.71 (2H, d, $J_{7-7} = 12.0$ Hz, H-7), 1.19 (3H, s, CH₃-19),

0.99 (3H, d, $J_{21-20} = 6.8$ Hz, CH₃-21), 0.84 (3H, s, CH₃-18), 0.80 (3H, d, $J_{27-25} = 6.0$ Hz, CH₃-27).

¹³C RMN

δ ¹³C: 36.6 (C-1), 33.9 (C-2), 199.4 (C-3), 125.5 (C-4), 160.6 (C-5), 201.8 (C-6), 32.1 (C-7), 35.1 (C-8), 53.7 (C-9), 38.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.6 (C-12), 40.3 (C-13), 55.6 (C-14), 31.6 (C-15), 80.6 (C-16), 61.9 (C-17), 17.3 (C-18), 16.3 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.2 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.2 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

5.3.2 Formación de la Dioxima de la (25*R*)-spirost-4-en-3,6-diona.



Esquema 8. Formación de diosgenin-3,6-dioxima

En un matraz balón de 250 mL se agregaron 0.85 g (2 mmol) de diosgenin-3,6-diona (**2**), que se disolvió en 30 mL de EtOH y 0.8 g de acetato de potasio, al que se agregaron 0.560g (8mmol) de NH₂OH.HCl, la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo por 1 hr. La reacción concluyó cuando se detectó una mancha más polar que la materia prima (**3**) al monitorear por CCF (Esquema 8). Una vez transcurrido ese tiempo se separó la fase orgánica, se realizaron 3 lavados con agua destilada y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄, fue concentrada en el rotavapor, y posteriormente purificada en columna cromatográfica con gel de sílice y un sistema 6:4 (hexano y acetato de etilo).

5.3.2.1 Elucidación de (25R, 3Z, 6Z)-dihidroxiiminoespirost-4-eno (115).

Fórmula condensada: C₂₇H₄₀N₂O₄, P.M= 456.62, p.f. 150-152°C (sistema 3:2 hexano /AcOEt) cristales blancos. Rendimiento 77 %.

IR ν (cm⁻¹) 3313 (O-H), 1681 (C=C)

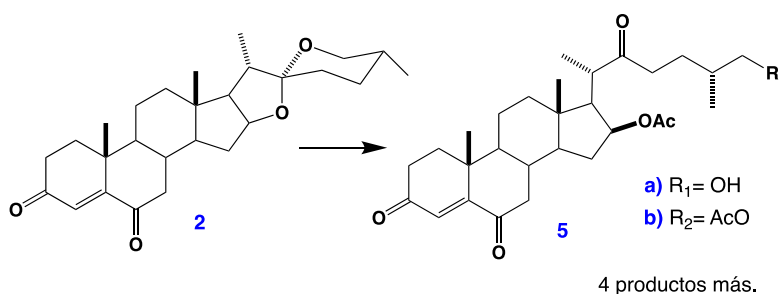
¹H RMN

δ ¹H: 6.58 (1H, s, H-4), 4.43 (1H, m, H-16), 3.48 (1H, dd, $J= 9.2, J= 2.8$ Hz, H-26e), 3.37 (1H, dd, $J= 11.2, J= 11.2$ Hz, H-26a), 3.07 (2H, dd, $J_{2-2}= 18, J_{2-1}= 3.6$ Hz H-2), 3.44 (2H, m, H-7), 1.06 (3H, s, CH₃-19), 0.98 (3H, d, $J_{21-20}= 6.8$ Hz, CH₃-21), 0.82 (3H, s, CH₃- 18), 0.79 (3H, d, $J_{27-25}= 6$ Hz, CH₃-27)

¹³C RMN

δ ¹³C: 39.3(C-1), 18.7(C-2), 156.4(C-3), 119.3(C-4), 147.3(C-5), 156.6 (C-6), 46.0(C-7), 32.7(C-8), 49.8(C-9), 38.8(C-10), 21.1(C-11), 33.4(C-12), 40.3(C-13), 61.8 (C-14), 31.4 (C-15), 80.6 (C-16), 56.3(C-17), 16.2(C-18), 19.0(C-19), 41.6(C-20), 14.4 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.2 (C-25), 66.9 (C-26), 17.1 (C-27).

5.3.3 Apertura de cadena lateral de diosgenin-3,6-diona y purificación de productos 22-oxocolestánicos.



Esquema 9. Apertura de cadena tipo 22 oxo de diosgenin-3,6-diona

En un matraz de bola de 250 mL provisto de agitación magnética y enfriado en un ultra enfriador a -10 °C se mezclaron 1 gramo de diosgenin-3,6-diona (**2**) diluido en 10 ml de diclorometano, 6 ml de anhídrido acético y 5 ml de eterato de trifluoruro de boro, se dejó agitar la mezcla en el ultra enfriador a -10 °C durante 10 minutos y posteriormente se dejó agitar durante 10 minutos más a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de agitación se pasó la mezcla a una solución saturada de bicarbonato de sodio de 500 ml para neutralizarla y se dejó agitar durante 5 minutos. A continuación, se pasó el crudo de reacción a un embudo de separación en donde se realizaron 3 lavados con agua destilada. Se recuperó la fase orgánica y se pasó por un embudo con sulfato de sodio para eliminar cualquier rastro de humedad. El crudo de reacción se pasó por un rotavapor a 50 °C y se pesó una vez los solventes se evaporaron. Finalmente, se agregaron 20 ml de diclorometano para diluir el crudo de reacción, se adicionó gel de sílice y se mezclaron en un rotavapor a 40 °C. Ya que se mezcló el crudo de reacción con el gel de sílice y se evaporó completamente el diclorometano, se procedió a empacar la columna cromatográfica, para ello se agregó a la columna gel de sílice limpia, después el gel de sílice mezclado con el crudo de reacción y finalmente un poco de algodón. Se obtuvieron 6 productos de los cuales solo 2 pudieron obtenerse puros (Esquema 9), por lo que no se hicieron más intentos por aislar y caracterizar el resto del crudo de reacción.

Los compuestos **5a**, y **5b** se eluyeron en sistema de disolventes en relación 7:3 hexano/acetato de etilo, obteniéndose cada uno en 35% y 30% respectivamente como sólidos blancos, el resto de los productos se guardaron como mezcla.

5.3.3.1 Elucidación del derivado 22-oxocolest-4-en-26OH-3,6-diona (**5a**).

Sólido blanco, punto de fusión: 172-174 °C (Hexano/AcOEt)

IR (cm⁻¹): 3010 (OH); 2939 (CH, alifático); 1720 (tensión C=O); 1000 (tensión C-O).

¹H RMN

δ ¹H: 6.18 (1H, s, H-4), 5.01 (1H, *m*, H-16), 3.45 (2H, *d*, $J_{25,26} = 5$ Hz, H-26), 2.94 (1H, *dc*, $J_{20-21} = 15$ Hz, $J_{20-17} = 10$ Hz, H-20), 2.01 (3H, *s*, CH₃COO-16), 0.89 (3H, *d*, $J_{27-25} = 10$ Hz, CH₃-27), 1.12 (3H, *d*, $J_{21-20} = 5$ Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, *s*, CH₃-19), 0.85 (3H, *s*, CH₃-18).

¹³C RMN

δ ¹³C: 37.0 (C-1), 27.9 (C-2), 201.5 (C-3), 126.0 (C-4), 160.9 (C-5), 199.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 35.0 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.4 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), (16.8 C-21), 213.8 (C-22), 38.7 (C-23), 27.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.6 (C-26), 17.1 (C-27), 170.7 (C-C=O 16), 21.3 (CH₃COO-16).

5.3.3.2 Elucidación del derivado 22-oxocolest-2-en-26OAc-3,6-diona (5b).

Sólido blanco, punto de fusión: 178-181 °C (Hexano/AcOEt)

IR (cm⁻¹): 3497 (OH); 2936 (CH, alifático); 1728, 1680 (C=O, cetonas); 1708 (C=O, acetato).

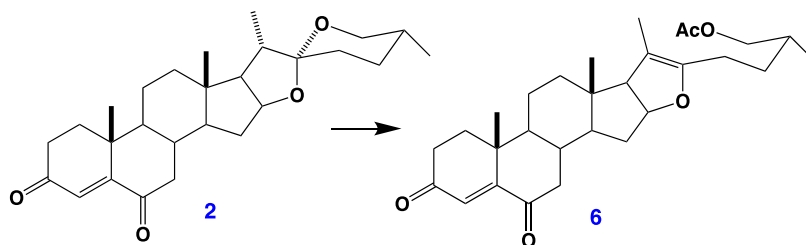
¹H RMN

δ ¹H: 6.19 (1H, *s*, H-4), 4.62 (1H, *m*, H-16), 3.25 (1H, *m*, H-26), 2.94 (1H, *dc*, $J_{20-21} = 15$ Hz, $J_{20-17} = 10$ Hz, H-20), 2.01 (3H, *s*, CH₃COO-16), 0.89 (3H, *d*, $J_{27-25} = 10$ Hz, CH₃-27), 1.12 (3H, *d*, $J_{21-20} = 5$ Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, *s*, CH₃-19), 0.85 (3H, *s*, CH₃-18).

¹³C RMN

$\delta^{13}\text{C}$: 37.0 (C-1), 27.9 (C-2), 201.5 (C-3), 126.0 (C-4), 160.9 (C-5), 199.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 35.0 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.4 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), (16.8 C-21), 213.8 (C-22), 38.7 (C-23), 27.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.6 (C-26), 17.1 (C-27), 170.7 (C-C=O 16), 21.3 (CH₃COO-16).

5.3.4 Apertura de la cadena lateral de diosgenin-3,6-diona (**2**) para conducir a derivados Pseudocolestánicos con Anhídrido Mixto (AATFA).



Esquema 10. Apertura de cadena tipo Pseudo de diosgenin-3,6-diona (**2**).

Con antelación fue preparado el anhídrido acético-trifluoroacético (AATFA) el cual se utilizó de forma inmediata. Se utilizó un matraz de balón de 50 mL con agitación magnética, al cual se adicionaron 1.6 mL de AcOH (27.9 mmol) y 3.1 mL (21.8 mmol) de anhídrido trifluoroacético agitando vigorosamente por 2 minutos.

Por otro lado, en un matraz de bola de 50 mL con agitación magnética, se agregaron 929 mg (2.18 mmol) de la diosgenin-3,6-diona (**2**) los cuales se disolvieron en 10 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), más 1 mL de BF₃·OEt₂ (7.96 mmol), a esta mezcla se agregó inmediatamente el AATFA preparado al inicio. La mezcla de la reacción se mantuvo con agitación magnética vigorosa a temperatura ambiente por 5 a 6 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el crudo de reacción se monitoreo por CCF, y fue vaciado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de salmuera con trozos de hielo. Transcurridos 5 minutos, la mezcla fría del crudo de reacción fue lavado con salmuera (1 x 20 mL), y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 30

mL) y agua destilada fría (1 x 30 mL). La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ y concentrada en el rotavapor. Fueron obtenidos 3 productos, que fueron separados por cromatografía en columna automatizada tipo flash con el cromatógrafo Selekt de Biotage, en la que se utilizaron una serie de sistemas de disolventes compuestos por hexano y acetato de etilo en distintas concentraciones. El producto de interés (**6**) se obtuvo con sistema 8:2 hexano – acetato de etilo en 40% de rendimiento. Los otros 2 compuestos se apartaron como mezcla (Esquema 10).

5.3.4.1 Elucidación del derivado Pseudodiosgenin-3,6-diona (**6**).

Sólido blanco, punto de fusión: 178-181 °C (Hexano/AcOEt).

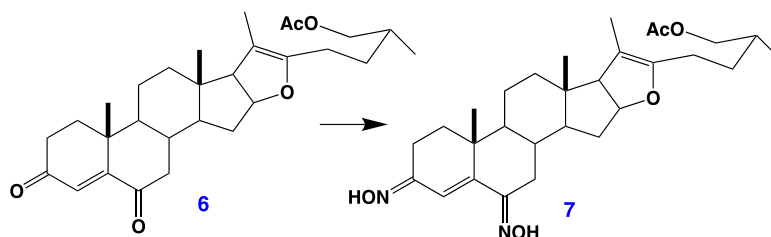
IR (cm⁻¹): 3497 (OH); 2936 (CH, alifático); 1728, 1680 (C=O, cetonas); 1708(C=O, acetato).

RMN

¹H δ ¹H: 6.19 (1H, s, H-4), 4.62 (1H, *m*, H-16), 3.25 (1H, *m*, H-26), 2.94 (1H, *dc*, *J*₂₀₋₂₁= 15 Hz, *J*₂₀₋₁₇= 10 Hz, H-20), 2.01 (3H, s, CH₃COO-16), 0.89 (3H, *d*, *J*₂₇₋₂₅= 10 Hz, CH₃-27), 1.12 (3H, *d*, *J*₂₁₋₂₀= 5 Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, s, CH₃-19), 0.85 (3H, s, CH₃-18).

¹³C δ ¹³C: 37.0 (C-1), 27.9 (C-2), 201.5 (C-3), 126.0 (C-4), 160.9 (C-5), 199.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 35.0 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.4 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.8 (C-21), 213.8 (C-22), 38.7 (C-23), 27.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.6 (C-26), 17.1 (C-27), 170.7 (C-C=O 16), 21.3 (CH₃COO-16).

5.3.5 Formación de la Dioxima de la Pseudodiosgenin-3,6-diona.



Esquema 11. Formación de la Pseudodiosgenin-3,6-diona.

En un matraz balón de 250 mL, fueron agregados 936 mg (2 mmol) de pseudodiosgenin-3,6-diona (**6**), los cuales fueron disueltos con 30 mL de EtOH y 0.8 g de KOAc, a esta mezcla se le adicionaron 0.560g (8 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$. Una vez realizada la mezcla de reacción, esta se llevó a reflujo por 1 hr. La reacción concluyó al observarse en la placa de CCF una mancha más polar que la materia prima (Esquema 11). Al concluir el tiempo de reacción y asegurarnos de que no había materia prima en la mezcla, se hicieron 3 lavados de la fase orgánica con agua destilada y esta última se secó con Na_2SO_4 , fue concentrada en el rotavapor y se purificó en columna cromatográfica con gel de sílice con un sistema 6:4 (hexano y acetato de etilo).

5.3.5.1 Elucidación de (3Z, 6Z)-Pseudodihidroxiinoespirost-4-eno (7).

Fórmula condensada: $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_5$, P.M= 498.66, p.f. 155-157°C (sistema 3:2 hexano /AcOEt) sólido blanco. Rendimiento 67 %.

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3312 (OH de la oxima), 1683 (C=C)

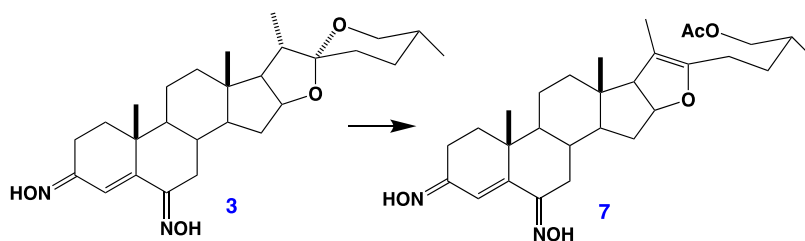
RMN

^1H δ ^1H : 6.58 (1H, s, H-4), 4.43 (1H, m, H-16), 3.48 (1H, dd, $J= 9.2$, $J= 2.8$ Hz, H-26e), 3.37 (1H, dd, $J= 11.2$, $J= 11.2$ Hz, H-26a), 3.07 (2H, dd, $J_{2-2}= 18$, $J_{2-1}= 3.6$ Hz

H-2), 3.44 (2H, m, H-7), 1.06 (3H, s, CH₃-19), 0.98 (3H, d, $J_{21-20} = 6.8$ Hz, CH₃-21), 0.82 (3H, s, CH₃-18), 0.79 (3H, d, $J_{27-25} = 6$ Hz, CH₃-27)

¹³C δ ¹³C: 39.3(C-1), 18.7(C-2), 156.4(C-3), 119.3(C-4), 147.3(C-5), 156.6 (C-6), 46.0(C-7), 32.7(C-8), 49.8(C-9), 38.8(C-10), 21.1(C-11), 33.4(C-12), 40.3(C-13), 61.8 (C-14), 31.4 (C-15), 80.6 (C-16), 56.3(C-17), 16.2(C-18), 19.0(C-19), 41.6(C-20), 14.4 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.2 (C-25), 66.9 (C-26), 17.1 (C-27).

5.3.6 Apertura tipo Pseudo de la cadena lateral de la dioxima de la diosgenin-3,6-diona.



Esquema 12. Apertura tipo Pseudo de la diosgenin-3,6-dioxima **3**.

Con antelación fue preparado el anhídrido acético-trifluoroacético (AATFA) el cual se utilizó de forma inmediata. Se utilizó un matraz de balón de 50 mL con agitación magnética, al cual se adicionaron 1.6 mL de AcOH (27.9 mmol) y 3.1 mL (21.8 mmol) de anhídrido trifluoroacético agitando vigorosamente por 2 minutos.

Adicionalmente, en otro matraz de bola de 50 mL con agitación magnética vigorosa se agregaron 929 mg (2.18 mmol) de diosgenin-3,6-diona (**2**) la cual fue disuelta en 10 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), 1 mL de BF₃·OEt₂ (7.96 mmol) y finalmente se agregó el AATFA que fue previamente obtenido. El cruddo de la reacción se llevó a temperatura ambiente con agitación magnética vigorosa por 5 a 6 minutos. Al concluir ese tiempo, la mezcla fue tratada con agua destilada fría, y a la fase orgánica se le trato con 3 lavados de agua destilada, separando la fase orgánica que se secó con Na₂SO₄, y llevada a concentrar en el rotavapor. Se obtuvieron 3 productos, que fueron separados por cromatografía en columna automatizada tipo

flash con el cromatógrafo Selekt de Biotage, en la que se utilizaron una serie de sistemas de disolventes compuestos por hexano y acetato de etilo en distintas concentraciones. El producto de interés se obtuvo con sistema 3:2 hexano – acetato de etilo en 45% de rendimiento (Esquema 12).

5.3.6.1 Elucidación de (3Z, 6Z)-Pseudodihidroxiinoespirost-4-eno (7).

Fórmula condensada: $C_{29}H_{42}N_2O_5$, P.M= 498.66, p.f. 155-157°C (sistema 3:2 hexano-AcOEt) sólido blanco. Rendimiento 45 %.

IR ν (cm^{-1}) 3313 (OH oxima), 1681 (C=C)

1H RMN

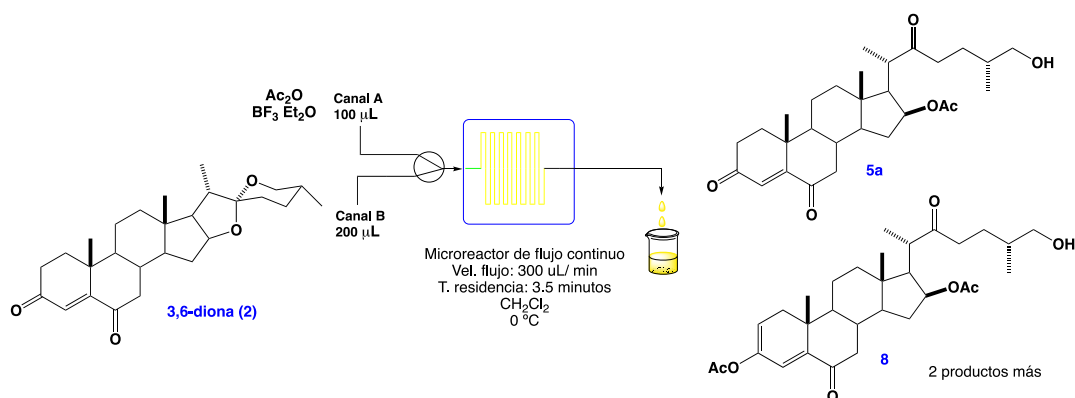
δ 1H : 6.58 (1H, s, H-4), 4.43 (1H, m, H-16), 3.48 (1H, dd, $J= 9.2$, $J= 2.8$ Hz, H-26e), 3.37 (1H, dd, $J= 11.2$, $J= 11.2$ Hz, H-26a), 3.07 (2H, dd, $J_{2-2}= 18$, $J_{2-1}= 3.6$ Hz H-2), 3.44 (2H, m, H-7), 1.06 (3H, s, CH_3 -19), 0.98 (3H, d, $J_{21-20}= 6.8$ Hz, CH_3 -21), 0.82 (3H, s, CH_3 - 18), 0.79 (3H, d, $J_{27-25}= 6$ Hz, CH_3 -27)

^{13}C RMN

δ ^{13}C : 39.3(C-1), 18.7(C-2), 156.4(C-3), 119.3(C-4), 147.3(C-5), 156.6 (C-6), 46.0(C-7), 32.7(C-8), 49.8(C-9), 38.8(C-10), 21.1(C-11), 33.4(C-12), 40.3(C-13), 61.8 (C-14), 31.4 (C-15), 80.6 (C-16), 56.3(C-17), 16.2(C-18), 19.0(C-19), 41.6(C-20), 14.4 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.2 (C-25), 66.9 (C-26), 17.1 (C-27).

5.4 Procedimiento general. Reacciones en Microreactor de Flujo Continuo Syrris.

5.4.1 Apertura de cadena lateral de 3,6 diona de diosgenina mediante reacción de flujo continuo y purificación de productos.



Esquema 13. Reacción de espirocetal de **2** por flujo continuo.

La metodología con tecnología facilitadora como el flujo continuo, se realizaron utilizando un equipo Syrris Asia (Syrris, Inglaterra) con N₂ como gas acarreador. En el depósito 1 del reactor de flujo continuo (RFC) se agregó 1 gr (2.34 mmol) de diosgenin-3,6-diona (**2**) diluida en 21 mL de diclorometano y en el depósito 2 del RFC se agregó una mezcla de 5 mL de anhídrido acético (Ac₂O, 50 mmol) y 20 mL de eterato de trifluoruro de boro (BF₃-Et₂O, 8 mmol). Se ajustó la temperatura de la reacción a -10 °C, la presión a 1 atmosfera y la velocidad de extracción del depósito 1 a 100 µL/min mientras que la del depósito 2 se ajustó a 300 µL/min. Una vez que el equipo terminó de sacar las últimas fracciones, la mezcla de reacción se pasó a una solución saturada de bicarbonato de sodio de 500 mL para neutralizarla y se dejó agitar durante 5 minutos. A continuación, se pasó la solución a un embudo de separación en donde se realizaron 3 lavados con agua destilada. Se recuperó la fase orgánica y se pasó por un embudo con sulfato de sodio para eliminar cualquier rastro de humedad. El crudo de reacción se pasó por un rotavapor a 50 °C y se pesó una vez los solventes se evaporaron. El crudo obtenido se separó por cromatografía

automatizada en columna tipo flash en el equipo Selekt de Biotage, identificandose 4 productos, de los cuales se separaron y caracterizaron los 2 mayoritarios.

Se agregaron 20 mL de diclorometano para diluir el crudo de reacción, se adicionó gel de sílice y se mezclaron en un rotavapor a 40 °C para soportar la muestra para cromatografía en columna tpo flash en el cromatógrafo Selekt de Biotage. Se procedió a empacar la columna cromatográfica con gel de sílice, y después el gel de sílice mezclado con el crudo de reacción.

5.4.1.1 (25R)-22-oxocolest-4-en-26-hidroxi-3,6-diona (5a).

Sólido amorfo blanco. Punto de fusión: 173-174 °C (hexano-AcOEt)

IR cm^{-1} : 3011 (OH); 2939 (CH, alifático); 1721 (tensión C=O); 1000 (tensión C-O).

RMN

^1H δ : 6.18 (1H, s, H-4), 5.01 (1H, *m*, H-16), 3.45 (2H, *d*, $J_{25,26} = 5$ Hz, H-26), 2.94 (1H, *dc*, $J_{20-21} = 15$ Hz, $J_{20-17} = 10$ Hz, H-20), 2.01 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO-16}$), 0.89 (3H, *d*, $J_{27-25} = 10$ Hz, CH_3-27), 1.12 (3H, *d*, $J_{21-20} = 5$ Hz, CH_3-21), 1.01 (3H, s, CH_3-19), 0.85 (3H, s, CH_3-18).

^{13}C δ : 37.0 (C-1), 27.9 (C-2), 201.5 (C-3), 126.0 (C-4), 160.9 (C-5), 199.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 35.0 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.4 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.8 (C-21), 213.8 (C-22), 38.7 (C-23), 27.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.6 (C-26), 17.1 (C-27), 170.7 (C-C=O 16), 21.3 ($\text{CH}_3\text{COO-16}$).

5.4.1.2 Diacetato de 22-oxocolest-26OH-3b,16b-diil-2,4-dien-6-ona (8).

Rendimiento 26%, sólido blanco amorfo. Punto de fusión: 164-167 °C (hexano-AcOEt)

IR (cm^{-1}): 3014 (OH); 2938 (CH, alifático); 1722 (tensión C=O); 1012 (tensión C-O).

RMN ¹H δ: 6.16 (1H, s, H-4), 5.02 (1H, *m*, H-16), 3.44 (2H, *d*, $J_{25,26} = 5$ Hz, H-26), 2.94 (1H, *dc*, $J_{20-21} = 15$ Hz, $J_{20-17} = 10$ Hz, H-20), 2.01 (3H, s, CH₃COO-16), 0.89 (3H, *d*, $J_{27-25} = 10$ Hz, CH₃-27), 1.12 (3H, *d*, $J_{21-20} = 5$ Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, s, CH₃-19), 0.85 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C δ: 37.0 (C-1), 119.4 (C-2), 157.5 (C-3), 128.5 (C-4), 143.7 (C-5), 199.0 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 35.0 (C-15), 75.1 (C-16), 55.2 (C-17), 13.4 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.8 (C-21), 213.3 (C-22), 38.7 (C-23), 27.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.4 (C-26), 17.1 (C-27), 168.8 (C-C=O 16), 169.7 (C-C=O 3), 21.3 (CH₃COO-16).

6. Discusión de resultados.

Mediante una ruta de síntesis de nuevos derivados cetónicos esteroideos tanto en el esqueleto como en la cadena lateral esteroidea; se logró que los grupos funcionales originales presentes en los anillos A y B se transformaran, llegando a la generación de nuevos derivados con funciones oxigenadas en los anillos A y B, y modificaciones a nivel de la cadena lateral (Figura 8). Este trabajo de tesis comprende la síntesis de estructuras cetónicas e hidroximínicas, a partir de diosgenina (**1**), a través de metodologías convencionales y con el uso de química de flujo continuo.

Como se planteó en los antecedentes la presencia de una cadena lateral oxocolestánica han demostrado tener un papel fundamental al momento de su aplicación como promotores de crecimiento vegetal, por lo que la obtención de este tipo de compuestos es interesante para evaluar su efecto anabólico. Una opción viable de modificación de la cadena lateral de sapogeninas espirostánicas es la acetólisis del espiroacetal, del cual se ha observado que se pueden obtener diversos compuestos;⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ el esqueleto esteroideo con función diona es responsable de mostrar actividad anabólica, semejante a la testosterona.

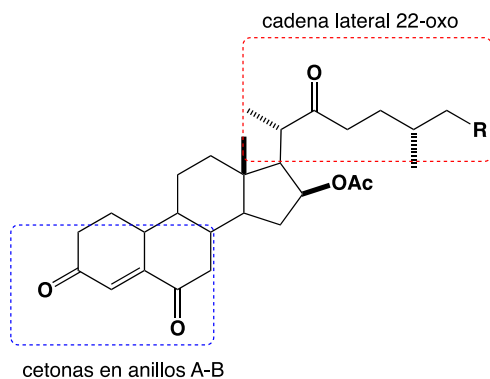
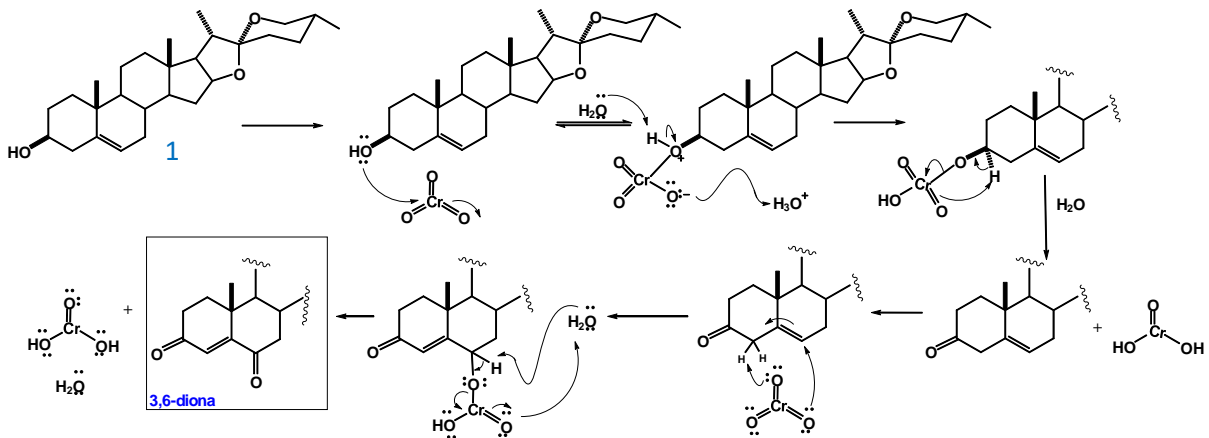


Figura 8: Esteroide con modificaciones en anillos A y B y cadena lateral.

Para obtener estos grupos funcionales, se decidió iniciar con la oxidación del hidroxilo en C-3 de diosgenina con reactivo de Jones. Al establecer la estrategia de síntesis y observar los primeros resultados experimentales con la finalidad de dirigir la oxidación a sitios concretos, se ensayó la reacción a temperatura baja (esquema 8) que condujera a la obtención de forma cuantitativa del producto dicetónico (**2**) mayoritariamente. En el mecanismo del esquema 8 se puede apreciar que el medio ácido promueve el rearrreglo del doble enlace en el C-5, para pasar al anillo A en el C-4 en el paso final.



Esquema 14. Mecanismo propuesto de la oxidación de **1** con reactivo de Jones para conducir a la 3,6-diona.

Las señales que es posible apreciar en el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de **2** nos muestran señales dentro de la montaña entre 1 y 2 ppm, según el ambiente químico de los H, con la presencia de la señal simple en 6.18 ppm que corresponde al nuevo H vinílico en C-4; prosiguiendo con la señal múltiple en 4.43 ppm que corresponde al H-16, la cual no experimenta un cambio significativo en comparación con la materia prima, lo que confirma que el espiroacetal sigue presente al seguir integro el anillo E; en 3.48 ppm se observa la señal con un patrón de coplamiento tipo dd, con una $J_{26e,26a}=10.9$ Hz, $J_{26e,25}=4.6$ Hz asignada al H-23ec; a continuación a esta señal, en 3.36 ppm se aprecia una señal dd con una $J_{26e,26a}=J_{26e,25}=10.9$ Hz que se asignó al H-26a. En 2.71 ppm se presenta una señal doble con $J_{7a,7e}=12$ Hz característico de la señal para H-7a que presenta un acoplamiento geminal, con un desplazamiento significativo derivado de la presencia de la cetona en posición C-6; en 1.19 ppm está presente la señal simple del metilo 19, que se movió un poco a frecuencias altas debido a la cercanía e influencia de los grupos carbonilos en los anillos A-B, mientras que los metilos 18, 21 y 27 se mantienen sin cambios comparados con la materia prima (Figura 9).

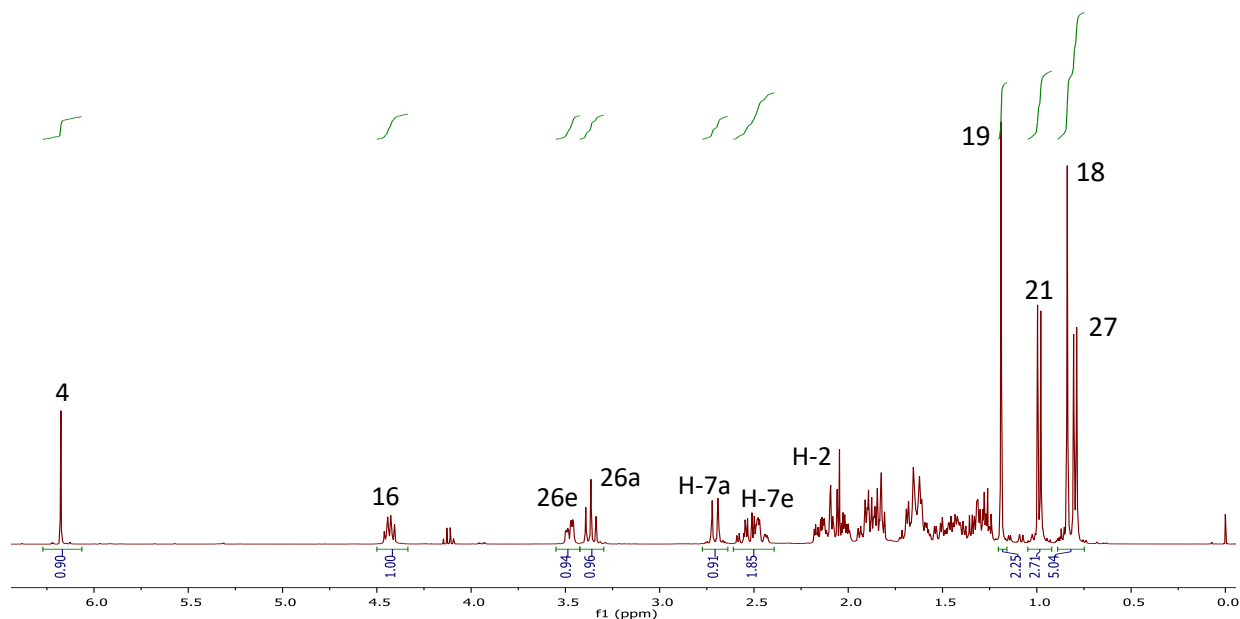


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H para la 4-en-3,6-diona **2**.

Al analizar los datos del espectro de RMN de ^{13}C se aprecia a frecuencias altas, las señales poco intensas de los carbonilos de la posición C-6 y C-3 en 201.8 ppm y 199.40 ppm respectivamente; en 160.6 ppm encontramos la señal del C-vinílico C-5 y en aproximadamente 125.5 ppm está la señal del C-4 confirmando el reordenamiento del doble enlace en C5-C6. Siguiendo el análisis, en 109.3 ppm se presenta una la señal correspondiente al C-22 típico del espirocetal de los anillos E/F (Figura 10). Al realizar la asignación de los C-16 y C-26 se echó mano del experimento HSQC que correlaciona los H con sus C, que evidencia una correlación directa del H-16 y el C-16, mismo caso con el C-26 donde fue posible apreciar cómo estos protones diasterotópicos H-26 correlacionan con este C.

La ruta de síntesis muestra que decidimos hacer la apertura de la cadena lateral de la 3,6-diona para obtener compuestos 22-oxocolestánicos, y con cadena lateral tipo pseudo, y tratar de realizar las mismas reacciones con la dioxima de la diosgenin-3,6-diona. Sin embargo, hubo dificultades para purificar los crudos de reacción de las dioximas, debido a que estos eran muy complejos derivado de la cantidad de subproductos que se formaron además del esperado, y que dificultó su separación. Por esta razón, se reportan los derivados mayoritarios, y que fueron aislados en cantidades suficientes para su caracterización inequívoca.

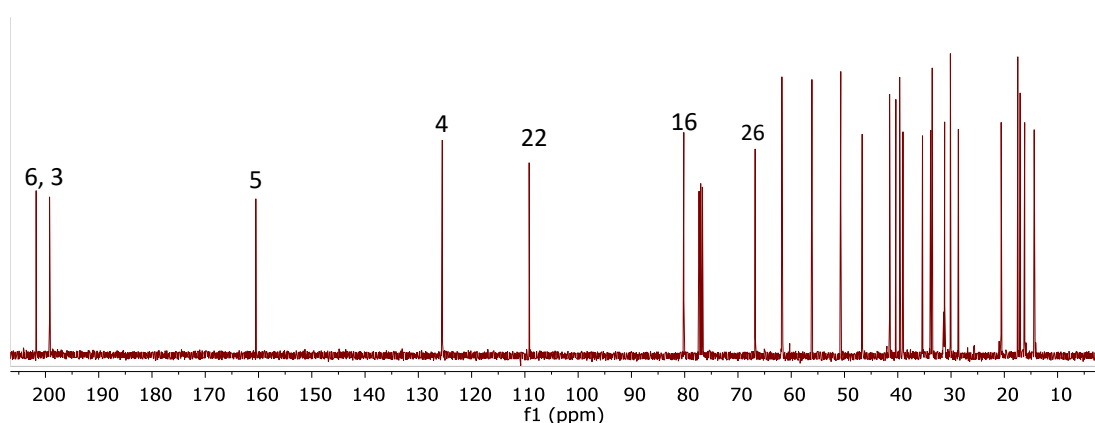
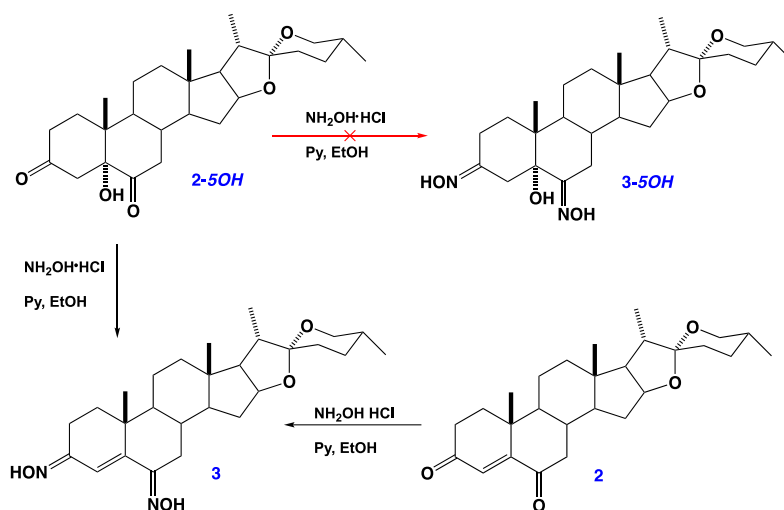


Figura 10. Espectro de ^{13}C a 125 MHz de la 4-en-3,6 diona 2.

6.1 Formación de oximas en posiciones 3 y 6.

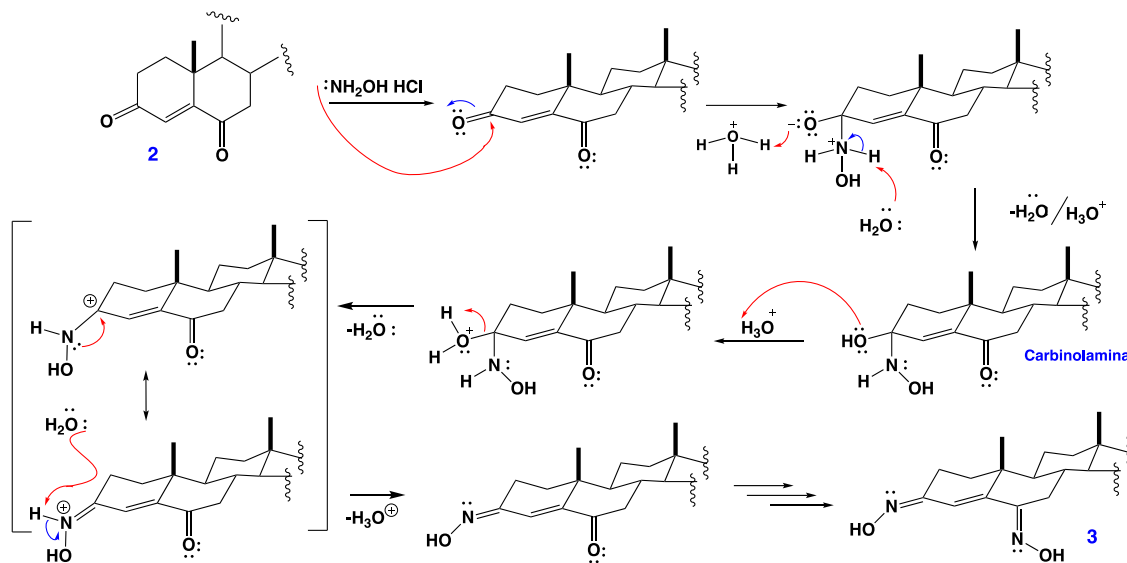
Tal como se expuso en los antecedentes, la participación de un heteroátomo como el nitrógeno en estructuras esteroidales ha demostrado potenciar la actividad antiproliferativa en estos compuestos, y nos ha parecido interesante incorporar oximas esteroidales a los derivados objetivo; las cetonas en los compuestos que se han obtenido en este trabajo de tesis en las posiciones C-3 y C-6, nos permite investigar esta opción y sus repercusiones a nivel del análisis estructura /actividad, por medio de la reacción de condensación con fuentes de nitrógeno como la hidroxilamina.



Esquema 15. Formación de oximas en las posiciones 3 y 6.

Como se observa en el Esquema 15, en el producto de esta reacción se genera la formación de un compuesto dihidroximinico **3** mayoritariamente. Se propuso el mecanismo de reacción del Esquema 16, donde la reacción da inicio con el ataque nucleofílico de la hidroxilamina al C del carbonilo en C-3 de **2**. Aunque en este mecanismo se propone que la protonación del oxígeno se da posterior al ataque del par de electrones del N, y es seguida de la desprotonación del grupo amino, es bien sabido que se requiere de catálisis ácida (que en este caso es la liberación de la hidroxilamina la que provee de HCl), o lo que es lo mismo, la presencia de H⁺ para facilitar la reacción de adición, finalmente ambas propuestas conducen a un intermediario *carbinolamina*, que conduce finalmente a la oxima por la protonación

de este intermediario que es seguida de la eliminación de agua; el mismo proceso se repite en la posición C6, formando la dioxima como producto final.



Esquema 16. Mecanismo de condensación de **2** con hidroxilamina.

Al analizar el espectro de RMN de ^1H de **3**, es inevitable observar que presentan gran similitud con la materia prima ya que el ambiente químico de ningún H se afecta; por ejemplo, en 6.55 ppm se ve la señal simple que corresponde al protón vinílico H-4, en 4.44 ppm se presenta una señal múltiple correspondiente al H-16, que al igual que los protones en H-26 conservan similares desplazamientos al igual que en la materia prima; solo la señal en 3.1 ppm del protón en H-7 se ha desplazado a frecuencias altas debido a la cercanía de los grupos hidroxilos de la oxima (Figura 11). No obstante, la información que se obtiene del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto dioxima **3** nos pone en evidencia que si hay un cambio significativo, y las señales en la región de 200 ppm han desaparecido, transformándose en dos nuevas señales en 156.4 ppm y 156.2 ppm, las cuales pertenecen a señales de $\text{C}=\text{N}$ de la dioxima **3**.

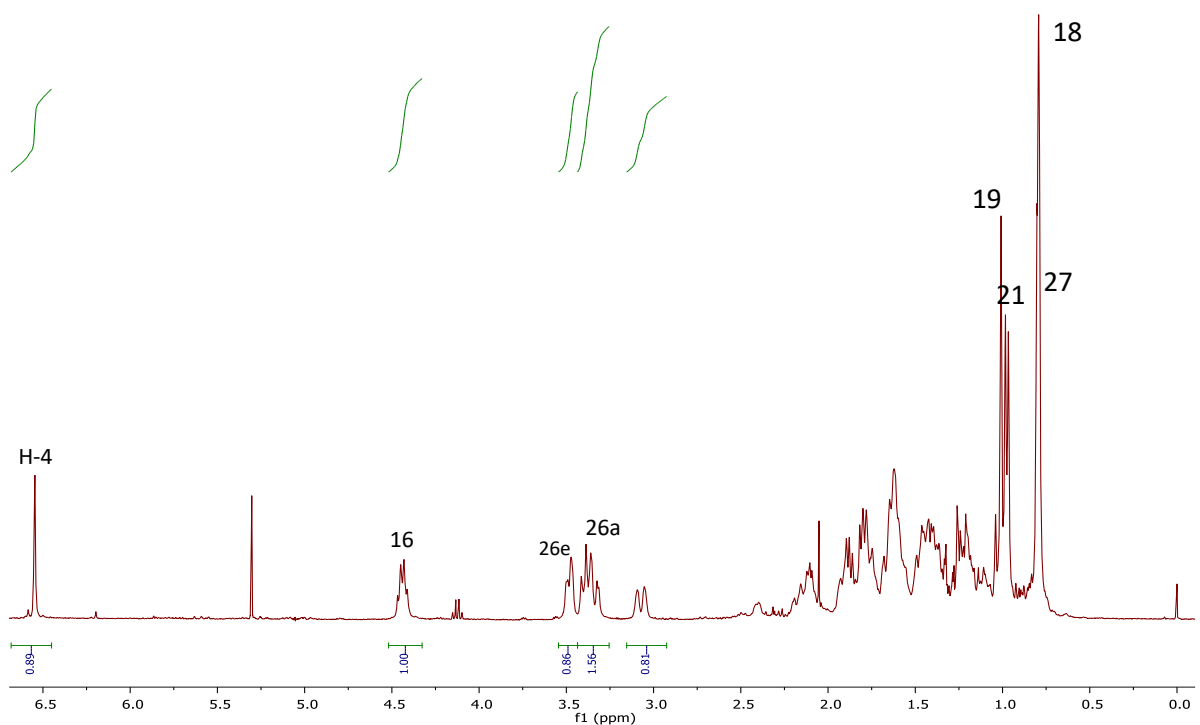


Figura 11. Espectro de RMN-¹H de la dioxima **3**.

Es necesario resaltar que las otras señales observadas en el espectro no han sufrido un cambio significativo porque no fue afectado su ambiente químico, como ejemplo podemos ver en 109.3 ppm a la señal correspondiente al C-22 del espirocetal, que da prueba de que los anillos E y F del esteroide no fueron afectados (Figura 12).

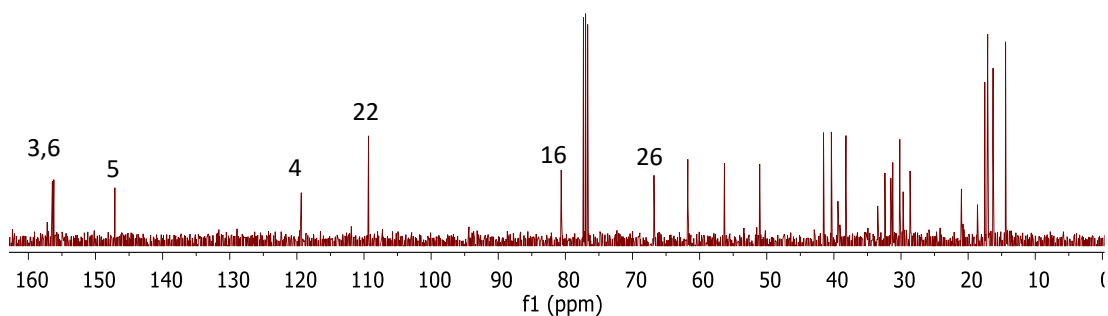


Figura 12. Espectro de RMN de ¹³C de la dioxima **3**.

Con ayuda del HSQC fue posible observar las correlaciones C-H a un enlace, permitiendo ver que la señal en 6.55 ppm de la región de los H-vinílicos, al ser señal simple fue asignada al H-4 y la señal correlacionó con C-4. (Figura 13).

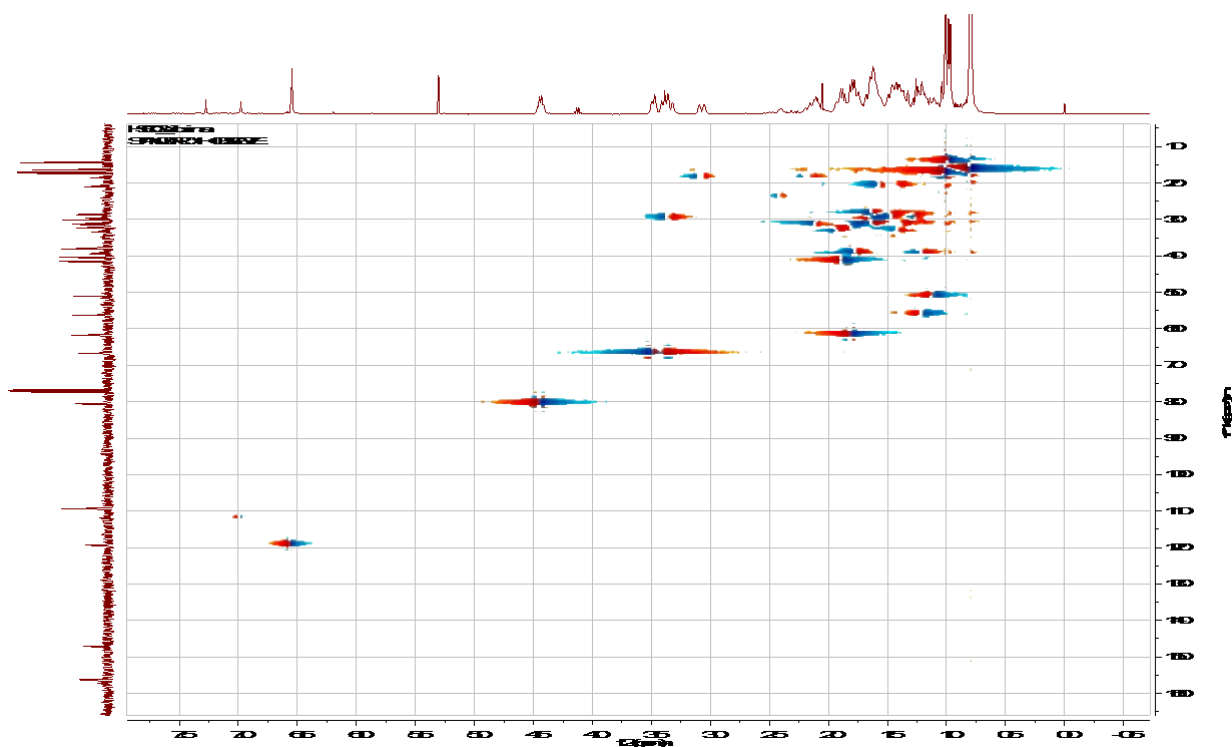
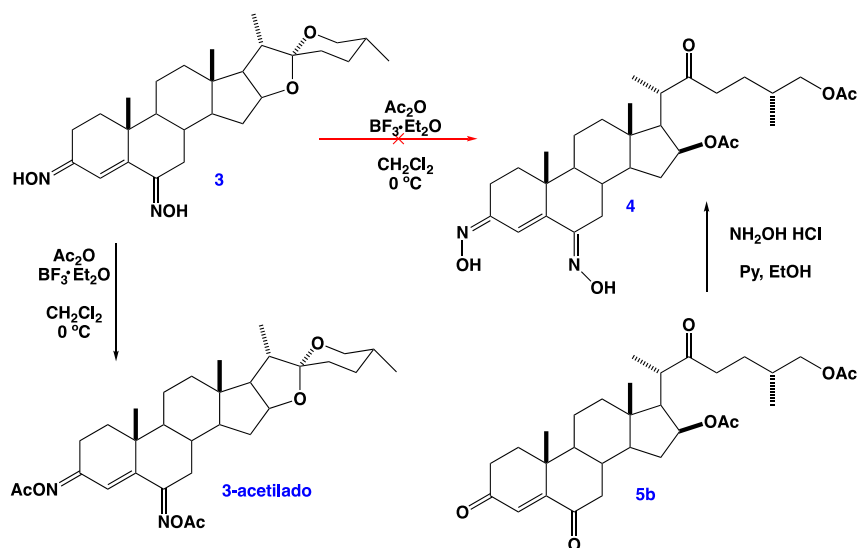


Figura 13. Espectro RMN-HSQC de la dioxima **3**.

6.2 Apertura del espiroacetal de derivados 3,6-oxidados.

Como se abordó en los antecedentes, está publicado en la literatura, tanto de otros autores como en trabajos previos del grupo de investigación, que la presencia de una cadena lateral 22-oxocolestánica es responsable de importantes efectos en la actividad biológica, como en los promotores de crecimiento vegetal, la actividad antitumoral en líneas de cáncer de diversas etiologías, por lo que es de nuestro interés la obtención de compuestos biológicamente activos de forma potenciada, por lo que decidimos realizar una apertura o fisión de la cadena lateral de los compuestos dicetónicos e hidroximínicos obtenidos. En los últimos reportes

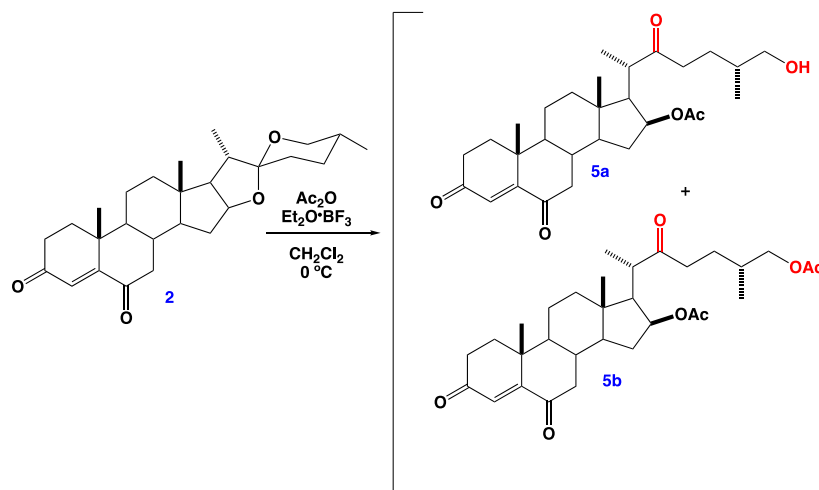
se ha tratado de modificar la acetólisis con el uso de un co-disolvente con un control la temperatura, para orientar y favorecer la obtención de derivados 22-oxocolestánicos.³⁴ Con base en estos reportes y el trabajo previo del grupo de investigación, se llevó a cabo la reacción de apertura del espiroacetal de la dioxima **3**, que condujo a un compuesto acetilado en los hidroxilos de los grupos hidroximínicos de la materia prima, como se observa en el Esquema 17, resultado de la alta electrofilicidad que le concede al grupo acetato la presencia del ácido de Lewis. Hemos intentado desproteger la oxima, pero es posible que afecte la cadena lateral; por lo que se decidió proponer una alternativa a este ruta de síntesis.



Esquema 17. Reacción de apertura de cadena tipo 22-oxo de la dioxima **3**.

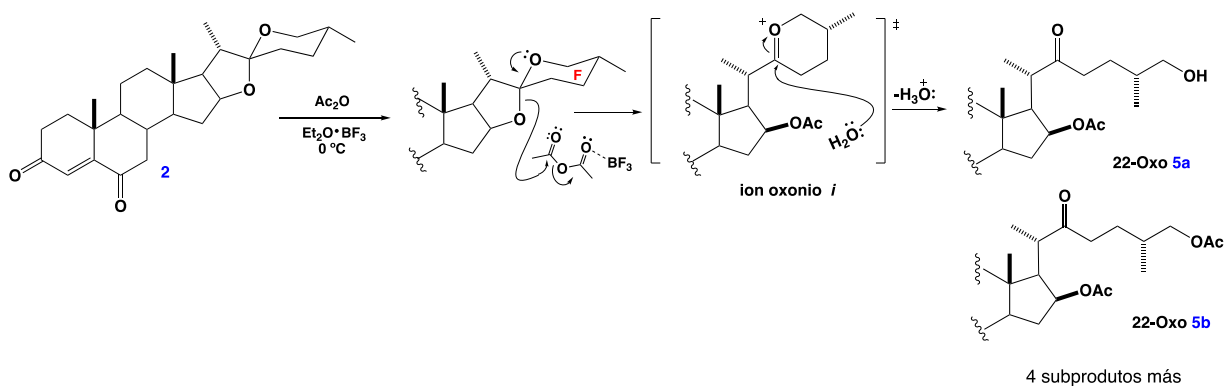
Tal como es descrito en la literatura en reportes de Fernández Herrera⁽³⁵⁾ y diversos autores, la biosíntesis del espirocetal se da a partir de la cadena lateral del colesterol por medio de una cadena de oxidaciones; la formación de un grupo hidroxilo en C-16 y en uno de los metilos terminales de la cadena (C-26), además de la formación de un grupo cetónico en C-22. La formación de la protosapogenina, que es transformada en un hemicetal (producto del ataque del hidroxilo 16β al C=O en C-22), y luego transformada en un ion oxonio *i* que termina en la formación del espirocetal. Con base en estos datos, se llevó a cabo un estudio sobre la temperatura y su influencia en la reacción de acetólisis de diosgenina (**2**), y para ello

se ensayaron y modificaron diversos parámetros mediante reacciones a temperatura ambiente y a bajas temperaturas, cuyos resultados se encuentran descritos en diversos reportes en la literatura.³⁶ Para conseguir la formación de la cadena 22-oxocolestánica, se llevó a cabo la reacción mediante la metodología detallada en la literatura, utilizando anhídrido acético y $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ a 0°C obteniendo los compuestos **5a-5b** en buenos rendimientos (Esquema 18).



Esquema 18. Productos de la apertura regioselectiva de **2**.

En los resultados obtenidos fue posible detectar la obtención de la cadena 22-oxocolestánica con un OH en C-26 **5a**, y se observó la formación del derivado 22-oxocolestánico acetilado en la posición 26 **5b**, como se muestra en el Esquema 12.



Esquema 19. Mecanismo de apertura de la 4-en-3, 6-diona **2** para la obtención de 22-oxocolestenos.

La apertura del anillo F⁽³⁷⁾ despertó nuestro interés, ya que da lugar a un compuesto a través de un proceso meramente cinético, al compararlo con la apertura del anillo E que continúa con la apertura del anillo F, que es termodinámicamente más favorecido derivado de la tensión angular o de anillo en un ciclo de 5 versus un anillo de 6.

Como se puede ver en el esquema 19, la apertura del anillo E conduce al ion oxonio *i* cuando este formó un nuevo enlace C-O y produjo además la acetilación del O en C-16, que posee una estructura análoga al colesterol (anillo E/F abierto y cadena lateral), y a **5b** con la acetilación de 26-OH. Las proporciones de los derivados 26-OH y 26-OAc y de los otros 4 subproductos, no son las mismas que se obtienen cuando se realizan sobre sapogeninas como diosgenina, que no presentan el sistema dicetónico en los anillos A-B. Al considerar estos resultados, es posible asumir que la dicetona presente en los anillos A/B del esteroide tiene una influencia en la dirección de la reacción, un efecto estereoelectrónico que afecta la reactividad de posiciones tan alejadas como los anillo E/F, conduciendo a la formación de los derivados descritos y caracterizados, y otros 4 derivados que continúan sin ser elucidados, siguiendo la metodología descrita en la literatura. En concreto, este efecto no se ha encontrado en reportes donde el material de partida no contenga grupos cetónicos electroatrayentes.⁽³⁸⁾

Al obtener esta evidencia, decidimos conducir la ruta de síntesis preparando primero los derivados cetónicos 22-oxocolestánicos, y a partir de estos, obtener las oximas, y tuvimos mejores rendimientos que se discuten más adelante.

Es posible apreciar que el compuesto con la cadena 22-oxocolestánica **5a** con el OH en C-26 fue identificado como el producto mayoritario en la reacción, con punto de fusión de 171 °C. En el espectro de IR se observan bandas en 3011 cm⁻¹ para el OH en C-26, y una banda intensa para el C=O del AcO en C-16 en 1721 cm⁻¹.

En el análisis de la RMN de ¹H, se aprecia que en la región de 2.0 ppm solo se presenta una señal propia del acetilo en la posición C-16, es de destacar que el espectro guarda una similitud con el de su material de partida. Las señales de los protones en C-26 se muestran traslapadas como una sola señal intensa para cada

H en 3.44 ppm, consecuencia del libre giro que presenta la cadena lateral abierta 22-oxocolestánica (Figura 14).

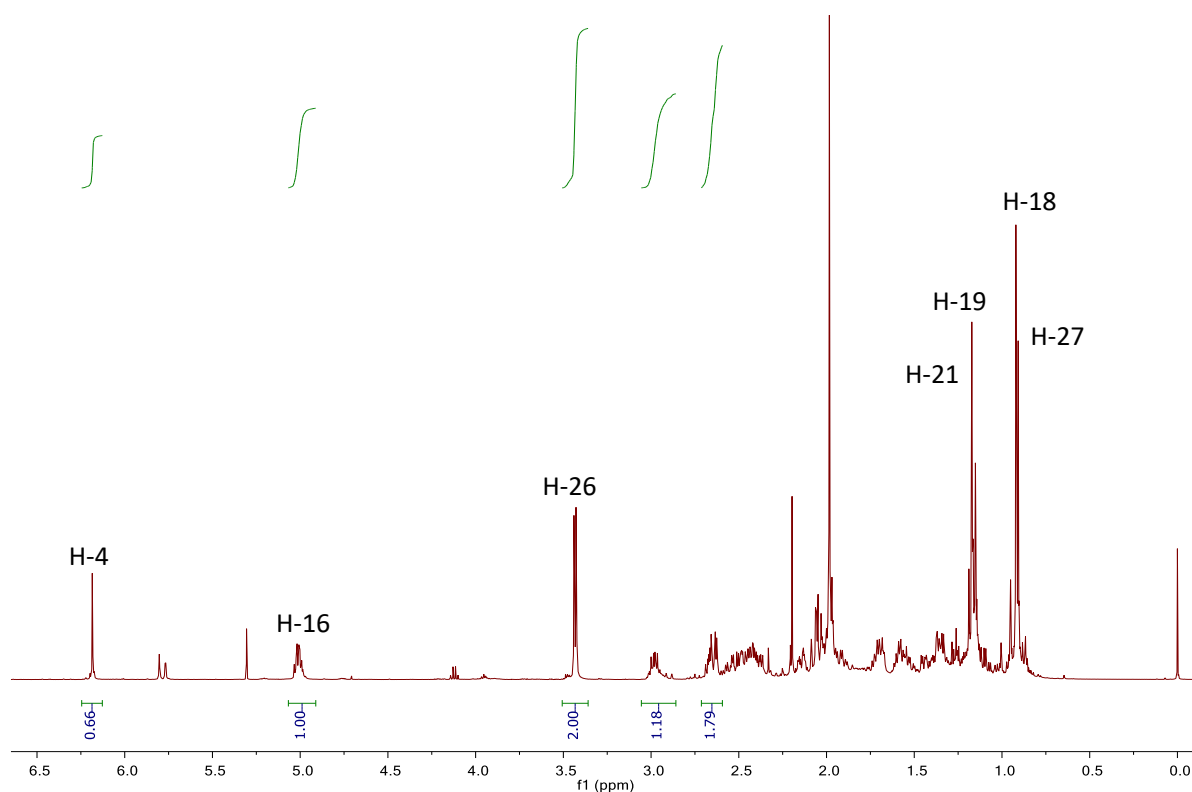


Figura 14. Espectro de RMN-¹H del 22-oxocolestánico **5a**.

El análisis de los datos arrojados por el espectro de RMN-¹³C permite observar que en la región de los C=O de los acetatos solo se presenta una señal en 170.1 ppm que pertenece al acetato C-16; y en 68.55 ppm hay una señal del C-26 desplazado a frecuencias más altas debido a la cercanía al grupo acetato. Se destaca en 212.6 ppm la señal correspondiente al C=O C-22, en 201.1 ppm y 199.5 ppm permanecen las señales de los C-3 y C-6; en frecuencias más bajas se aprecian las señales en 160.8 ppm y 126.0 ppm correspondientes a los carbonos vinílicos C5 y C4. El C-16 aparece antes de las señales del CDCl₃, desplazamiento característico del anillo E abierto en el esteroide (Figura 15).

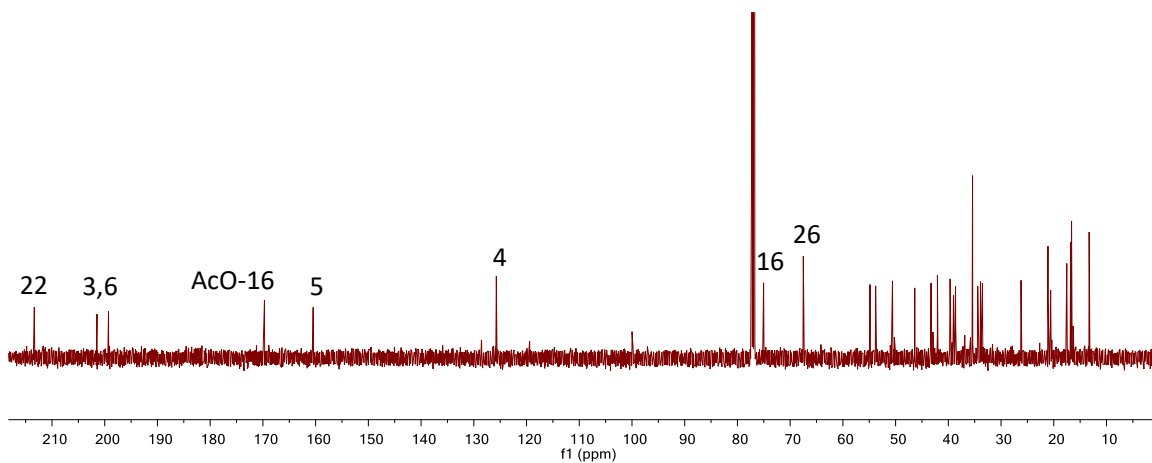


Figura 15. Espectro de ^{13}C a 125 MHz del compuesto 22-oxocholestánico **5a**.

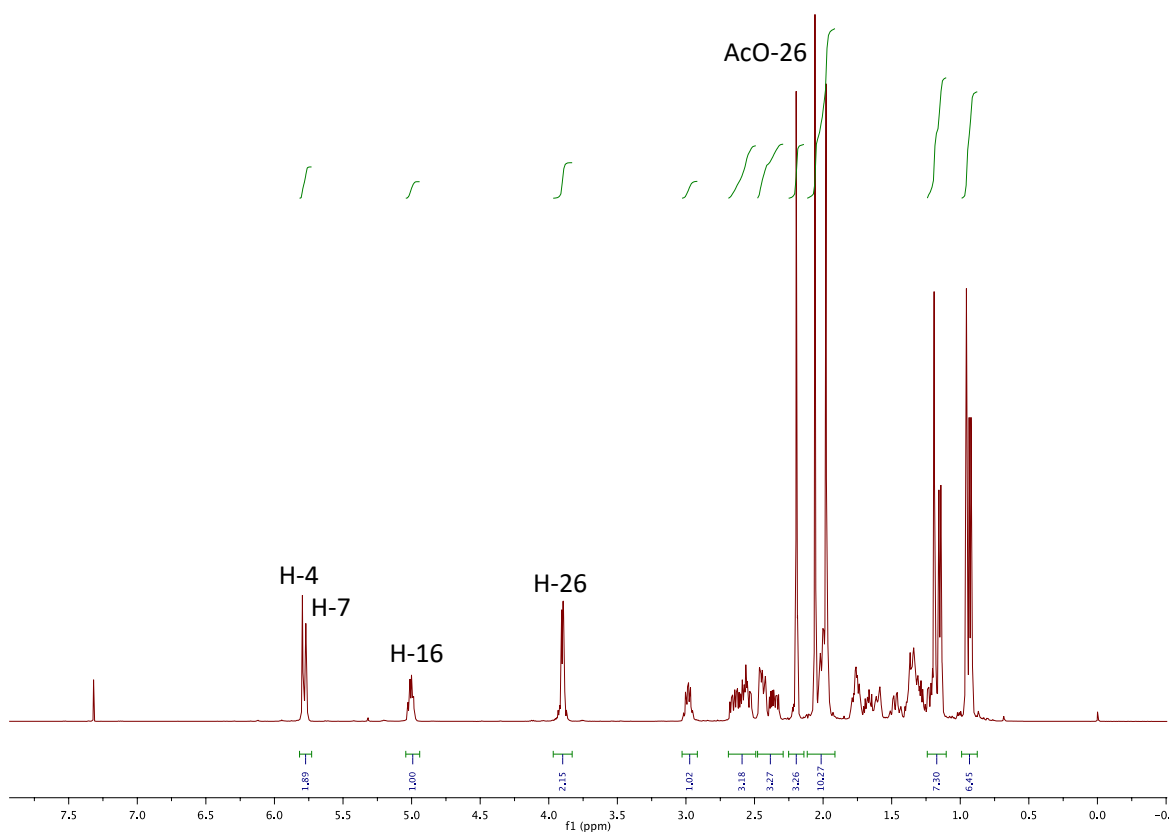


Figura 16. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 22-oxo **5b**.

Los datos que nos proporciona el espectro de RMN de ^1H de **5b**, muestra los desplazamientos químicos de los H de la estructura en correspondencia al ambiente químico que los rodea, y el H-4 se muestra como una señal simple en la región de

los vinílicos. El H16 y los protones H26 diastereotópicos no se modificaron significativamente en su desplazamiento en la ventana espectral (Figura 16).

El análisis de las señales del espectro de RMN de ^{13}C para **5b**, muestra las señales de los 33 átomos de C presentes en la estructura según su ambiente químico; se observa el C-22 en 212.3 ppm, y el C-6 y C-3 bases de la dicetona. Los C=O de los acetatos en 26 y 16 se delimitan en 168 a 171 ppm. Los cuatro C vinílicos se avistan en la región de 144 a 115 ppm, y en 75.11 ppm se aprecia el C-16 que es característico para la cadena colestánica, tal como vemos en la Figura 17.

Usando la información que arroja el HSQC se asignaron las correlaciones C-H a un enlace, con lo que se apreció que las señales en 5.5 y 5.6 ppm en la región de los vinílicos, correlacionan con diferentes carbonos, y que al ser señales simples fueron asignadas a H-7 que pertenece a un metino y, para el caso de H-4 la señal correlacionó con C-4. Ambas señales de H vinílicos no están acopladas, pero si están conjugadas (Figura 18).

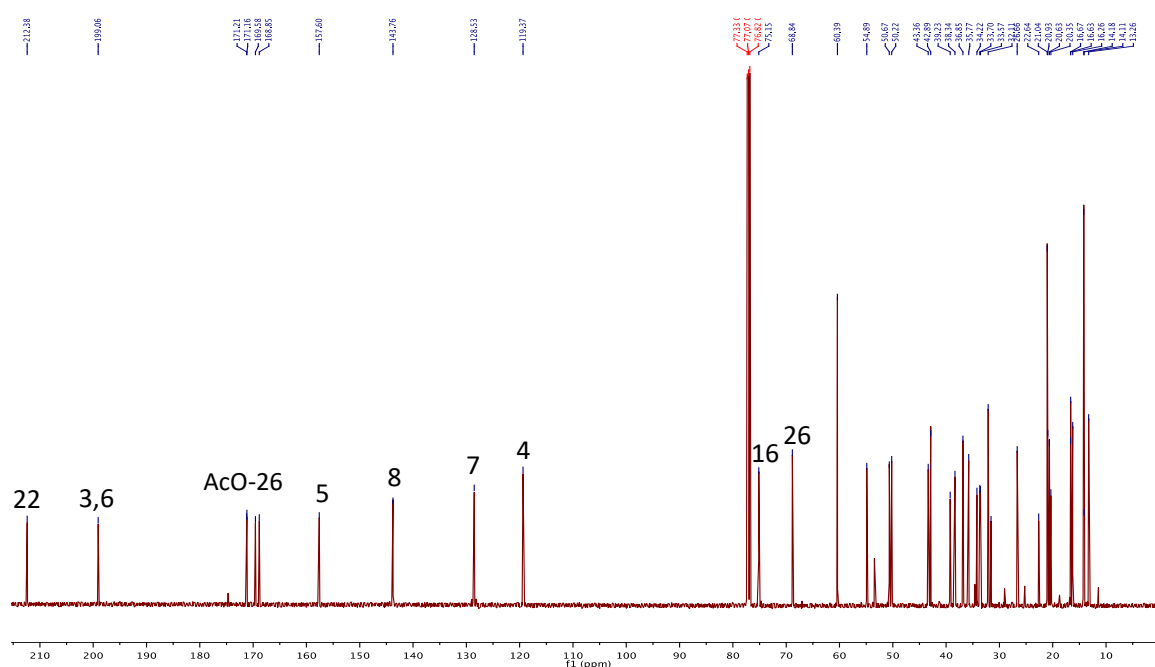


Figura 17. Espectro de RMN- ^{13}C del derivado 22-oxo **5b**.

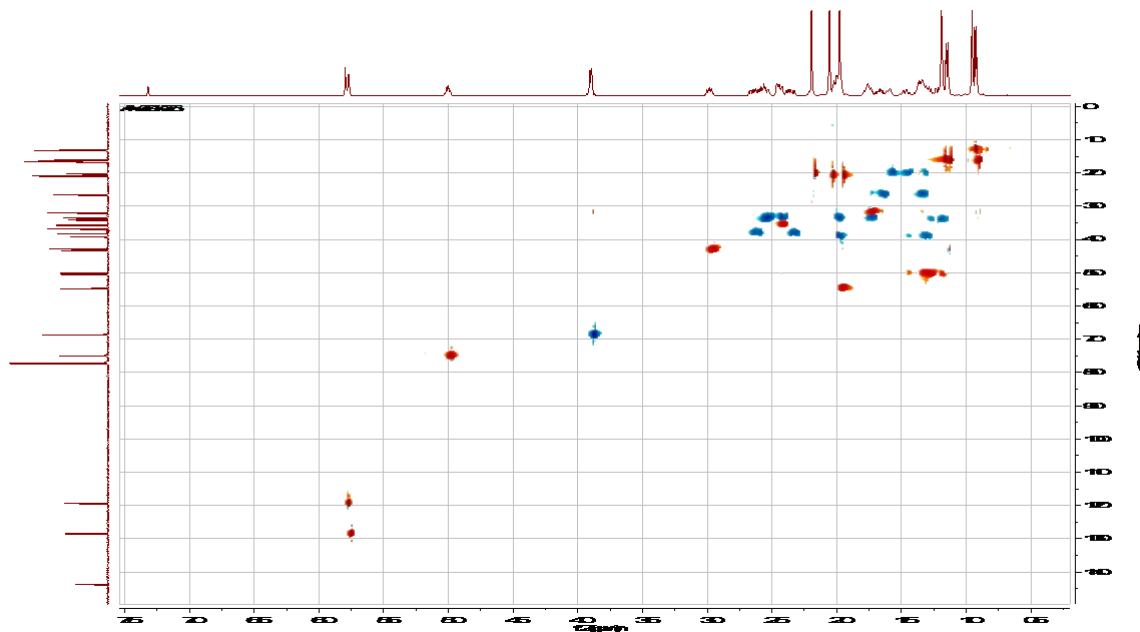
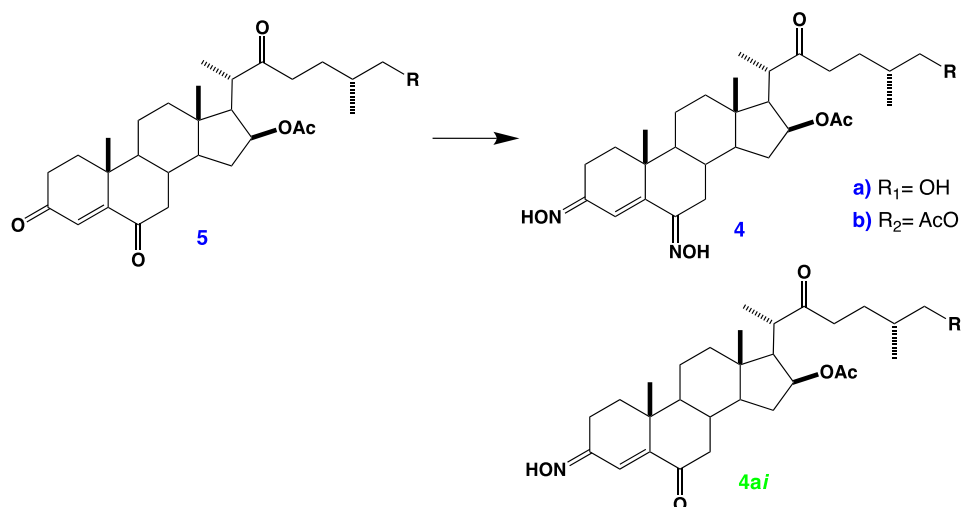


Figura 18. Espectro de RMN-HSQC del compuesto 22-oxo **5b**.

6.3 Reacción de condensación para la obtención de la dioxima de la 16,26-diacetoxi-22-oxocolest-4-en-3-ona (**4**).

Se hizo reaccionar al derivado 16,26-diacetoxi-22-oxocolest-4-en-3-ona (**5b**) con hidroxilamina y piridina, para la condensación de esta fuente de nitrógeno y obtención de la dioxima en posición 3 y 6. Como resultado de la condensación del compuesto **5b**, se obtuvo el intermediario oxima **4a_i**, que mantiene el C=O en C-6, información que da la pista para asumir que la reacción inició con la formación de la oxima en C-3, y posteriormente se dio en C-6, ya que las condiciones de reacción favorecen que el enol regrese a su forma cetónica y la reacción de condensación ocurre para conducir a la dioxima **4a** como producto mayoritario (Esquema 20). La elucidación de ambos productos se muestra enseguida:



Esquema 20. Condensación de la 22-oxocolest-4-en-3,6-diona **5** con hidroxilamina.

Por medio del espectro de RMN-¹H de la dioxima **4b**, es posible apreciar los desplazamientos químicos típicos de los H de esta estructura según su ambiente químico y aquellos más desprotegidos se desplazan a frecuencias altas en la ventana espectral, destacando el H-4 como una señal simple en la región de los vinílicos. El H-16 y los protones diastereotópicos H-26 no cambiaron mucho sus desplazamientos. La señal del H-7 se desplaza a campos bajos debido a estar adyacente al C=N de la posición 6 (Figura 19).

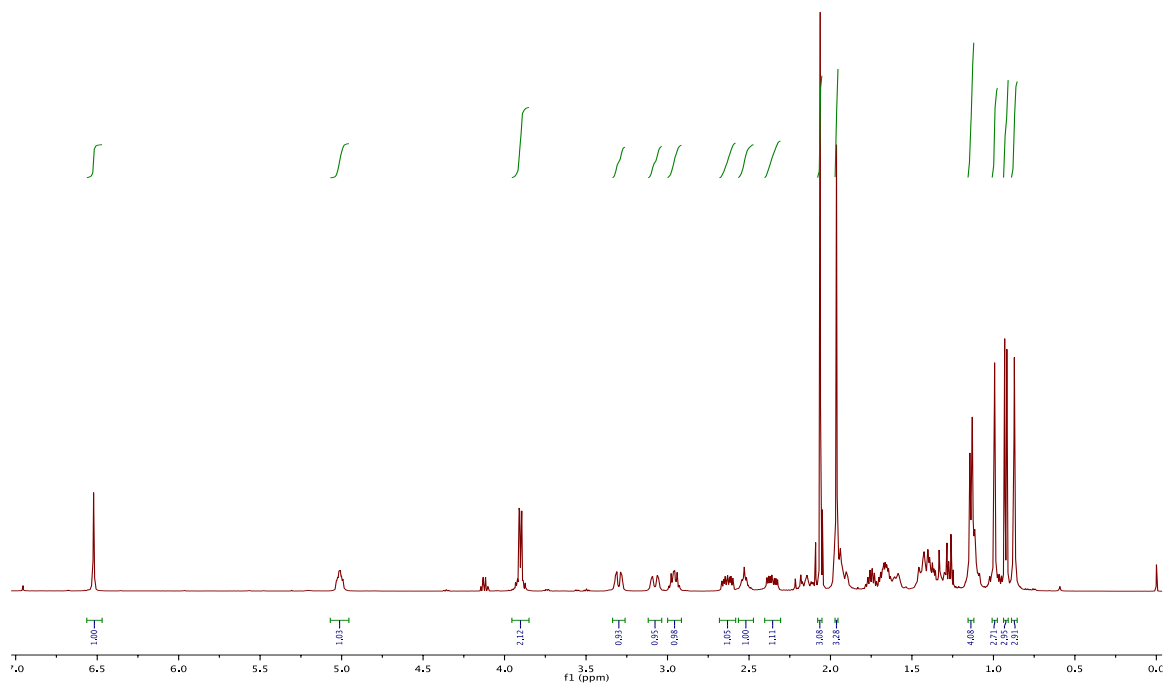


Figura 19. RMN de ^1H de la dioxima 22-oxocolest-4-en-3,6-diona **4b**.

Lo que podemos ver en el espectro de RMN- ^{13}C del compuesto dhidroximínico **4b**, son las señales de los 31 átomos de C según su ambiente químico; destacando el C-22 en 212.3 ppm, característico de una cetona aislada. Los carbonos de los C=O de los acetatos en C-26 y C-16 se ubican en 168 a 171 ppm. El desplazamiento observado para C-5 y C-4 que son vinílicos se aprecian en la región de 144 ppm y 115 ppm; en 75.2 ppm el C-16 característico de un C base de oxígeno (Figura 20).

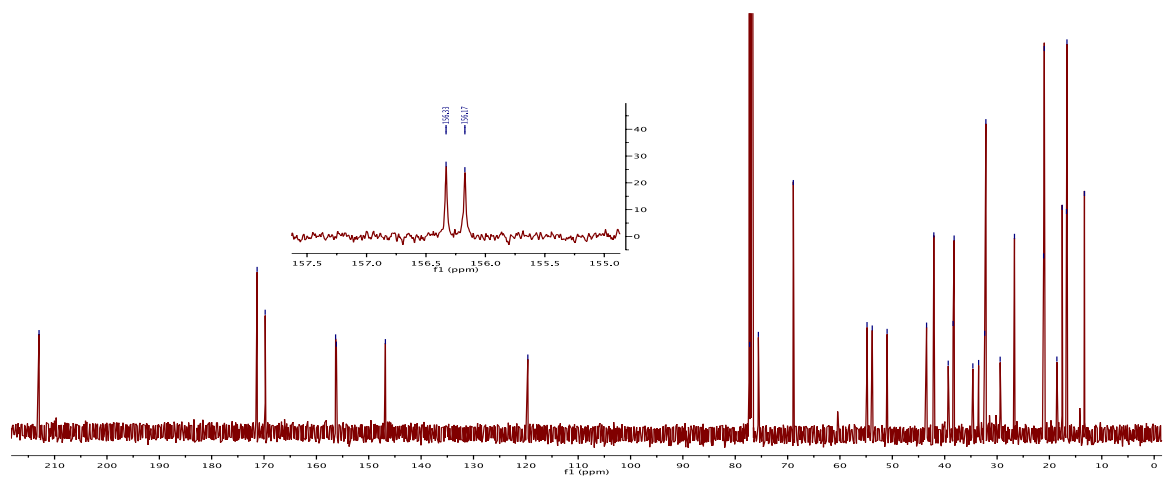


Figura 20. RMN de ^{13}C de la dioxima 22-oxocolest-4-en-3,6-diona **4b**.

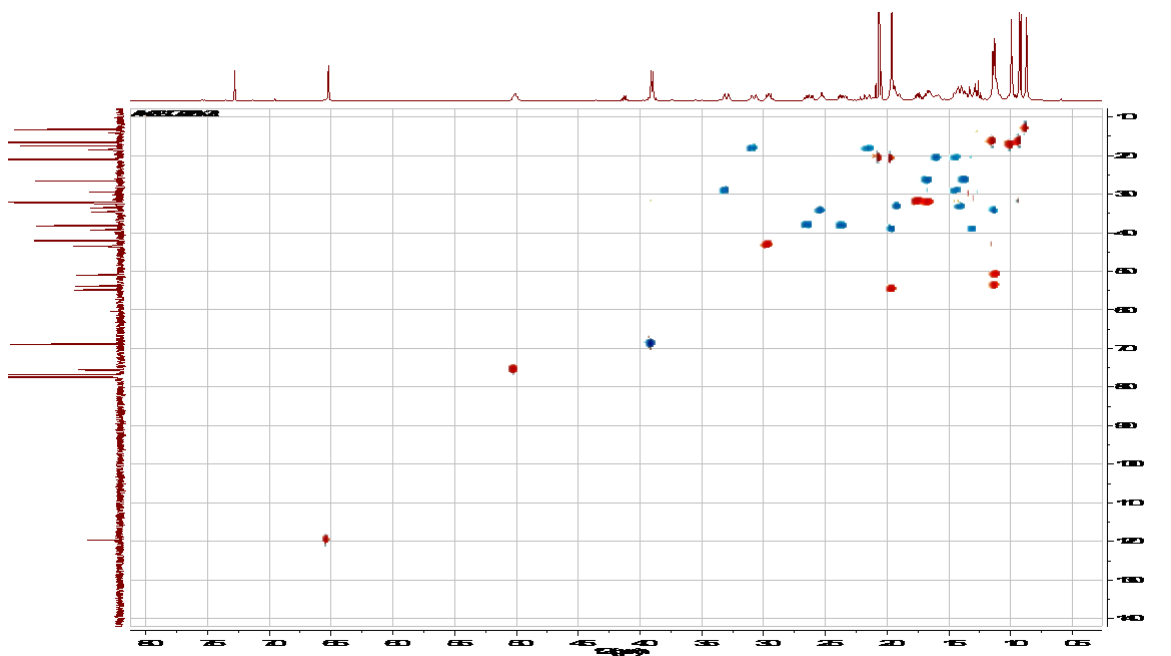


Figura 21. Espectro HSQC de la dioxima 22-oxocolest-4-en-3,6-diona **4b**.

Por medio del HSQC fue posible realizar las correlaciones C-H a un enlace, y se logró correlacionar la señal de ^1H en 6.1 ppm en la región de los vinílicos, que al ser una señal simple fue asignada al H-4; la señal múltiple en 5.0 ppm que pertenece a un metino y correlacionó con el C-16; el H-7 correlaciona con el C-7 (Figura 21).

La figura del espectro de RMN de ^1H de **4a**, nos permite analizar la presencia de los H presentes en la estructura según su entorno químico, y el H-4 se presenta como una señal simple en la región característica de los vinílicos. El H-7 se aprecia como una señal doble al estar acoplado a H-8 -como en la materia prima- y se desplaza a frecuencias altas al ser tener en su cercanía un átomo electroattractor en C-6. El metino H-16 aparece como una señal compleja múltiple desplazada a frecuencias altas por estar unido a un C base de oxígeno, así mismo ocurre con los protones en H-26 que son diastereotópicos (Figura 22).

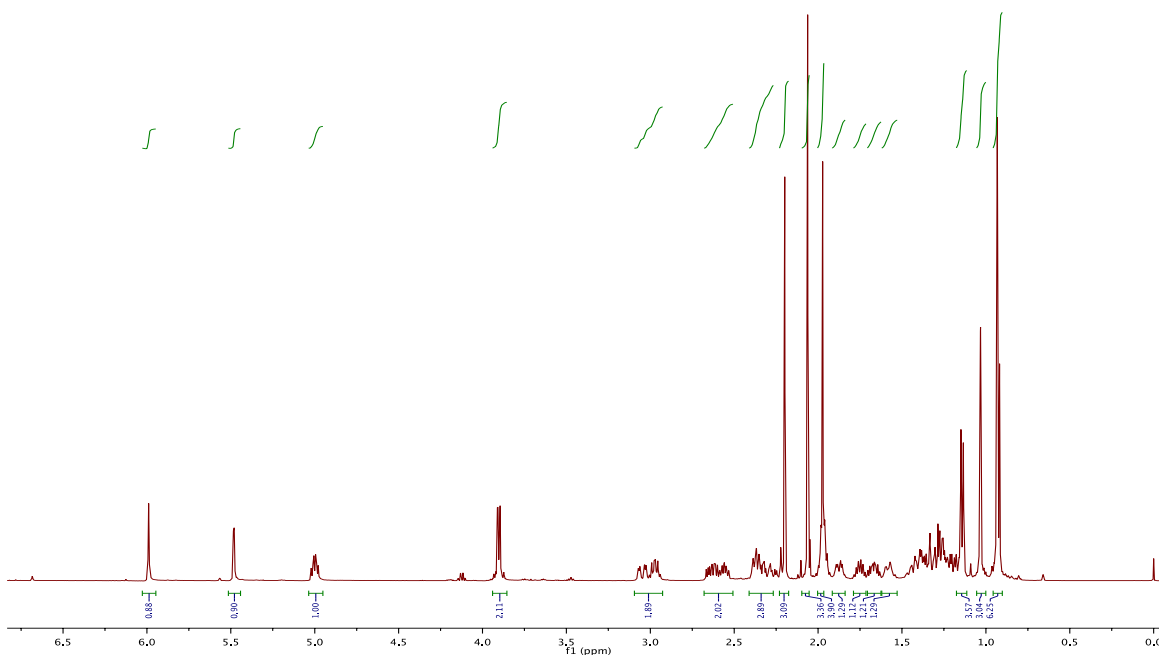


Figura 22. Espectro de RMN-¹H del derivado oxima **4a**.

En el espectro de RMN-¹³C de **4a**, podemos apreciar los 33 átomos de C de la estructura que aparecen en la ventana espectral en regiones que dependen de su ambiente químico y grado de sustitución. El C-22 aparece en 212.1 ppm por ser una cetona aislada, y el C-3 y C-6 ahora son un C=N en 156.1 ppm. Los C=O de los acetatos en las posiciones 26 y 16 se observan en la región de 169 a 171 ppm. Los C vinílicos se encuentran en la región de 144 a 115 ppm. En la región de los C base de oxígeno se encuentra en 75.3 ppm el C-16 característico de la cadena 22-oxocolestánica donde el anillo se ha abierto (Figura 23).

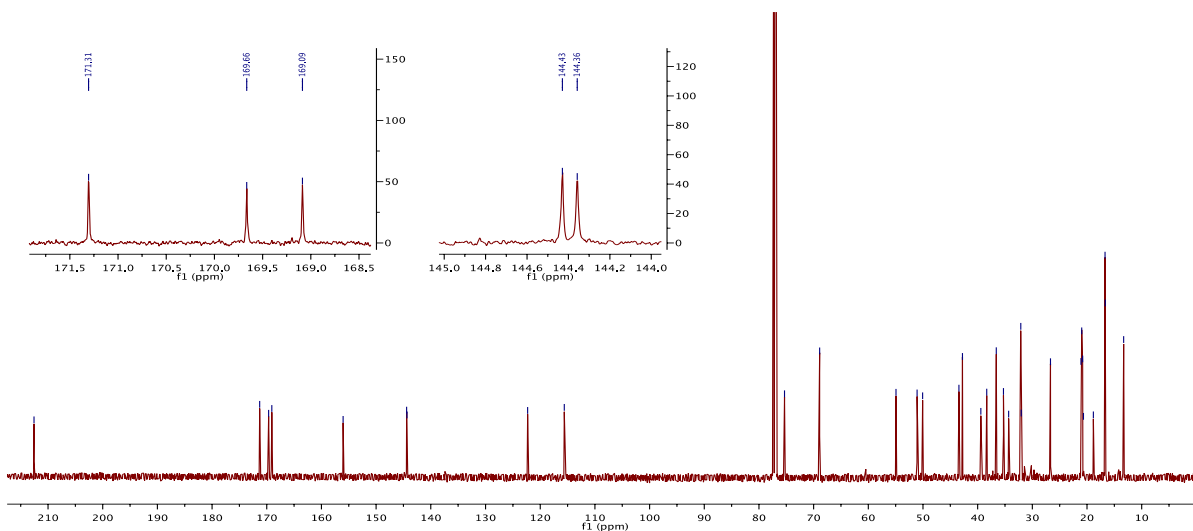


Figura 23. Espectro de RMN-¹³C del derivado oxima **4a**.

Apoyándonos en la información del espectro HSQC se realizaron las correlaciones C-H a un enlace, donde las señales en 6.01 y 5.52 ppm en la región de los vinílicos, correlacionan con diferentes carbonos, la señal doble fue asignada a H-7 que pertenece a un metilo y se acopla con H-8; y para el caso de H-4 la señal simple correlacionó con C-4. Ambas señales de H vinílicos no están acopladas, pero si forman parte de un sistema conjugado (Figura 24).

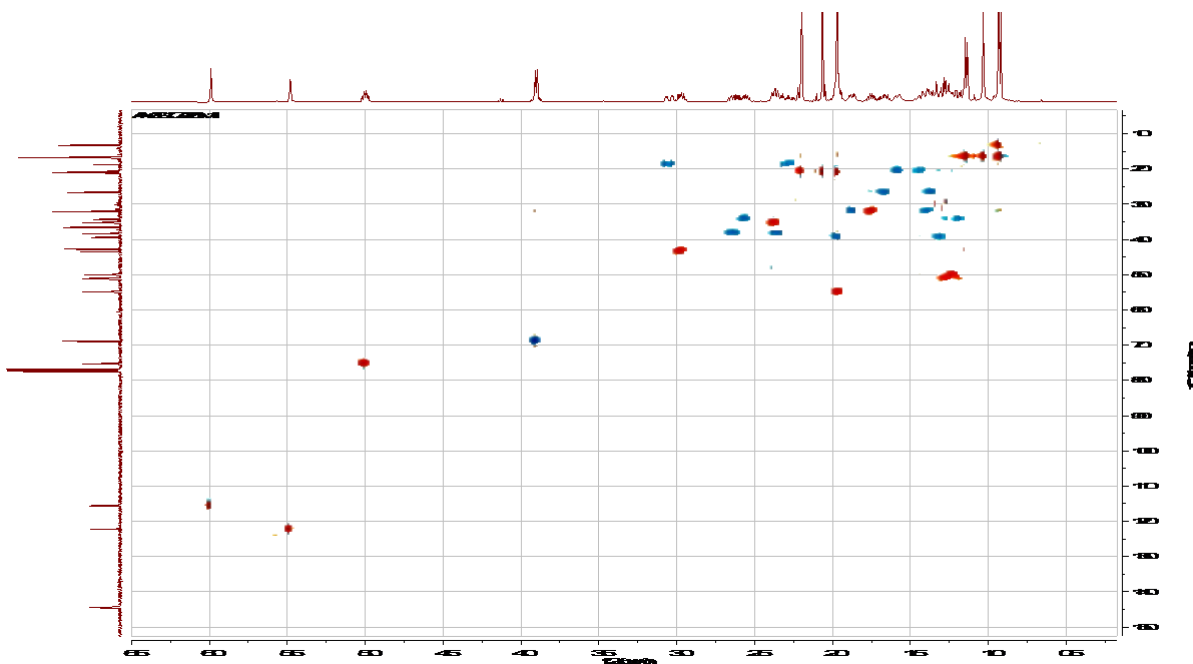


Figura 24. Espectro de RMN HSQC del derivado oxima **4a**.

Es necesario resaltar que la cetona en C-22 no reaccionó en esta ocasión, a pesar de tener los equivalentes necesarios para la reacción de condensación con las tres cetonas. La reacción fue regioselectiva, dificultándose la condensación en la posición 22, posiblemente debido al libre giro de la cadena lateral que se encuentra atada al C-20 y el impedimento estérico del metilo 21.

Al obtener mezcla de compuestos, fue de gran ayuda la purificación con el equipo de cromatografía automatizada tipo flash Selekt de Biotage, para facilitar la separación del crudo de reacción (Figura 25).



Figura 25. Cromatograma Selekt de la dioxima **3**.

Este equipo tiene un detector de UV que identifica y genera un cromatograma que permite separar según las longitudes de onda que detecta para cada componente de la mezcla a separar.

La función lambda-all del software Spektra permite escanear todas las longitudes de onda a la vez, proporcionando un análisis espectral completo de los picos a medida que eluyen de la columna flash. No se necesita la lambda máximo para un

compuesto: si se absorbe dentro del rango de longitud de onda especificado, Spektra lo detectará. En el instrumento lambda-all y dos longitudes de onda individuales se pueden mostrar a la vez; también permite el posprocesamiento de la corrida para su posterior análisis. Este software realiza, además, correcciones de línea base reales, para saber que los picos que está viendo en los datos y las fracciones que se están colectando, son reales. Esto lo efectúa automáticamente el sistema ejecutando un gradiente rápido al comienzo de la ejecución y determinando la absorbancia UV a través del gradiente en cada punto. Esta corrección la aplica en tiempo real cuando se realiza la purificación.

6.4 Uso de flujo continuo para la apertura de la cadena lateral de 3,6-dioxoespirostanos

La química de flujo es el proceso de realizar reacciones químicas en un tubo, capilar o dispositivo microestructurado (un reactor de flujo), y es mucho más que la adaptación de los procesos por lotes a los sistemas de flujo. Es una tecnología facilitadora que permite tener selectividad, reducción de subproductos, uso de condiciones de reacción drásticas (presión y temperatura), fácil control de la reacción, optimización y escalado, esto último se logra rápidamente cambiando el volumen del reactor o adaptando varios reactores de flujo en paralelo, siempre cuidando que los flujos se vuelvan a calcular para lograr los mismos tiempos de residencia (Figura 26):

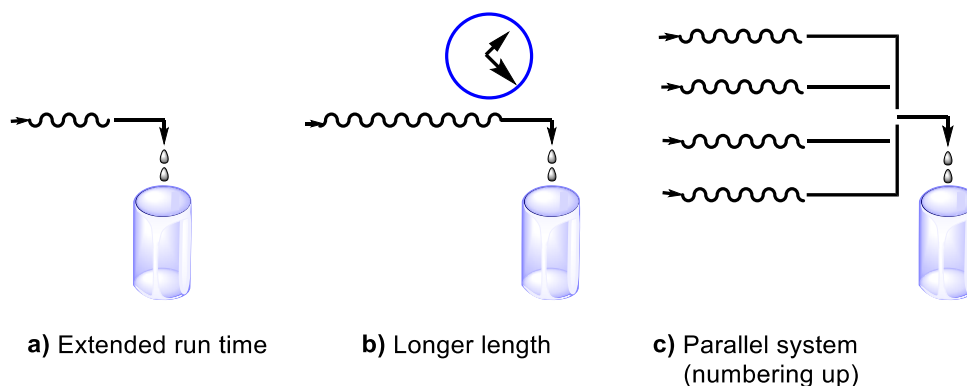


Figura 26. Ejemplo de secuencia de reacción en flujo continuo: a) extendiendo el tiempo de residencia, b) tubería de gran longitud, c) sistemas paralelos.

La química de flujo continuo es una herramienta o tecnología facilitadora que genera menos residuos por lo que se le ha asociado a la química verde. La gran ventaja de la química de flujo es la facilidad de admitir otros métodos de activación, menos utilizados, como son la electroquímica y la fotoquímica.³⁹ Tomando ventaja de la experiencia previa en el trabajo de escalamiento por flujo continuo del grupo de investigación, y aprovechando la oportunidad de contar con un reactor de flujo continuo marca Syrris modelo Asia, decidimos reestudiar la apertura de la cadena lateral de las dioxosapogeninas (diona) por flujo continuo, para aprovechar las ventajas de las reacciones con flujo laminar (Figura 27).⁴⁰

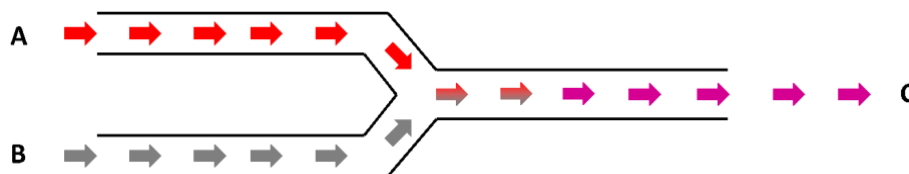


Figura 27. Flujo laminar en microrreactores, donde los reactivos están en íntimo contacto, con movimiento restringido.

Llevamos a cabo la obtención de los 22-oxocolestenos, donde la apertura de la cadena lateral de la diosgenin-3,6-diona presenta siempre la formación de muchos subproductos. Esta metodología proporcionó mayor selectividad en la reacción, como se muestra en la Figura 28 de la CCF del crudo.

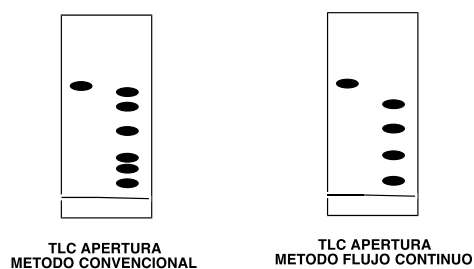
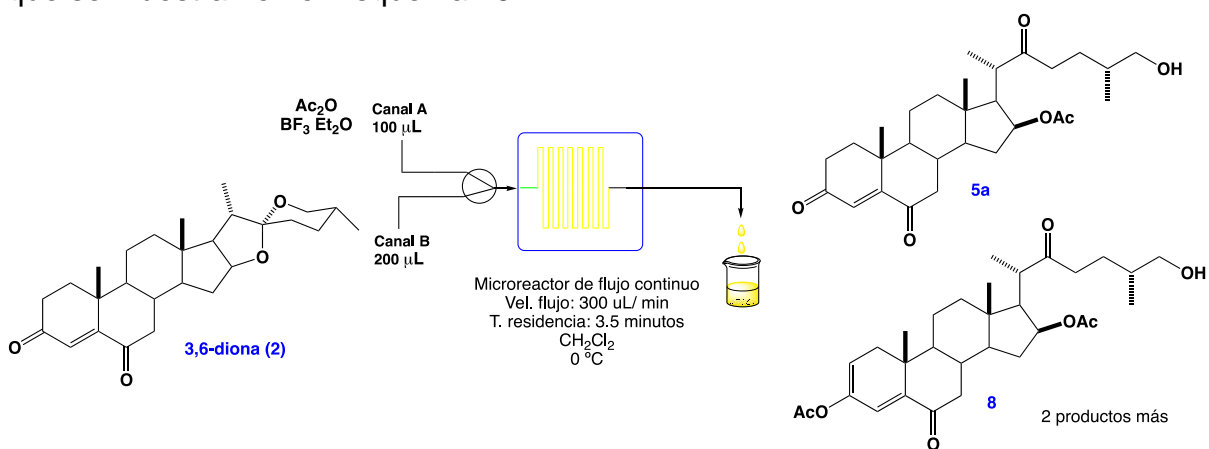


Figura 28. Micro reactor de flujo continuo y comparación del crudo de reacción por CCF en método convencional y flujo continuo.

La reacción de la apertura regioselectiva de la cadena lateral de la 3,6-diosgenindiona **2** se llevó a cabo por flujo continuo, en las condiciones de reacción que se muestran en el Esquema 15:



Esquema 21. Obtención de derivados 22-oxocholestánicos **5a** y **8** por flujo continuo.

Se logró la obtención de 4 derivados 22-oxocolesténicos en el crudo de reacción, siendo los dos mostrados en el Esquema 15 los mayoritarios, los otros 2 no se identificaron por falta de tiempo; sin embargo, al comparar la CCF de la reacción por el método convencional, y la realizada en flujo continuo (Figura 28), es posible notar la menor formación de subproductos, y como consecuencia, aumentó el rendimiento de los productos mayoritarios. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **5a** y **8** se describen a continuación.

Los datos recabados en el espectro de RMN de ^1H del derivado 22-oxocolesténico **8** muestran las señales de los H vinílicos 2 y 4 en 5.7 ppm. El H-16 se presenta como una señal múltiple en 5.0 ppm, característico de un H unido a un C base de acetato y con el anillo E abierto, lo que confirmó que es una cadena colestánica. El patrón de acoplamiento de los H-26 como una señal doble muy intensa, es distintivo de la cadena lateral 22-oxocolestánica; el H-20 se localizó a frecuencias altas como una señal múltiple (Figura 29).

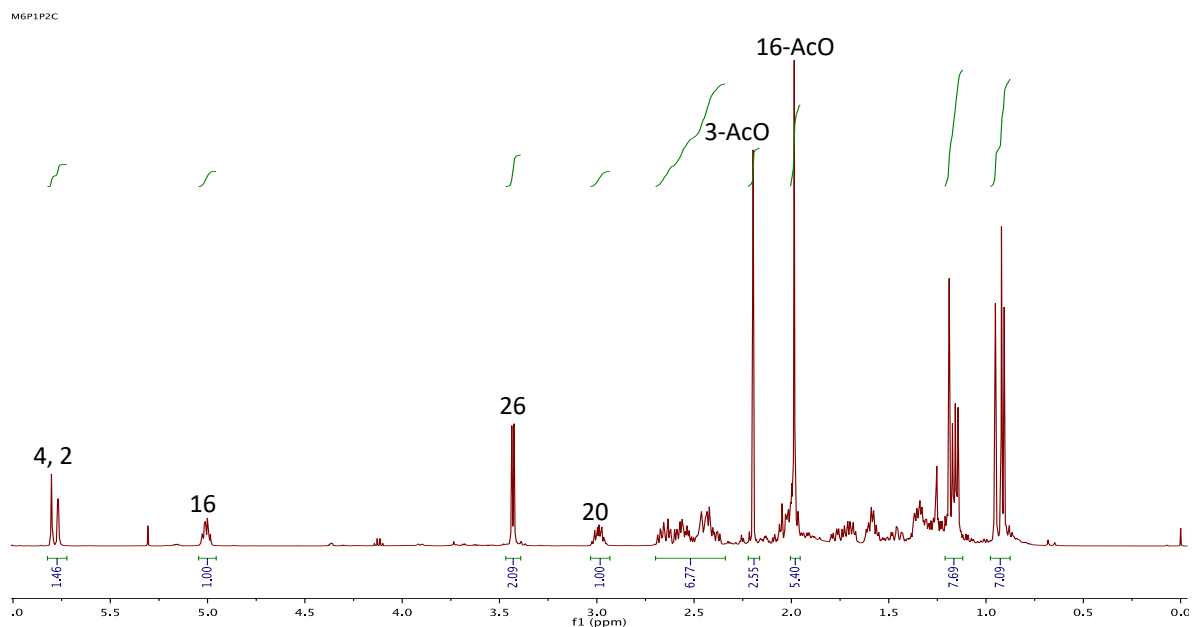


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H del derivado **8** obtenido por flujo continuo.

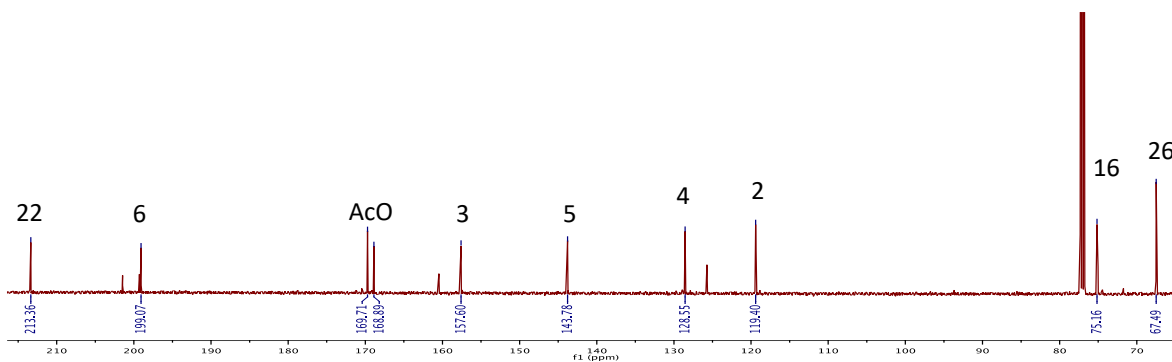


Figura 30. Espectros de RMN de ^{13}C del derivado **8** obtenido en flujo continuo.

Los datos que se obtienen del espectro de RMN de ^{13}C , permitieron asignar la estructura por la presencia de las señales del C-22 en 213.36 ppm, desplazamiento propio de una cetona aislada; la señal en 199.07 ppm fue asignada al C-6, y los C de los acetatos en C-3 y C-16; así como de los C vinílicos 2-3 y 4-5, y presentando la señal del C-16 antes de las señales del CDCl_3 , característico para una cadena colestánica. Es muy interesante que se haya formado la cetona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada en los anillos A-B, ya que extendió la conjugación en ambos anillos, logrando una estructura muy estable, con la protección del OH en C-3 (Figura 30).

6.5 Apertura de la cadena lateral de diosgenin-3,6-diona (**2**) y diosgenin-3,6-dioxima (**3**) para conducir a derivados Pseudocolestánicos con Anhídrido Mixto (AATFA).

Para funcionalizar la cadena lateral de la diosgenin-3,6-diona (**2**), se llevó a cabo la apertura con el anhídrido mixto anhídrido acético-trifluoroacético (AATFA) generado *in situ* en la mezcla de reacción. Esta metodología permite la obtención de pseudosapogeninas en buenos rendimientos, cuando estas no tienen modificaciones en los anillos A-C. ⁽⁴¹⁾ La ruta de síntesis (Esquema 22) implicó varios ensayos para conducir a la apertura regioselectiva de la cadena lateral y obtener la dioxima **7**, ya que la presencia de la dicetona de los anillos A-B tiende a reaccionar con las condiciones de reacción, provocando la señalización de este

sistema (Figura 31), provocando que se generen subproductos que no son fáciles de separar debido a la similitud del Rf (al ser isómeros sus características físicas son similares), provocando que se den mezclas complejas de separar.

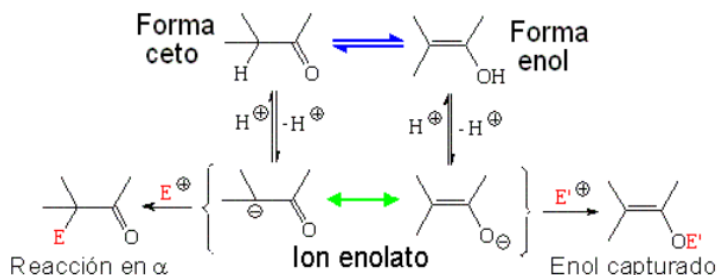
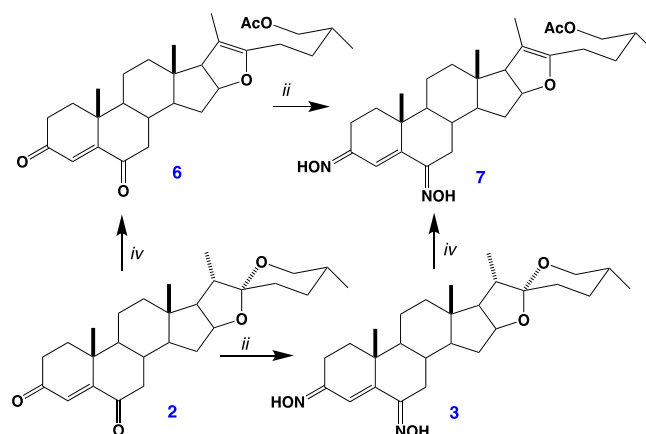


Figura 31. Enolización de cetonas en medio ácido.



Esquema 22. Pseudocolestenos cetónicos e hidroximínicos.

La caracterización de la pseudodiosgenin-3,6-diona (**6**) nos muestra que se logró la apertura regioselectiva de la cadena lateral, cuya purificación se llevó con ayuda del equipo de cromatografía automatizada tipo flash Selekt de Biotage, para facilitar la separación del crudo de reacción. La reacción originó la formación de 3 compuestos isoméricos, cuyos Rfs se encuentran muy cercanos, por lo que su purificación fue un poco compleja. El compuesto mayoritario fue el derivado **6**, que se caracterizó y asignó como sigue:

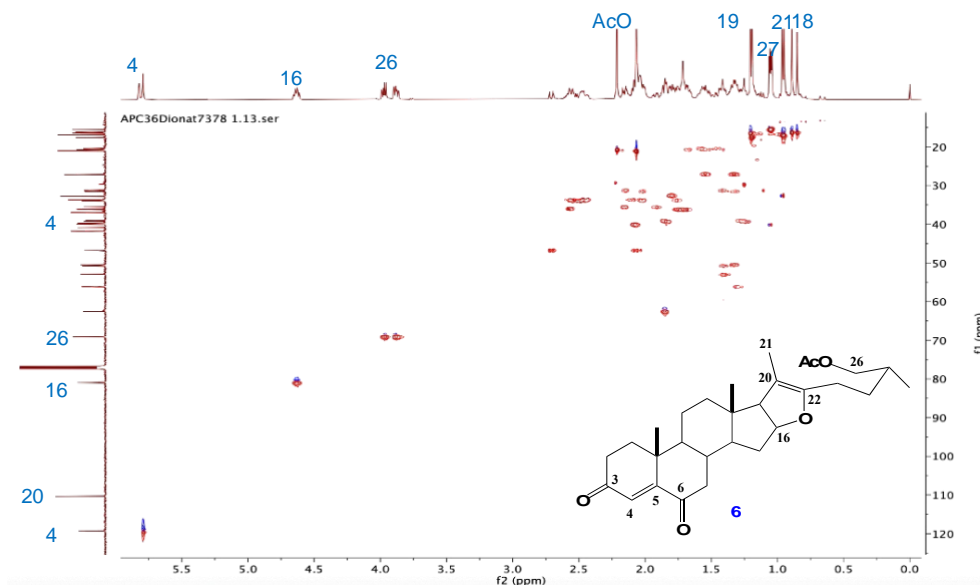


Figura 32. Espectro RMN-HSQC a 500 MHz de pseudodiona **6**.

En el espectro de RMN de ^1H para **6** se puede observar una señal en 5.61 ppm correspondiente al protón vinílico en 4, y en 4.42 ppm una señal múltiple que corresponde al H-16 con un desplazamiento químico característico cuando éste forma parte de un anillo, en este caso el furano (anillo E) de la cadena pseudocolestánica.

En cuanto a los protones H-26 que son diastereotópicos se observan como señales con una multiplicidad doble de dobles en 3.97 ppm que corresponde al H26e con $J_{26e-25}=5.97$ Hz y $J_{26e-26a}=10.8$ Hz y la segunda en 3.88 ppm correspondiente al H26a con $J_{26a-25}=5.97$ Hz y $J_{26a-26e}=10.8$ Hz patrón de acoplamiento característico derivado de la apertura del anillo F, y por la cadena lateral abierta se protegió el O en 26 y se aprecia la señal del acetato 26 en 2.05 ppm (Figura 32).

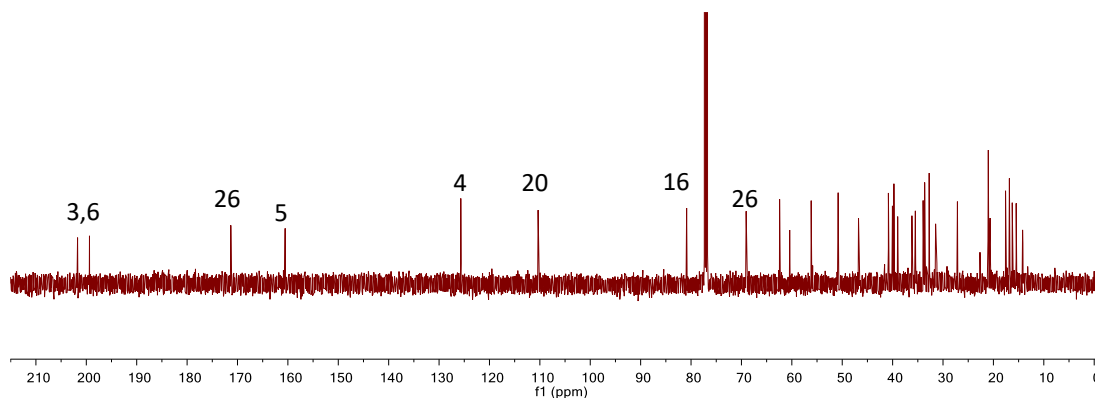


Figura 33. Espectro de ^{13}C del derivado pseudodiona **6**.

En el espectro de RMN ^{13}C de la Figura 33 del compuesto **6**, en 109.8 ppm se observa una señal que corresponde al C-20 que ahora es cuaternario; en 171.6 ppm la señal del acetato en C-26, y en 81.2 ppm una señal que pertenece al C-16 a frecuencias altas, después de las señales del CDCl_3 , característico de cuando se encuentra dentro de un ciclo en esta caso el anillo E que permanece cerrado. En frecuencias altas en la región de los C cuaternarios, las señales en 201 ppm y 199 ppm corresponden a los dos grupos carbonilos de los anillos A/B para los C-6 y C-3.

Se logró aislar el derivado pseudocolestánico **7** y este fue caracterizado. El espectro de RMN de ^1H de la dioxima **7**, permite apreciar los H de esta estructura según su ambiente químico que los coloca en ciertas regiones de la ventana espectral, destacando el H-4 como una señal simple en la región de los vinílicos, que se encuentra entre los anillos de la dioxima. El H-16 y los protones H-26 mantienen su patrón de acoplamiento con pocos cambios en su desplazamiento con respecto al derivado pseudodicetónico **6**. La señal del H-7 se desplaza a frecuencias más altas despegándose de la montaña de señales debido a estar unido al C-adyacente al C=N del C-6 (Figura 34).

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado con ayuda del experimento HSQC (Figura 34), en el que se apreciaron las correlaciones C-H, donde se apreció que la señal simple en la región de los vinílicos en 6.1 ppm, al ser una señal simple pertenece a

H-4; la señal en 5.0 ppm que integra para 1H y es un metino que correlaciona con el C-16; para el caso de H-7 la señal correlacionó con el C-7.

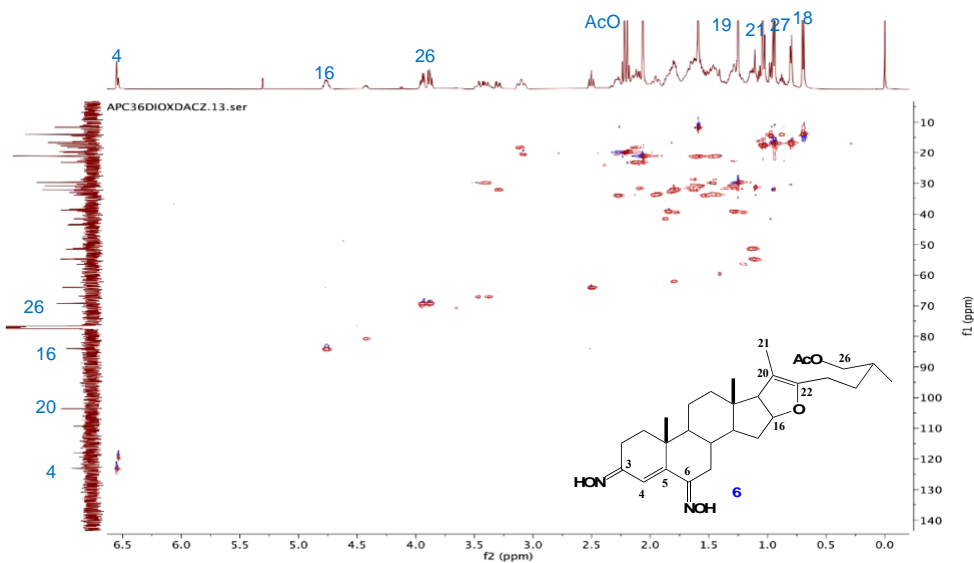
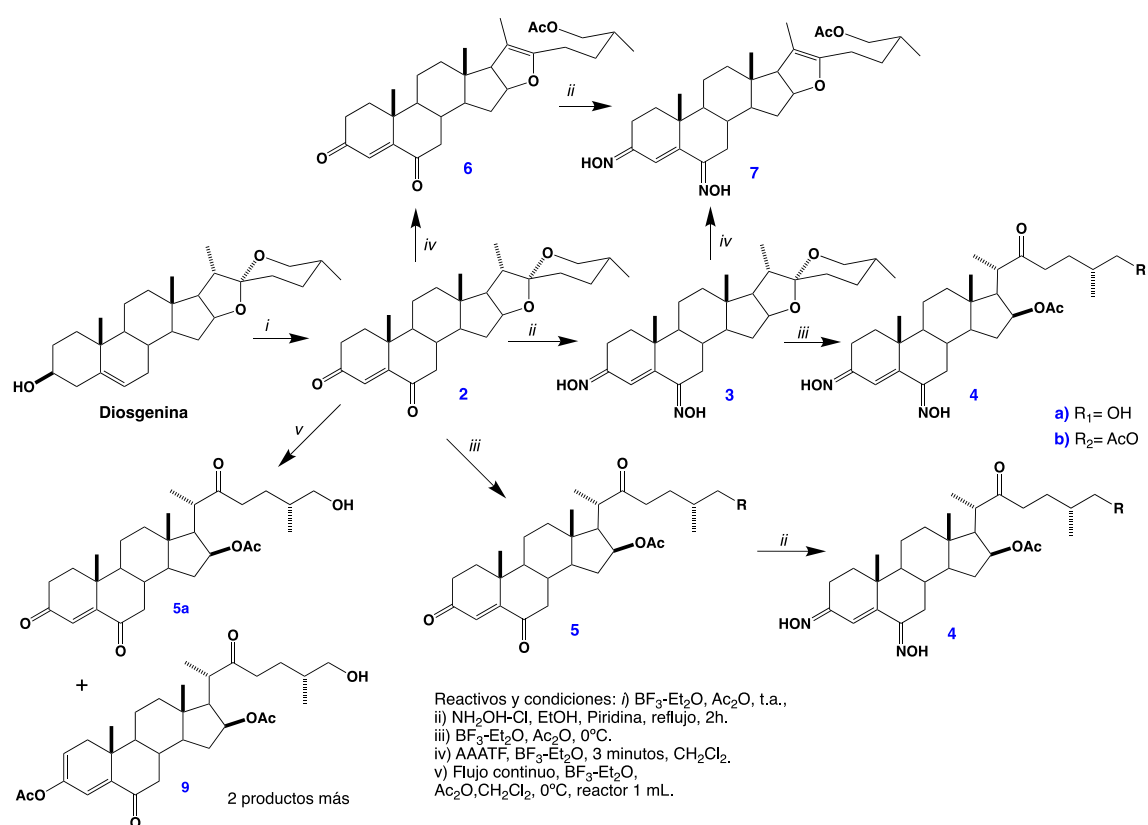


Figura 34. Espectro de RMN HSQC del derivado pseudocolestánico **7**.

7. CONCLUSIONES.

Las modificaciones para la oxidación de diosgenina fueron para generar dicetonas y tricetonas en posiciones claves del esqueleto así como en la cadena lateral esteroidal, y concluir con la formación de las oximas en dichas posiciones en buenos lo cual se logró en buenos rendimientos.

La siguiente parte de la ruta de síntesis, condujo a la modificación de la cadena lateral del derivado dicetónico **2** en medio ácido en diferentes condiciones, obteniendo los derivados dicetónicos e hidroximínicos con cadena espirostánica, 22-oxocolestánicas y pseudocolestánica en rendimientos moderados, debido a la formación de subproductos (Esquema 23).



Esquema 23. Ruta de síntesis que se siguió.

Hemos encontrado que las proporciones de los derivados 26-OH y 26-OAc y de los otros 4 subproductos, no son las mismas que se obtienen cuando se realizan sobre

sapogeninas como diosgenina, que no presentan el sistema dicetónico en los anillos A-B. Al analizar los resultados obtenidos en esta serie de reacciones, podemos asumir que la dicetona en los anillos A-B del esteroide ejerce un efecto estereoelectrónico que afecta la reactividad de posiciones tan alejadas como los anillo E/F, conduciendo a la formación de los derivados descritos y caracterizados en proporciones diferentes en comparación con materias primas que no han sido modificadas, así como otros derivados que se forman por enolización y otras reacciones secundarias. Este efecto no ha sido detectado en los reportes donde la materia prima no contiene grupos cetónicos electroatrayentes.

Para tratar de disminuir la formación de subproductos y aumentar el rendimiento en la apertura de la cadena lateral de la 3,6-diona para obtener compuestos 22-oxocolestánicos, se usó química verde. La química de flujo continuo nos ayudó a reducir la formación de subproductos, pasando de obtener 6 productos a solo 4. De estos ensayos se obtuvieron los compuestos **5-7** en cantidades suficientes para su caracterización y evaluación biológica.

La obtención de las nuevas oximas de los derivados cetónicos estirostánicos, 22-oxocolestánicos y pseudocolestánicos se pensó con el objetivo de evaluar su actividad biológica e impulsar su potencial de acción como anabólicos. Los derivados dicetónicos **2** y **6** fueron tratados con hidroxilamina para la obtención de nuevos derivados dihidroximínicos. Los nuevos productos obtenidos en cantidades suficientes se enviaron para la evaluación *in vitro* de su actividad biológica en líneas celulares de músculo esquelético, que se espera tengan resultados alentadores en la síntesis de proteínas y aumento del número de células musculares.

8. REFERENCIAS

- ¹ Esposito, D., Komarnytsky, S., Shapses, S., & Raskin, I. (2011). Anabolic effect of plant brassinosteroid. *The FASEB Journal*, 25(10), 3708–3719. doi:10.1096/fj.11-181271.
- ² Morgan, B. P., & Moynihan, M. S. (2000). Steroids. In A. Seidel (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (Wiley, p. -). USA. <http://doi.org/10.1002/0471238961>
- ³ Klyne, W.; Química de los Esteroides 1a. Ed., CECSA, 1970.
- ⁴ Griffin, R. W. Química orgánica moderna. Nueva York : McGraw-Hill, 1981, 494.
- ⁵ Chappell, L., Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J. R., Mafham, M., Bell, J. L., ... & RECOVERY Collaborative Group. (2020). Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19-preliminary report. *The New England journal of medicine*.
- ⁶ Cea, A. (1985). Biotecnología de esteroides. *Elementos*, 1(4/5), 15–19.
- ⁷ Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88(06), 587–605. <http://doi.org/doi:10.1079/BJN2002725>
- ⁸ Miramontes, L. (2002). La industria de esteroides en México y un descubrimiento que cambiaría el mundo. *Ingenierías*, 5(17), 20–24.
- ⁹ León, F. (2000). El origen de Syntex, una enseñanza histórica en la ciencia mexicana. *ContactoS*, (38), 5–9.
- ¹⁰ (ACS), A. C. S., & (SQM), S. Q. de M. (1999). The Marker degradation and creation of the mexican steroid hormone industry 1938-1945. *Am. Chem. Soc., Y Soc. Quim. Mex.*
- ¹¹ a) Khrpach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; de Groot, A. E. *Brassinosteroids, A New Class of Plant Hormones*; Academic Press: San Diego. 1999. b) Cutler, H. G.; Yokota, T.; Adam, G. *Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications*. Eds. ACS. Washington, D. C.: 1991. c) Sakurai, A.; Yokota, T.; Clouse, S. D. *Brassinosteroids. Steroidal Plant Hormones*. Springer-Verlag. Tokyo: 1999. d) Hayat, S.; Ahmad, A. Eds. *Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 2003.
- ¹² Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R., & Smith, M. V. (1970). The discovery of α -elongation factor, its properties, and mechanism of action. *Nature*, 225, 1065-1068.
- ¹³ Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., & Yoshida, S. (1998). Biosynthesis of brassinosteroids in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 49(7), 1841-1848.
- ¹⁴ a) Iglesias-Arteaga, M. A., Símuta-López E. M., Montiel-Smith, S., Meza-Reyes, S., & Sandoval-Ramírez, J. (2005). New synthesis of 3-benzoylindoles using a modified Bischler–Napieralski reaction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3A), 381-384. b) Rincon, S., del Rio, R. E., Sandoval-Ramírez, J., Meza-Reyes, S., Montiel-Smith, S., Fernández-Herrera, M. A., Farfan, N., & Santillán, R. (2006). An efficient synthesis of arylpiperazines from 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. *Tetrahedron*, 62(11), 2594-2599.
- ¹⁵ Gómez-Calvario, V., Arenas-González, A., Meza-Reyes, S., Montiel-Smith, S., Vega-Báez, J.L., Sandoval-Ramírez, J., & Hernández-Linares, M.G. (2013). 15. Synthetic pathway to 22,23-dioxocholestanic chain derivatives and their usefulness for obtaining brassinosteroid analogues. *Steroids*, 78, 902.

-
- ¹⁶ a) Mikhaleva, A., Zaitsev, A. B., & Trofimov, B. A. (2006). Advances in synthesis of azolopyridines. *Russian Chemical Reviews*, 75(9), 797-823. b) Lokanatha, K. M. (2008). Pyrido[2,3-d] pyrimidines: a review of recent progress. *Top Heterocycl Chem*, 13, 1-69.
- ¹⁷ Sikharulidze, M. I., Nadaraia, N. S., Kakhabrishvili, M. L., Barbakadze, N. N., & Mulkidzhanyan, K. G. (2010). *Chemistry of natural compounds*, 46(3), 493-494.
- ¹⁸ Reyes Melchor J. (2022). *Obtención de aminoesteroides a partir de diosgenina y su análisis quimioinformático*. Tesis de licenciatura. BUAP.
- ¹⁹ a) Abele, E., Abele, R., Golomba, L., Višnevská, J., Beresneva, T., Rubina, K., & Lukevics, E. (2010). Synthesis and reactions of heterocyclic azomethine ylides. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 46(8), 1123-1153. b) Abele, E., Abele, R., Rubina, K., & Lukevics, E. (2005). Synthesis of azomethine ylides from heterocyclic imines and their reactions. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 41(2), 163-190.
- ²⁰ Díaz-Velandia, J., Durán-Díaz, N., Robles-Camargo, J., & Elena Loaiza, A. (2011). Preparación de nanopartículas de quitosano como sistema de liberación controlada de compuestos fenólicos. *Universitas Scientiarum*, 16(3), 294-302.
- ²¹ Bansal, R., & Acharya, P. C. (2014). *Chem. Rev.*, 114, 6986.
- ²² Cui, J., Huang, L., Fan, L., & Zhou, A. (2008). A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-one steroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp. sponges. *Steroids*, 73(3), 252-256.
- ²³ Parvez, M. K., Tabish Rehman, M., Alam, P., Al-Dosari, M. S., Alqasoumi, S. I., & Alajmi, M. F. (2019). Plant-derived antiviral drugs as novel hepatitis B virus inhibitors: Cell culture and molecular docking study. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(3), 389–400. doi: 10.1016/j.jsps.2018.12.008
- ²⁴ Smith, M. B.; March, J. (2001). *Advanced Organic Chemistry. Reaction Mechanisms and Structure*. 5th ed. John Wiley & Sons: New York.
- ²⁵ Iglesias-Arteaga, M. A., Sandoval-Ramírez, J., Mata-Esma, M. Y., Viñas-Bravo, O., & Bernès, S. (2004). Synthesis of a new oxime-steroid derivative with antiproliferative activity. *Tetrahedron Letters*, 45(25), 4921-4926
- ²⁶ Zhabinskii, V. N.; Khripach, N.B.; Khripach, V. A. (2015). Brassinosteroid plant hormones: structures, biosynthesis, bioactivity, and functions. *Steroids*, 97, 87-97.
- ²⁷ Michelini, F. M., Ramirez, J. A., Berra, A., Galagovsky, L. R., Alche, L. E. (2004). Antiviral activity of steroidal glycosides from the roots of *Solanum nigrum*. *Steroids*, 69(11-12), 751-755.
- ²⁸ Malikova, J., Swaczynova, J., Kolar, Z., and Strnad, M. (2008). Naturally occurring brassinosteroids - biosynthesis, functions and applications. *Phytochemistry*, 69, 418-435.
- ²⁹ Esposito, D., Komarnytsky, S., Shapses, S., & Raskin, I. (2011). An aqueous extract of *Polypodium leucotomos* (Fernblock) prevents development of UV-induced hyperplasia and dermal elastosis in hairless mice. *FASEB Journal*, 25(11), 3708-3718. doi: 10.1096/fj.11-186874
- ³⁰ Kuhn, C. M. (2002). The emergence of the study of addiction. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 411-423. doi: 10.1210/rp.57.1.411
- ³¹ Di, R., Murray, A. F., Xiong, J., Esposito, D., Komarnytsky, S., Gianfagna, T. J., & Munafo Jr, J. P. (2020). In vitro anticancer activity of carnosol in triple negative breast cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 258, 112766.
- ³² Perrin, P. D., & Armarego, W. D. F. (1989). *Purification of Laboratory Chemicals* (3rd ed.). Pergamon Press.
- ³³ Kaufman, S., & Rosenkranz, G. (1978). A general method for the synthesis of N-alkylaziridines. *Journal of Organic Chemistry*, 43(17), 3502-3504.
- ³⁴ Hernández, J. F., & Ibarra, L. E. (2017). Compounds derived from the oxidation of cholesterol: An update. *Steroids*, 118, 1-17.
- ³⁵ 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. (2010).

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*, 18(7), 2474-2484.

³⁶ Guerrero-Luna, G. (2017) Diseño y síntesis de nuevos promotores de crecimiento vegetal esteroidales polihidroxilados a partir de espirostenos. Tesis de maestría. BUAP.

³⁷ Hudlicky, T. (1996). Ring Opening Reactions: Conformational Effects, Stereochemistry and Reactivity. In *The Way of Synthesis* (pp. 145-190). John Wiley & Sons, Inc.

³⁸ Sánchez-Sánchez, L., Hernández-Linares, M. G., Escobar, M. L., López-Muñoz, H., Zenteno, E., Fernández-Herrera, M. A., Guerrero-Luna, G., Carrasco-Carballo, A., & Sandoval-Ramírez, J. (2016). Antiproliferative, cytotoxic, and apoptotic activity of steroidal oximes in cervicouterine cell lines. *Molecules*, 21(11), 1533.

³⁹ Hernández-Linares, M.G., Guerrero-Luna, G, Pérez-Estrada, S., Ellison, M., Ortin-Avilés, M.M, Garcia-Garibay, M. A. (2015) Large Scale Green Chemical Synthesis of Adjacent Quaternary Chiral Centers by Continuous Flow Photodecarbonylation of Aqueous Suspensions of Nanocrystalline Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 137 (4), 1679–1684.

⁴⁰ Guerrero-Luna, G. (2022). Síntesis de nuevos bis-esteroides a partir de sapogeninas esteroidales usando metodologías verdes. Tesis doctoral. BUAP

⁴¹ Montiel-Smith, S., Meza-Reyes, S., Viñas-Bravo, O., Fernández-Herrera, M. A., Martínez-Pascual, R., Sandoval-Ramírez, J., Fuente, A., Reyes, M., & Ruiz, J. (2005). Synthesis of 22-oxocolestanic acid derivatives. *Arkivoc*, 6, 127-135.