



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biotecnología

“Obtención de aminoesteroides a partir de diosgenina y su análisis quimioinformático”

Tesis presentada para obtener el título de:

Licenciada en Biotecnología

Presenta:

Jaquelin Reyes Melchor

Directora de Tesis:

Dra. María Guadalupe Hernández Linares

Co-directora de Tesis:

Dra. Maura Cárdenas García

Puebla, Pue., Mayo de 2022.



Este trabajo de tesis Fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación del Jardín Botánico Universitario de la BUAP, bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Hernández Linares y la Dra. Maura Cardenas García del Laboratorio de Fisiología Celular de la Faultad de Medicina de la BUAP. Agradezco al CONACyT (Proyecto CF-2019-171508) el apoyo para la realización de esta tesis.



Parte de este trabajo de tesis fue presentado en los siguientes foros académicos:

1. **XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**, la cual se llevó a cabo en modalidad virtual, del 19 al 23 de abril de 2021, con la presentación de los siguientes trabajos en modalidad cartel en plataforma Twitter:
 - a) Oxidación de esteroides: nuevas alternativas de esteroides con actividad anabólica.
2. **XV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**, la cual se llevó a cabo en Cuernavaca, Morelos., del 08 al 12 de abril de 2019, con la presentación de los siguientes trabajos en modalidad cartel:
 - a) Síntesis de nuevos derivados 22-oxocolestenos hidroximínicos y evaluación de la actividad antimicrobiana frente a cepas resistentes
3. **57th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America**, la cual se llevó a cabo en San Luis Potosí, del 4 al 8 de agosto de 2018, con los trabajos en cartel titulados:
 1. Development of a green methodology for the extraction of saponins from *Dioscorea mexicana*.

Artículos arbitrados:

3. Guerrero-Luna, G.; Reyes-Melchor, J.; Bernès, S.; Hernández-Linares, M.G. Diosgenin-3,6-dione: second polymorph in space group P212121. *IUCrData* **2020** 5, x201200. <https://doi.org/10.1107/S2414314620012006>

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 ESTEROIDES	3
1.2 PRINCIPALES FAMILIAS DE ESTEROIDES	3
1.2.1 Saponinas esteroidales	3
1.2.2 Sapogeninas esteroidales	5
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 MODIFICACIONES DE LAS SAPOGENINAS. CADENA LATERAL Y ANILLOS A-D	8
2.2 Importancia de las oximas en la actividad biológica.....	11
2.3 Oximas esteroidales. Reactividad y actividad biológica.	12
2.4 PROGRAMAS PREDICTORES QUIMIOINFORMÁTICOS.....	15
2.4.1 Molinspiration.....	15
2.4.2 Swiss Target Prediction.....	16
2.4.3 PASS Online.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 Objetivos particulares.....	18
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
4.1 EQUIPOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS	19
4.2 Disolventes y materias primas.....	20
4.3 PROGRAMAS PREDICTORES, ANÁLISIS EN SILICO	20
4.4 Caracterización de Diosgenina.....	21
4.5 MODIFICACIÓN DE LOS ANILLOS A Y B	22
4.5.1 Obtención del Acetato de Diosgenina	22
4.5.2 OBTENCIÓN DEL EPÓXIDO β, β DEL ACETATO DE DIOSGENINA.....	23
4.5.3 Apertura del epóxido β, β del acetato de diosgenina (40)	24
4.5.4 OXIDACIÓN DEL TRIOL DE DIOSGENINA (41)	25
4.5.5 Oxidación selectiva de Diosgenina.....	26
4.5.6 FORMACIÓN DE (25R, 3Z, 6Z)-DIHIDROXIMINOESPIROST-4-ENO (44).	27
4.5.7 Formación de la cadena 22-oxocolestánica de 43.	28
4.5.8 PROTECCIÓN DEL DERIVADO 26-HIDROXI-22-OXO-3,6-DIONA. OBTENCIÓN DE 6,16,26-TRIACETOXI-22-OXO-4-EN-3-ONA (48).	30
4.5.9 Reacción de condensación para la obtención de la oxima y dioxima de la 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (122)	31

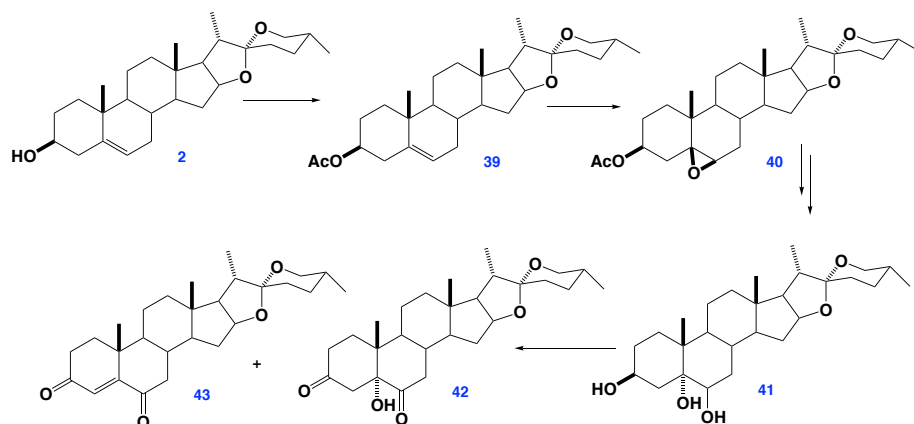
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
5.1 Acetilación de Diosgenina.....	33
5.2 Epoxidación esterosselectiva del acetato de diosgenina (39).....	35
5.3 Apertura en medio ácido del β -epóxido 40 para obtener el triol trans-diaxial (41)..	38
5.4 Oxidación del triol 41 con reactivo de Jones	43
5.5 Formación de oximas en posiciones C-3 y C-6.	53
5.6 Apertura del espiroacetal de derivados 3,6-dicetónicos.	56
5.7 Protección del derivado 26-hidroxi-22-oxo-3,6-diona. Obtención de 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona	67
5.8 Reacción de condensación para la obtención de la dioxima y oxima de la 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (49 y 50)	70
5.9 Análisis de la actividad biológica in silico a través de métodos quimioinformáticos	78
5.9.1 Análisis in silico.....	78
5.9.2 Resultados	79
6. CONCLUSIONES.....	85
7. BIBLIOGRAFÍA	88
8. ANEXOS	90

ABREVIATURAS.

δ	Desplazamiento químico en RMN
Δ	Doble enlace
Δ_r	Calentamiento a reflujo
K_2CO_3	Carbonato de Potasio
KOAc.	Acetato de Potasio
ax	Axial
c	Señal cuádruple
COSY	Espectroscopía de correlación (C orrelation S pectroscopy)
d	Señal doble (en datos de RMN)
dc	Señal doble de cuádruple
dd	Señal doble de doble
ddd	Señal doble de doble de doble
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformamida
ec	Ecuatorial
EMAR	E spectrometría de m asas de a lta r esolución
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces (H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation)
HSQC	Espectroscopía de Correlación Heteronuclear de Cuanto Único (H eteronuclear S ingle Q uantum C orrelation)
IC ₅₀	Concentración que inhibe el 50% de crecimiento celular
<i>m</i> -CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
<i>p</i> -TsCl	Cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo
μ g	Picogramos
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Señal simple
t	Señal triple
m	Señal múltiple
t. a.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina (Thin-layer chromatography)
TMS	Tetrametilsilano
TsOH	Acido <i>p</i> -toluensulfónico
Ts	Grupo tosilo

RESUMEN.

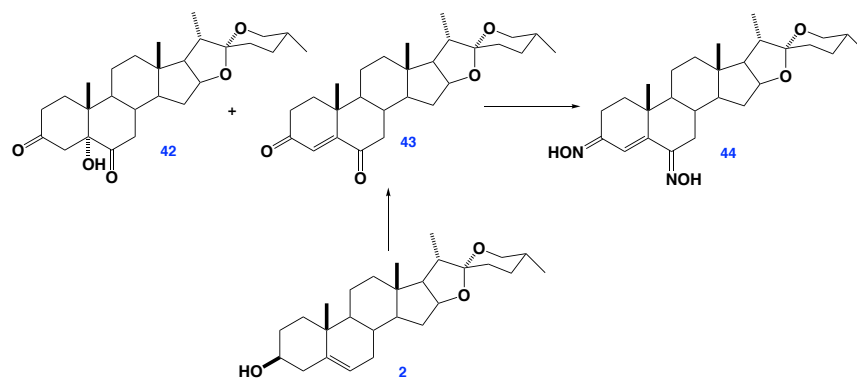
En el presente trabajo de tesis se presentan diferentes modificaciones a los anillos A y B de la diosgenina (**2**), para obtener nuevos compuestos con estructuras poli-oxigenadas, algunas de las cuales fueron evaluadas como agentes anticancerígenos. La estrategia sintética consistió en el desarrollo de una metodología viable para la obtención de nuevos derivados esteroidales con la modificación de los anillos A/B de diosgenina, se oxidó el doble enlace Δ^5 para conducir al derivado β -epóxido **40** de manera estereoselectiva. Este derivado **40** se hidrolizó en medio ácido para realizar la desprotección del alcohol de C-3 y efectuar la apertura del epóxido obteniendo el triol **41**, mismo que fue oxidado para conducir a las dicetonas **42** y **43** (Esquema A).



Esquema A.

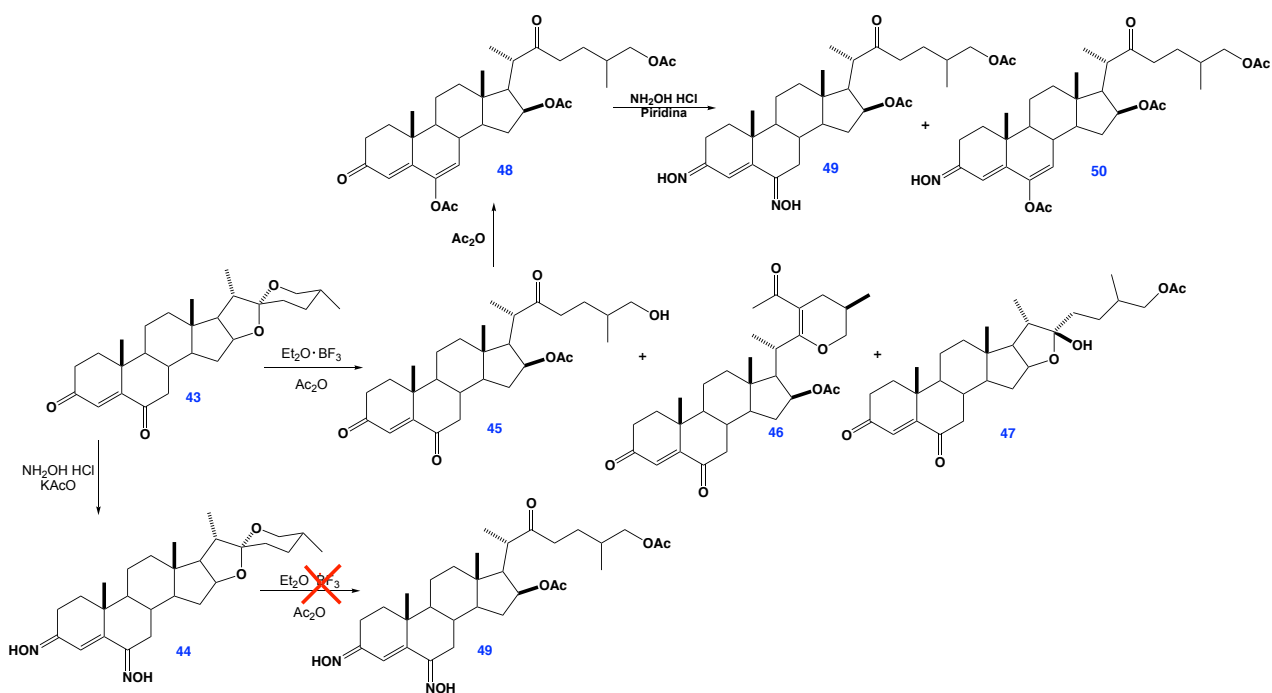
Estos derivados dicetónicos espiroestánicos **42** y **43** fueron tratados con hidroxilamina para la obtención de nuevos derivados hidroximínicos. Se obtuvo una mezcla de productos donde **44** fue el producto mayoritario. Los resultados de esta reacción dieron la pauta para la elucidación del mecanismo y además optimizar la obtención de la dioxima **44**, por lo que se propuso una metodología alterna para conducir al intermediario dicetona con un Δ^4 **43**, generando una ruta de síntesis más corta, accesible y de mayor rendimiento global (Esquema B).

El compuesto dicetónico **43**, fue modificado en condiciones ácidas para lograr la apertura selectiva del espirocetal para conducir a los derivados **45-47** con cadena 22-oxocolestánica (Esquema C).



Esquema B.

Con el derivado 22-oxocolestánico **45** se efectuó su protección con Ac_2O y posterior condensación con hidroxilamina, lo cual condujo selectivamente al nuevo derivado 22-oxo-3,6-dihidroiminico **49** y la oxima **50**, con posible actividad antiproliferativa.



Esquema C.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Esteroides.

Los esteroides son lípidos simples no saponificables, en su mayoría de origen eucarionte, presentes en células animales y vegetales ampliamente distribuidos en la naturaleza, donde realizan funciones biológicas elementales de gran importancia, encontrándose involucrados en diversos procesos bioquímicos y con función estructural, tal como el colesterol (Figura 1).¹ Cuando son administrados a otros organismos pueden causar efectos fisiológicos, puesto que tienen la habilidad de atravesar las membranas celulares y asociarse con diversos receptores.

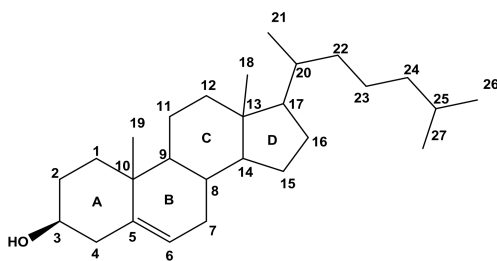


Figura 1.- Estructura del colesterol y numeración del esqueleto esteroideal.

Los esteroides, por definición, son aquellos compuestos que poseen en el esqueleto un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno o un esqueleto derivado de éste mediante rupturas, alargamientos o contracciones de los anillos; generalmente presentan grupos metilo en C-10 y C-13 y una cadena alquílica puede estar presente en C-17. En la Figura 1, se muestra la numeración para los esteroides dada por la IUPAC.¹ Los esteroides presentan generalmente diversas funciones oxigenadas.²

1.2. Principales familias de esteroides.

1.2.1. Saponinas esteroidales.

Los esteroides se clasifican en diversas familias que poseen similitudes estructurales; entre los esteroides más importantes están las hormonas sexuales, ácidos biliares, corticosteroides, vitaminas D, hormonas de crecimiento vegetal y animal, alcaloides esteroidales y saponinas.³

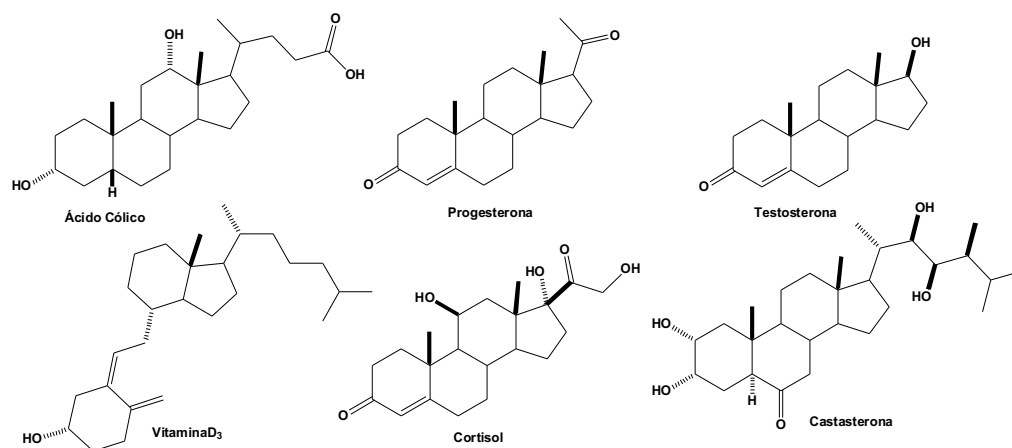
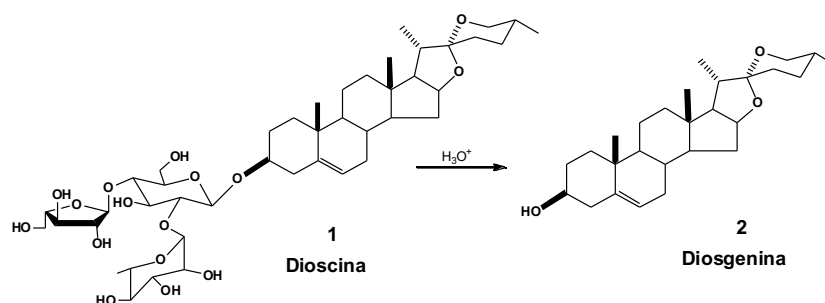


Figura 2.- Esteroides representativos.

Estructuralmente, las saponinas están conformadas por dos partes, una sacárida y otra sapogenínica (aglicona) que puede ser triterpénica o esteroidal. Un ejemplo de saponinas esteroidales es la dioscina (Figura 3).



Esquema 1. Obtención de diosgenina a partir de la dioscina por hidrólisis ácida.

Las saponinas se han aislado de diversos órganos vegetales; se han encontrado numerosas saponinas esteroidales en las familias de las monocotiledóneas, especialmente en las dioscoreáceas (*Dioscorea*), agaváceas (*Agave*, *Yucca*) y liliáceas (*Smilax* y *Trillium*). Por ejemplo, la parrillina está presente en la raíz de la *Sarsaparrilla mexicana* y la dioscina en los tubérculos de la *Dioscorea composita* (Figura 3).



Figura 3.- Fuentes naturales de saponinas (liliáceas, dioscoreáceas y agaváceas).

1.3. Sapogeninas esteroidales.

La aglicona de las saponinas puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal, mejor conocida como sapogenina. Las sapogeninas esteroidales se clasifican como colestánicas, espirostánicas y furostánicas,⁴ siendo las más comunes las del tipo espirostánico. El término espirostanos tiene su origen en la cadena lateral, constituida por dos anillos unidos en un solo átomo de carbono a través de un puente cetálico que involucra las posiciones C-16, C-22 y C-26 y es responsable de un grupo de reacciones específicas y características de este grupo cetálico.

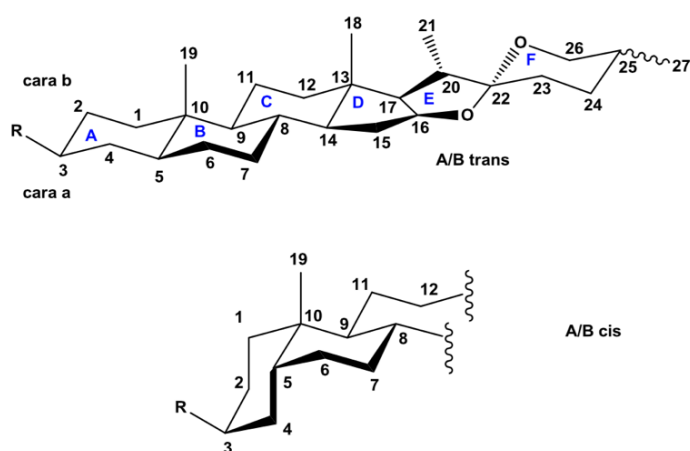


Figura 4. Fusión A/B *trans*, A/B *cis* y numeración de las sapogeninas.

La mayoría de los espirostanos conocidos pertenecen a la serie 5 α (fusión A/B *trans*) y una minoría a la serie 5 β (fusión A/B *cis*); algunos tienen insaturaciones en C-5 como la diosgenina, que es una de las principales materias primas para la obtención de hormonas; además pueden encontrarse grupos hidroxilo en las posiciones 2, 6, 12, 15 y 17. Por lo general, las sapogeninas presentan 3 centros estereogénicos adicionales

a los comprendidos en una estructura colestánica: el 16S, 22S y en C-25. Las sapogeninas esteroidales se numeran como se observa en la Figura 4.

Estos compuestos llaman la atención considerablemente ya que presentan una amplia gama de propiedades farmacológicas por lo que se han usado desde siglos atrás en la medicina tradicional y últimamente en la industria farmacoquímica. En los años 1940's se desarrolló una amplia investigación sobre la fertilidad en el ser humano, y se llegó a establecer que ésta depende fundamentalmente de ciertos compuestos esteroidales tales como las hormonas sexuales. Se confirió gran atención a la progesterona debido a su



Figura 5. Russel Marker posando con la “cabeza de negro”

utilización en la terapia médica en el tratamiento de varios desórdenes menstruales y en la prevención de ciertos tipos de aborto y control natal. Sin embargo, su obtención resultaba costosa, lo cual repercutía en su precio, hecho que impedía su uso generalizado. Las

sapogeninas surgieron en el panorama mundial en los años 40's cuando Marker⁵ produjo grandes cantidades de progesterona a partir de diosgenina, a través de un proceso en cinco etapas. Esa misma transformación fue posible realizarla en otras sapogeninas y resultó ser la clave para preparar hormonas sexuales y análogos.

Fue así, que este acontecimiento culminó en el surgimiento de la industria mexicana

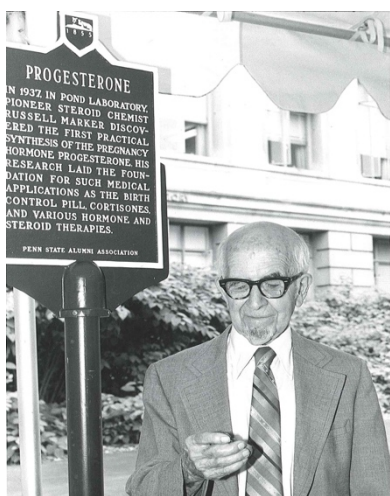


Figura 6. Marker en Pensilvania

de esteroides, cuyo desarrollo se facilitó debido a la abundancia de fuentes de sapogeninas, las cuales fueron explotadas generando grandes beneficios económicos, aunque no a nuestro país. Contrariamente a lo que podría pensarse, la investigación de la reactividad de la cadena lateral espirocetálica de las sapogeninas no está concluida; se puede encontrar en la literatura en fechas recientes, reportes de nuevas transformaciones de la cadena lateral de las sapogeninas esteroidales⁶ que han abierto diferentes caminos a la generación de nuevos agentes terapéuticos y

agroquímicos.

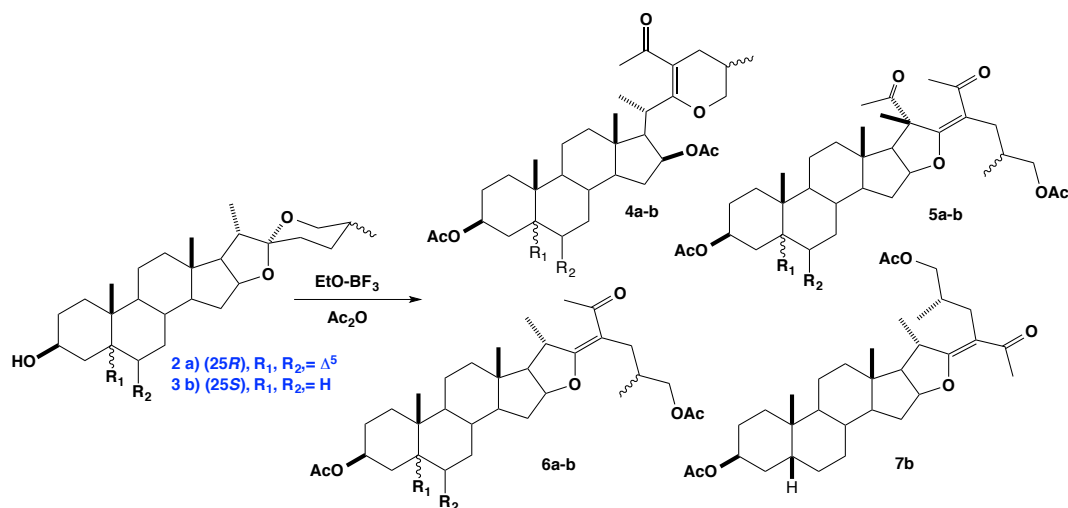
Actualmente diversos derivados esteroidales han mostrado actividad biológica de amplio espectro, como antibióticos⁷, antivirales⁸ y anticancerígenos⁹, por lo que está demostrado que pueden tener diversas aplicaciones. La química de los esteroides ofrece la posibilidad de investigar y desarrollar rutas sintéticas eficientes que resulten en mayores rendimientos de productos esteroidales de posible trascendencia en la industria agroindustrial y la farmacéutica.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Modificaciones de las sapogeninas. Cadena lateral y anillos A-D.

Desde que se sintetizaron los primeros esteroides en la década de los 30's, se ha generado una carrera acelerada para obtener nuevas estructuras con propiedades importantes en varios ámbitos a nivel industrial. Se tenía la idea equivocada, hasta hace poco tiempo, que ya se había escrito todo en cuanto a la química de los esteroides; sin embargo, reportes de los últimos años ponen de manifiesto que el tema de los esteroides tiene mucho por revelar y un repunte a nivel mundial, por lo que se han publicado trabajos muy importantes al respecto.

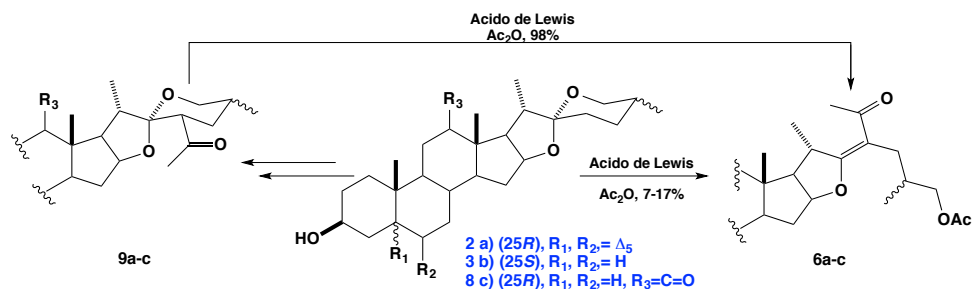
Es necesario considerar que hubo una pausa en cuanto a reportes de investigaciones relacionadas con el tema de esteroides, sobre todo con respecto a la cadena lateral; sin embargo, en años recientes, la modificación de la cadena lateral ha sido reestudiada por diversos grupos de investigación.¹⁰ Sandoval y colaboradores, han reportado la transformación de las cadenas laterales de la diosgenina (**2**) y la sarsasapogenina (**3**) obteniendo los correspondientes derivados furosténicos y epoxicolectánicos por apertura de la cadena espirocetálica sapogenínica en medio ácido como se observa en el Esquema 2.



Esquema 2. Apertura regioselectiva de la cadena lateral de las sapogeninas **2** y **3**.

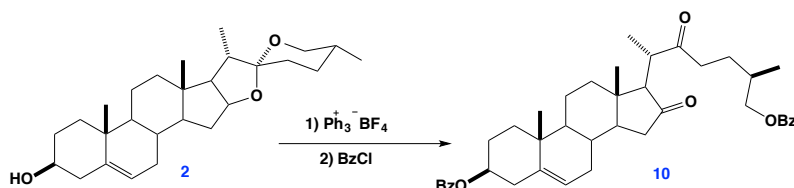
La metodología desarrollada por este grupo de investigación, ha permitido el estudio detallado de la reactividad de la cadena lateral. Así, cuando se trata a la 23-acetilsapogenina **9a-c** bajo condiciones de acetólisis,¹¹ da lugar a una apertura selectiva del anillo F de la sapogenina, generando el derivado furosténico de 33 átomos de carbono

correspondiente (**6a-c**) en rendimientos mayores, con la formación de una cadena lateral conteniendo una cetona α,β -insaturada en C-23 (Esquema 3).



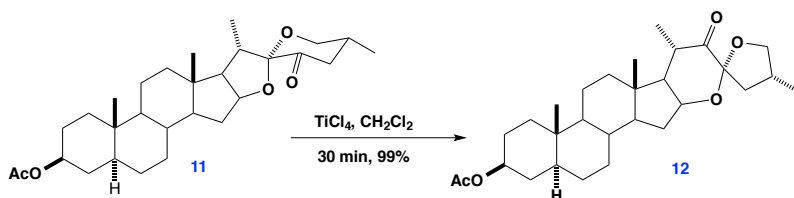
Esquema 3. Obtención de derivados 23-sustituídos de las sapogeninas **2,3** y **8**.

En la reacción entre el tetrafluoroborato de tritilo y el espirocetal sapogenínico de la diosgenina conduce al núcleo de la kriptogenina **10** (Esquema 4).¹² En las condiciones de reacción mostradas se efectúa la apertura del anillo E formándose un alcoholato en C-16; para la formación de la cetona correspondiente debe ocurrir una migración del hidruro en C-16 hacia el catión tritilo.



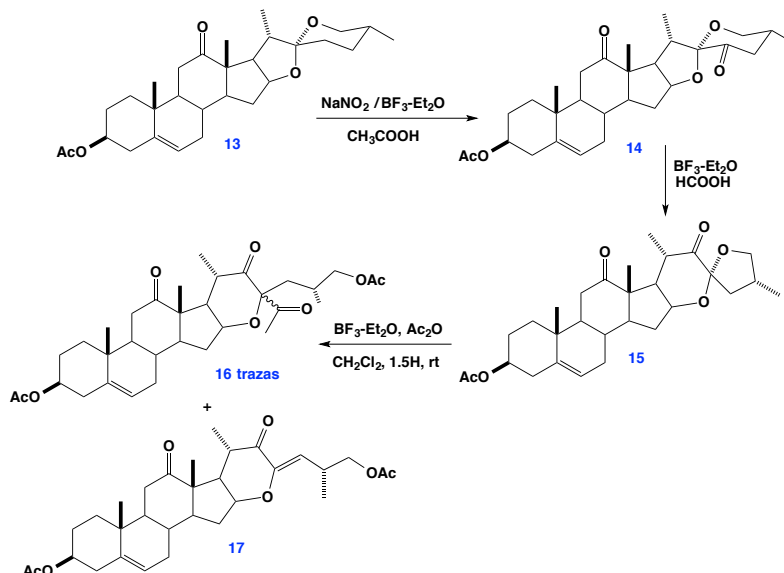
Esquema 4. Formación de la estructura de kriptogenina a partir de **2**.

La funcionalización de la cadena espirocetálica es una de las principales estrategias en la obtención de nuevos compuestos con alto potencial en actividad biológica. En consecuencia con la funcionalización de la cadena lateral, los rearrreglos que involucran el espirostanos siguen siendo investigados. En 1992, Suárez¹³ publicó la isomerización de la 23-oxotigogenina (**11**) al derivado 22-oxo-23-espirocetálico **12** empleando TiCl₄, con un rendimiento del 99% (Esquema 5).



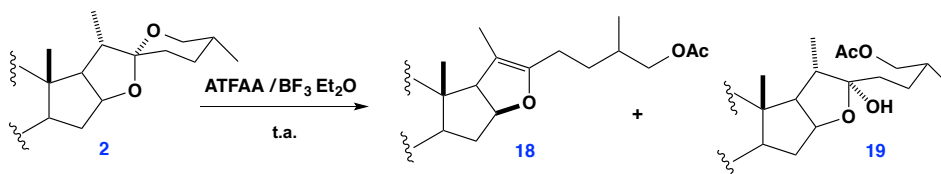
Esquema 5. Isomerización de **11** a **12** promovida por TiCl₄.

En 2015, López y col.¹⁴ reportaron la apertura regioselectiva del anillo F de 22-oxo-23-espirocetales (**13**) usando $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ en anhídrido acético que produjo nuevas cadenas colestánicas del tipo de derivados de botogenina (**17**).



Esquema 6. Apertura regioselectiva del anillo F de 22-oxo-23-espirocetales (**13**) por $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ en anhídrido acético.

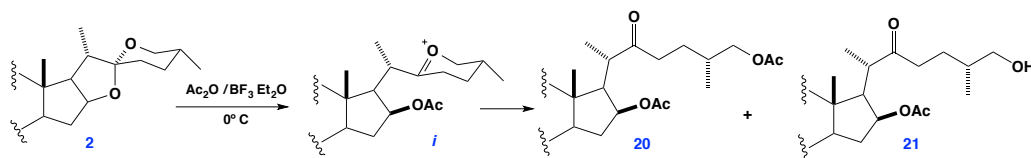
Se reportó por Sandoval y col en 2012,¹⁵ que cuando se emplea un anhídrido mixto acético-trifluoroacético, en presencia de $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ sobre el espirocetal de diversas sapogeninas a temperatura ambiente, se obtiene el diacetato de pseudosapogenina (**18**) y el compuesto furostánico **19** (Esquema 7). El derivado hidroxilado en C-22 se deshidrató fácilmente dirigiéndose a la formación de **18**. Por tanto, esta metodología constituye la primera en efectuar la apertura selectiva del anillo F esteroide a temperatura ambiente, con un rendimiento prácticamente cuantitativo. Adicionalmente, esta metodología se lleva a cabo en un tiempo de reacción significativamente corto.



Esquema 7. Formación de pseudosapogeninas a temperatura ambiente.

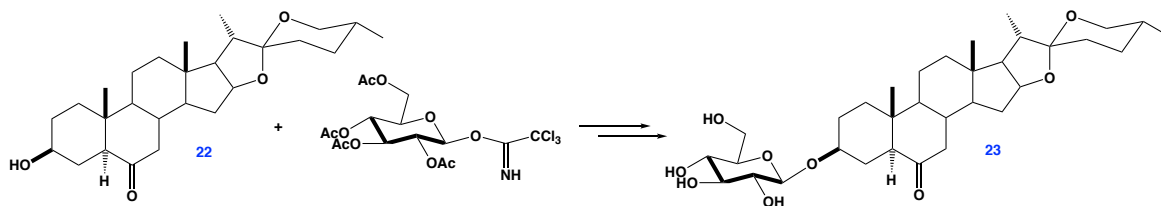
Con base en estos antecedentes, el grupo de trabajo de Sandoval y col.¹⁶ desarrolló la metodología apropiada para abrir regioselectivamente el anillo E protegiendo *in situ* a los

grupos alcohol en C-16 y C-26. Esta apertura inicia con la formación de un intermediario ión oxonio *i* (Esquema 8) el cual al ser atacado por una molécula de agua (captada del medio ambiente o en el work up) conduce al grupo alcohol en C-26, el cual es acetilado *in situ* por medio del $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O} / \text{Ac}_2\text{O}$ remanente, conduciendo a la formación de derivados 22-oxocolestánicos.



Esquema 8. Formación de la cadena 22-oxocolestánica.

En 2009 Sandoval y colaboradores¹⁷ presentaron en un reporte la síntesis y caracterización espectroscópica de un nuevo esteroide, la glucolaxogenina **23**, el cual fue obtenido por modificación de los anillos A y B de la diosgenina y su acoplamiento a carbohidratos, conduciendo a la obtención de precursores de brasinoesteroides con actividad citotóxica (Esquema 10).



Esquema 9. Síntesis de glucolaxogenina (**23**).

Los trabajos antes citados dan muestra de la versatilidad y utilidad sintética de las sapogeninas esteroidales y las modificaciones que en ellas pueden llevarse a cabo, para conducir a nuevos derivados con grupos funcionales responsables de la actividad biológica tan variada y relevante como son los promotores de crecimiento vegetal (PCV) o antiproliferativa.

2.2 Importancia de las oximas en la actividad biológica.

La función oxima es un intermediario sintético importante, ya que puede ser transformada en grupos orgánicos como carbonilo, amino, nitro y ciano; además, es utilizada en la producción de compuestos heterocíclicos, aprovechando su conversión a óxidos de nitrilo o nitrosoalquenos, intermediarios reactivos que en presencia de alquenos o alquinos generan isoxazoles y 1,2-oxazinas.¹⁸ Muchos compuestos que contienen un

fragmento oxima o éter de oxima exhiben diversas actividades biológicas entre las que se encuentran la antiinflamatoria,¹⁹ antifúngica (Figura 7), antibacterial, anti-cancerígena y antiviral entre otras.²⁰

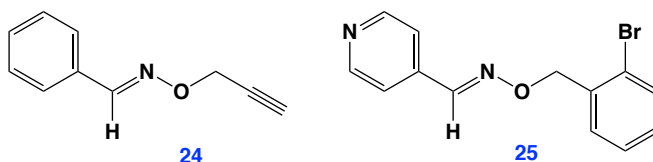


Figura 7. Oximas con actividad antifúngica.²¹

Existen compuestos químicos que se han sintetizado a partir de oximas y actualmente se

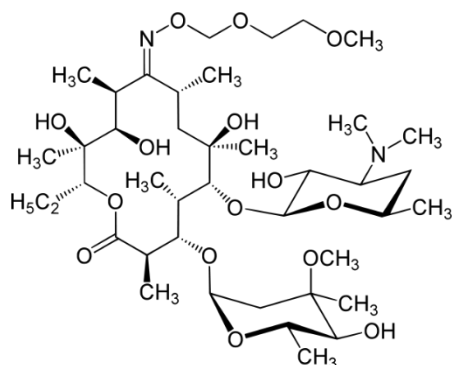


Figura 8. Estructura de la Roxitromicina

encuentran en uso dentro de la industria farmacéutica y biotecnológica, por ejemplo: reguladores de crecimiento de insectos (Flucycloxuron), antibióticos macrólidos (Roxitromicina, Figura 8) y los agentes antifúngicos (Econazol); todos estos compuestos contienen la funcionalidad de éter oxima. Algunas penicilinas semisintéticas comerciales (oxaciclina, cloxaciclina y dicloxaciclina) poseen cadenas laterales de isoxazolilo y tuvieron como precursor un derivado

hidroximínico.

2.3 Oximas esteroidales. Reactividad y actividad biológica.

El alcance sintético de las oximas ha crecido rápidamente en los últimos años, haciéndose evidente en el hecho de que se hayan publicado diversos trabajos de revisión en los últimos 10 años.²² Las oximas esteroidales han sido útiles en la realización de rearrreglos moleculares así como para obtener amidas y nitrilos.²³

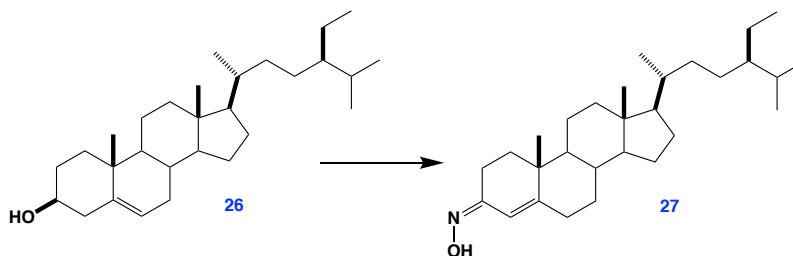


Figura 9. Obtención de la oxima del β -sitosterol (27).

Otro ejemplo claro de la importancia de las oximas en la estructura esteroidea, es la oxima **27** obtenida a partir del β -sitosterol (**26**), misma que ha mostrado importante actividad citotóxica además de ser antagonista del virus de la hepatitis²⁴ (Figura 9).

No obstante, en la naturaleza se han encontrado otras oximas esteroidales (Figura 10), en la esponja marina *Cinachyrella australiensis*,²⁵ mismas que han presentado una selectiva actividad citotóxica contra diversos tipos de células cancerígenas induciendo muerte por apoptosis.²⁶

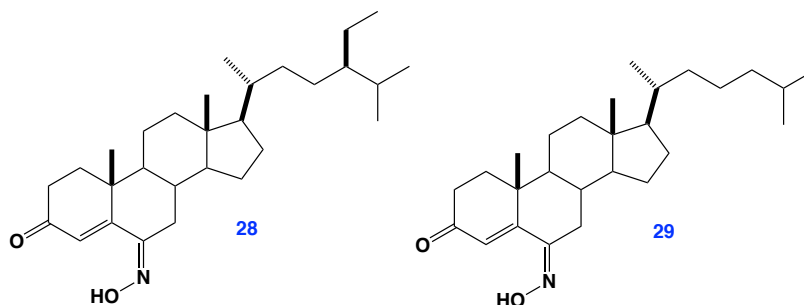


Figura 10. Oximas esteroidales de origen natural.

Así también, se ha realizado la síntesis de oximas en la posición 18 a partir de pregnenolona (**30**) (Figura 11), demostrando también alta actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer como HCT-15 y MCF-7.²⁷

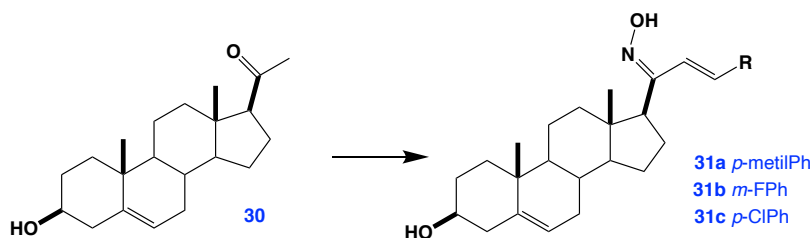


Figura 11. Oximas esteroidales derivadas de pregnenolona (**30**).

La obtención de oximas con actividad anticancerígena ha permitido generar diversos tipos de oximas esteroidales tanto en la cadena lateral como en los primeros anillos, demostrando en ambos casos alta actividad biológica.²⁸ Además, derivados de este tipo de compuestos como lo son las tiosemicarbazonas, las semicarbazonas y las hidrazonas en combinación con oximas han mostrado potenciar aún más la actividad anticancerígena en líneas celulares de SGC-7901 y Bel-7404.²⁹ De igual manera oximas derivadas de la estrona (**32**) (Figura 12) han demostrado una actividad no solo alta contra células

cancerígenas, sino que además inducen a estas células tumorosas a una muerte por apoptosis.³⁰

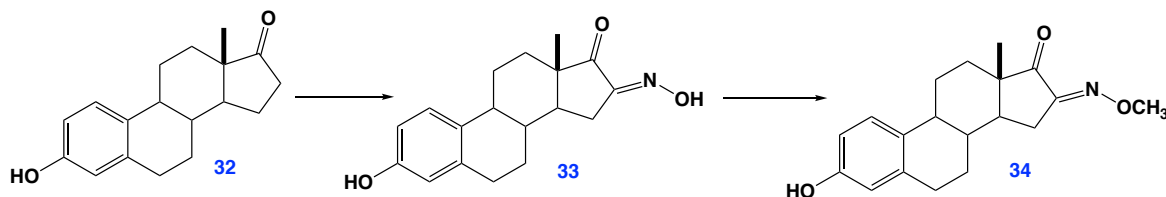
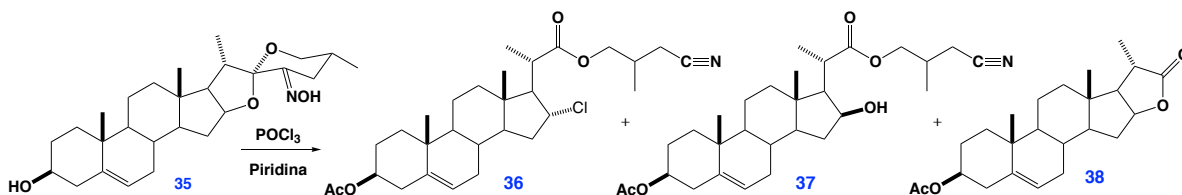


Figura 12. Oximas esteroidales derivadas de estrona (**32**).

Algunas cetoximas en condiciones de rearrreglo de Beckmann, además de producir a la amida o la lactama, generan subproductos que provienen de una fisión; uno de estos subproductos es un derivado que contiene un grupo nitrilo y otro es una imina. A esta reacción secundaria se le conoce como Reordenamiento Anormal de Beckmann (RAB) o de segundo orden. En el reporte de Sandoval²³ y colaboradores se observa la transformación de la cadena espirocetálica de diosgenina **2**, obteniendo la 23-hidroxiiminodiosgenina **35**, la cual fue tratada con POCl_3 en piridina conduciendo al rearrreglo anormal de Beckmann por la apertura del espirocetal generando derivados 23, 24-bisnorcol-5-énicos **36-38** (Esquema 10).



Esquema 10. Derivados 23, 24-bisnorcol-5-énicos **36-38** por la apertura del espirocetal de 23-hidroxiiminodiosgenina **35**.

En el transcurso de los últimos años en nuestro grupo de investigación se han sintetizado diversos derivados de diosgenina, a través de diversas metodologías, los cuales han mostrado una alta actividad anticancerígena y también como promotores de crecimiento vegetal. Con base en estos resultados, el enfoque de este trabajo es ampliar la variedad de estructuras con potencial biológico y mejorar las metodologías de síntesis con menos pasos involucrados, para conducir a la obtención de mejores rendimientos, y con

cantidades suficientes de los compuestos diana para la evaluación de algunos nuevos derivados *in vitro* y a mediano plazo *in vivo*.

2.4 Programas Predictores Quimioinformáticos.

La quimioinformática es un término que incluye el diseño, la creación, la organización, la gestión, la recuperación, el análisis, la difusión, la visualización y el uso de información química; esta información suele ser bastante voluminosa y sólo puede procesarse por medios electrónicos.³¹ Una de las aplicaciones principales de la quimioinformática se encuentra en el desarrollo de nuevos fármacos, donde es útil en la extracción, almacenamiento, organización, análisis y visualización de datos químicos. Sin embargo, también ha sido de utilidad en la predicción de las actividades de los compuestos en un objetivo determinado, así como de sus propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas, esta herramienta se ha ampliado a otras áreas, como la química de los alimentos y las fragancias.³²

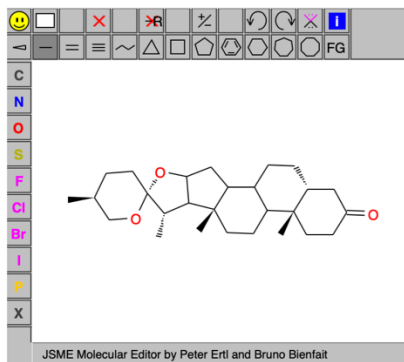
Para el uso de estos programas suele utilizarse nomenclaturas que permitan identificar el compuesto químico deseado a explorar. Uno de éstos es el código SMILES por sus siglas en inglés “Simplified Molecular Input Line Entry Specification”, Especificación Simplificada de Entrada Molecular en Línea de Texto, permite representar una estructura molecular tridimensional como una cadena de caracteres que pueden ser leídos por los programas informáticos. Los programas que utilizan este código, comprenden por ejemplo que un doble enlace se indica con el signo igual (=) o bien, que la quiralidad de un elemento se señala con la arroba (@), esta puede ser simple cuando se indica un giro en el sentido contrario al de las agujas del reloj (levógiro), o bien una “@” doble la cual indica que el giro se realiza en sentido de las agujas del reloj (dextrógiro). Los siguientes programas son ejemplos de estas aplicaciones y actualmente son de accesos libre.

2.4.1 Molinspiration: admiten la manipulación y el procesamiento de moléculas, incluida la conversión de moléculas a códigos SMILES. Esta calculadora de acceso libre permite la normalización de moléculas, generación de tautómeros, fragmentación de moléculas, cálculo de varias propiedades moleculares, modelado molecular y diseño de fármacos (Molinspiration, 2021) (Figura 13).

Enter SMILES

O[C@]1(CN([H])C(C)(C)C([H])C1=CC(C)=C(N)C(C)=C1[Clear](#)

or draw molecule below

[Calculate Properties](#)[Predict Bioactivity](#)[Galaxy 3D Generator](#)[Molinspiration home](#)[Molinspiration products and services](#)[Molinspiration services FAQ](#)[Terms of service](#)

© Molinspiration Cheminformatics 2021

Figura 13. Molinspiration. Se muestra la interfaz para iniciar la predicción de la actividad biológica del compuesto deseado. Cuenta con una herramienta que permite dibujar la estructura química del compuesto de interés para transformarla a la nomenclatura SMILES. Principalmente permite calcular propiedades farmacológicas, predecir bioactividad y generar estructuras 3D. <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.

2.4.2 Swiss TargetPrediction: permite estimar probabilidades de efectos farmacológicos que son combinaciones de similitudes de moléculas ingresadas por el usuario, de tal forma que estima los objetivos macromoleculares más probables de una molécula pequeña, asumida como bioactiva. Esta predicción se realiza por comparación con una base de datos de 370,000 activos conocidos en más de 3,000 proteínas de tres especies diferentes (Swiss TargetPredicción, 2021) (Figura 14).



Figura 14. Swiss TargetPrediction. Se muestra la interfaz para iniciar la predicción de la actividad biológica. Cuenta con una herramienta para dibujar la estructura química del

compuesto a estudiar y obtener su nomenclatura SMILES. Predice las proteínas que pudieran tener interacción con el compuesto en estudio, además de permitir seleccionar la especie donde se desea observar dichas interacciones. <http://www.swisstargetprediction.ch>.

2.2.3 PASS online: a través de la fórmula estructural es capaz de predecir más de 4,000 tipos de actividad biológica, los cuales incluyen efectos farmacológicos, mecanismos de acción, efectos tóxicos y adversos, interacción con enzimas y transportadores metabólicos, etc. La predicción es posible incluso para estructuras virtuales diseñadas aun no sintetizadas (Pass on line, 2021) (Figura 15).

The screenshot shows the PASS online web interface. At the top, the logo "PASSonline" is displayed in blue. To the right of the logo are links for "(Log out) Go" and a search icon. Below the logo is a navigation menu with links: "» Home", "» Definitions", "» Products", "» Services", "» FAQ", and "» Contacts". The main content area features a grid of buttons: "Predict new compound", "View old results", and "View/change profile" in the top row; and "SMILES", "MOL file", and "Marvin JS" in the bottom row. Below these buttons is a large text input field containing the SMILES string C(C)(C)C([H])C1=CC(Cl)=C(N)C(Cl)=C1. A "Get prediction" button is located directly below the input field.

Figura 15. PASS online. Se muestra la interfaz para iniciar la predicción de la actividad biológica. Admite diversos tipos de archivo incluyendo la nomenclatura SMILES. Es posible guardar los compuestos previamente estudiados, además de que permite asignar una probabilidad de activación y otra de inhibición. <http://way2drug.com/passonline/predict.php>.

Las limitaciones de ingreso durante la pandemia provocaron que tuviéramos que realizar trabajo in silico, el cual nos sirve para organizar estrategias de trabajo experimental y optimizar los recursos.

3 OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General:

Diseñar y sintetizar nuevos aminoesteroidales de diosgenina y evaluar su actividad biológica.

3.2 Objetivos Particulares:

- 1) Transformar selectivamente la cadena lateral de diosgenina, así como los anillos A y B para obtener nuevos derivados cetónicos y aminoesteroidales.
- 2) Optimizar las metodologías propuestas en la obtención de los compuestos 3,6-dicetónicos esteroidales.
- 4) Evaluar *in silico* e *in vitro* la posible actividad antiproliferativa de las nuevas estructuras aminoesteroidales.
- 5) Elucidar las estructuras de los nuevos derivados obtenidos mediante el empleo de los diferentes métodos espectroscópicos y espectrométricos (RMN, IR, EMAR, RX).

4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 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 de 500 MHz para los espectros de ^1H y de ^{13}C . Como disolvente se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) y Metanol deuterado (CD_3OD) conteniendo tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ). Las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales en los diferentes espectros de ^1H se abrevia como s: señal simple, sa: simple ancha, d: señal doble, t: señal triple, dc: doble de cuádruples y m: señal múltiple.

Espectroscopía de Infrarrojo

Se utilizó un espectrofotómetro de Infrarrojo Agilent Cary 630 FTIR. Para el registro del espectro se emplearon las interfaces ATR con punta de diamante y DIAL PATH. La ubicación de cada banda de transmitancia se expresa en números de onda ν (cm^{-1}).

Polarimetría

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 empleando soluciones clorofórmicas en una microcelda de 10 cm de longitud y utilizando la línea de emisión D del Na ($= 589 \text{ nm}$) a temperatura ambiente. Las desviaciones levo- y dextrógiras se acompañan con el valor de la concentración empleada.

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.

4.2 Disolventes y Materias Primas.

A la diosgenina (**2**) comercial utilizada se le realizaron pruebas como: punto de fusión, cromatografía de placa fina, resonancia magnética nuclear sin mostrar ninguna impureza, por lo cual no fue necesaria su purificación. Los reactivos utilizados fueron de calidad grado analítico y se utilizaron directamente de su empaque. Todos los disolventes se purificaron y secaron de acuerdo con las técnicas descritas en la literatura.³³

4.3 Programas predictores, análisis *in silico*.

A partir de las estructuras químicas de los aminoesteroides de interés, se crearon los códigos SMILES. Una vez obtenidos los códigos SMILES se procedió a probar cada uno de ellos en tres diferentes plataformas: Molinspiration, Swiss TargetPrediction y Passonline. Se realizó una depuración de la información obtenida, considerando interacciones de interés de aquellas moléculas que se encuentran relacionadas con nuestros compuestos y la con actividad antiproliferativa ya conocida.³⁴

4.4 Caracterización de Diosgenina.

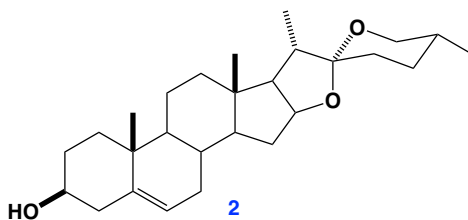


Figura 16. Estructura de diosgenina (2).

La diosgenina (2), se caracterizó por métodos físicos y espectroscópicos, los datos fueron comparados con los de la literatura. Polvo amorfo, p.f. = 199-202 °C.³⁵

¹H RMN

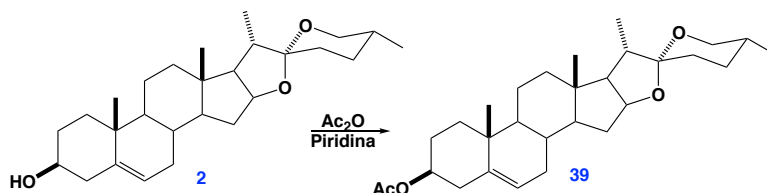
δ: 5.34 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.41 (1H, ddd, $J_{16-15a} = J_{16-15e} = J_{16-17} = 7.6$ Hz, H-16), 3.51 (1H, ma, H-3), 3.46 (1H, ddd, $J_{gem} = 10.8$, $J_{26e-25a} = 4.4$, $J_{26e-24e} = 2.4$ Hz, H-26e), 3.37 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8$ Hz, H-26a), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, d, $J_{27-25} = 6.4$ Hz, CH₃-27), 0.79 (3H, s, CH₃-18).

¹³C RMN

δ: 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

4.5 Modificación de los anillos A y B.

4.5.1 Obtención del acetato de diosgenina.



Esquema 11. Acetato de diosgenina (**39**).

A una solución de 2.0 g (4.82 mmol) de diosgenina (**2**) en 10 mL de anhídrido acético (106 mmol) y 1 mL de piridina se colocó a reflujo por 1 h. Transcurrido este tiempo, se le adicionó agua fría (50 mL) para formar un precipitado blanco, el cual fue lavado con una solución saturada de NaHCO_3 (2x25 mL) y posteriormente, con agua destilada (2x25 mL). Se obtuvo 1.87 g (85%) de un sólido blanco correspondiente a **39** (Esquema 11).

Fórmula condensada: $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_4$, P.M= 456.66, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 85%. $[\alpha]_D = -122^\circ$ (CHCl_3 , c 1.0)

IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm^{-1} .

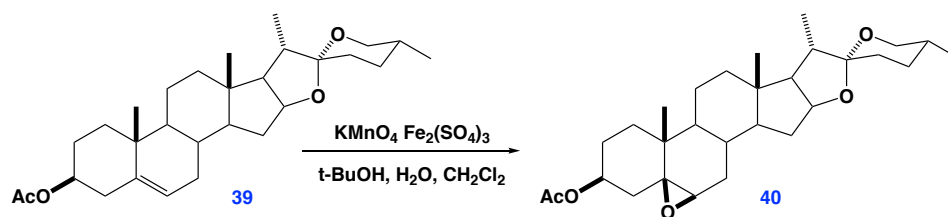
^1H RMN

δ (500Hz): 5.37 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.59 (1H, m, H-3), 4.41 (1H, m, H-16), 3.47 (1H, ddd, $J_{\text{gem}}=10.8$, $J_{26e-25a}=4.4$ $J_{26e-24e}=2.4$ Hz, H-26e), 3.37 (1H, dd, $J_{\text{gem}}=J_{26a-25a}=10.8\text{Hz}$, H-26a), 2.03 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO-3}$), 1.02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-19}$), 0.97 (3H, d, $J_{21-20}=7.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-21}$), 0.79 (3H, d, $J_{27-25}=6.4$ Hz, $\text{CH}_3\text{-27}$), 0.79 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-18}$).

^{13}C RMN

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 170.4($\text{CH}_3\text{COO-3}$), 21.4($\text{CH}_3\text{COO-3}$).

4.5.2 Obtención del epóxido β, β del acetato de diosgenina.



Esquema 12. Obtención del epóxido β, β del acetato de diosgenina (**40**).

A una solución de 500 mg (1.1 mmol) de **39** en 20 mL de CH_2Cl_2 fue añadida una solución de 2.0 g (12.65 mmol) de KMnO_4 , 1.0 g (2.5 mmol) de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0.2 mL de H_2O y 5 mL de CH_2Cl_2 , la solución se colocó en agitación magnética a temperatura ambiente y se añadió 0.5 mL de *t*-BuOH, después de 30 min, la mezcla de reacción se filtró por una capa de gel de sílice para retirar el oxidante, se añadió 30 mL de CH_2Cl_2 para terminar de eluir, el crudo filtrado fue lavado con agua (2x25 mL), secado con Na_2SO_4 y evaporado para obtener 482 mg (85%) de un polvo blanco correspondiente al compuesto **40** (Esquema 12).

Fórmula condensada: $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_8$, P.M= 605.0, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 85%.

IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm^{-1} .

EMAR: Observado: 473.3257. Calc.: 473.3267

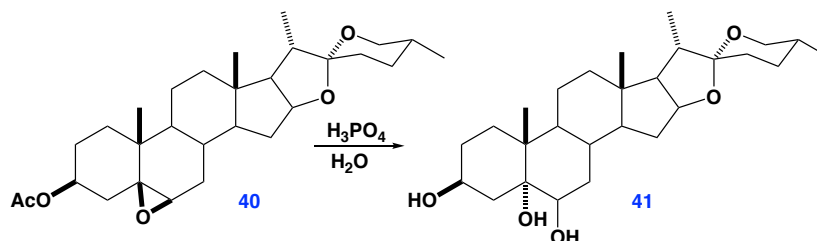
^1H NMR

δ (500 MHz): 4.76 (1H, m, H-3), 4.32 (1H, m, H-16), 4.02 (1H, dd, $J_{26e-26a}=10.9$ Hz, $J_{26e-25}=5.6$ Hz, H-26_e), 3.88 (1H, dd, $J_{26a-26e}=10.9$ Hz, $J_{26a-25}=6.5$ Hz, H-26_a), 3.02 (1H, m, H-6), 2.04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO-3}$), 1.08 (3H, d, $J_{21-20}=7.1$ Hz, CH_3-21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25}=6.8$ Hz, CH_3-27), 0.88 (3H, s, CH_3-18), 0.82 (3H, s, CH_3-19).

^{13}C NMR

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 61.5 (C-5), 60.0 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 170.4($\text{CH}_3\text{COO-3}$), 21.4($\text{CH}_3\text{COO-3}$).

4.5.3 Apertura del epóxido β,β del acetato de diosgenina (**40**).



Esquema 13. Apertura del epóxido β,β del acetato de diosgenina (**40**).

Una solución de 1.0 g (2.11 mmol) de **40** en 30 mL de CH_2Cl_2 se adicionó 20 mL de una solución alcohólica al 5 % de H_3PO_4 y 4 mL de H_2O destilada y se colocó en agitación magnética a temperatura ambiente por 12 h, posteriormente, se evaporó la mezcla de CH_2Cl_2 y alcohol a presión reducida, el sólido obtenido se lavo con una solución saturada de NaHCO_3 (2x25 mL) y H_2O destilada (2x25 mL), se obtuvo 789 mg (83%) de un polvo blanco correspondiente al compuesto **41** (Esquema 13).

Fórmula condensada: $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_5$, P.M= 448.64, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 83 %.

IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm^{-1} .

EMAR: Calc. 449.3267; Observ. 449.3269.

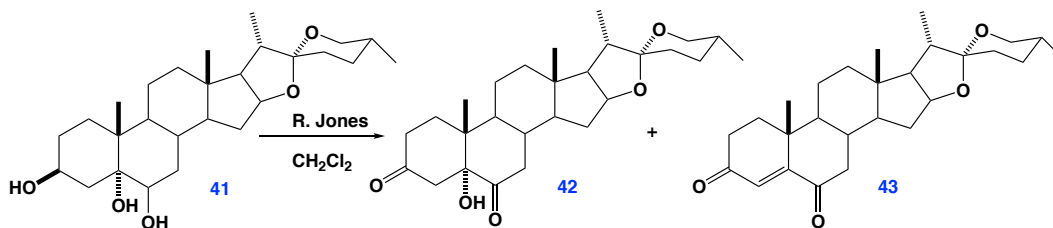
^1H NMR

δ (500 MHz): 4.64 (1H, m, OH-5), 4.40 (1H, m, H-16), 4.99 (1H, m, H-16), 4.02 (1H, dd, $J_{26e-26a}=10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 5.6$ Hz, H-26_e), 3.88 (1H, ddd, $J_{16-15a} = 8.5$ Hz, $J_{16-15e} = 7.5$ Hz, $J_{16-17} = 6.0$ Hz, H-26_a), 1.08 (3H, d, $J_{21-20} = 7.1$ Hz, CH_3 -21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH_3 -27), 0.88 (3H, s, CH_3 -18), 1.19 (3H, s, CH_3 -19).

^{13}C NMR

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 68.1 (C-5), 76.1 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 170.4($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$ -3), 21.4($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$ -3).

4.5.4 Oxidación del Triol de Diosgenina (41).



Esquema 14. Oxidación del Triol de Diosgenina (41).

Se disolvió 1.00 g (2.23 mmol) de **41** en 20 ml de CH_2Cl_2 y 60 mL de acetona, la reacción se enfrió a 0°C en agitación, posteriormente, se agregó 3.0 mL de reactivo de Jones gota a gota en un lapso de 10 min. Cuidando que no rebase los 10°C , una vez agregado el reactivo la reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 30 min; la mezcla de reacción se vertió a un embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo, se realizaron de dos a tres lavados con agua destilada, se secó con Na_2SO_4 . Se obtuvo una mezcla de productos menos polares, posteriormente se purificó en columna de cromatografía con gel de sílice utilizando sistema 9:1 (hexano/ AcOEt) obteniendo 396 mg (40%) de **42** y 330 mg (35 %) de **43**.

Fórmula condensada: $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_5$, P.M= 444.60, p.f. $193\text{-}194^\circ\text{C}$ (AcOEt / acetona), Rendimiento del 80%.

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1685. ($\text{C}=\text{O}$)

EMAR: Calc. 445. 2954; Observ. 445.2936.

^1H RMN

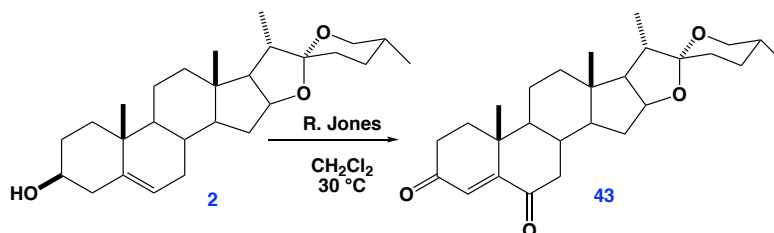
δ ^1H : 4.43 (1H, m, H-16), 3.48 (1H, m, H-26e), 3.36 (1H, dd, $J_{26-26} = J_{26a-25a} = 10.4$ Hz, H-26a), 3.02 (1H, m, OH-5), 2.89 (1H, d, $J_{4a,4e} = 15.8$ Hz), 2.30 (1H, dd, $J_{4a,4e} = 15.8$ Hz, $J_{4a,2e} = 2.0$ Hz), 2.78 (2H, dd, $J_{7a-7e} = J_{7a-8} = 12.4$ Hz, H-7a), 2.35 (2H, m, H-7e), 1.19 (3H, s, CH_3 -19), 0.99 (3H, d, $J_{21-20} = 6.8$ Hz, CH_3 -21), 0.84 (3H, s, CH_3 - 18), 0.80 (3H, d, $J_{27-25} = 6.0$ Hz, CH_3 -27).

^{13}C RMN

δ ^{13}C : 36.6 (C-1), 33.9 (C-2), 211.3 (C-3), 38.5 (C-4), 83.1 (C-5), 210.8 (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).

4.5.5 Oxidación selectiva de diosgenina.



Esquema 15. Oxidación selectiva de Diosgenina (**2**).

Se disolvió 2.0 g (4.8 mmol) de diosgenina (**2**) en 40 ml de CH_2Cl_2 y 132 mL de acetona, la reacción se enfrió a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ en agitación, posteriormente, se agregó el reactivo el Jones gota a gota en un lapso de 10 min. Cuidando que no rebase los $10\text{ }^\circ\text{C}$, una vez agregado el reactivo la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente; la reacción fue monitoreada con CCF, hasta que se observó un cambio de coloración (naranja a verde) se agregó isopropanol para extinguir todo el reactivo de Jones, la mezcla de reacción se vertió a un embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo, se realizaron de dos a tres lavados con agua destilada, se secó con Na_2SO_4 . Se obtuvo un producto menos polar que la materia prima, posteriormente, se purificó en columna de cromatografía con gel de sílice utilizando sistema 9:1 (hexano y AcOEt) obteniendo 1.63 g (80%) de **43**.

Fórmula condensada: $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$, P.M= 426.6, p.f. $193\text{-}194^\circ\text{C}$ (AcOEt/ acetona), rendimiento 80%.

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 2949 (C-H), 1685. (C=O)

EMAR: $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$, Calculado: 426.6988, Observado: 426.6982.

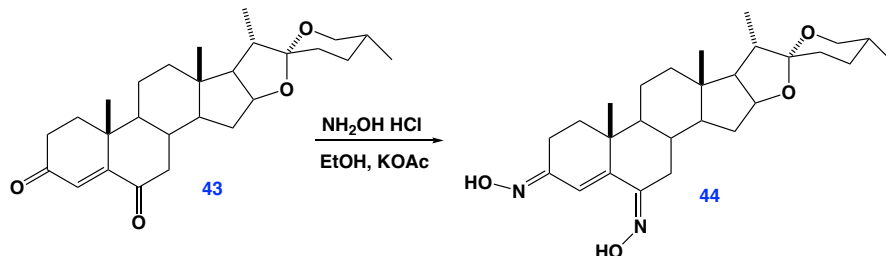
^1H RMN

$\delta\text{ }^1\text{H}$: 6.18 (1H, s, H-4), 4.43 (1H, m, H-16), 3.48 (1H, m, H-26e), 3.36 (1H, dd, $J_{26-26} = J_{26a-25a} = 10.4\text{ Hz}$, H-26a), 2.71 (2H, d, $J_{7-7} = 12.0\text{ Hz}$, H-7), 1.19 (3H, s, CH_3 -19), 0.99 (3H, d, $J_{21-20} = 6.8\text{ Hz}$, CH_3 -21), 0.84 (3H, s, CH_3 - 18), 0.80 (3H, d, $J_{27-25} = 6.0\text{ Hz}$, CH_3 -27).

^{13}C RMN

$\delta^{13}\text{C}$: 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).

4.5.6 Formación de (25*R*, 3*Z*, 6*Z*)-dihidroxiiminoespirost-4-eno (**44**).



Esquema 16. Formación de (25*R*, 3*Z*, 6*Z*)-dihidroxiiminoespirost-4-eno (**44**).

Se colocaron 0.85 g (2 mmol) de 3,6 diona de la diosgenina (**114**), se disolvió con 30 ml de EtOH y 0.8 g de KOAc, posteriormente, se agregó 0.56g (8mmol) de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, se mantuvo a reflujo por 1h. La reacción se dio por terminada cuando se observó una mancha más polar que la materia prima por CCF. Una vez transcurrido ese tiempo se separó la fase orgánica, se realizó de 2 a 3 lavados con agua destilada y se secó con Na_2SO_4 , se concentró y se purificó en columna de cromatografía con gel de sílice utilizando sistema 6:4 (hexano y acetato de etilo).

Caracterización de (25*R*, 3*Z*, 6*Z*)-dihidroxiiminoespirost-4-eno (**44**).

Fórmula condensada: $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$, P.M= 456.62, p.f. 150-152°C (sistema 3:2 hexano /AcOEt) cristales blancos. Rendimiento 77 %.

EMAR-EI: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$.: 456.2988; observado: 456.2982.

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3313 (O-H), 1681 (C=C)

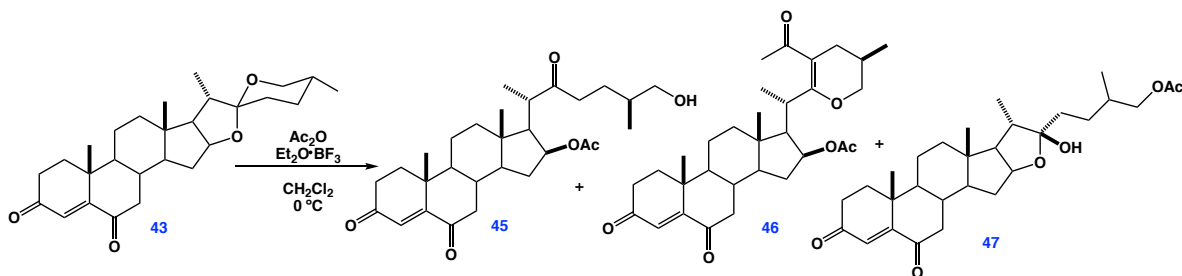
^1H RMN

$\delta^{1\text{H}}$: 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)

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).

4.5.7 Formación de la cadena 22-oxocolestánica de **43**.



Esquema 17. Formación de la cadena 22-oxocolestánica de **43**.

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disolvió 1 g de la 4-en-3,6-diona **43** en 0.5 mL de CH₂Cl₂ y 5 mL de anhídrido acético. La solución se enfrió a 0 °C y se agregaron gota a gota 1 mL de BF₃·OEt₂. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 15 min y transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo y se extrajo con CH₂Cl₂ (100 mL). La fase orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (6 x 50 mL) y con agua (2 x 50 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna.

Los compuestos **45**, **46** y **47** se eluyeron con un sistema hexano/AcOEt 7:3 obteniéndose cada uno en 45, 15 y 30% respectivamente, **45** y **47** como sólidos blancos, y **46** como laca.

Caracterización del derivado 22-oxo-26OH-3,6-diona (**45**).

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).

EMAR (m/z): Calculado para C₂₉H₄₂O₆ :487.3060; observado 487.3065.

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, $\text{CH}_3\text{COO-16}$), 0.89 (3H, *d*, $J_{27-25} = 10$ Hz, $\text{CH}_3\text{-27}$), 1.12 (3H, *d*, $J_{21-20} = 5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-21}$), 1.01 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-19}$), 0.85 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-18}$).

^{13}C RMN

δ ^{13}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- $\text{C}=\text{O}$ 16), 21.3 ($\text{CH}_3\text{COO-16}$).

Caracterización del derivado Epoxi-3,6-diona (46).

Laca amarillo pálido.

IR (cm^{-1}): 2936 (CH, alifático); 1728, 1680 (C=O, cetonas); 1708 (C=O, acetilo).

EMAR (*m/z*): Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_6$ 511.3060 observado 511.3051.

^1H RMN

δ (500 MHz): 6.22 (1H, s, H-4), 5.14 (1H, ddd, $J_{16-17} = J_{16-15e} = 7.5$ y $J_{16-15a} = 4.5$ Hz, H-16), 4.07 (1H, *m*, H-20), 4.21 (1H, dd, $J_{26e-25} = 3.5$ y $J_{26e-26a} = 10.5$ Hz, H-26_e), 3.41 (1H, dd, $J_{26a-25} = J_{26a-26e} = 10.5$ Hz, H-26_a), 2.20 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-23}^2$), 2.02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-3}$), 1.84 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-16}$), 1.18 (3H, d, $J_{21-20} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_3\text{-21}$), 1.03 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-19}$), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_3\text{-27}$), 0.92 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-18}$).

^{13}C NMR

δ (125 MHz): 202.5 (C-3), 198.4 (C-6), 197.9 (C-23¹), 171.1 (C-22), 170.4 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO-3}$), 170.3 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO-16}$), 159.6 (C-5), 122.1 (C-4), 106.8 (C-23), 74.9 (C-16), 71.4 (C-26), 55.8 (C-17), 54.2 (C-14), 49.9 (C-9), 42.1 (C-13), 39.6 (C-12), 37.9 (C-4), 36.8 (C-1), 36.4 (C-10), 34.8 (C-15), 32.7 (C-20), 31.5 (C-24), 31.5 (C-7), 31.3 (C-8), 29.6 (C-23²), 27.6 (C-2), 26.4 (C-25), 21.0 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO-26}$), 20.7 (C-11), 19.3 (C-21), 19.1 (C-19), 16.7 (C-27), 12.8 (C-18).

Caracterización del derivado 22-hidroxi-26OAc-3,6-diona (47).

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).

EMAR (m/z): Calculado para C₂₉H₄₂O₆ 487.3060; observado 487.3065.

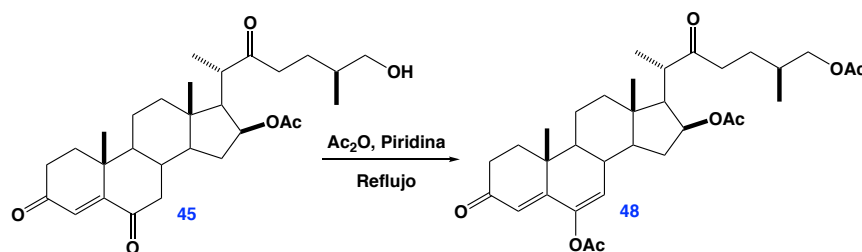
¹H RMN

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

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).

4.5.8 Protección del derivado 26-hidroxi-22-oxo-3,6-diona. Obtención de 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (48).



Esquema 18. Obtención de 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (**48**).

A una solución de 400 mg (4.82 mmol) de 26-hidroxi-22-oxo-3,6-diona (**45**) en 3 mL de anhídrido acético (106 mmol) y 0.5 mL (4.0 mmol) de piridina se colocó a reflujo por 1 h. Transcurrido este tiempo, se adicionó agua fría (50 mL) para formar un precipitado blanco, el cual fue lavado con una solución saturada de NaHCO₃ (2x25 mL) y posteriormente con agua destilada (2x25 mL). Se obtuvo 1.87 g (85%) de un sólido blanco correspondiente a **48**.

Fórmula condensada: C₃₃H₄₈O₈, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 85%. [α]_D= -122° (CHCl₃, c=1.0)

IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm^{-1} .

EMAR: (m/z): Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_8$: 571.3271 observado 571.3260.

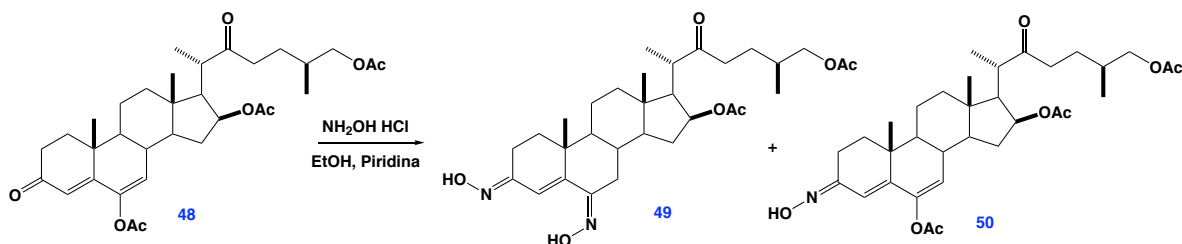
^1H RMN

δ : 5.80 (1H, s, H-4), 5.74 (1H, d, $J=2.24$ Hz, H -7), 5.01 (1H, m, H-16), 3.91 (2H, m, H-26), 2.20 (3H, s, CH_3COO -6), 2.03 (3H, s, CH_3COO -26), 1.98 (3H, s, CH_3COO -16), 1.02 (3H, s, CH_3 -19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20}=7.2$ Hz, CH_3 -21), 0.79 (3H, d, $J_{27-25}=6.4$ Hz, CH_3 -27), 0.79 (3H, s, CH_3 -18).

^{13}C RMN

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 199.0 (C-3), 129.0 (C-4), 143.7 (C-5), 157.6 (C-6), 128.5 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 212.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 169.5 (CH_3COO -16), 171.1 (CH_3COO -6), 171.2 (CH_3COO -26).

4.5.9 Reacción de condensación para la obtención de la oxima y dioxima de la 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (48).



Esquema 19. Obtención de la oxima y dioxima de la 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (48).

Se colocaron 0.85 g (2 mmol) de 6,16,26-triacetoxi-4-en-3,22-diona (**48**), se disolvió con 30 mL de EtOH y 0.5 mL de piridina, posteriormente se agregó 0.56g (8mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$, se mantuvo a reflujo por 1h. La reacción se dio por terminada cuando se observó una mancha más polar que la materia prima por CCF. Una vez transcurrido ese tiempo se separó la fase orgánica, se realizó de 2 a 3 lavados con agua destilada y se secó con Na_2SO_4 , se concentró y se purificó en columna de cromatografía con gel de sílice utilizando sistema 3:2 (hexano y acetato de etilo).

Caracterización de la dioxima de 16,26-diacetoxi-4-en-3,6,22-triona (49).

Fórmula condensada: $C_{31}H_{46}N_2O_7$, punto de fusión: 196-198 °C, rendimiento 50 %.

IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm^{-1} .

EMAR: (m/z): Calculado para $C_{31}H_{46}N_2O_7$: 634.3471 observado: 559.3383 [M+1].

1H RMN

δ : 5.80 (1H, s, H-4), 5.74 (1H, d, $J=2.24$ Hz, H -7), 5.01 (1H, m, H-6), 3.91 (2H, m, H-26), 2.23 (3H, s, $\underline{C}H_3COO-6$) 2.03 (3H, s, $\underline{C}H_3COO-26$), 1.98 (3H, s, $\underline{C}H_3COO-16$), 1.02 (3H, s, CH_3-19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20}=7.2$ Hz, CH_3-21), 0.79 (3H, d, $J_{27-25}=6.4$ Hz, CH_3-27), 0.79 (3H, s, CH_3-18).

^{13}C RMN

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 156.0 (C-3), 129.0 (C-4), 144.0 (C-5), 156.3 (C-6), 43.4 (C-7), 32.1 (C-8), 51.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 54.8 (C-14), 31.8 (C-15), 75.5 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 212.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 171.4 ($\underline{C}H_3COO-16$), 170.4 ($\underline{C}H_3COO-26$).

Caracterización de la oxima de 6,16,26-triacetoxi-4-en-3,22-diona (50).

Fórmula condensada: $C_{33}H_{47}NO_8$, punto de fusión: 187-189 °C, rendimiento 30 %.

IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm^{-1} .

EMAR: (m/z): Calculado para $C_{33}H_{47}NO_8$: 586.3380 observado 586.3384.

1H RMN

δ : 6.01 (1H, s, H-4), 5.52 (1H, d, $J=2.24$ Hz, H -7), 5.01 (1H, m, H-16), 3.91 (2H, m, H-26), 2.20 (3H, s, CH_3COO-6), 2.03 (3H, s, $CH_3COO-26$), 1.98 (3H, s, $CH_3COO-16$), 1.19 (3H, s, CH_3-19), 1.23 (3H, d, $J_{21-20}=7.2$ Hz, CH_3-21), 0.98 (3H, s, CH_3-18). 0.97 (3H, d, $J_{27-25}=6.4$ Hz, CH_3-27).

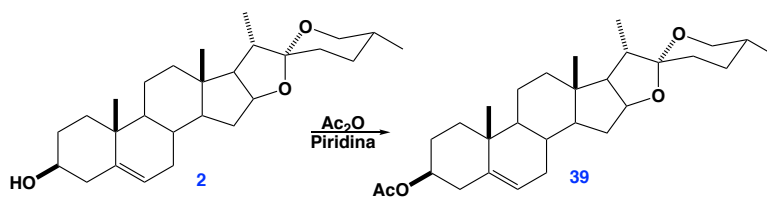
^{13}C RMN

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 156.0 (C-3), 122.0 (C-4), 144.4 (C-5), 144.3 (C-6), 115.4 (C-7), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 75.3 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 212.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 68.9 (C-26), 17.1 (C-27), 169.0 ($\text{CH}_3\text{COO-16}$), 169.6 ($\text{CH}_3\text{COO-6}$), 171.3 ($\text{CH}_3\text{COO-26}$).

5 Discusión de Resultados

Después de analizar la influencia de cada una de las funciones químicas presentes en los reportes de la literatura, realizar diversas búsquedas y actualización bibliográficas, así como la revisión de los datos fisicoquímicos de programas predictores quimiinformáticos, se planteó una ruta de síntesis de nuevos derivados que contienen modificaciones en los anillos A y B, así como a nivel de la cadena lateral. Este apartado del trabajo de tesis comprende la discusión de las metodologías de síntesis de estructuras polihidroxiladas, cetónicas y aminoesteroidales, a partir de diosgenina (**2**), los posibles mecanismos de reacción, la elucidación espectroscópica y finalmente el análisis de la actividad biológica in vitro y resultados quimiinformáticos.

5.1 Acetilación de Diosgenina.



Esquema 20. Acetilación de diosgenina.

La acetilación del hidroxilo en la posición 3 se llevó a cabo mediante calentamiento del esteroide en anhídrido acético con piridina como base, una vez obtenido el producto se

obtuvo su punto de fusión 194-196 °C, un $\alpha_D = -122^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3) coincidiendo con lo reportado en la literatura.³⁶ En el IR se observa una banda en 1730 del éster, diferente a la diosgenina, lo que da prueba de la acetilación.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz (Figura 17.) se observa una gran similitud con la materia prima, por ejemplo, las señales correspondientes a H-6 y H-16 no presentan cambios significativos, pero por el contrario en 4.59 ppm se observó una señal múltiple que se asigna a H-3, que a diferencia de la diosgenina se desplazó a frecuencias altas debido al efecto de desprotección que el grupo acetato ejerce sobre este protón. Por su parte los protones diasterotópicos H-26 conservan el mismo efecto que en la materia prima y en 2.31 ppm se observa la señal correspondiente a los protones en 4, y una nueva señal simple en 2.03 ppm característica a los protones del metilo del acetato agregado, a partir de este punto el espectro es muy similar a la materia prima.

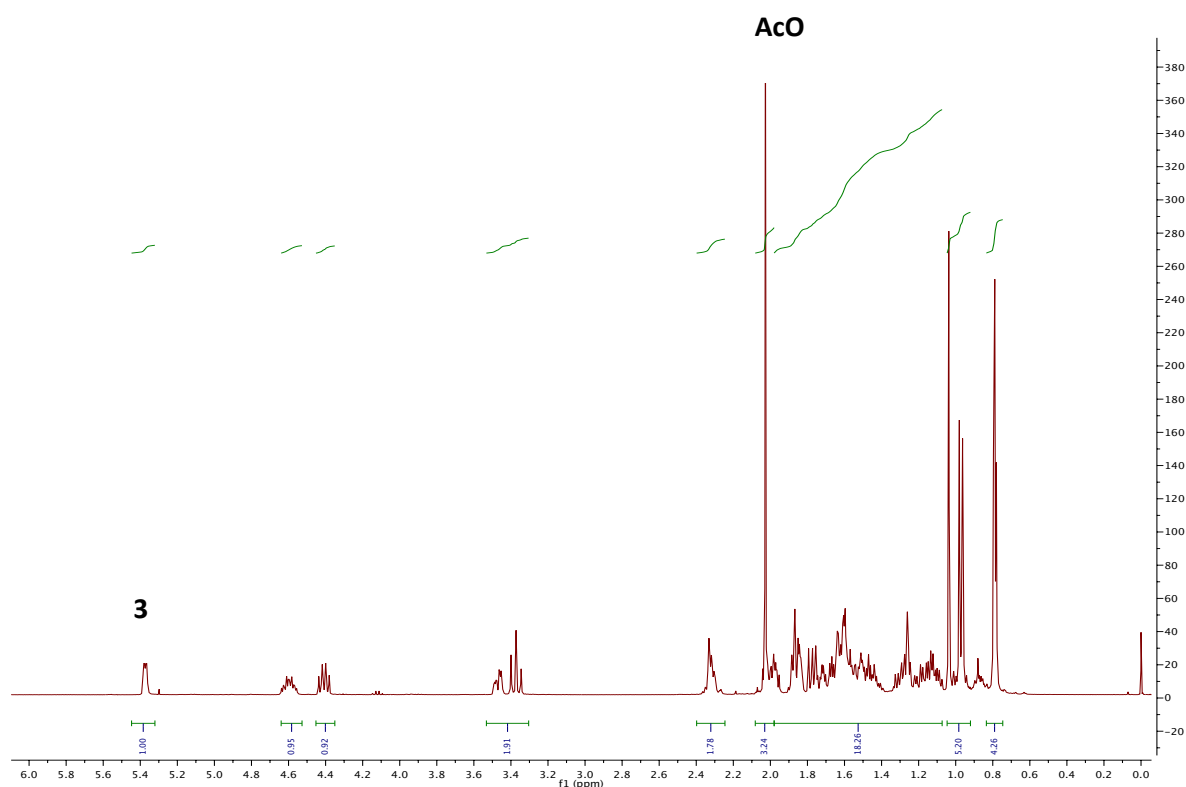


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del acetato de diosgenina (39).

Por otro lado en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 18) se observan 29 señales, dos más que en la materia prima, en 170.2 ppm destaca una señal característica del carbonilo del grupo ester, así mismo se observa en 139.5 y 122.2 ppm que se conserva el doble enlace de la posición 5.

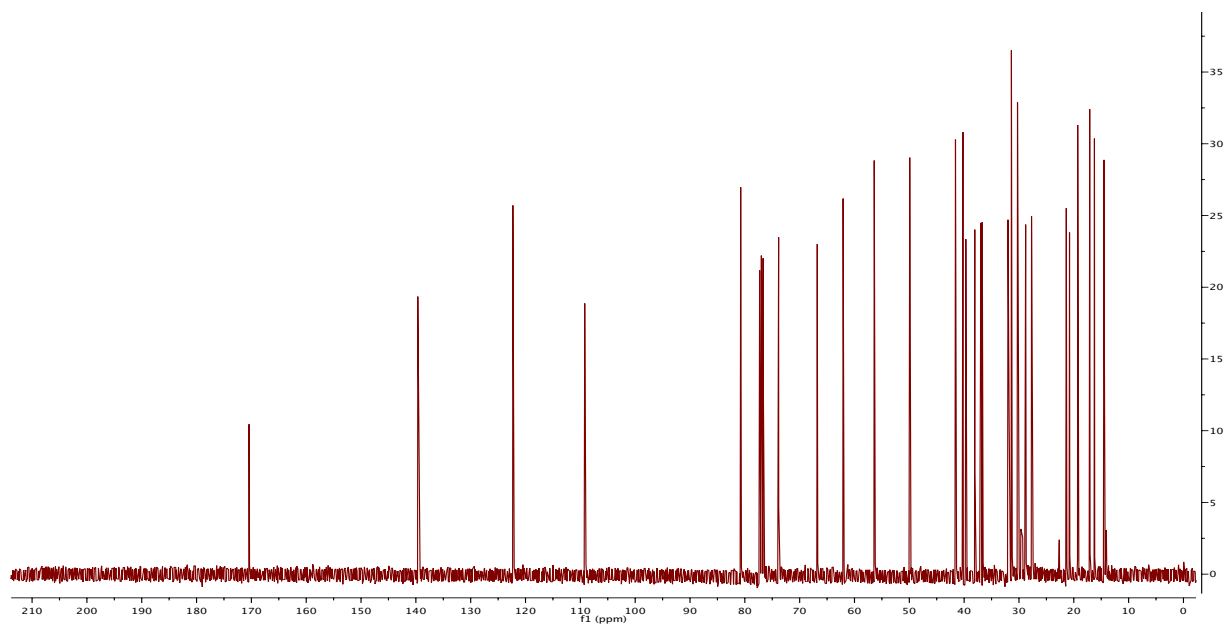
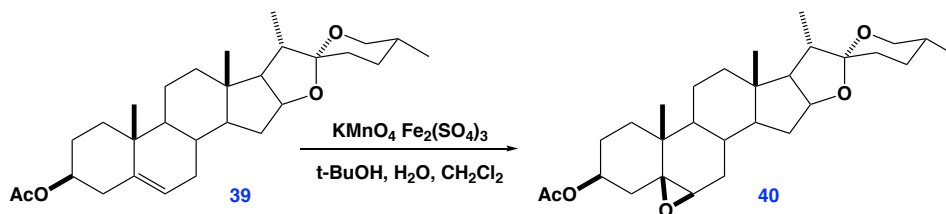


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del acetato de diosgenina (**39**).

5.2 Epoxidación estereoselectiva del acetato de diosgenina (**39**).



Esquema 21. Epoxidación catalítica de acetato de diosgenina (**39**).

Una vez protegido el hidroxilo de la posición de 3, se procedió a una epoxidación estereoselectiva del doble enlace utilizando una oxidación lenta en soporte de un metal, en este caso es utilizado ion Fe^{3+} como ácido de Lewis que se acompleja en la cara más disponible del doble enlace, en este caso la cara α , saturando esta cara, lo que obliga a que la epoxidación únicamente ocurra en la cara β , al momento de analizar el producto se observa un punto de fusión de 194-196 °C, un $[\alpha]_D =$, y un pico ion molecular de 473.3257. En el IR se observan las bandas en 1720 del C=O del acetato en C-3 y en 1448 de los estiramientos C-O.

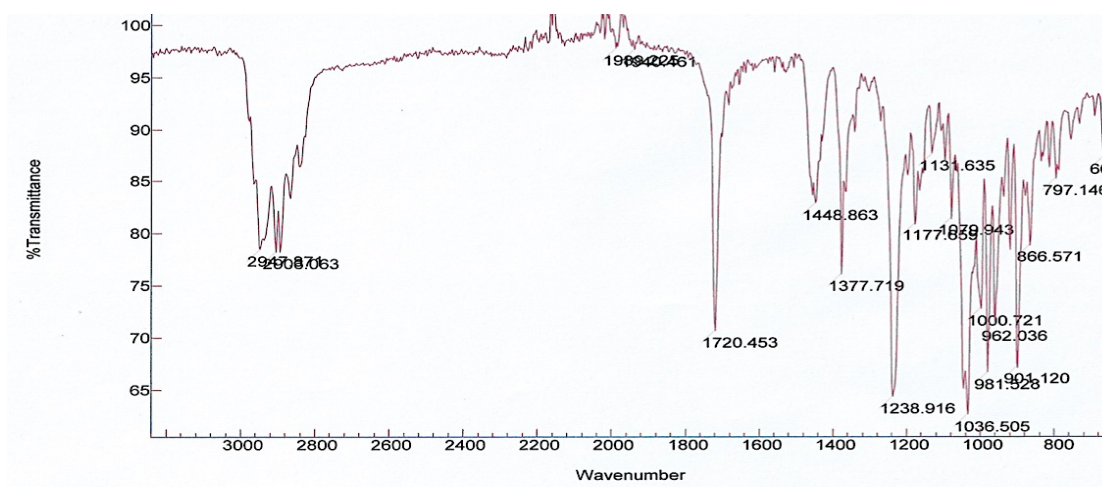


Figura 19. Espectro de IR del epóxido **40**.

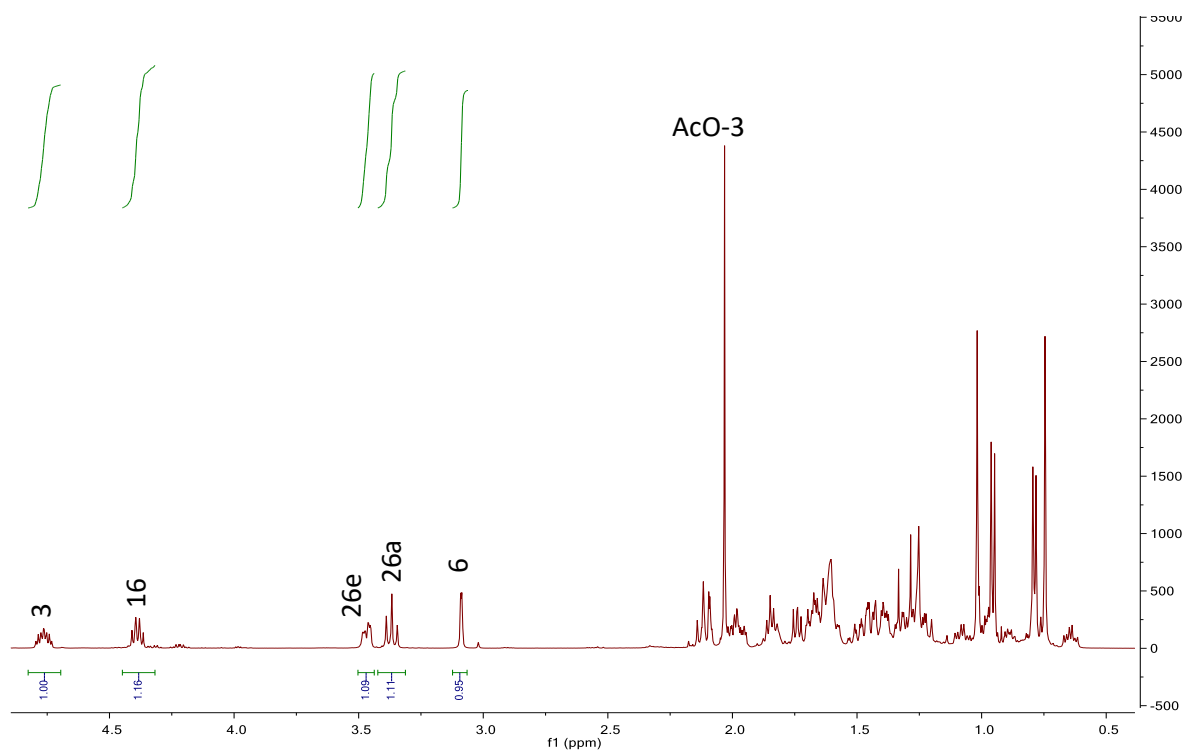


Figura 20. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz del epóxido **40**.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del producto **40** (Figura 20) se observa en 4.76 ppm una señal múltiple que corresponde a H-3 del cual se observa solo un ligero cambio al igual que en H-16 se mantiene en 4.32 ppm sin modificación aparente, de la misma manera los protones diastereotópicos en C-26 mantienen sus desplazamientos, pero aparece una nueva señal en 3.02 ppm correspondiente al H-6 que antes era vinílico y ahora es base de oxígeno lo cual es indicativo de la formación del epóxido.

Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21) se puede observar en 170.4 ppm una señal que indica que el acetato se conservó después de la oxidación, pero las señales correspondientes al doble enlace no se observan en el espectro, aparecen dos nuevas señales en 63.4 ppm y 62.4 ppm correspondientes a los carbonos 5 y 6 respectivamente indicativos de la formación del epóxido en esta posición, así mismo, en 109.2 ppm se observa que se ha conservado el espiroacetal lo cual confirma la estructura del producto.

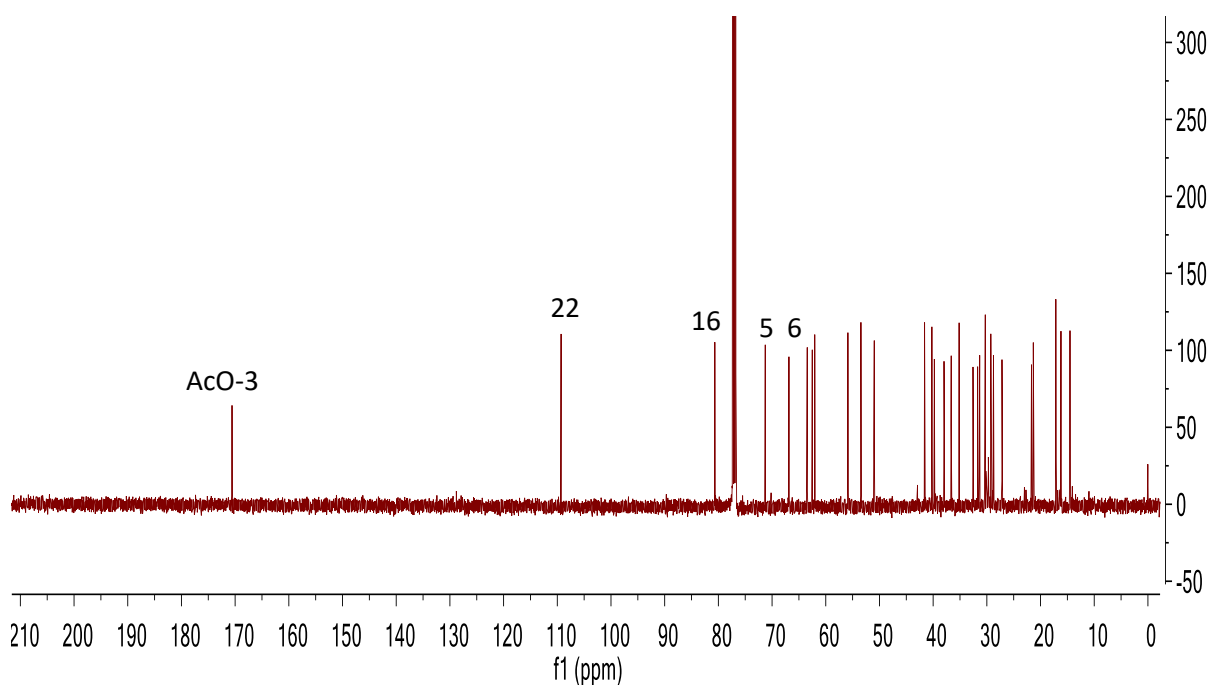
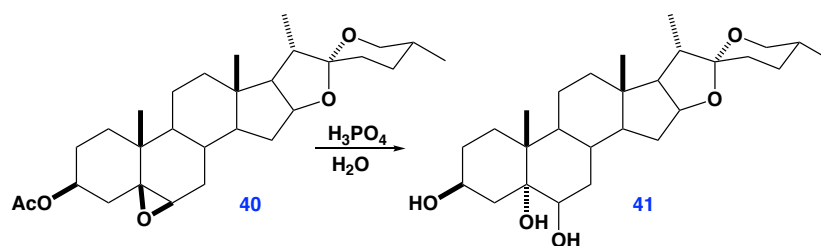


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del epóxido **40**.

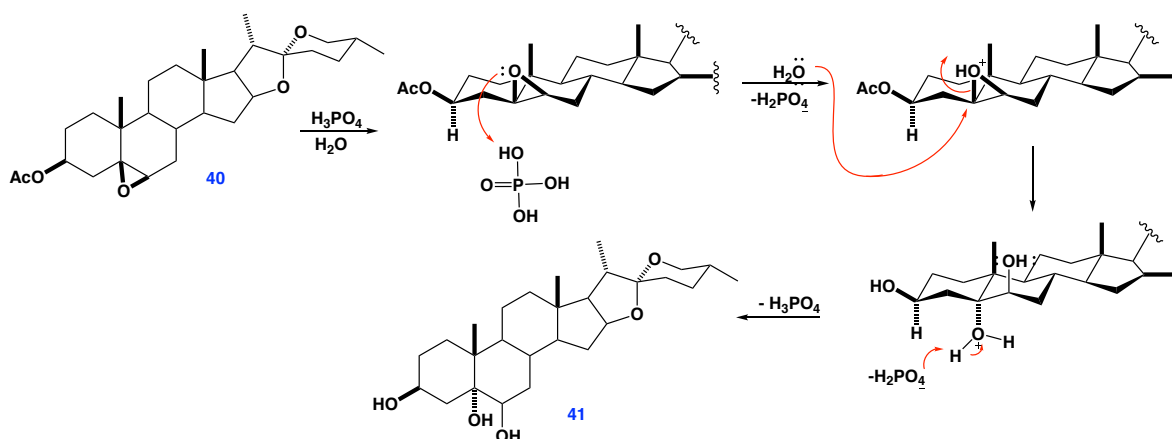
5.3 Apertura en medio ácido del β -epóxido **40** para obtener el triol *trans*-diaxial (**41**).



Esquema 22. Apertura del β -epóxido **40** en medio ácido.

Para la obtención del glicol en los carbonos 5 y 6 de manera estereoselectiva, se procedió a una apertura en medio ácido con agua como nucleófilo, como se ha reportado en la literatura.³⁷ Cuando se hace la apertura de este tipo de epóxidos esteroidales se genera un hidroxilo en α en el C-5 y un hidroxilo en β en el C-6 de manera estereoselectiva, esto

se debe a que la apertura del epóxido se da por la cara α del esteroide, dado que el epóxido se encuentra en la cara β , provocando impedimento estérico al igual que los metilos angulares 18 y 19. La adición del nucleófilo por abajo (cara α) así como la protonación del oxígeno del epóxido, provoca que el OH en C-5 tenga orientación α , y el OH que proviene del epóxido quede unido al C-6 (ver mecanismo en el Esquema 23); simultáneamente se observó la hidrólisis del acetato en la posición 3.



Esquema 23. Mecanismo de la apertura estereoselectiva del epóxido **40**.

Al momento de realizar la reacción se observó un cambio de polaridad drástico en el producto, de manera que el producto precipitó durante la reacción conforme se formaba, al filtrar la reacción se obtuvo un producto blanco, con un pico ion molecular 449.3269, el cual presentó un punto de fusión alto, cercano a los 200 °C. El espectro de IR del derivado **41** muestra las bandas características de los grupos OH presentes en los anillos A y B (Figura 22).

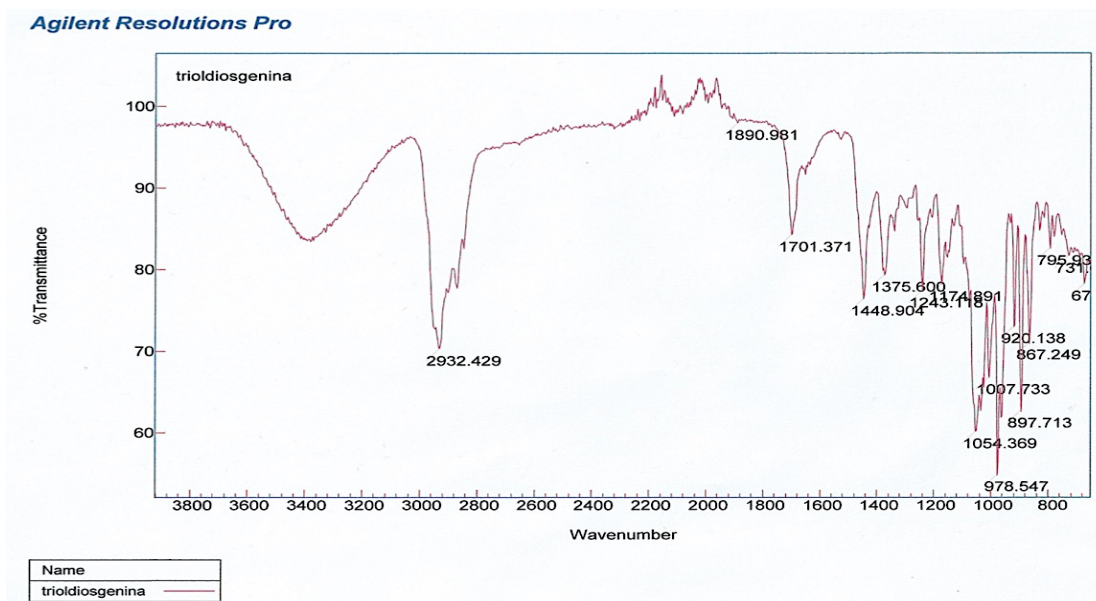


Figura 22. Espectro de IR del triol **41**.

El espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de **41** fue obtenido en metanol deuterado (CD_3OD) debido a la poca solubilidad del compuesto; se observa una señal ancha en 4.64 ppm que corresponde al hidroxilo en la posición 5 el cual su protón no se intercambiò con deuterio del solvente debido al impedimento estérico generado por la posición donde se encuentra este grupo funcional, inmediatamente después de observa la señal correspondiente a H-16 la cual no sufre cambios considerables se mantiene como un ddd con $J_{16,15a}=8.5$ Hz, $J_{16,15e}=7.5$ Hz, $J_{16,17}=6.0$ Hz, en 4.02 ppm se observa la señal correspondiente a H-3 el cual se desplazó a frecuencias bajas debido a la hidrólisis del acetato.

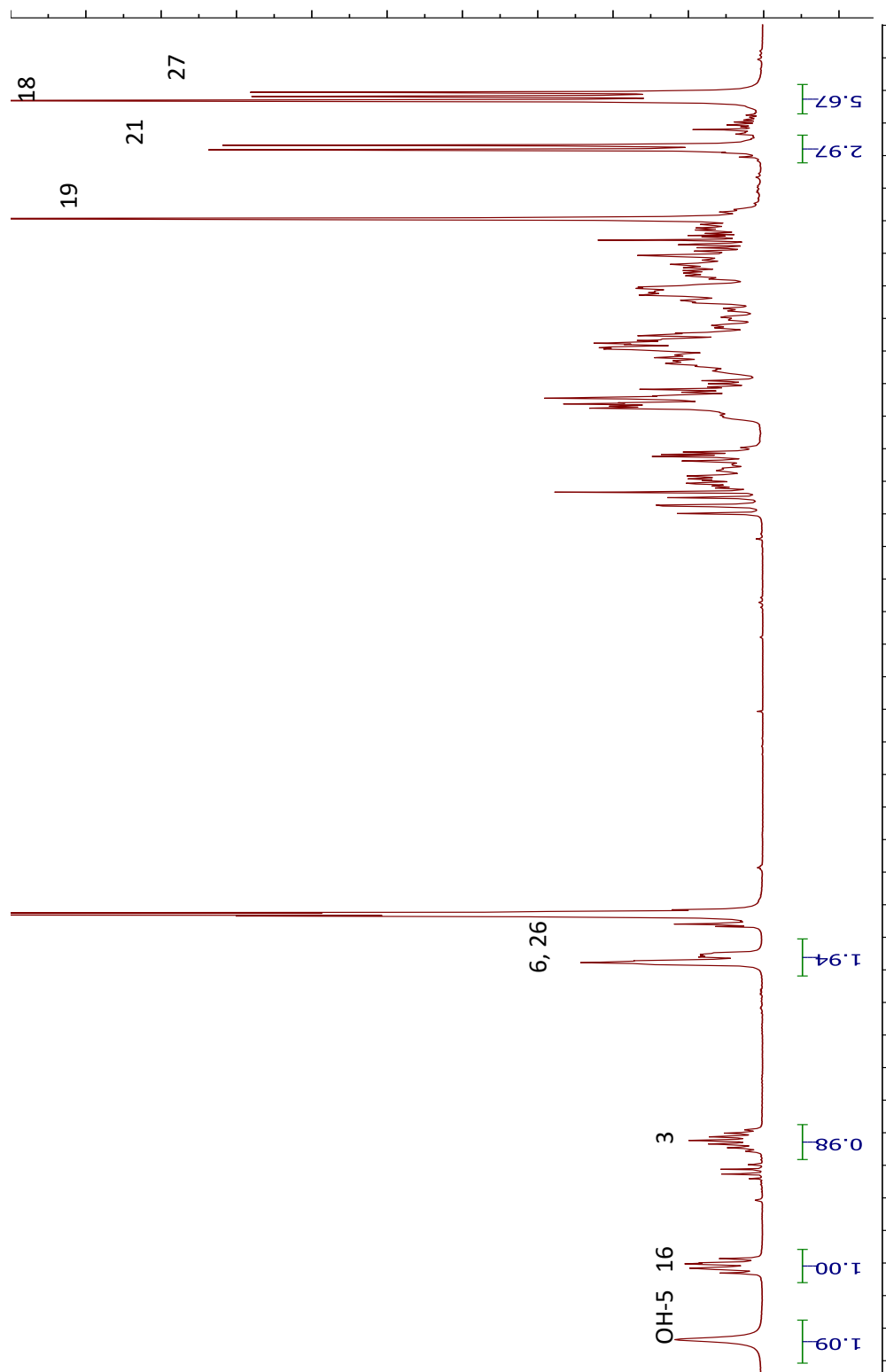


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del triol **41** en CD_3OD .

Por otra parte, las señales correspondientes a los protones 6 y 26 se encuentran alrededor de 3.4 ppm pero se observa un traslapamiento en estas señales entre sí, y con la señal correspondiente al disolvente; un efecto interesante se observó en la señal del metilo 19, que normalmente se observa en 1.0 ppm pero ahora se desplazó a 1.19 ppm debido al efecto generado por los hidroxilos en C-5 y C-6, en específico en C-6, ya que en el epóxido igualmente se observaba dicho efecto ya que se encontraba en la misma cara que el metilo-19. Por su parte en el espectro de ^{13}C se observa que la señal en 109.2 ppm se mantiene, indicando que el espirocetal se ha conservado; pero aparece una nueva señal en 66.4 ppm la cual corresponde al carbono 5 base del hidroxilo en esta posición, los carbonos 16 y 26 conservan sus desplazamientos, pero aparece una señal 75.3 ppm correspondiente al carbono 6; para distinguir entre estos carbonos fue de gran ayuda el experimento HSQC donde el C-6 fue fácilmente asignado ya que en 5 no existe un protón unido a carbono.

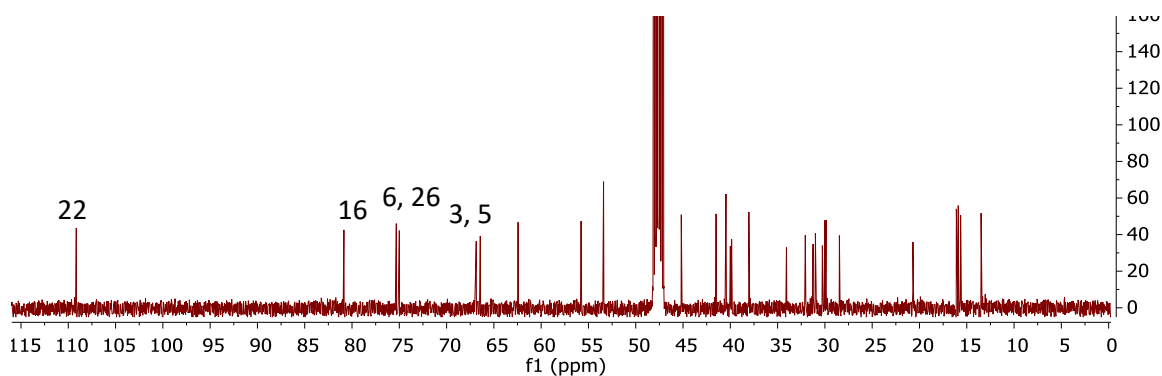


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del triol **41** en CD_3OD .

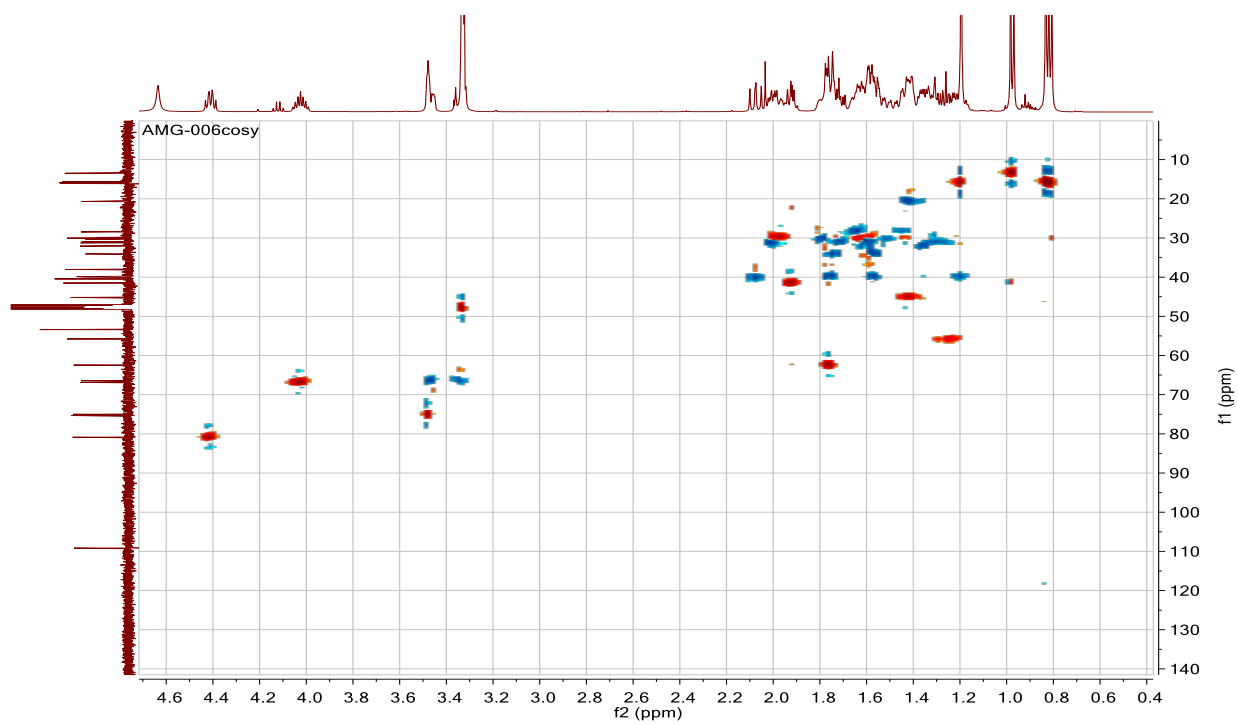
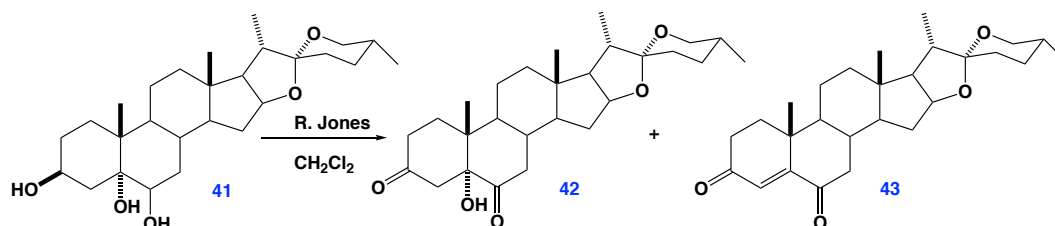


Figura 25. Espectro de RMN HSQC del triol **41**.

5.4 Oxidación del triol 41 con reactivo de Jones.



Esquema 24. Oxidación del triol 41.

Una vez obtenido el producto polihidroxilado se pretendía realizar la apertura de la cadena lateral, sin embargo, debido a la poca solubilidad del compuesto fue difícil lograrlo con las condiciones de reacción de apertura de la cadena lateral, por lo que para mejorar la solubilidad del compuesto se realizó la oxidación con reactivo de Jones. Se observó la formación de dos productos: uno con la oxidación de los dos hidroxilos (42), y otro con la eliminación del hidroxilo en C-5 formando un doble enlace (43).

Se realizó la separación de ambos productos por cromatografía en columna tipo flash; la caracterización de 42 mostró en el espectro de IR una banda característica para OH presente en el C-5 en 3349 cm⁻¹, así mismo bandas en 1712 cm⁻¹ para el C=O de las cetonas en C-3 y C-6 del anillo A y B. El espectro de masas mostró un pico ión molecular 445.2936.

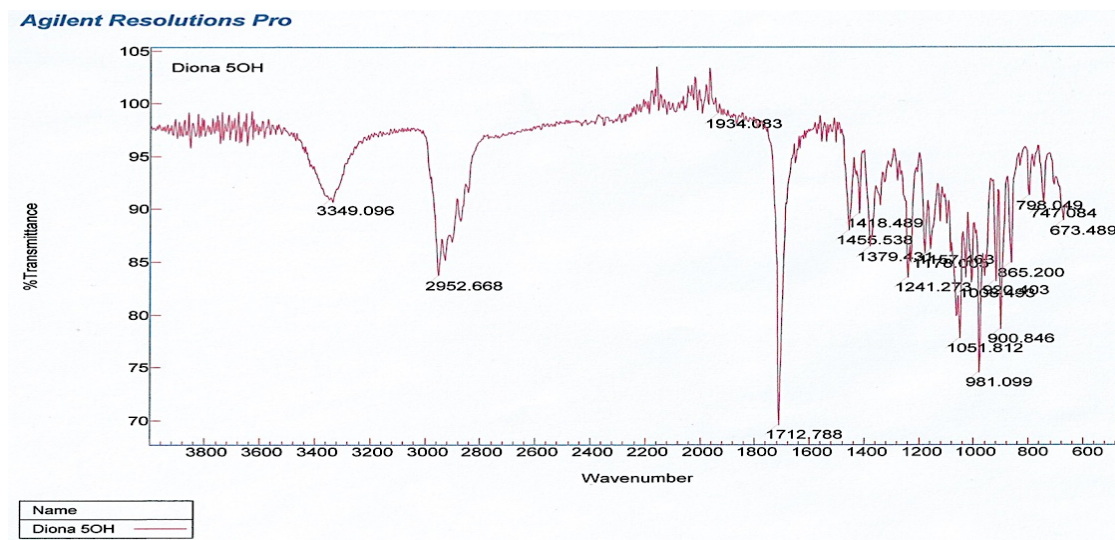


Figura 26. Espectro de IR de la 5-hidroxi-3,6-diona 42.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz se observa que la señal correspondiente a H-16 se mantiene sin modificaciones considerables, al igual que las señales de los protones diasterotopicos de C-26; sin embargo, es notable la señal de grupo hidroxilo que se desplaza en este caso a 3.02 ppm debido al cambio magnético generado por la oxidación. En la región de 2.2 ppm a 2.9 ppm se observa un incremento en el número de señales, esto debido a todos los protones α a carbonilos que se formaron en el producto y cuyo ambiente químico provoca su desplazamiento, primero en 2.89 ppm se observa una señal doble con $J_{4a,4e}=15.8$ Hz correspondiente al protón diasterotópico en la posición 4a el cual solo se acopla con su protón geminal, con este protón y el experimento COSY se logra encontrar el protón 4e en 2.30 ppm el cual es un dd con $J_{4e,4a}=15.8$ Hz, $J_{4a,2e}=2.0$ Hz, el cual presenta el segundo acoplamiento w debido a la disposición espacial del producto. Por otro lado en 2.78 ppm se encuentra una señal triple con $J=12.4$ Hz, aunque es una señal doble de dobles, solo que debido a una equivalencia entre las constantes de acoplamiento se observa como un triple, ya que 7a se acopla con su protón geminal y el protón en 8, con esta señal y utilizando el experimento COSY permitió encontrar a 7e en 2.30 ppm como una señal múltiple; en 2.1 ppm se encuentran dos señales múltiples que corresponden a los protones en H-2, en este caso después de la oxidación se observa que se ha perdido el efecto que se ha venido observando en el metilo 19 debido a que se a oxidado el hidroxilo en C-6 lo que confirma que se debida a la influencia de este grupo es específico (Figura 27).

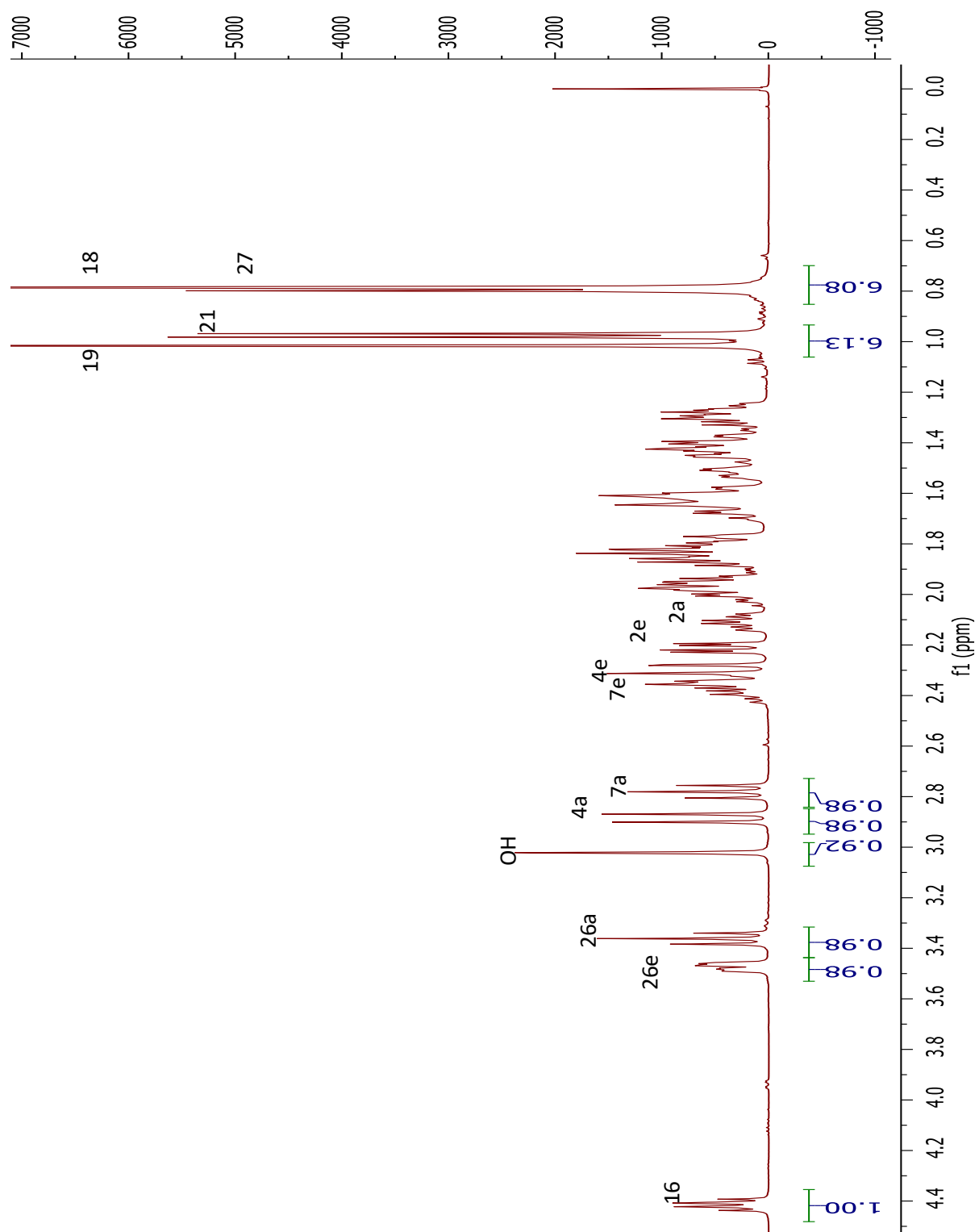


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de la 5-hidroxi-3,6-diona **42**.

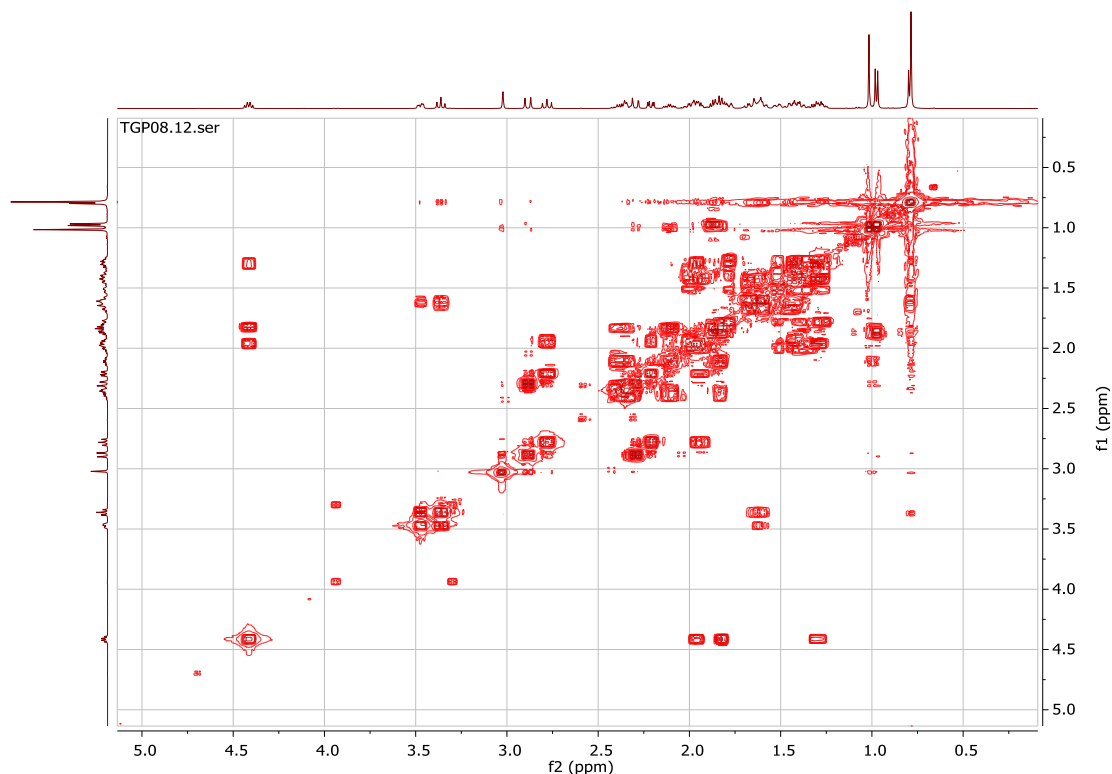


Figura 28. Espectro COSY de la 5-hidroxi-3,6-diona **42**.

Por su parte en el espectro de RMN de ^{13}C se observa la aparición de dos señales una en 211.3 ppm y otra en 210.8 ppm correspondientes a los carbonos 3 y 6 respectivamente, los cuales fueron identificados inequívocamente con el experimento de HMBC; en 109.3 ppm se observa que se conserva el espirocetal y se observa la desaparición de dos señales en la región característica de los C-base de oxígeno y una señal en 82.6 ppm se hace más visible correspondiendo al carbono en 5, confirmando en el HSQC que no presenta unión a H, de igual manera con el experimento de HSQC se puede asignar los carbonos correspondientes a los protones α a carbonilo obtenidos en este producto, es evidente y se confirma el carácter diasterotópico de los protones en 2, 4 y 7 confirmando la estructura. Persiste el hidroxilo en la posición 5 confirmando que no hubo eliminación, además que se consiguió mejorar la solubilidad de este producto con respecto a su materia prima.

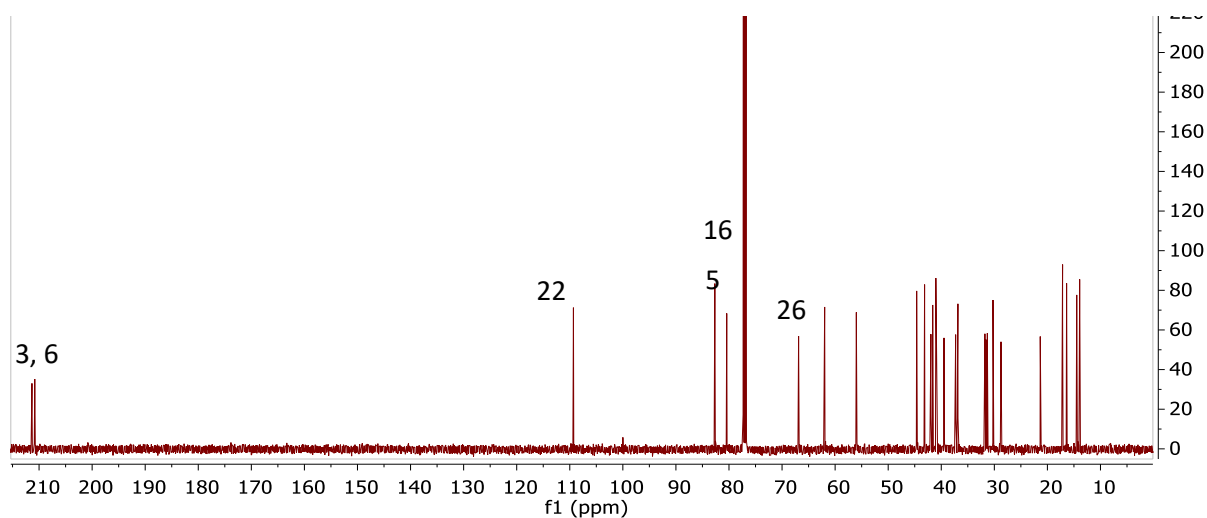


Figura 29. Espectro de ^{13}C a 125 MHz de la 5-hidroxi-3,6-diona **42**.

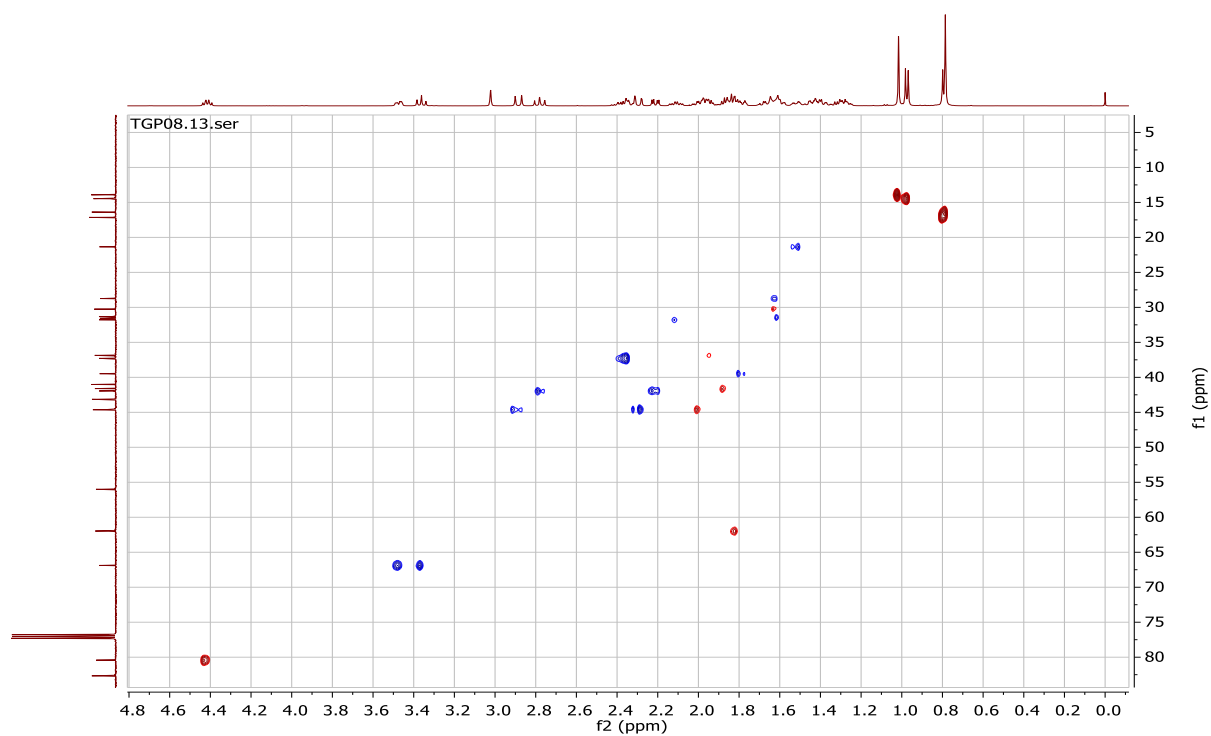
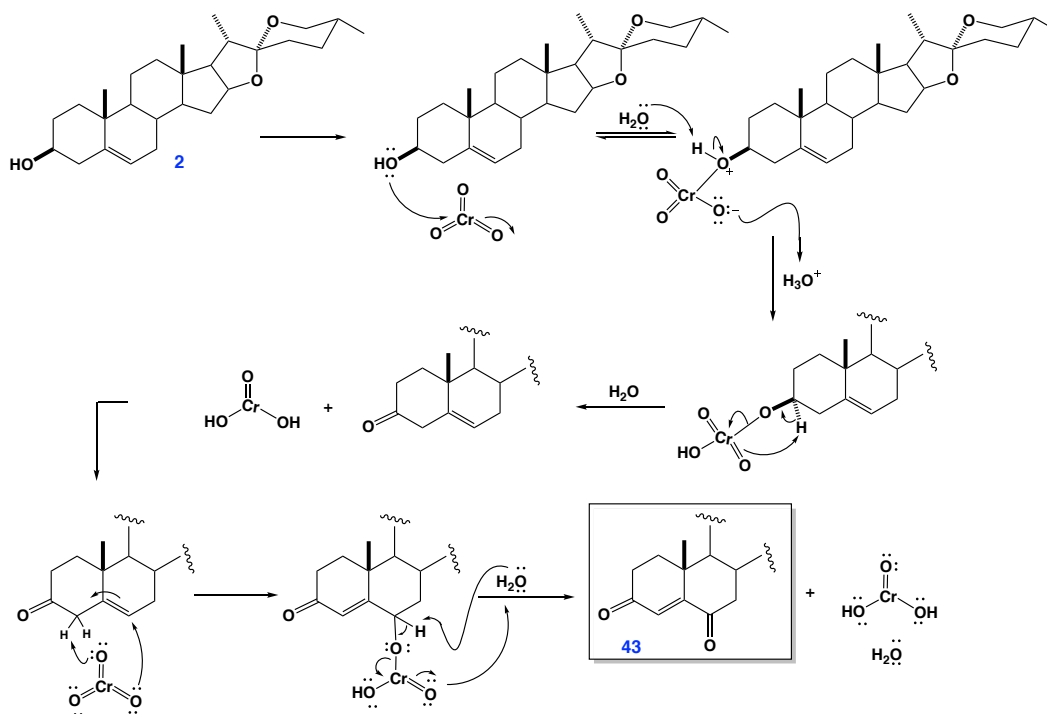


Figura 30. Espectro de RMN HSQC de la 5-hidroxi-3,6-diona **42**.

Por otro lado, observamos que para favorecer la obtención del producto de eliminación **43** era necesario calentar ligeramente (30 °C) para favorecer la eliminación del OH en C-5. Por otro lado, decidimos obtener la 3,6-diona **43** por oxidación directa de diosgenina (**2**), obteniendo un rendimiento superior al de la oxidación del triol **41**; a continuación se presenta el mecanismo para llegar a **43**.



Esquema 25. Mecanismo propuesto de oxidación de la diosgenina (**2**) para conducir a la 3,6-diona **43**.

Se obtuvieron cristales idóneos de la diona **43** que confirman la estructura con la presencia del sistema dicetónico conjugado en los anillos A/B, cuya estructura fue publicada en un artículo de *IUCrData* (<https://doi.org/10.1107/S2414314620012006>). Este reporte es muy importante, debido a que el reporte anterior de esta estructura es erróneo, y no había reportes más recientes, debido a la dificultad que presenta la obtención de cristales adecuados de este compuesto.

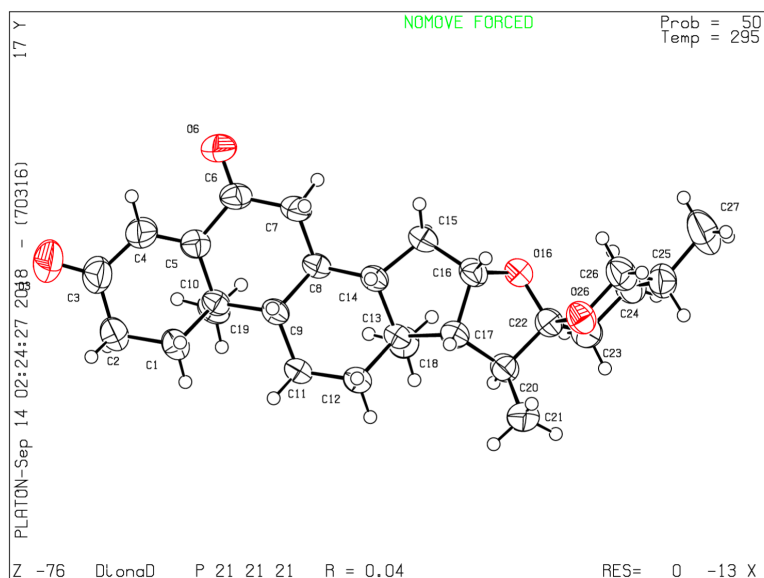


Figura 31. Estructura cristalina la 3,6-diona **43** obtenida por Difracción de Rayos-X.

Se comprobó que la oxidación de Jones no afecta los anillos E/F de diosgenina, y confirmamos que el centro quiral C25 conservó su configuración *R* original, mientras que la estructura de Rajnikant y colaboradores tiene una configuración 25*S*. Mientras trabajábamos con esta molécula, obtuvimos cristales prismáticos bien formados y de alta calidad, y recolectamos datos de difracción con el propósito de mejorar la estructura reportada anteriormente.³⁸ Sin embargo, pronto quedó claro que en su lugar se había cristalizado una nueva forma; aunque la simetría del cristal no cambió, se observaron diferencias en los parámetros de las celdas tan grandes como 2 Å. Después del refinamiento de la estructura, se comparó un patrón de difracción de Rayos X de polvos simulado (ver publicación, figura 2) con el obtenido con el modelo de ³⁸Rajnikant et al. (2000). Los patrones son claramente diferentes, como es de esperar para dos formas polimórficas. El polimorfismo parece ser consecuencia de una ligera modificación de la conformación de los anillos A y B (Figura 31).

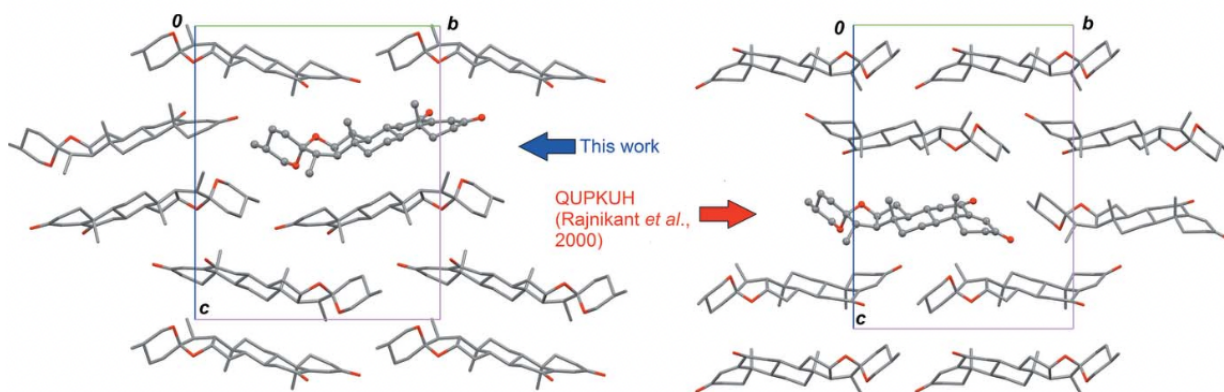


Figura 32. Comparación de la estructura cristalina del nuevo polimorfo (izquierda, diona **43**) con la reportada anteriormente (derecha).

Continuando con la caracterización de este compuesto, al analizar el espectro de masas se observa un pico ion molecular en 426.6982 uma, presenta un punto de fusión de 193-194 °C. Las señales observadas al analizar el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de **43** confirman la presencia de los H según su ambiente químico, destacando una nueva señal en 6.18 ppm como una señal simple que corresponde al nuevo H vinílico del C-4, en 4.43 se observa una señal múltiple que corresponde a H-16, en la cual no se observa un cambio significativo con respecto a la materia prima lo que confirma que no se ha afectado el espiroacetal; en 3.48 podemos observar una señal dd con $J_{26e,26a}=10.9$ Hz, $J_{26e,25}=4.6$ Hz que corresponde al H-23 ecuatorial, junto a esta señal en 3.36 se observa una señal dd con $J_{26e,26a}=J_{26e,25}=10.9$ Hz que corresponde al H-26a, donde tanto los valores de las constantes de acoplamiento como el desplazamiento dejan de manifiesto que el espirocetal no ha sufrido efecto alguno. En 2.71 ppm se observa una señal doble con $J_{7a,7e}=12$ Hz característico de la señal del protón 7a con un acoplamiento geminal, mismo que se desplazó debido a la presencia del grupo carbonilo en C-6, mismo efecto que se observó en el caso del compuesto **42**; por otro lado en 1.19 ppm se observa la señal correspondiente al metilo 19 el cual se desplazó ligeramente a frecuencias altas debido a la influencia generada por los grupos carbonilos ingresados al esteroides, mientras que los metilos 18, 21 y 27 se mantienen los desplazamientos como en la materia prima, confirmando la selectividad de la reacción en los anillos A y B.

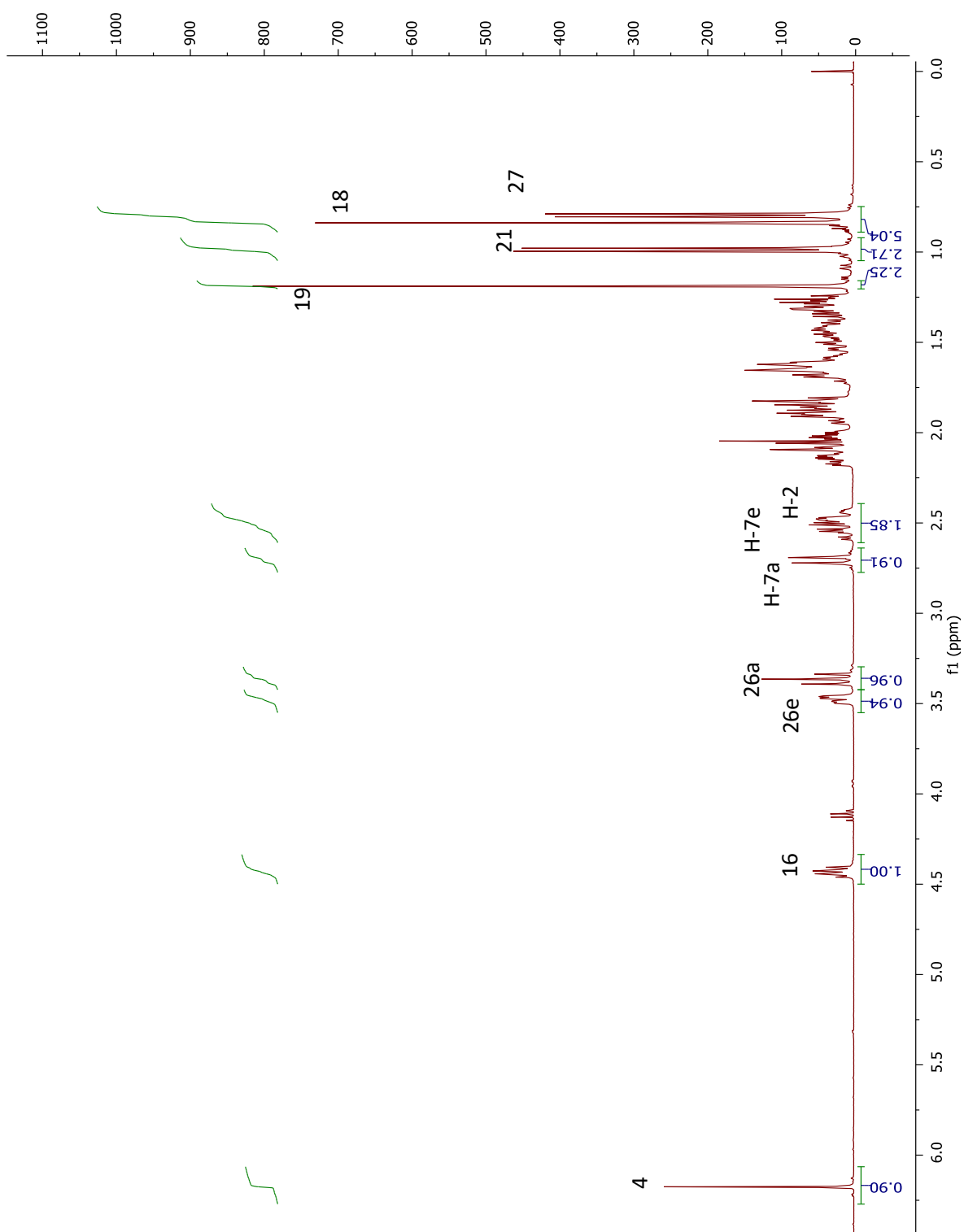


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de la 4-en-3,6-diona **43**.

En el espectro de ^{13}C se puede observar a frecuencias altas las señales de los grupos carbonilos de la posición C-6 y C-3 en 201.8 ppm y 199.4 ppm respectivamente; en 160.6 ppm se presenta la señal correspondiente al carbono vinílico en C-5 y en 125.5 ppm la señal de C-4 confirmando la estructura propuesta para los anillos A y B de este producto de eliminación. Por otra parte, en 109.3 ppm podemos observar la señal correspondiente al C-22 característico de la fusión de los anillos E-F en el espirocetal. Para la asignación de C-16 y C-26 fue de utilidad el experimento HSQC, observando una correlación directa entre el protón 16 y su carbono respectivo, en el caso de C-26 se observó cómo ambos protones diasterotópicos H-26 correlacionan con este.

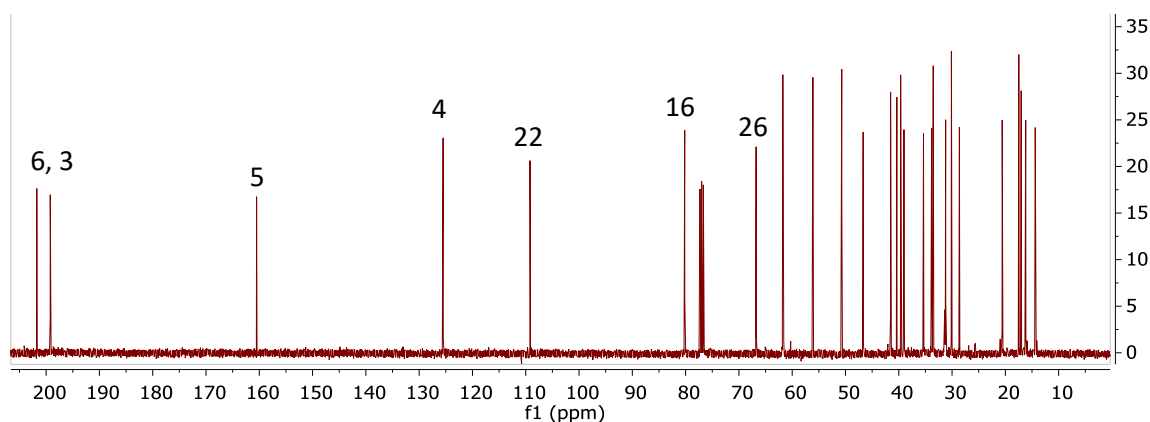


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la 4-en-3,6 diona **43**.

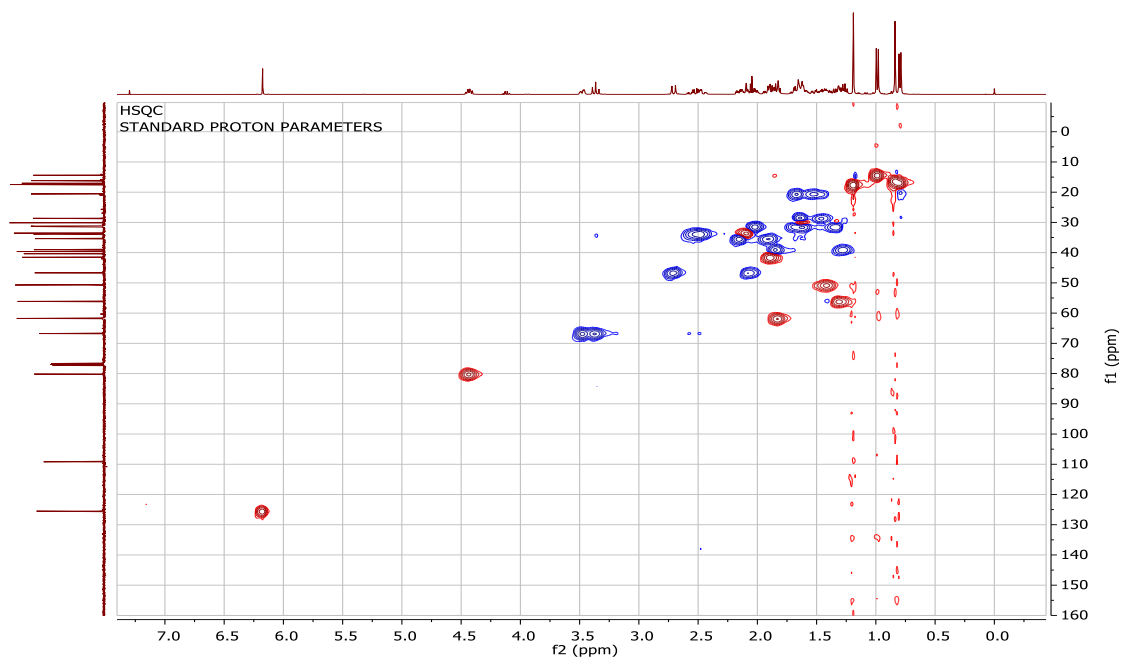
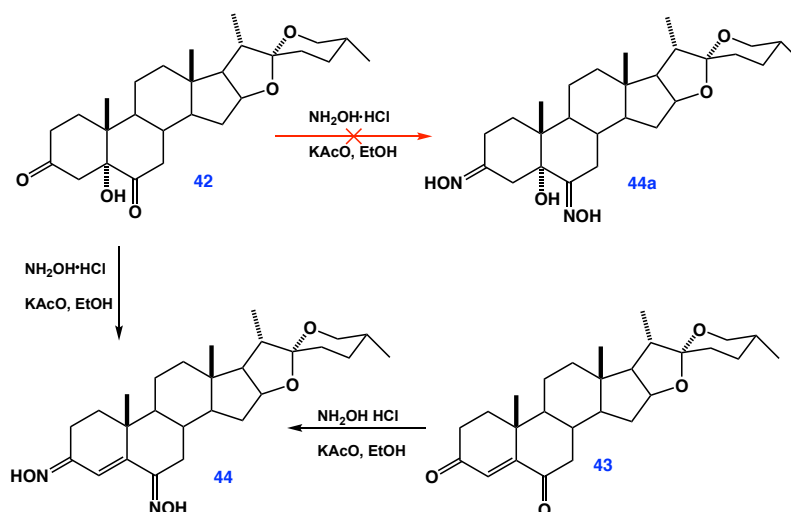


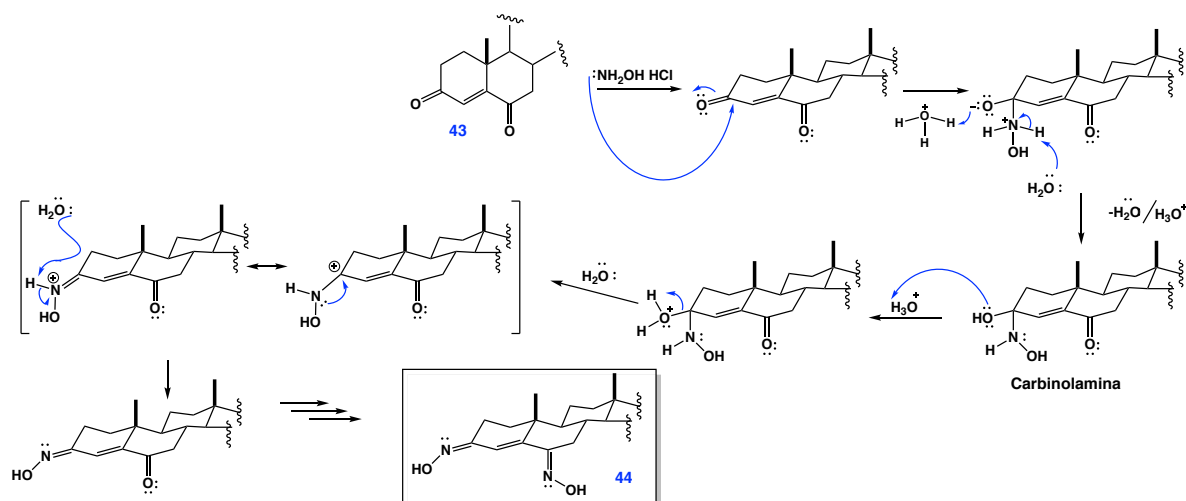
Figura 35. Espectro de RMN HSQC de la 4-en-3,6 diona **43**.

5.5 Formación de oximas en posiciones C-3 y C-6.



Esquema 26. Formación de las oximas **44**, **44a**.

Como se mostró en los antecedentes, el hecho de introducir nitrógeno a estructuras esteroidales ha mostrado generar y/o potenciar la actividad anti-proliferativa de estos compuestos, por lo que generar oximas esteroidales cobró gran interés; las funciones cetónicas en los compuestos que se han obtenido en este trabajo de tesis en las posiciones C-3 y C-6, permite explorar esta opción, mediante una reacción de condensación con hidroxilamina. En primera instancia se esperaba que la 3,6 diona-5-OH **42** generara un compuesto 3,6-dihidroximino-5-OH **44a** como se observa en el Esquema 26; sin embargo, al momento de analizar el producto obtenido de esta reacción se observa la formación del compuesto 4-en-3,6-dihidroximino **44** como producto mayoritario, el mismo que se obtuvo de la reacción de condensación con la 4-en-3,6-diona **43**. Este resultado se puede explicar a través del mecanismo de reacción propuesto mostrado en la Esquema 27, en donde la reacción se inicia con la adición nucleofílica de la hidroxilamina al grupo carbonilo en C-3 de la 3,6-diona **43**. A continuación, la protonación del oxígeno, seguida de la desprotonación del grupo amino, conduce a un producto inestable denominado carbinolamina, que se convierte finalmente en la oxima por protonación seguida de pérdida de agua; el mismo proceso ocurre en la posición 6, generando la dioxima correspondiente.



Esquema 27. Mecanismo de condensación de la 4-en-3,6-diona **43** con hidroxilamina.

Al analizar el producto mayoritario obtenido se observó en el espectro de masas el pico ion molecular en 456.2982 uma, el compuesto presenta un punto de fusión de 150-152 °C menor al de la materia prima, y un $[\alpha]_D^{25} = +37.8^\circ \text{ C}$, en el espectro de IR se puede observar una banda ancha en 3313 cm^{-1} debida a los grupos hidroxilos de las oximas del compuesto, como se puede observar en la Figura 36.

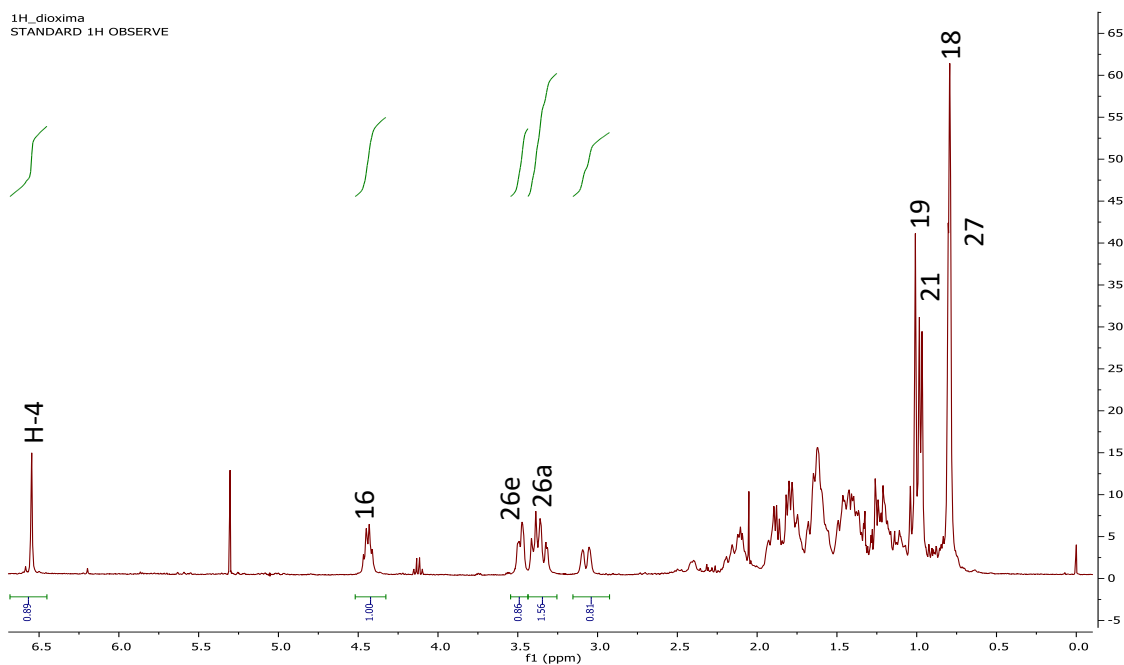


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de la dioxima **44**.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **44** se puede observar una gran similitud con la materia prima dado que no se afectó a ningún protón de la estructura directamente; por ejemplo, se observa en 6.55 ppm una señal simple que corresponde al protón vinílico en 4, en 4.44 ppm se observa una señal múltiple que corresponde al H-16 al igual los protones en 26 conservan sus desplazamientos como en la materia prima, lo cual podría generar confusión en la formación del compuesto, solo una señal en 3.1 ppm que corresponde al protón en 7 el cual se ha desplazado a frecuencias altas debido a la cercanía de los grupos hidroxilos.

Sin embargo, al observar el espectro de ^{13}C del compuesto dioxima si se nota un cambio significativo, las señales alrededor de 200 ppm han desaparecido y dos nuevas señales en 156.4 ppm y otra en 156.2 ppm han aparecido las cuales corresponden a señales de $\text{C}=\text{N}$ de la dioxima obtenida, cabe destacar que las otras señales observadas en el espectro no han mostrado cambio significativo al no ser modificado su ambiente químico, por ejemplo en 109.3 ppm se observa la señal correspondiente al C-22 del espiroacetal, lo que confirma que siguen intactos los anillos E y F del esteroide.

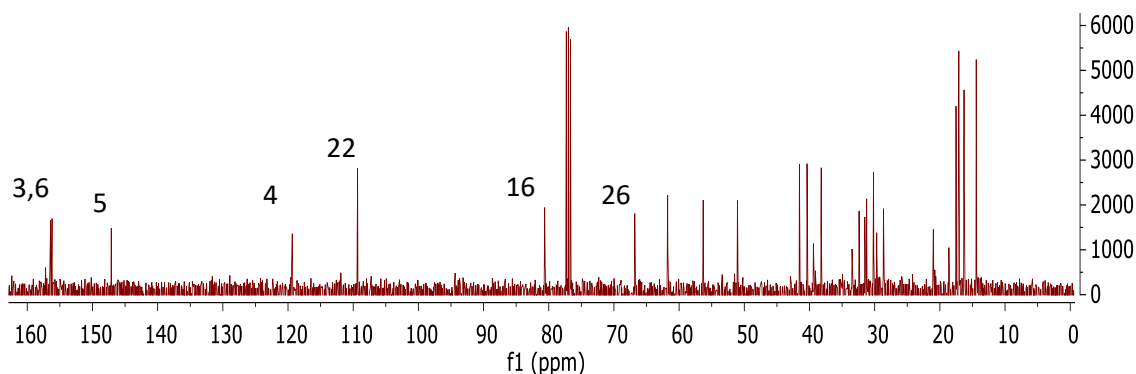


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la dioxima **44**.

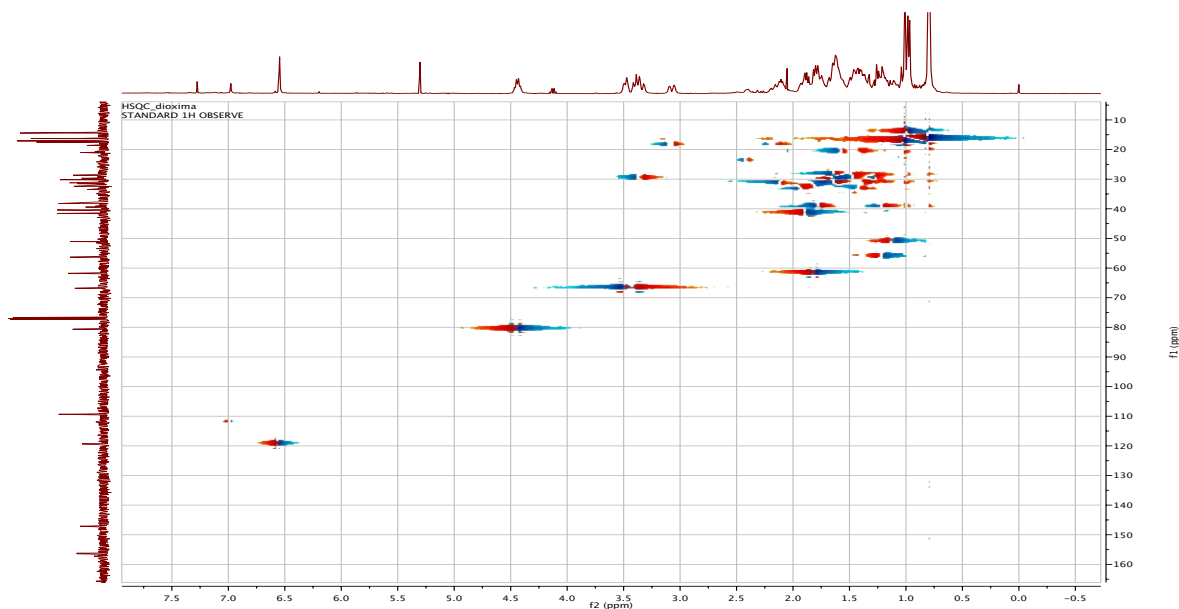
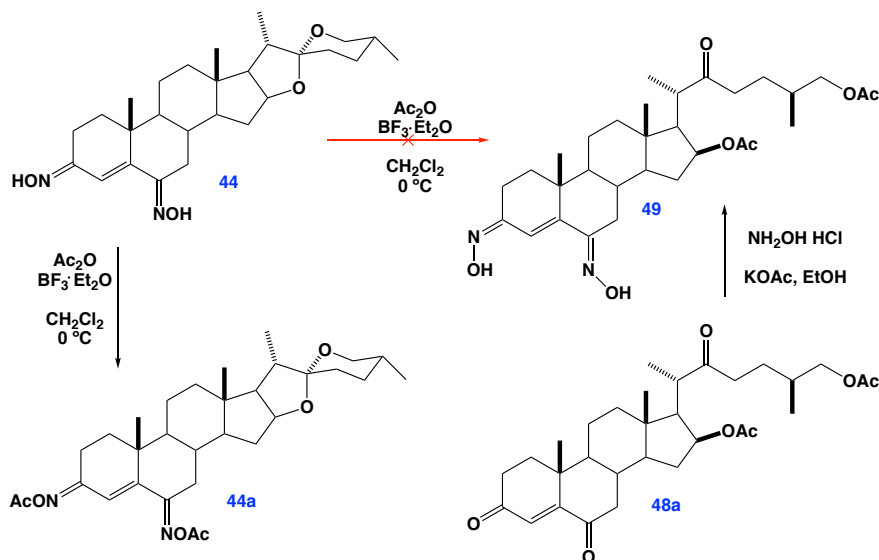


Figura 38. Espectro de RMN HSQC de la dioxima **44**.

5.6 Apertura del espiroacetal de derivados 3,6-dicetónicos.

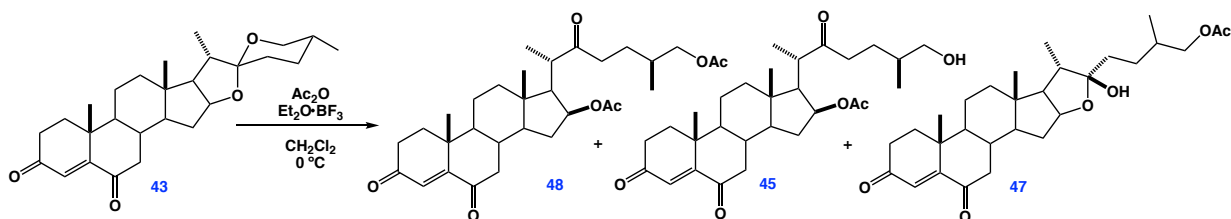
Como se mencionó en los antecedentes, está demostrado en la literatura en trabajos previos del grupo de investigación, que cuando está presente la cadena lateral 22-oxocolestánica en diferentes derivados, éstos han mostrado importante actividad biológica como promotores de crecimiento vegetal y han reportado una elevada actividad antiproliferativa en líneas de cáncer cervicouterino, por lo que con la finalidad de obtener nuevas moléculas biológicamente más activas, se procedió a abrir la cadena lateral de los compuestos obtenidos para conseguir este tipo de funcionalidad en la cadena lateral. Si bien previamente en este trabajo de tesis se ha mostrado una ruta oxidativa con este fin, nuestro grupo de investigación en los últimos años ha explorado modificar la reacción de acetólisis empleando un co-disolvente con la finalidad de orientar la reacción a la obtención de derivados 22-oxocolestánicos.¹⁶ Con este antecedente se realizó la reacción para la apertura del espiroacetal de la dioxima **44** obtenida, la cual al momento de realizar la reacción condujo a un compuesto acetilado en los hidroxilos de los grupos hidroximínicos de la materia prima, como se observa en el Esquema 28, efecto que se explica debido a la alta eletrofilicidad que le da al grupo acetato la presencia del ácido de Lewis, por lo que para dirigir la reacción al producto deseado, se decidió buscar una ruta alternativa la

obtención de un compuesto de ese tipo. No se hicieron intentos por separar y caracterizar **44a** y **48a**.



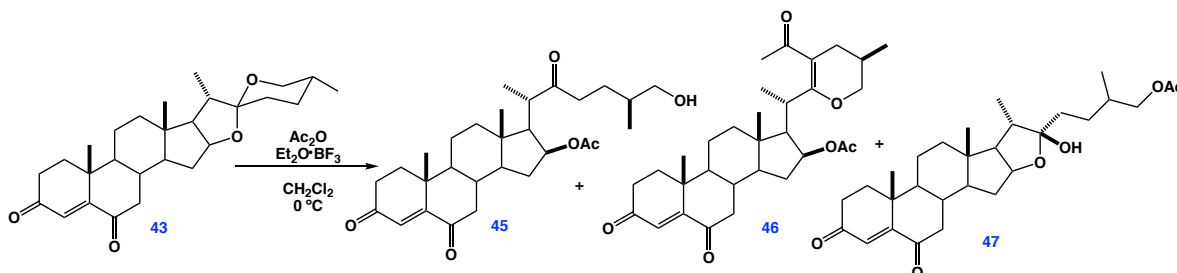
Esquema 28. Reacción de apertura de la dioxima **44**.

Como se puede encontrar descrito en la literatura,¹⁶ el espirocetal se forma biosintéticamente a partir de la cadena lateral del colesterol mediante una serie de oxidaciones. Esta última estructura llamada protosapogenina, es transformada en un hemiacetal (producido por el ataque del hidroxilo 16β al carbonilo en C-22), luego en un ion oxonio y finalmente en un espirocetal. Analizando la influencia de la temperatura en la reacción de acetólisis en diosgenina (**2**) se realizaron reacciones a temperatura ambiente y bajas temperaturas, cuyos resultados se encuentran descritos en diversos reportes del grupo de investigación. Para lograr la formación de la cadena 22-oxocolestánica reportada por el grupo de investigación en diversas ocasiones, se realizó la reacción siguiendo la metodología descrita en la literatura, utilizando anhídrido acético y $\text{F}_3\text{B} \cdot \text{OEt}_2$ a 0°C dando como resultado la obtención de los compuestos **45**, **47** y **48**.



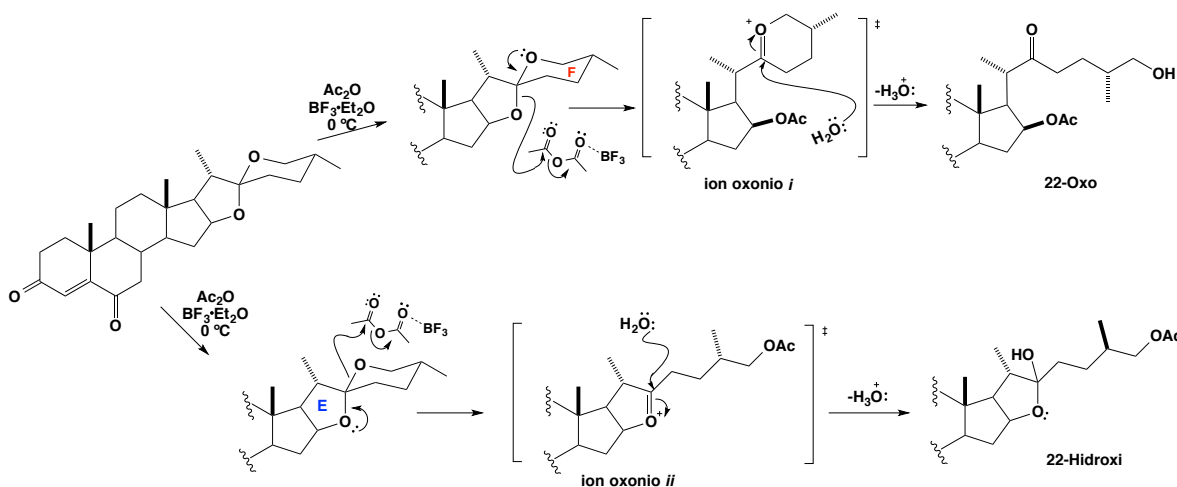
Esquema 29. Productos esperados en la apertura regioselectiva de la 4-en-3,6-diona **43**.

Al analizar los resultados de esta reacción de la formación de la cadena 22-oxocolestánica se observó que no se formó el derivado 22-oxocolestánico acetilado en la posición 26 **45**, solo se detectó la formación de los nuevos derivados con un OH en C-26 **45**, un derivado epoxicolestánico **46** y el 22-hidroxi-3,6-diona **47** como se muestra en el Esquema 30.



Esquema 30. Productos de la apertura de la 4-en-3,6-diona **114**.

Los productos **45**, **46** y **47** se obtuvieron con un 45 %, 15 % y 30 % de rendimiento respectivamente. La formación de estos productos de acetólisis se puede explicar mediante el mecanismo de reacción, como se observa en el Esquema 31, donde bajo las condiciones de reacción utilizadas, se formó el ion oxonio (*i*) el cual es atacado en C-22 por una molécula de agua al efectuar el tratamiento de la reacción, conduciendo al producto con cadena 22-oxocolestánica. La apertura del anillo F conduce al ion oxonio *ii*; y éste al compuesto 22-hidroxi **47**, que posee una estructura análoga a las pseudosapogeninas. Alternativamente, la molécula de agua puede atacar la posición 26 del intermediario *i*, con lo cual el átomo de oxígeno cargado positivamente recupera su par electrónico y dirige a la formación del epoxicolestano **46**.



Esquema 31. Mecanismo de apertura de la cadena lateral de 4-en-3,6-diona **43**.

Al analizar estos resultados, podemos asumir que la dicetona en los anillos A-B del esteroide juega un papel predominante en la dirección de la reacción, conduciendo a la formación de los derivados descritos, a pesar de haber utilizado la metodología descrita en la literatura. Se deduce que el efecto estereoelectrónico ocasionado por la funcionalización de los anillos A y B, marca la tendencia para conducir a los productos hidroxilados en C-26 y C-22, así como la formación de la cadena epoxicolestánica, lo que no sucede en los reportes donde la materia prima no contiene grupos cetónicos electroatrayentes.

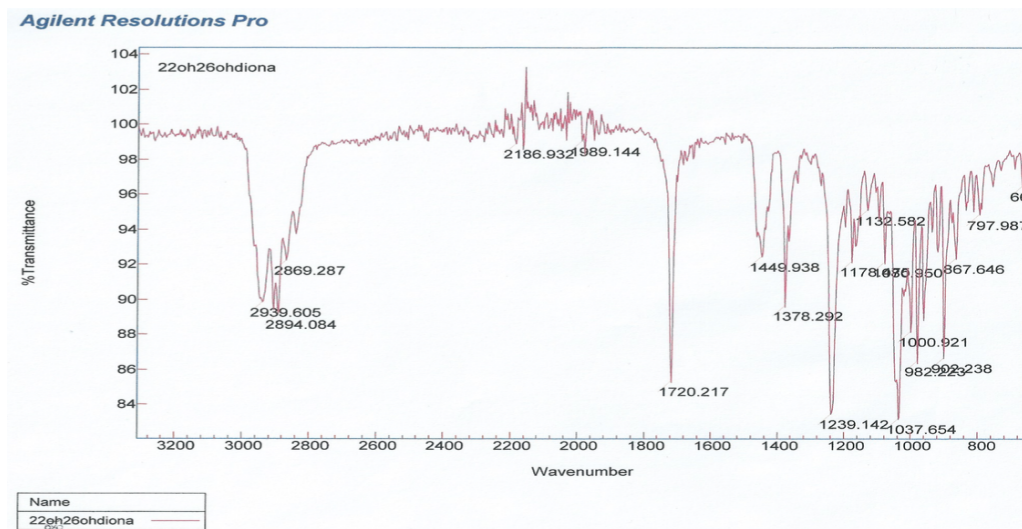


Figura 39. Espectro de IR del derivado 22-oxocolestánico **45**.

Se puede observar que el compuesto con la cadena 22-oxocolestánica **45** con el OH en C-26 fue el mayoritario en la reacción, el cual en su espectro de masas presenta un pico ion molecular de 487.3065, correspondiente al compuesto obtenido, un punto de fusión de 170 °C, en el IR se observan bandas en 3010 cm^{-1} para el OH en C-26, y una banda muy intensa para el C=O del acetilo en C-16 en 1720 cm^{-1} .

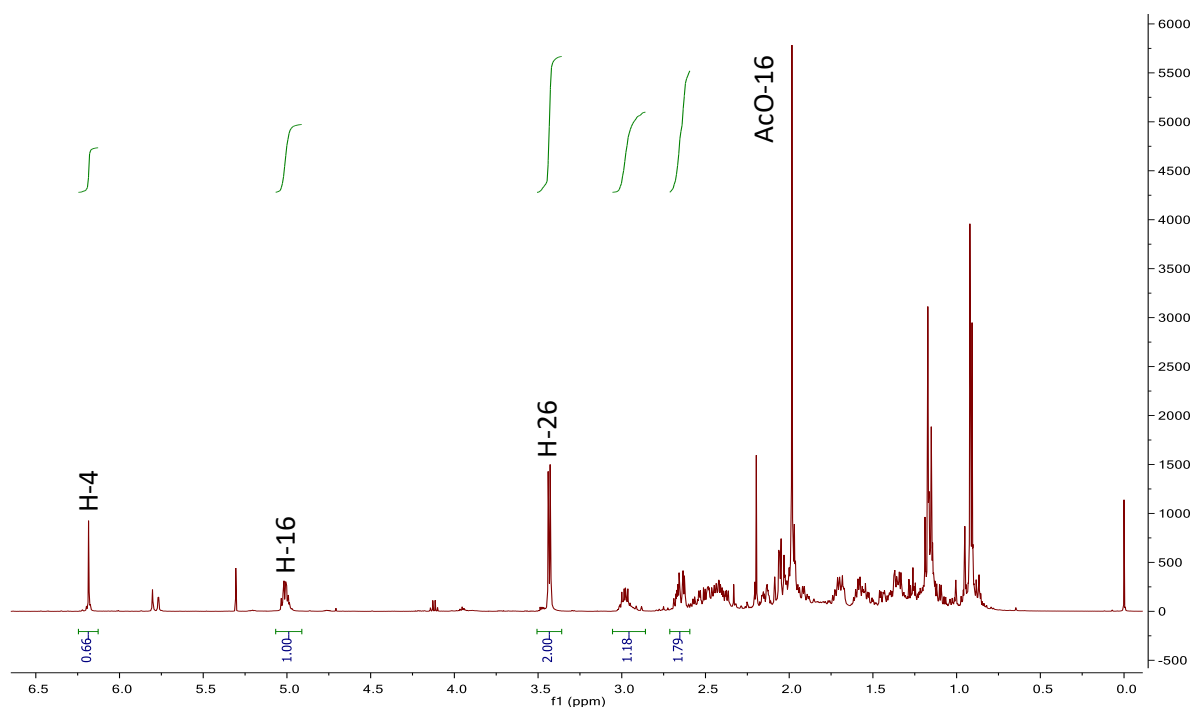


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del derivado 22-oxocolestánico **45**.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz podemos observar que en la región de 2.0 ppm solo se observa una señal correspondiente al acetilo en la posición 16, a parte de este cambio notable el espectro guarda una gran similitud con el derivado anterior, de igual manera los protones en 26 se muestra como una sola señal en 3.44 ppm debido al libre giro que ahora presenta la cadena lateral abierta.

De igual forma en el espectro de RMN de ^{13}C de RMN a 125 MHz se observa una gran similitud con el producto anterior, con la diferencia que en la región de los carbonilos de los acetatos solo se observa una señal en 170.0 ppm correspondiente al acetato en 16, y en 68.5 ppm se observa una señal del carbono en 26 ligeramente a frecuencias más altas, debido al cambio de grupo, a parte de estos cambios el espectro no muestra cambios aparentes con respecto al producto anterior, se observa en 212.6 ppm la señal correspondiente al carbonilo en la posición 22, en 201.1 ppm y 199.5 ppm aparecen las señal correspondientes a los carbonos 3 y 6, además se observa que el doble enlace sigue intacto después de la reacción con las señales en 160.9 ppm y 126.0 ppm correspondientes a los carbonos 5 y 4 del doble enlace respectivamente.

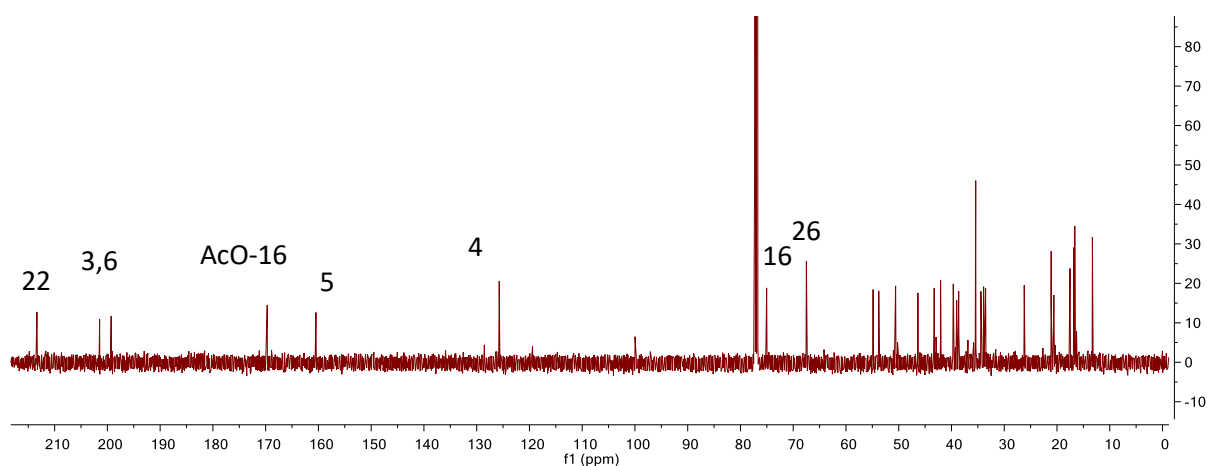


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del derivado 22-oxo-colestánico **45**.

El producto de la apertura del anillo F, se vuelve de gran interés como se observó en el mecanismo, ya que es un proceso puramente cinético si se compara con la apertura del anillo E que continua con la apertura del anillo F, mismo que termodinámicamente es más favorecido debido a la tensión angular mayor en un anillo de 5 versus un anillo de 6.

Este producto **47** mostró en el espectro de IR bandas en 1728 y 1665 cm^{-1} para los $\text{C}=\text{O}$ de la cetona α,β -insaturada en C-3 y el acetilo en C-26. La banda en 3450 cm^{-1} corresponde al la tensión OH libre en C-22.

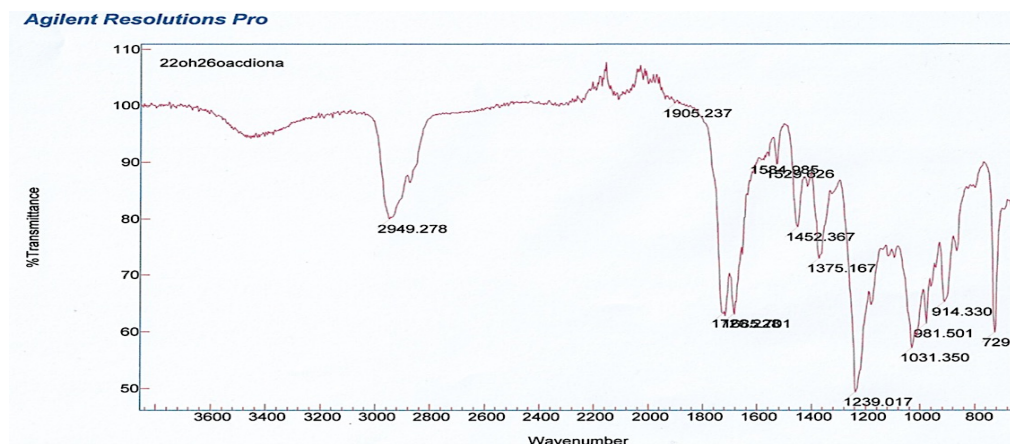


Figura 42. Espectro de IR del derivado 22-OH-colestánico **47**.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz se puede observar una señal en 6.19 ppm correspondiente al protón vinílico en 4, y en 4.62 ppm una señal múltiple que corresponde al protón en 16 característico cuando se forma parte de un ciclo, por otro lado, los protones diastereotópicos en 26 se muestran como señales doble de dobles, la primera sale en 3.97 ppm que corresponde al $\text{H}_{26\text{e}}$ con $J_{26\text{e}-25}=5.97$ Hz y $J_{26\text{e}-26\text{a}}=10.8$ Hz y la segunda en 3.88 ppm correspondiente al $\text{H}_{26\text{a}}$ con $J_{26\text{a}-25}=5.97$ Hz y $J_{26\text{a}-26\text{e}}=10.8$ Hz como resultado de la apertura del anillo F, se observa además la señal del acetilo en 26 en 2.05 ppm.

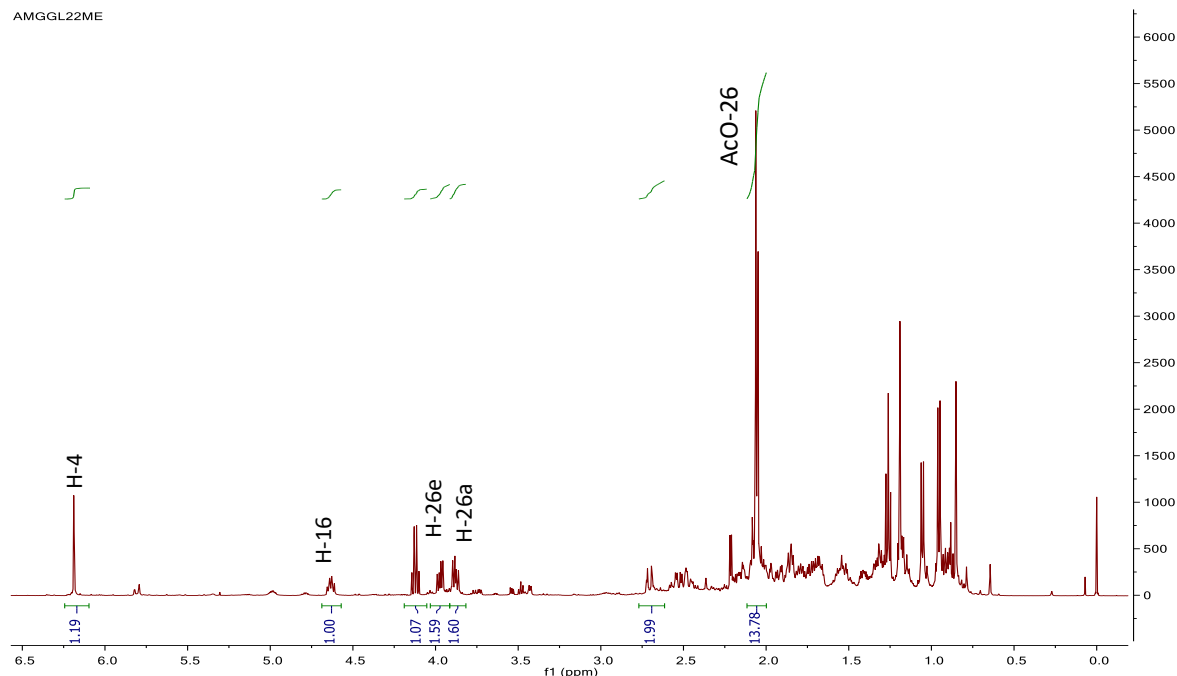


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del derivado 22-OH-colestánico **47**.

Por otro lado en el espectro de ^{13}C podemos observar poca diferencia con la materia prima en 110.5 ppm se observa una señal que podría pensarse que corresponde al espiroacetal, pero también puede corresponder al hemiacetal que se formó, así mismo indicativo de la reacción fue la aparición en 171.6 ppm correspondiente al acetato en 26, así mismo se observa en 81.1 ppm una señal que corresponde al carbono 16 a frecuencias altas característico de cuando se encuentra dentro de un ciclo, por otra parte se observa que en 201 ppm y 199 ppm se conservan los dos grupos carbonilos de los anillos A y B.

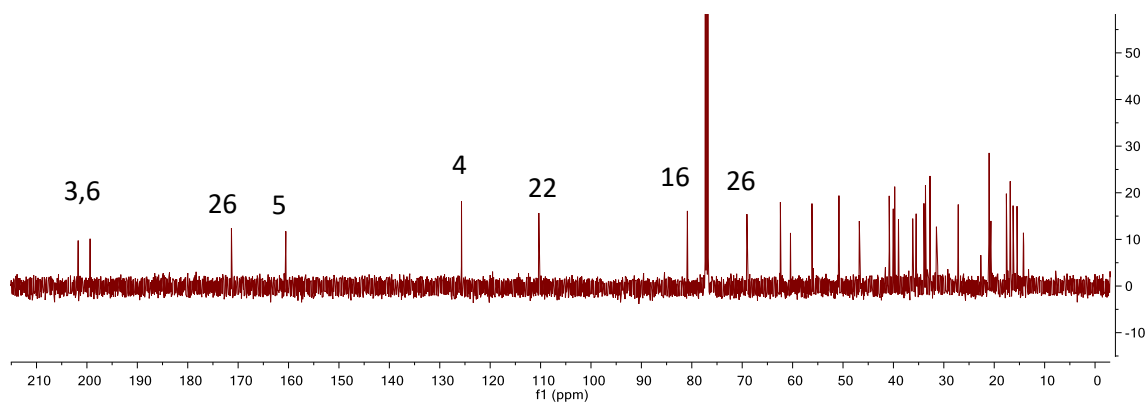


Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del derivado 22-OH-colestánico **47**.

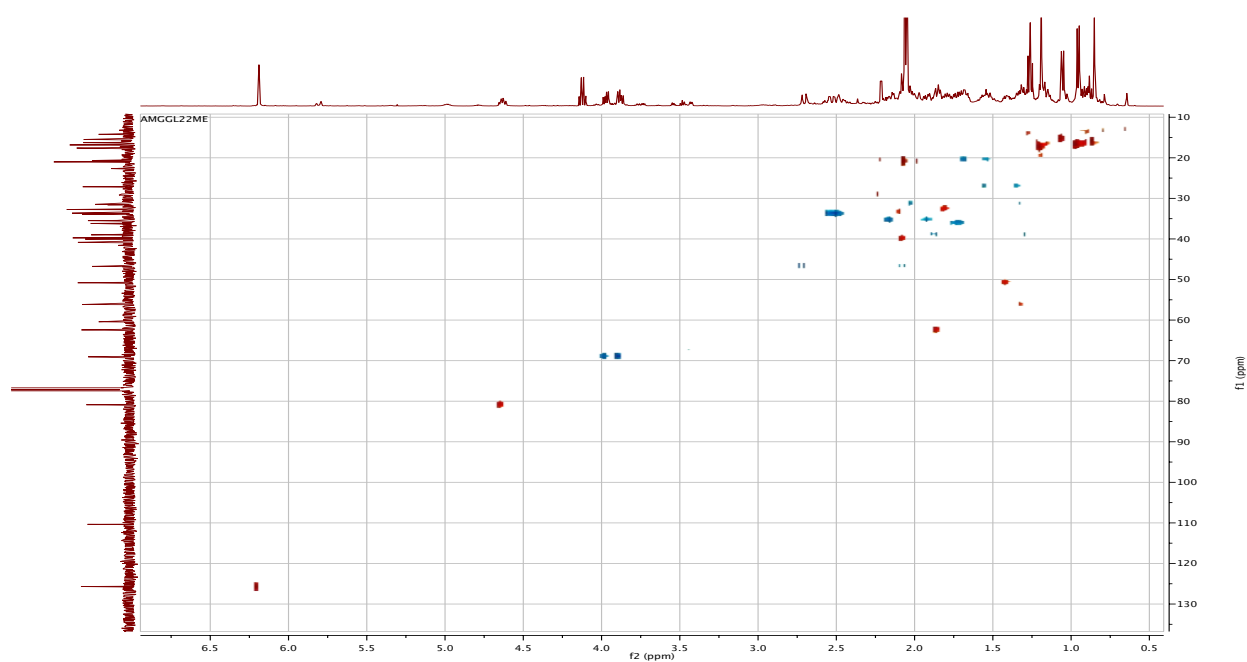


Figura 45. Espectro de RMN HSQC del derivado 22-OH-colestánico **47**.

Este compuesto en su espectro de IR muestra bandas en 1730 y 1685 cm^{-1} para las tensiones de $\text{C}=\text{O}$ de las cetonas α,β -insaturada en A/B y cadena lateral colestánica, así como del acetilo en C-16.

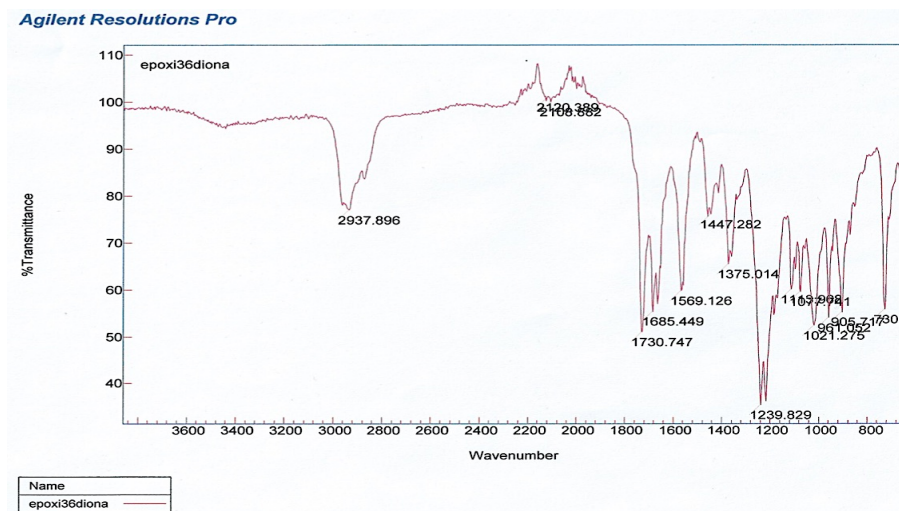


Figura 46. Espectro de IR del derivado epoxi-3,6-diona **46**.

El producto epoxicolesténico **46** tiene una estructura similar al compuesto **4a** pero con la dicetona en los anillos A y B con un sistema Δ^4 conjugado.

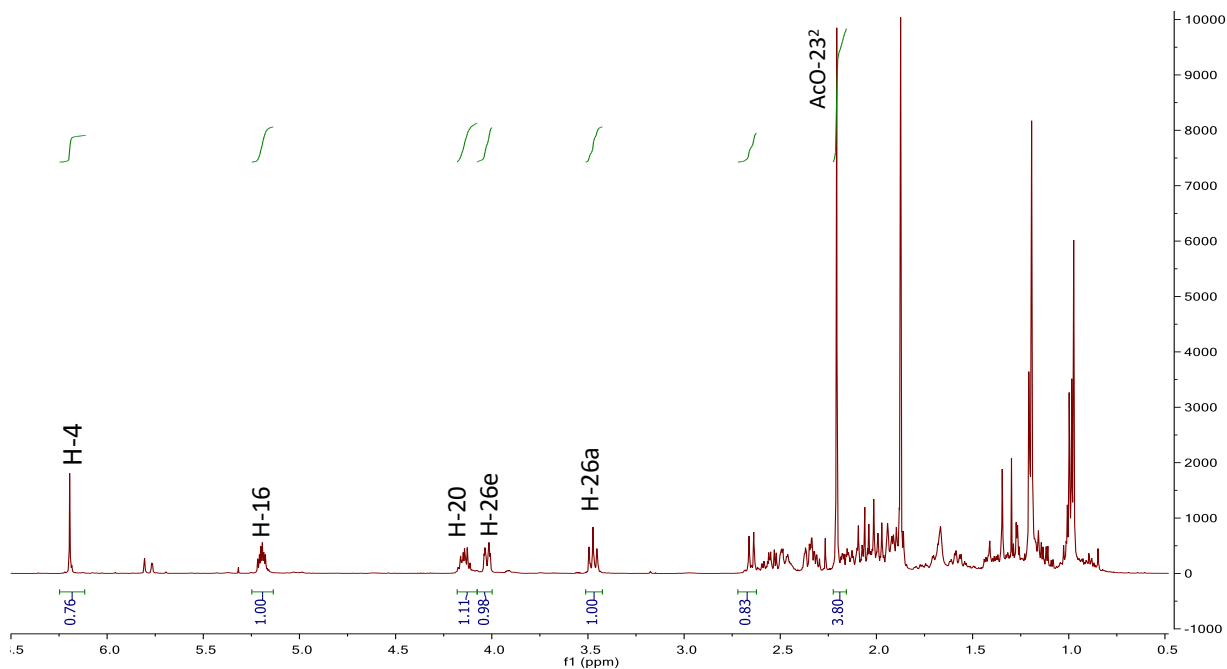


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del derivado epoxi-3,6-diona **46**.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz se observa una similitud con el compuesto **4a** con las respectivas diferencia en los anillos A y B, podemos observar la señal

en 6.2 ppm correspondiente al protón vinilo en 4, en 5.2 ppm se observa la señal múltiple del H-16, así mismo como dos señales múltiples se observan los protones diasterotópicos de 26 en 4.18 ppm y 4.0 ppm respectivamente (Figura 47). El espectro de RMN de ^{13}C muestra la señal del C-16 antes del disolvente, característico de las estructuras colestánicas, donde el anillo E está abierto (Figura 48).

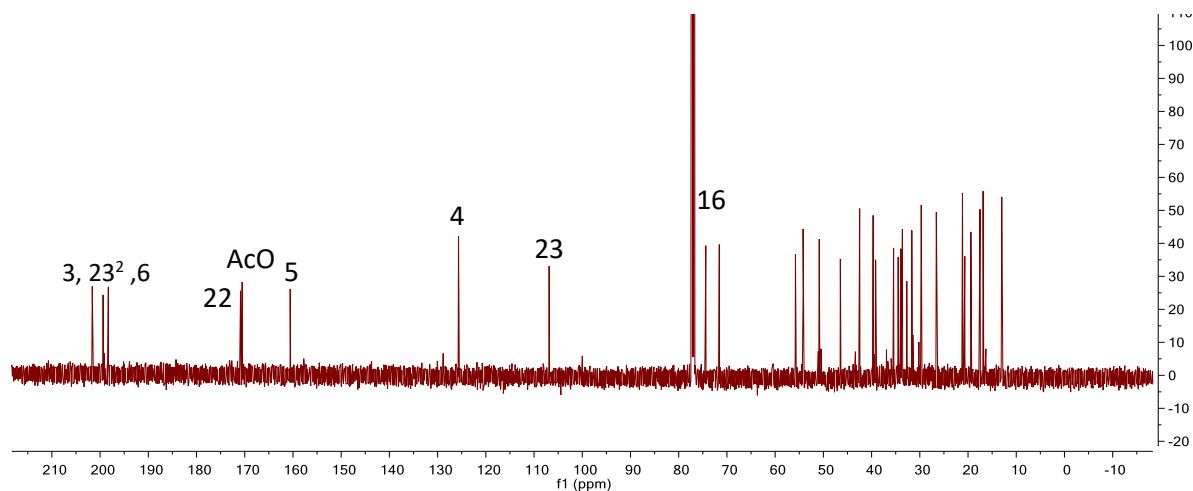


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C a 500 MHz del derivado epoxi-3,6-diona **46**.

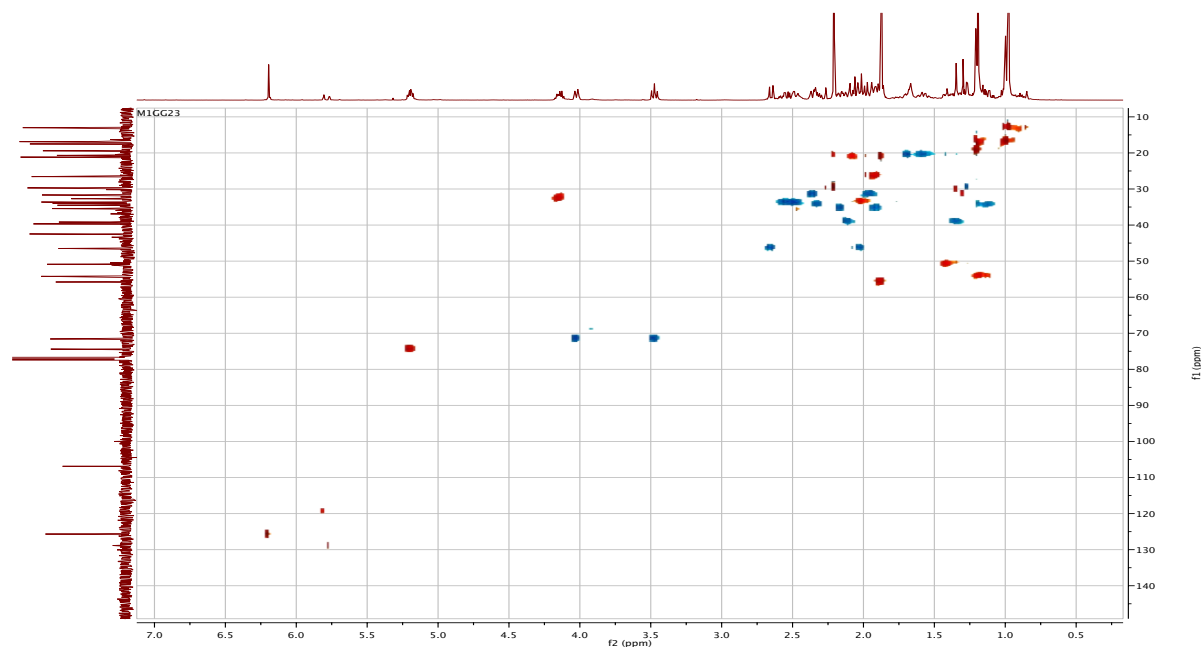
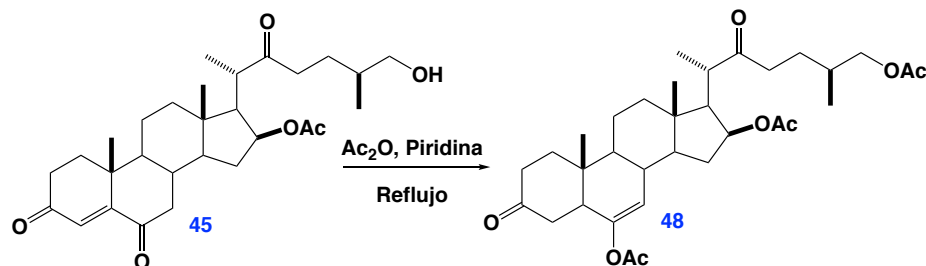


Figura 49. Espectro de RMN HSQC del derivado epoxi-3,6-diona **46**.

5.7 Protección del derivado 26-hidroxi-22-oxo-3,6-diona. Obtención de 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona.

Como estrategia para lograr la formación de la cadena 22-oxocolestánica con la posición 26 acetilada, se realizó la reacción de protección con anhídrido acético y piridina a reflujo por 1 hora. Se logró la protección del OH en C-26, sin embargo, la cetona C-6 se enólizó y acetiló generando el producto **48**.



Esquema 32. Protección del 22-oxocolestano **45**.

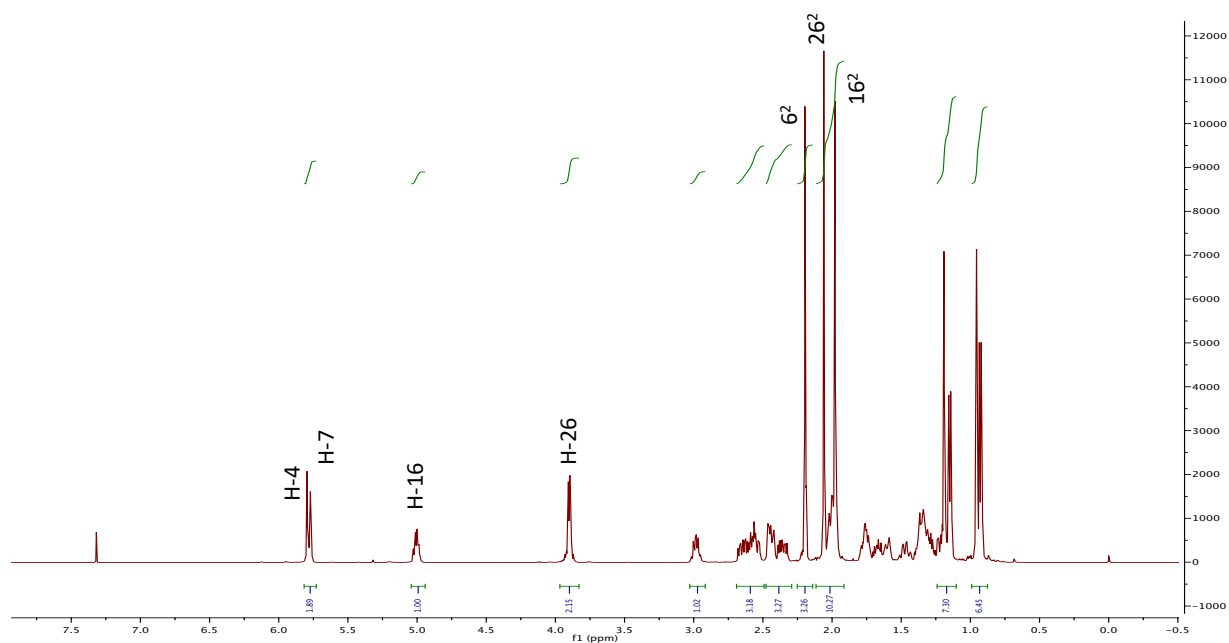


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del derivado 22-oxo-6-AcO **48**.

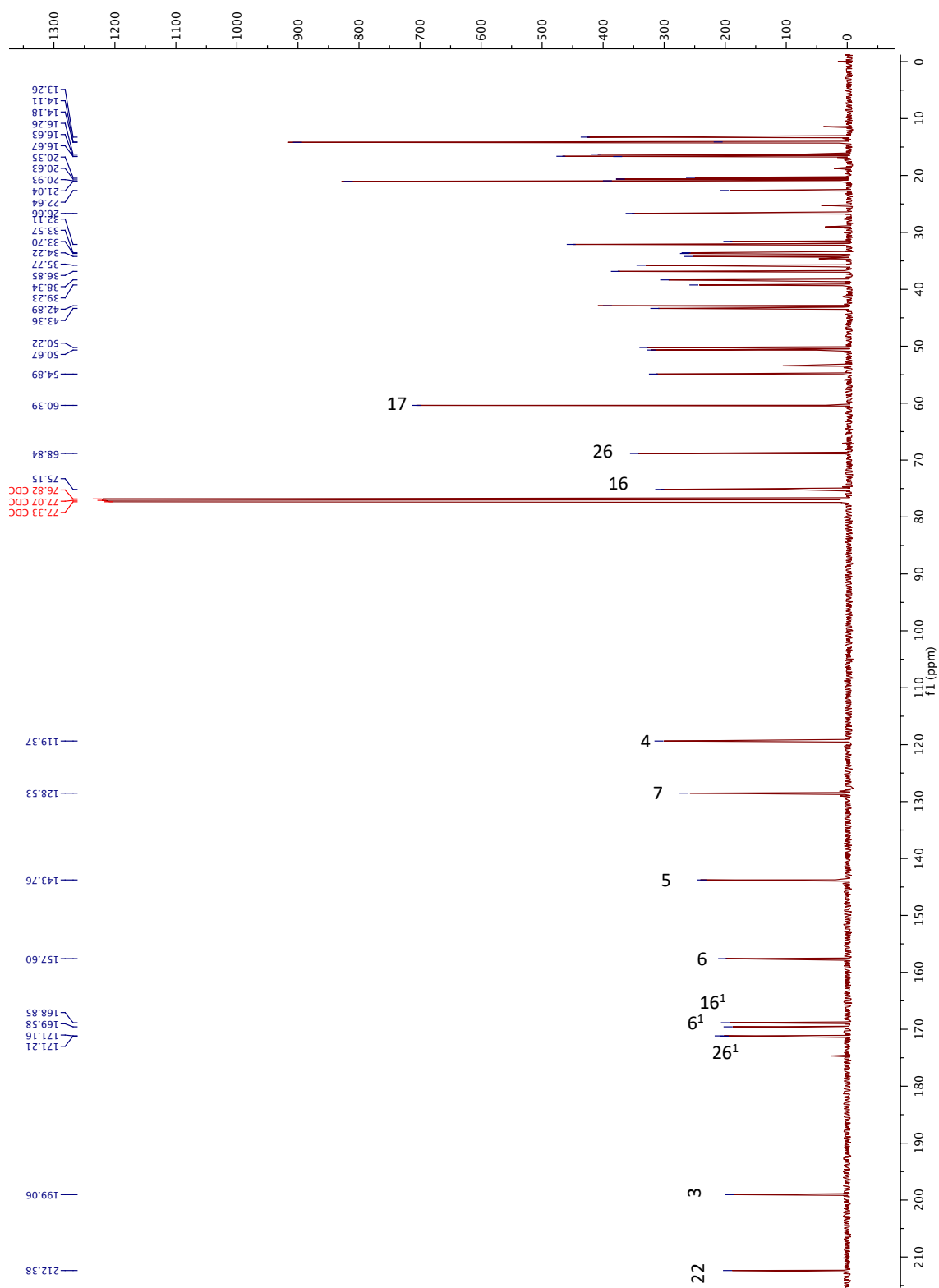


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del derivado 22-oxo-6-AcO **48**.

El espectro de RMN de ^1H del producto **48**, muestra los desplazamientos químicos de los H de su estructura según su ambiente químico, destacando el H-4 como una señal simple en la región de los vinílicos, y muy cercano se encuentra el H-7 vinílico como una señal doble al estar acoplado a H-8 y se desplaza a campos bajos debido a estar adyacente al acetilo en C-6. El H-16 y los protones diastereotópicos H-26 no cambiaron mucho sus desplazamientos (Figura 50).

El espectro de RMN de ^{13}C del producto **48**, muestra los desplazamientos químicos de los 33 átomos de C de su estructura según su ambiente químico; destaca el C-22 en 212.3 ppm, le sigue el C-3 base de la cetona. Los carbonos de los C=O de los acetatos en 6, 26 y 16 se localizan en 168 a 171 ppm. Los cuatro C vinílicos se encuentran en la región de 144 a 115 ppm, y en 75.1 ppm se encuentra el C-16 característico de la una cadena colestánica, como se aprecia en la (Figura 51).

Con el experimento HSQC se apreciaron las correlaciones C-H, con lo que se apreció claramente 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 52).

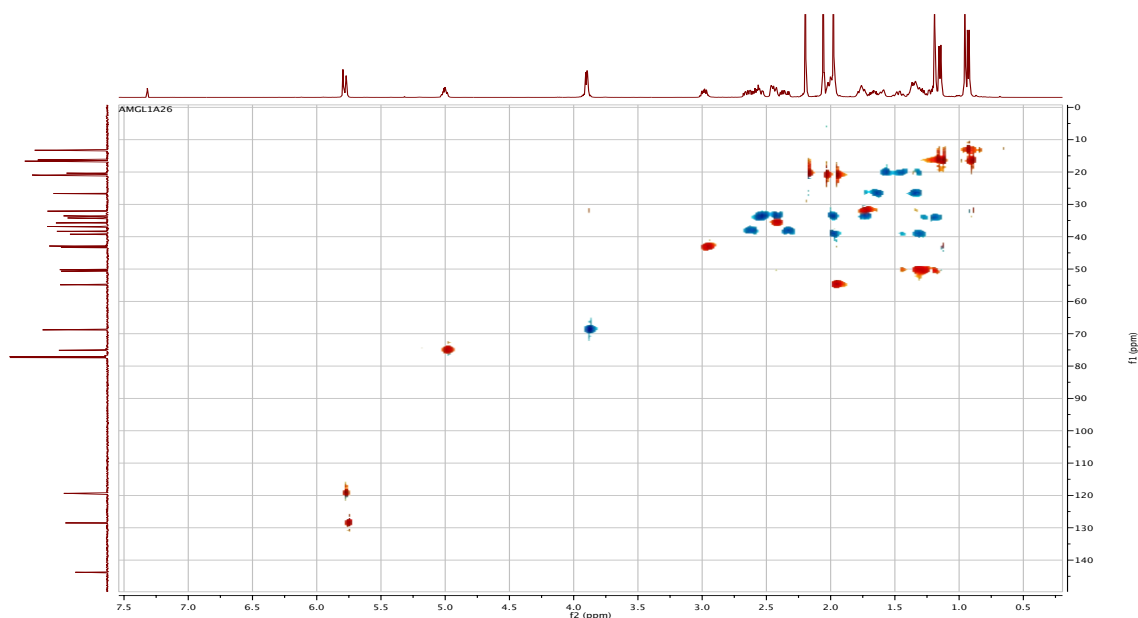
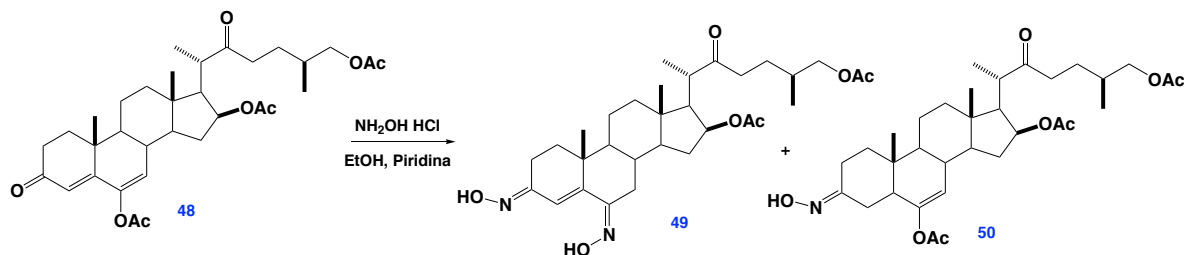


Figura 52. Espectro de RMN HSQC del derivado 22-oxo-6-AcO **48**.

5.8 Reacción de condensación para la obtención de la dioxima y oxima de la 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (49 y 50).



Esquema 33. Obtención de la 22-oxo dioxima **49** y oxima **50**.

Se hizo reaccionar al derivado 6,16,26-triacetoxi-22-oxo-4-en-3-ona (**48**) con hidroxilamina, para buscar la formación de la dioxima en posición 3 y 6. Dentro de los resultados de la reacción de condensación del compuesto **48**, se obtuvo un producto intermediario, la oxima **50**, que conserva el acetilo en C-6, lo cual confirma que la reacción inicio con la formación de la oxima en C-3, y posteriormente en C-6, ya que con las condiciones de reacción el enol se regresa a su forma cetónica y la reacción de condensación tiene lugar para conducir a la dioxima **49** que es el producto mayoritario. La caracterización de ambos productos se muestra a continuación:

El espectro de RMN de ^1H de la dioxima **49**, muestra los desplazamientos químicos de los H de su estructura, 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 $\text{C}=\text{N}$ de la posición 6 (Figura 53).

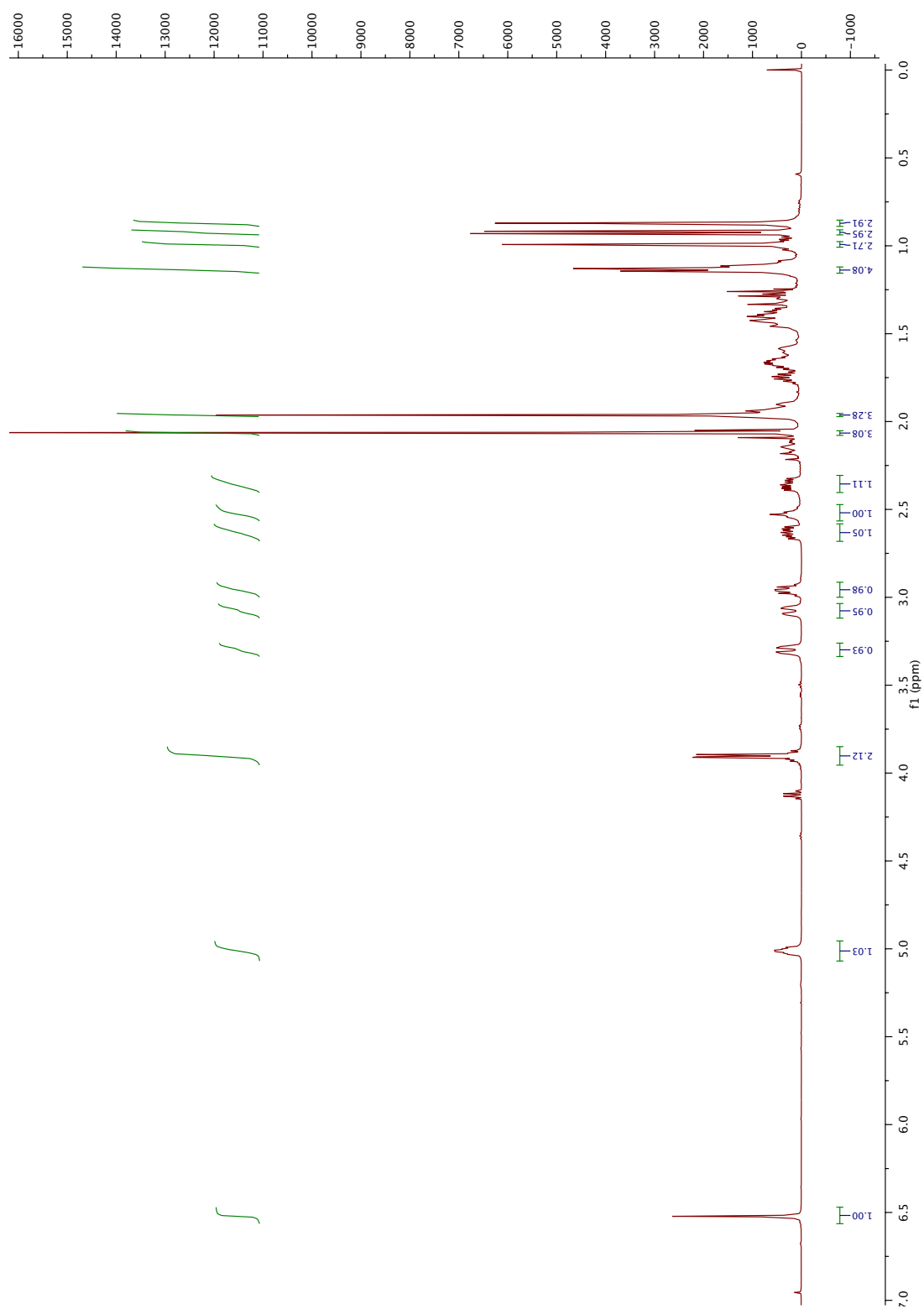


Figura 53. RMN de ^1H de la dioxima 22-oxo-3,6-diona **49**.

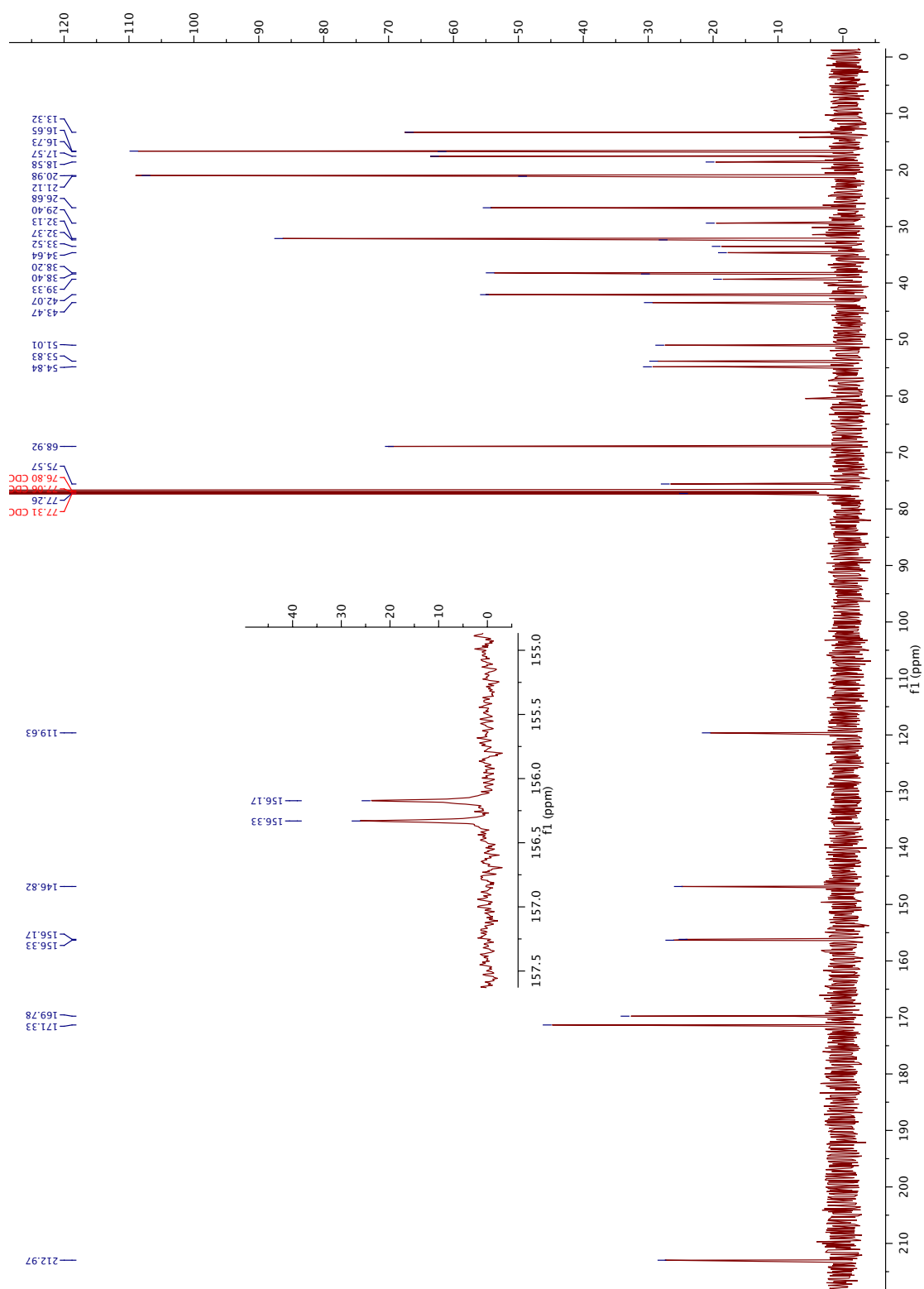


Figura 54. RMN de ^{13}C de la dioxima 22-oxo-3,6-diona **49**.

La Figura 54 corresponde al espectro de RMN de ^{13}C del producto dhidroximínico **122**, en éste se muestran los desplazamientos químicos de los 31 átomos de C según su ambiente químico; destaca el C-22 en 212.3 ppm. Los carbonos de los C=O de los acetatos en 26 y 16 se localizan en 168 a 171 ppm. El C-5 y C-4 vinílicos se encuentran en la región de 144 a 115 ppm, y en 75.3 ppm se encuentra el C-16 característico de un C unido a oxígeno.

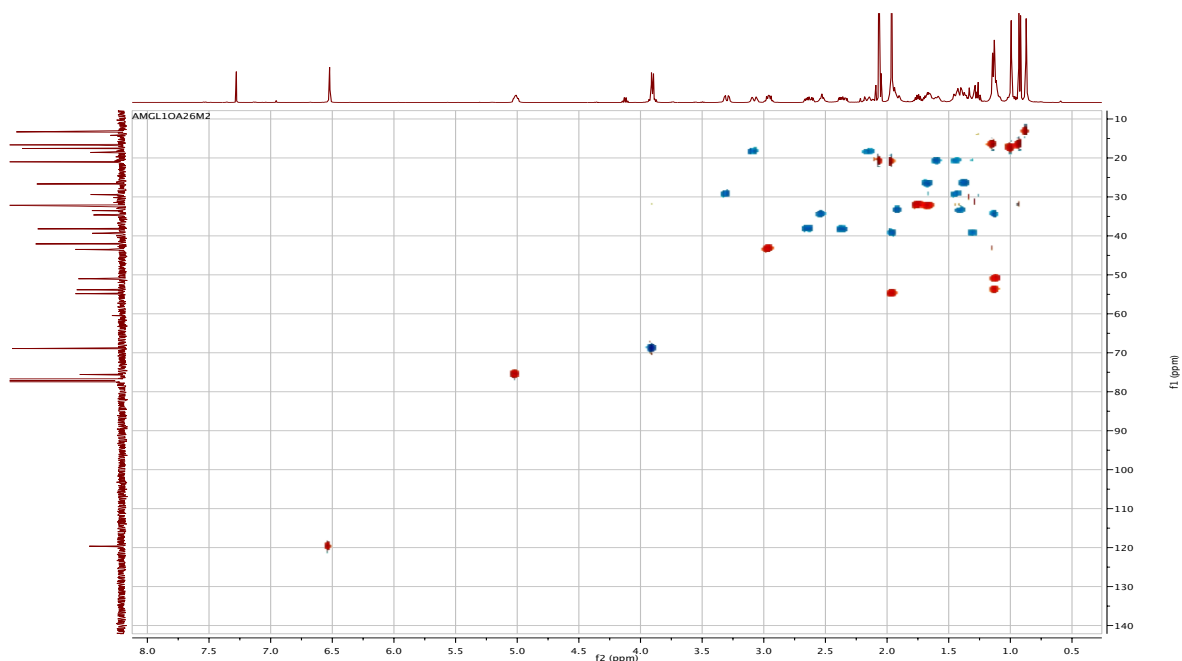


Figura 55. Espectro HSQC de la dioxima 22-oxo-3,6-diona **49**.

Con el experimento HSQC se apreciaron las correlaciones C-H, con lo que se apreció claramente que la señal en 6.1 ppm en la región de los vinílicos, al ser una señal simple fue asignada a H-4; la señal en 5.0 ppm que pertenece a un metino del C-16; para el caso de H-7 la señal correlacionó con C-7 (Figura 55).

En el espectro de IR de la oxima **123**, se observan las bandas en 1734 cm^{-1} y una en 1236 cm^{-1} para el acetato en 16 y 26. En 1529 cm^{-1} se observa la banda de tensión del C-N (Figura 56).

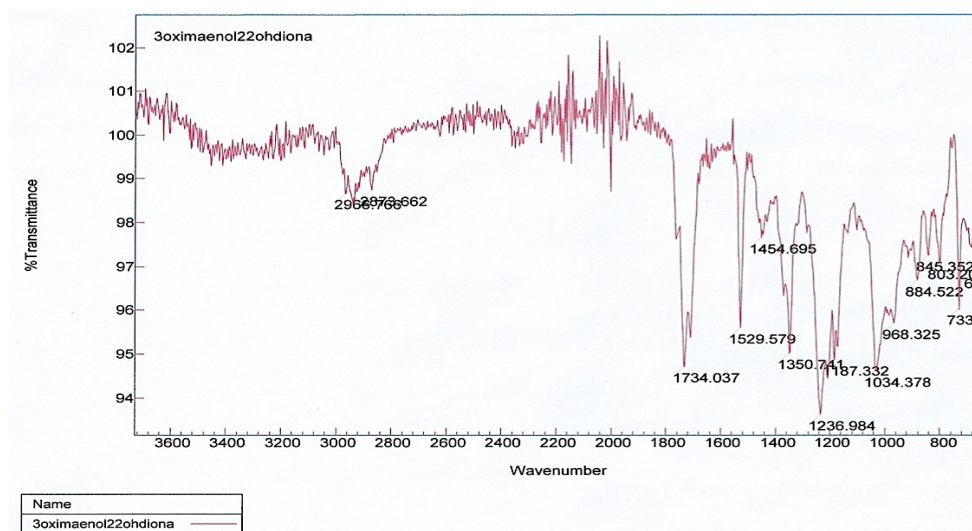


Figura 56. Espectro de IR del derivado oxima **50**.

El espectro de RMN de ^1H del producto **50**, muestra los desplazamientos químicos de los H de la estructura según su ambiente químico, destacando el H-4 como una señal simple en la región de los vinílicos, y muy cercano se encuentra el H-7 vinílico como una señal doble al estar acoplado a H-8 -como en la materia prima- y se desplaza a campos bajos al estar adyacente al acetilo en C-6. El H-16 y los protones diastereotópicos H-26 no modificaron mucho sus desplazamientos (Figura 57).

El espectro de RMN de ^{13}C del producto **50**, muestra los desplazamientos químicos de los 33 átomos de C de esta estructura según su ambiente químico; destaca el C-22 en 212.2 ppm, y el C-3 base de la cetona ahora es un C=N en 156 pmm. Los carbonos de los C=O de los acetatos en 6, 26 y 16 se localizan en 169 a 171 ppm. Los cuatro C vinílicos se encuentran en la región de 144 a 115 ppm, y en 75.3 ppm se encuentra el C-16 característico de la una cadena 22-oxocolestánica (Figura 58).

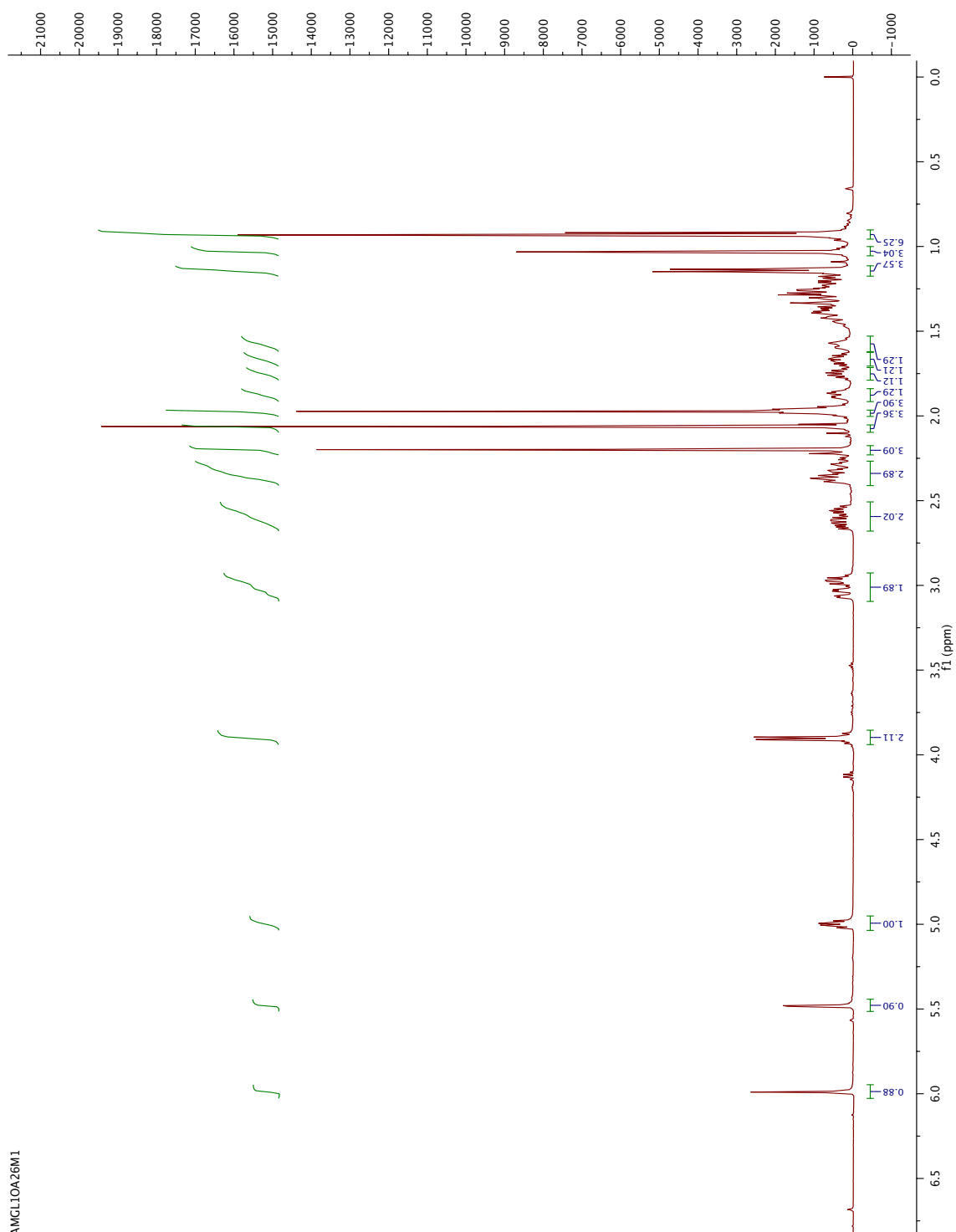


Figura 57. Espectro de RMN de ^1H del derivado oxima **50**.

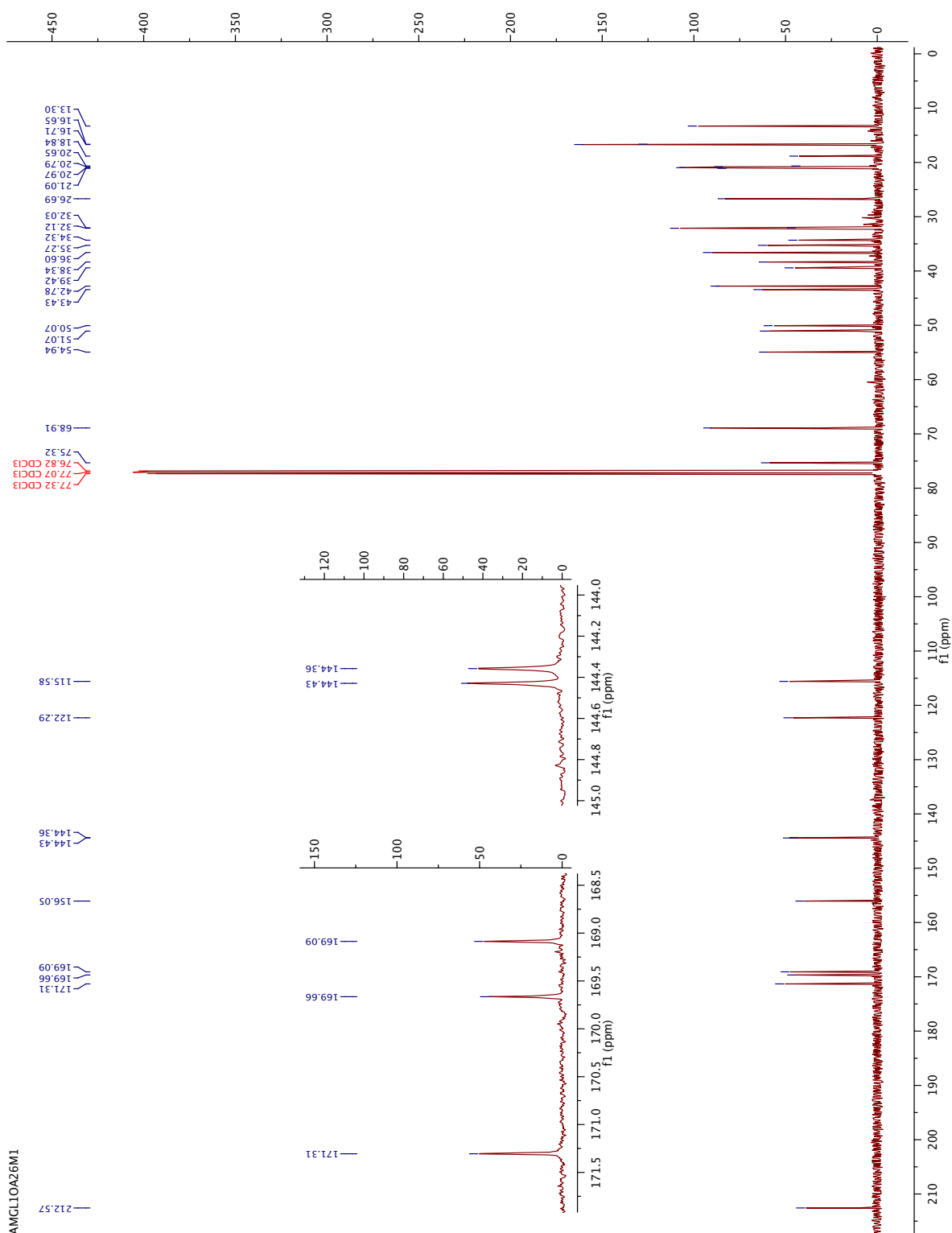


Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado oxima **50**.

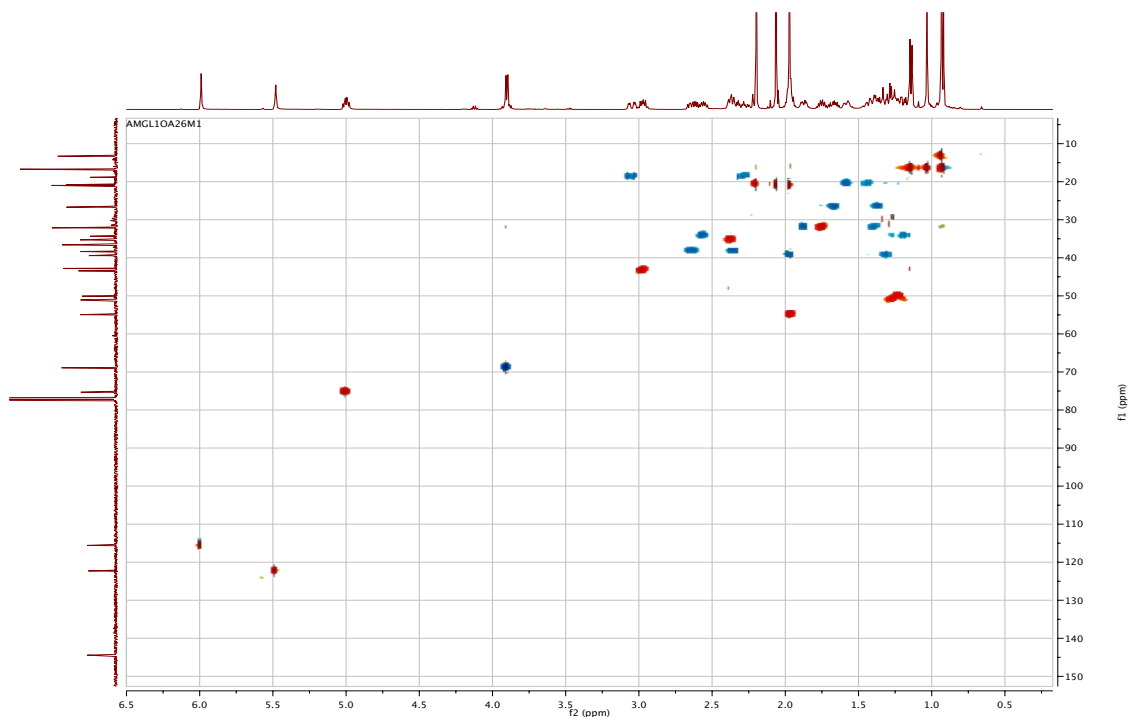


Figura 59. Espectro de RMN HSQC del derivado oxima **50**.

Con el experimento HSQC se apreciaron las correlaciones C-H, con lo que se apreció claramente que 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 metino 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 59). Por otra parte, en el experimento HMBC se observó claramente la correlación entre los protones H-4 y C-3, C-5 y C-6, así como también la correlación entre el protón C-8 y C-7.

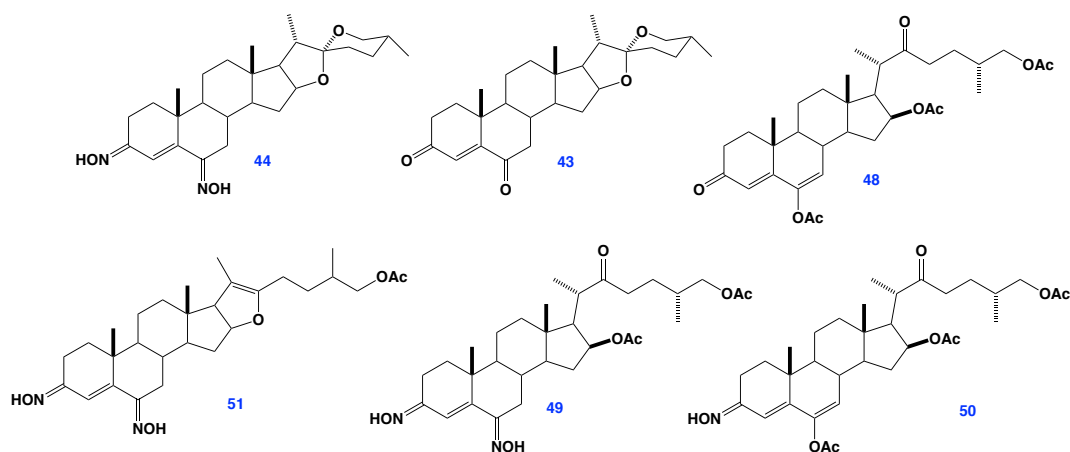
Por lo que se puede concluir, es que la cetona en C-22 tampoco reaccionó en esta ocasión, a pesar de tener los equivalentes necesarios para la reacción de condensación con las tres cetonas. La reacción fue regioselectiva, dificultándose la condensación en la posición 22 posiblemente debido al libre giro de la cadena lateral y el impedimento estérico del metilo 21.

5.9 Análisis de la actividad biológica *in silico* a través de métodos quimiinformáticos.

La disponibilidad de los datos farmacodinámicos, farmacocinéticos y toxicológicos, permiten mejorar sistemáticamente las propiedades de las moléculas en etapas tempranas del descubrimiento de moléculas bioactivas, para que estas tengan más probabilidad de éxito. Debido a lo anterior se han implementado el uso de los métodos computacionales *in silico*, como parte de un enfoque multidisciplinario para acelerar el descubrimiento de moléculas bioactivas y reducir los costos, la integración de estas herramientas pretende seleccionar candidatos para su evaluación experimental. En esta parte de la tesis se realiza un análisis de consenso farmacológico que combina los resultados *in silico*, calculados por diferentes programas quimiinformáticos y comprende: predicciones del perfil farmacodinámico, predicciones del perfil farmacocinético y predicciones del perfil toxicológico.

5.9.1 Análisis *in silico*.

Se construyeron las estructuras de las 6 moléculas en el programa Chems sketch, sin embargo, dicho servidor no fue útil para obtener toda la información requerida por lo cual las moléculas se construyeron nuevamente en el servidor Molinspiration y en este mismo programa se obtuvo la especificación de introducción lineal molecular simplificada o SMILES por sus siglas en inglés, la cual es una manera de representar la estructura química usando cadenas de caracteres alfanuméricos de tipo ASCII.



Esquema 34. Estructuras construidas en Chems sketch.

Además, en este programa se obtuvieron también las características de las moléculas para que a partir de la regla de los 5 de Lipinski saber si son adecuadas para usarse como fármacos y predecir su actividad biológica. La regla de los 5 Lipinski nos dice que para que una molécula sea susceptible a ser usada como fármaco debe de poseer:

1. Un coeficiente de partición ($\log P$) ≤ 5
2. Peso molecular (PM) ≤ 500 g/mol
3. Número de aceptores de enlaces de hidrógeno (nON) ≤ 10
4. Número de donantes de enlaces de hidrógeno (nOHNH) ≤ 5

Estos valores son muy importantes porque con ellos podemos establecer cuáles son las moléculas más hidrofóbicas y esto es relevante ya que esta propiedad afecta la absorción del fármaco, la biodisponibilidad, las interacciones hidrofóbicas fármaco-receptor, el metabolismo de las moléculas, así como su toxicidad.³⁹

Posteriormente, se introdujeron los SMILES de cada molécula en el programa Pass Online el cual nos arrojó la predicción de la posible actividad e inactividad biológica con los valores de probabilidad, donde P_a representa la probabilidad de que el compuesto presente la actividad y P_i que no presente la actividad, es importante que el valor de P_i no sea mayor o muy cercano al valor P_a ya que eso significaría que la probabilidad de que tenga la actividad es menor o muy cercana a la probabilidad de que no la tenga. Así como predecir los posibles efectos adversos y tóxicos de las moléculas estudiadas.

5.9.2 RESULTADOS

Molécula 43: Para esta molécula se obtuvo un coeficiente de partición de 4.64, un peso molecular de 426.60 g/mol, un número de aceptores de enlaces de hidrógeno de 4 y número de donantes de enlaces de hidrógeno de 0, el predictor de actividad nos arrojó que la molécula tiene una P_a de 0.888 de ser antineoplásico mientras que el P_i para la misma actividad es de 0.005. (Figura 60)

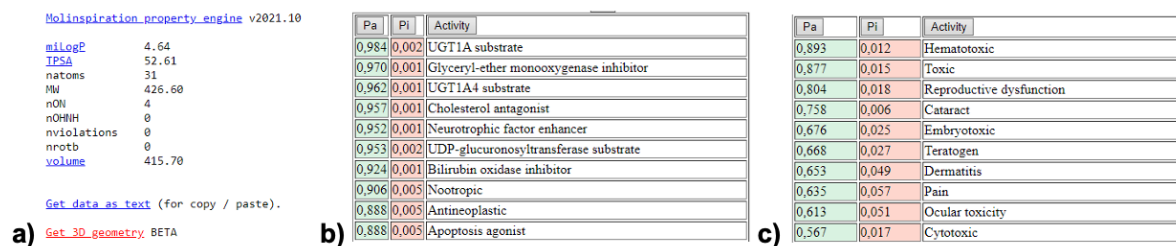


Figura 60. a) Cálculo de las propiedades moleculares y la puntuación de la bioactividad en Molinspiration. b) Actividades biológicas con sus valores de probabilidad en PASS online. c) Posibles efectos adversos y tóxicos con sus valores de probabilidad en PASS online.

Molécula 48: Para esta molécula se obtuvo un coeficiente de partición de 6.36, un peso molecular de 526.75 g/mol, un número de aceptores de enlaces de hidrógeno de 6 y número de donantes de enlaces de hidrógeno de 0, el predictor de actividad nos arrojó que la molécula tiene una Pa de 0.877 de ser antineoplásico mientras que el Pi para la misma actividad es de 0.005.(Figura 61)

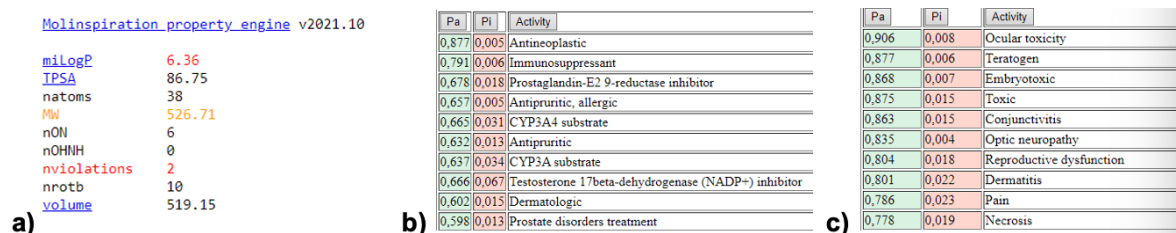


Figura 61. a) Cálculo de las propiedades moleculares y la puntuación de la bioactividad en Molinspiration. b) Actividades biológicas con sus valores de probabilidad en PASS online. c) Posibles efectos adversos y tóxicos con sus valores de probabilidad en PASS online.

Molécula 50: Para esta molécula se obtuvo un coeficiente de partición de 6.12, un peso molecular de 585.74 g/mol, un número de aceptores de enlaces de hidrógeno de 9 y número de donantes de enlaces de hidrógeno de 1, el predictor de actividad nos arrojó que la molécula tiene una Pa de 0.833 de ser antineoplásico mientras que el Pi para la misma actividad es de 0.008.

Molécula 49: Para esta molécula se obtuvo un coeficiente de partición de 5.12, un peso molecular de 558.52 g/mol, un número de aceptores de enlaces de hidrógeno de 9 y número de donantes de enlaces de hidrógeno de 2, el predictor de actividad nos arrojó que la molécula tiene una Pa 0.818 de ser antineoplásico mientras que el Pi para la misma actividad es de 0.010.

Molécula 44: Para esta molécula se obtuvo un coeficiente de partición de 5.54, un peso molecular de 456.63 g/mol, un número de aceptores de enlaces de hidrógeno de 6 y número de donantes de enlaces de hidrógeno de 2, el predictor de actividad nos arrojó que la molécula tiene una Pa de 0.845 de ser antineoplásico mientras que el Pi para la misma actividad es de 0.007. (Figura 62)

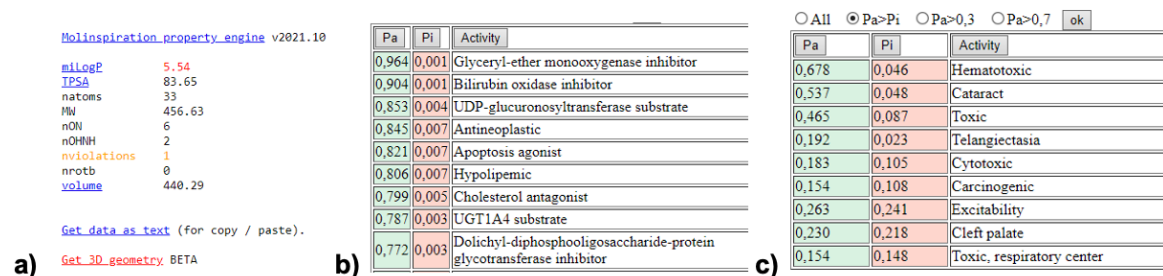


Figura 62. a) Cálculo de las propiedades moleculares y la puntuación de la bioactividad en Molinspiration. b) Actividades biológicas con sus valores de probabilidad en PASS online. c) Posibles efectos adversos y tóxicos con sus valores de probabilidad en PASS online.

Molécula 51: Para esta molécula se obtuvo un coeficiente de partición de 5.86, un peso molecular de 470.61g/mol, un número de aceptores de enlaces de hidrógeno de 7 y número de donantes de enlaces de hidrógeno de 2, el predictor de actividad nos arrojó que la molécula tiene una Pa de 0.468 de ser antineoplásico mientras que el Pi para la misma actividad es de 0.081.(Figura 63)

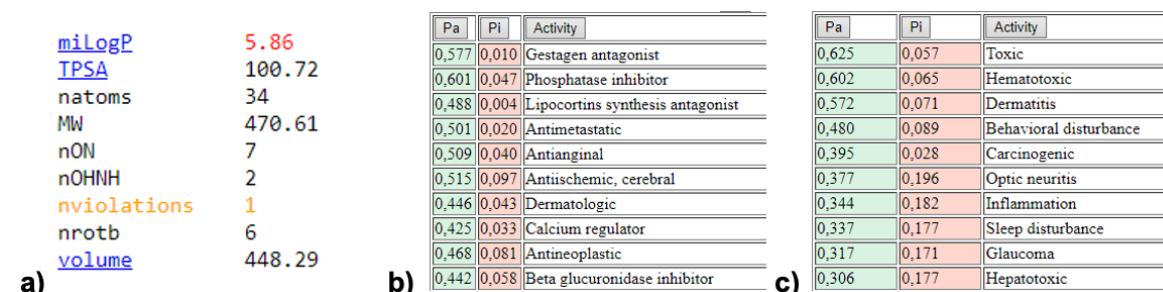


Figura 63. a) Cálculo de las propiedades moleculares y la puntuación de la bioactividad en Molinspiration. b) Actividades biológicas con sus valores de probabilidad en PASS online. c) Posibles efectos adversos y tóxicos con sus valores de probabilidad en PASS online.

De las 4 moléculas estudiadas, las moléculas 43, 44 y 51 cumplieron con al menos 3 de los 4 criterios de las reglas de Lipinski, por lo que se puede inferir que estas moléculas no tendrán problemas de solubilidad al momento de diseñar un fármaco que sea

administrado por la vía oral; en el caso de la molécula 48, esta solo cumple con 2 de los 4 criterios, pero al ser un esteroide se le permite sobrepasar un peso mayor a 500 g/mol sin afectar sus propiedades, porque las membranas biológicas de las células reconocen a los esteroides y los dejan pasar al medio intracelular, entonces de manera teórica todas las moléculas cumplen con el mínimo de los criterios de Lipinski.

Las oximas esteroidales estudiadas presentan resultados prometedores in silico, que se explican a continuación.

Las 4 moléculas estudiadas presentan una actividad antineoplásica, por lo que podrían tener potencial en el desarrollo de nuevos fármacos para tratar el cáncer o como tratamiento adyuvante para las terapéuticas de las que se dispone en la actualidad; además, esa actividad antineoplásica podría ser exacerbada por algunas de las otras similitudes farmacológicas que presentaron estas moléculas. Podría tener un efecto sinérgico junto con las moléculas 43 y 44 que también presentaron actividad como agonistas de la apoptosis, proceso que es vital en la patogénesis molecular del cáncer. Además, la molécula 6 presentó actividad similar a algunos Antimetastásicos, lo cual podría ser muy favorable, ya que las metástasis son la causa de más del 90% de las muertes en los pacientes con cáncer, por lo que esta molécula nos podría ayudar a detener, revertir e incluso prevenir el desarrollo de metástasis¹.

La molécula 44 presenta actividad como Hipolipemiente, por lo que podrían ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares o eventos cerebrovasculares al servir como primera línea terapéutica de las dislipidemias; se pueden buscar reducciones del perfil lipídico en monoterapia o usar a estas moléculas en el desarrollo de auxiliares de las terapéuticas existentes. Además, los efectos adversos que se han reportado para este tipo de medicamentos de manera general representan menos de un 3%, por lo que se podría valorar si esta molécula tiene un comportamiento similar². Esta molécula también actúa como Inhibidor de dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase, la cual pertenece a un complejo proteico que participa en la glicosilación de las proteínas a su paso por el retículo endoplásmico³, por lo que se puede estudiar su mecanismo molecular para determinar si se puede hacer selectiva y específica para determinadas dianas proteicas.

La molécula 43 presenta actividad como potenciador de factores neurotróficos o neurotrofinas, razón por la cual dichas moléculas pueden tener un papel importante en la

supervivencia, proliferación y maduración de ciertas neuronas, teniendo utilidad clínica en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington. Además, algunos estudios han demostrado que los factores neurotróficos pueden promover la regeneración de ciertos tejidos fuera del sistema nervioso central, por lo que también podríamos estudiar a estas moléculas como posibles candidatas terapéuticas en la regeneración de tejidos⁴. Esta molécula además presenta actividad similar a los Nootrópicos, los cuales, a pesar de estar aprobados para algunas enfermedades como el TDAH o la narcolepsia, se ha extendido su uso en individuos sanos con la finalidad de mejorar su rendimiento, razón que los ha hecho objeto de múltiples discusiones⁵. Es por ello que esta podría ser una ventana de oportunidad para dilucidar los mecanismos moleculares de estos fármacos en la potenciación de las habilidades cognitivas.

La molécula 48 presenta actividad como Inmunosupresor, por lo que se podría estudiar su efecto en el tratamiento de enfermedades reumatológicas o en la prevención del rechazo de órganos en los trasplantes; o incluso podríamos estudiar sus efectos en contextos más actuales como la Covid-19, en donde podrían tener un efecto muy benéfico en las fases avanzadas y graves de esta nosología al evitar una respuesta inmunitaria excesiva (tormenta de citocinas) que cause SDRA, insuficiencia multiorgánica o incluso la muerte⁶. Por otro lado, al tener actividad Antiprurítica, esta molécula también podría ser útil como complemento de las terapias antipruriginosas disponibles, especialmente en terapias sistémicas en donde podría ayudar a tratar el prurito severo y generalizado⁷.

La molécula 51 presentó actividad similar a los Antianginosos y Antiisquémicos, lo cual sería de utilidad en el tratamiento óptimo de la cardiopatía isquémica estable, ya que este se basa en la prevención de la angina y la isquemia para así poder aumentar la calidad y cantidad de vida de estos pacientes⁸.

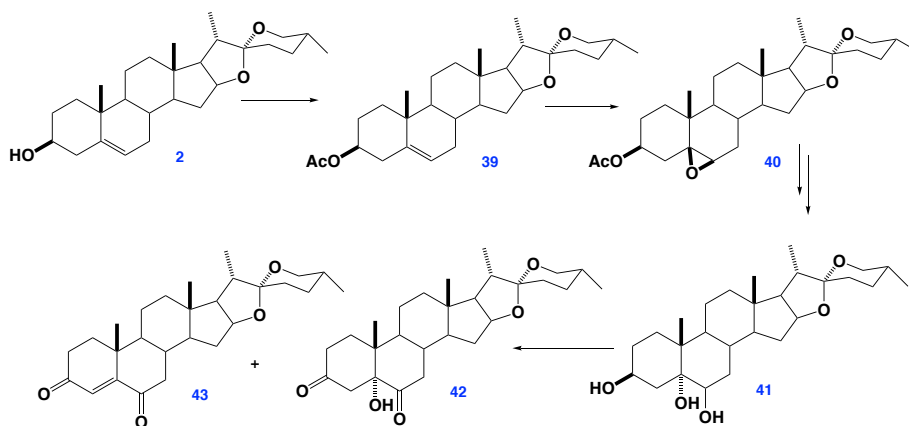
Hubo algunas moléculas, como la 48 y 51 que presentaron algunas actividades que considero inespecíficas, las cuales fueron reportadas con actividad similar a tratamientos para enfermedades dermatológicas, tratamiento de trastornos de la próstata, inhibidor de fosfatasa, antagonistas de la síntesis de lipocortinas o regulador del calcio, pero realmente algunos de estos conceptos abarcan a numerosas enfermedades o a diferentes proteínas con múltiples funciones, por lo que al no ser específicas, a menos que se estudien las vías moleculares que participan en la actividad de estas moléculas, no se puede definir con certeza la utilidad clínica específica de estas.

Algunas moléculas en las que considero se deberían profundizar en sus mecanismos moleculares, son la molécula 51 ya que esta actúa como inhibidor de la beta glucuronidasa, la cual es una enzima encargada de la degradación de uno de los productos intermediarios del metabolismo lisosomal, y la falla de esta enzima origina a la mucopolisacaridosis VII o Síndrome de Sly, por lo que si esta molécula actúa como inhibidor de esta enzima, existe un potencial riesgo de desarrollar dicho síndrome⁹. Por otro lado, la molécula 48 actúa como inhibidor de la testosterone 17 beta dehydrogenase, la cual es una enzima que cataliza la producción de esteroides anabólicos bioactivos, al convertir dehidroepiandrosterona (DHEA) en testosterona, y cuya deficiencia causa en hombres un trastorno autosómico recesivo 46XY, por lo que debe ser algo a considerar si la molécula se usa en el desarrollo de fármacos especialmente durante el embarazo^{10,11}.

Según los resultados obtenidos, las oximas esteroidales estudiadas presentan resultados prometedores en la actividad antitumoral *in silico*, desde una actividad biológica antineoplásica de manera general, pero también de manera específica en el cáncer de pulmón en la molécula 3, actividad antimetastásica que al ser esta una característica dominante de los cánceres sólidos pudiera ser relevante para el diseño de terapias traslacionales en estos tumores por ser un Hallmark del cáncer como lo definieron Weinberg y Hanahan,⁴⁰ otra actividad que presentaron las moléculas fue la de agonista de la apoptosis, mecanismo que se ve alterado en el cáncer, favoreciendo así la progresión tumoral y la resistencia a las terapias antitumorales, por lo que estas moléculas podrían ser útiles en el desarrollo de nuevos fármacos proapoptóticos.⁴¹

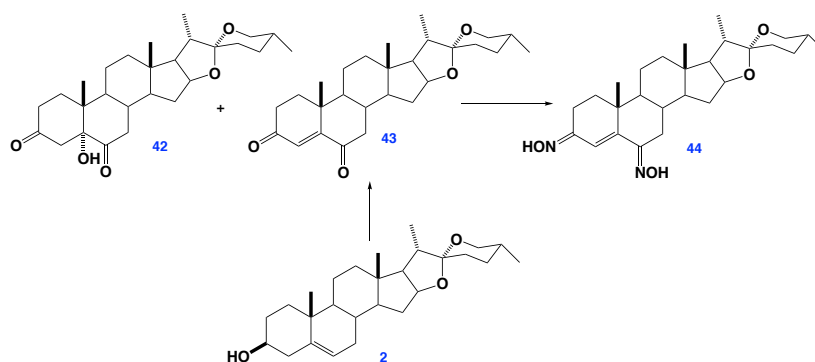
6. CONCLUSIONES.

La ruta de síntesis condujo a la modificación de los anillos A/B de diosgenina, para lo cual se oxidó el doble enlace Δ^5 resultando en la obtención del derivado β -epóxido **40** de manera estereoselectiva. Este derivado **40** se hidrolizó en medio ácido con la desprotección del alcohol de C-3 y la apertura del epóxido, obteniendo el triol **41**, mismo que fue oxidado para conducir a las dicetonas **42** y **43** en rendimientos cuantitativos (Esquema 35).



Esquema 35. Obtención de **40**, **41**, **42**, y **43**.

La obtención de las nuevas oximas de los derivados cetónicos se concibió con la idea de evaluar su actividad biológica como anticancerígenos. El derivado dicetónico espiroestánico **43** fue tratado con hidroxilamina para la obtención de nuevos derivados hidroximínicos (Esquema 36).

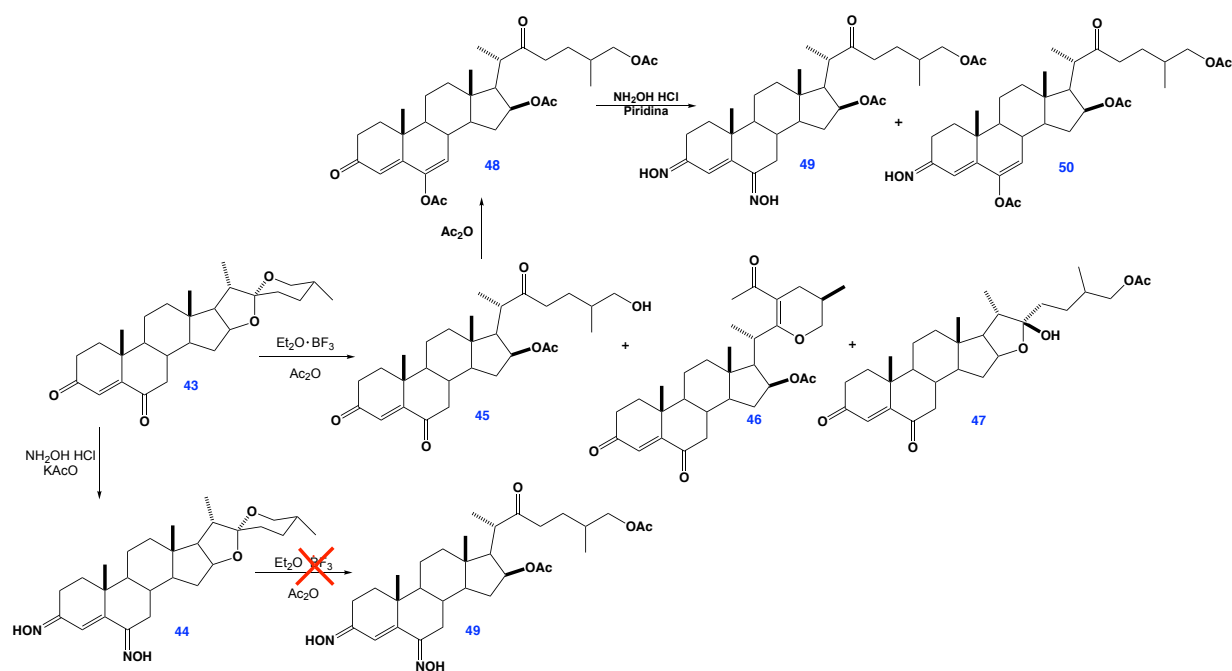


Esquema 36. Obtención de nuevos derivados hidroximínicos.

Los resultados de esta reacción dieron la pauta para la elucidación del mecanismo y además optimizar la obtención de la dioxima **44**, por lo que se propuso una metodología

alterna para conducir al intermediario dicetona con un Δ^4 **43**, generando una ruta de síntesis más corta, accesible y de mayor rendimiento global.

El compuesto dicetónico **43**, fue modificado en condiciones ácidas para lograr la apertura selectiva del espirocetal para conducir a los derivados **45-47** con cadena 22-oxocolestánica (Esquema 37).



Esquema 37. Obtención de **45**, **46**, y **47**.

Con el derivado 22-oxocolestánico **48** se efectuó su condensación con hidroxilamina en medio básico, lo cual condujo al selectivamente al nuevo derivado 22-oxo-3,6-dihidroiminico **49**, con posible actividad antiproliferativa. Los intentos efectuados para abrir el grupo espirocetálico de la dioxima **44** bajo las mismas condiciones aplicadas a **48**, solo condujo a la acetilación de los grupos hidroxilo de la dioxima **44**.

Con el derivado 22-oxocolestánico **45** se efectuó la protección del OH en C-26, conduciendo a la obtención del enol acetilado en C-6 **48**, que fue tratado con hidroxilamina para obtener la dioxima **49** y la oxima **50**.

Con base en los resultados obtenidos por el análisis *in silico*, todas las moléculas presentan posible actividad antineoplásica con Pa bastante cercanos a 1 y Pi muy bajos a excepción de la molécula 51 cuyo Pa es muy bajo, sin embargo, no todas las moléculas cumplen con la regla de los 5 de Lipinski ya que las moléculas **48**, **50**, **49**, **44** y **51** tienen un

coeficiente de partición mayor a 5 y las moléculas 48, 50 y 49 tienen un peso molecular mayor a 500 g/mol, por lo cual únicamente la molécula 43 es la que cumple con todos los lineamientos de las 5 de Lipinski pero esta regla nos dice que se puede suministrar la molécula como fármaco si se cumplen con al menos tres de las condiciones antes descritas, entonces las moléculas 44 y 51 también tienen potencial farmacológico ya que únicamente incumplen uno de los requisitos.

7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Klyne, W.; Química de los Esteroides 1a. Ed., CECSA, **1970**.
- ² Griffin, R. W. *Química orgánica moderna*. Nueva York : McGraw-Hill, **1981**, 494.
- ³ Dewick, P. M. *John Wiley & Sons. Medicinal Natural Products*. **1997**, 1.
- ⁴ Agrawal, P. K.; Jain, D. C.; Gupta, R. K.; Thakur, R. S. *Phytochemistry* **1985**, 24, 11, 2479.
- ⁵ a) Marker, R.E.; Rohrmann, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 588. b) Marker, R. E.; Rohrmann, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 846. c) Marker, R. E.; Rohrmann, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 3592.
- ⁶ a) Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J. C.; Rodríguez-Acosta, M.; Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M. A.; *Steroids*, **2015**, 98, 126. b) Hilario-Martínez, J. C.; Zeferino-Díaz, R.; Muñoz-Hernández, R.; Hernández-Linares M. G.; Cabellos, J. L.; Merino, G.; Sandoval-Ramírez, J.; Jin, Z.; Fernández-Herrera, M.A. *Org. Lett.* **2016**, 18, 1772. c) Hamid, A; Kaushal, T.; Ashraf, R.; Singh, A.; Gupta, A. C.; Prakash, O.; Sarkar, J.; Chanda, D.; Bawankule, D.U.; Khan, F.; Shanker, K.; Aiyelaagbe, O.O.; Negi, A.S. *Steroids* **2017**, 119, 43-52. d) Martínez-Pascual, R.; Meza-Reyes, S.; Vega-Baez, J.; Merino-Montiel, P. *Steroids* **2017**, 122, 24-33.
- ⁷ a) Do Nascimento, P.G.G.; Lemos, T. L.G.; Almeida, M. C.S.; de Souza, J.M.O.; Bizerra, A.M.C.; Santiago, G.M.P.; da Costa, J.G.M.; Henrique Coutinho, H. D.M. *Steroids*, **2015**, 104, 8 -15. b) Arenas-González, A.; Mendez-Delgado, L.A.; Merino-Montiel, P.; Padrón, J.M.; Montiel-Smith, S.; Vega-Báez, J.L.; Meza- Reyes, S. *Steroids*, **2016**, 116, 13-19. c) Jastrzebska, I.; Niemirowicz, K.; Brzozowska, W.I.; Bucki, R. *Steroids*, **2017**, 118, 55-60.
- ⁸ a) Wachsmann, M. B., Ramirez, J. A., Galagovsky, L. R., Coto, C. E. *Antivir. Chem. Chemother.* **2002** 13, 61–66. b) Michelini, F. M., Ramirez, J. A., Berra, A., Galagovsky, L. R., Alche, L. E. *Steroids* **2004**, 69, 713.
- ⁹ Malikova, J., Swaczynova, J., Kolar, Z., and Strnad, M. *Phytochemistry* **2008**, 69, 418.
- ¹⁰ a) M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez Gil, C.S. Pérez Martínez, F. Coll Manchado. *J Chem Soc Perkin Trans I*, **2001**, 3, 26-66. b) Y. Lopez, R. Santillan, N. Farfan. *Steroids*, **2006**, 71,12-17. c) S. Lee, P.L. Fuchs, *Can J Chem*, **2006**, 84, 1442-1447.
- ¹¹ Meza-Reyes, S., Sandoval-Ramírez, J., Montiel-Smith, S., Hernández-Linares, G., Viñas-Bravo, O., Martínez-Pascual, R., Farfán, N. *Arkivoc*, **2005**, 6, 307-320.
- ¹² Barton, D. H. R.; Magnus, P. D.; Smith, G.; Zurr, D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 861-863.
- ¹³ Hernández, R.; Marrero-Tellado, J. J.; Prout, K.; Suárez, E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 3, 275-277.
- ¹⁴ Díaz, A. C., Merinos, J. P. G., López, Y., Campos, J. B. G., Rosa, E., Santillán, R., Farfán, N., Morzycki, J. W. *Steroids*, **2015**, 100, 36-43.
- ¹⁵ a) 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. A. *Arkivoc* **2005** (vi) 127-135. b) Viñas-Bravo, O.; Martínez-Pascual, R.; Vega-Baez, J. L.; Gómez-Calvario, V.; Sandoval-Ramírez, J.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; López-De Rosas, A.; Martínez-Montiel, M.; Reyes, M.; Ruiz, J. A. *Steroids* **2012**, 77, 59-66.
- ¹⁶ a) Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, 53,126-130. b) 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. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 2474-2484.
- ¹⁷ Fernández-Herrera, M. A., Sandoval-Ramírez, J., López-Muñoz, H., Sánchez-Sánchez, L. *Arkivoc*, **2009**, 13, 170-184.
- ¹⁸ a) Mikhaleva A, Zaitsev AB, Trofimov BA. *Russ. Chem. Rev.* **2006**, 75 (9): 797-823. b) Lokanatha KM. *Top. Heterocycl. Chem.* **2008**, 13, 1-69
- ¹⁹ Sikharulidze MI, Nadaraia NS, Kakhabrishvili ML, Barbakadze NN, Mulkidzhanyan KG. *Chem. Nat. Compd.* **2010**, 46 (3), 493-494.
- ²⁰ a) Abele E, Abele R, Golomba L, Višnevská J, Beresneva T, Rubina K., Lukevics E. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2010**, 46 (8), 1123–1153. b) Abele E, Abele R, Rubina K, Lukevics E. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2005**, 41 (2),163–190.
- ²¹ Díaz-Velandia, J.; Durán-Díaz, N.; Robles-Camargo, J.; Elena Loaiza, A. *Universitas Scientiarum* **2011**, 16, 3, 294-302
- ²² Bansal, R.; Acharya, P. C. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 6986.
- ²³ Iglesias-Arteaga, M.A.; Sandoval-Ramírez, J.; Mata-Esma, M. Y.; Viñas-Bravo, O.; Bernès, S. *Tetrahedron Lett* **2004** 45 (25), 4921-4926.
- ²⁴ De Luca, L.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A. *J Org. Chem.* **2002**, 67, 6272-6276.
- ²⁵ Ding, X.; Xue, P.; Song, D. J. *Chin. J. Org. Chem.* **2005**, 25, 1606-1609.
- ²⁶ Cui, J.; Huang, L.; Fan, L.; Zhou, A. *Steroids* **2008**, 73, 252-256

- ²⁷ Abid, H.; Akram, S. M.; Shameem, A. *Steroids* **2014**, *84*, 64-69.
- ²⁸ a) Cui, J., G., Fan, L., Huang, L., Liu, H., L., Zhou, A., M., *Steroids*, **2009**, *74*, 62-72. b) Cui, J., Fan, L., Huang, Y., Xin, Y., Zhou, A., *Steroids*, **2009**, *74*, 989-995.
- ²⁹ Gan, C. Gui, J., Su, S., Lin, Q., Jia, L., Huang, Y., *Steroids*, **2014**, *87*, 99-107.
- ³⁰ Berényi, A., Minorics, R., et. al., *Steroids*, **2013**, *78*, 69-79.
- ³¹ Bhalerao, S. A., Verna, D. R., D'Souza, L. R., Teli, N. C., & Didwana, V. S. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, **2007** *4*(3), 475-499.
- ³² Naveja JJ, Oviedo-Osornio CI, Trujillo-Minero NN, Medina-Franco JL. *Mol Divers*. **2018**, *22*(1):247-258.
- ³³ Perrin, P. D.; Armarego, W. D. F. *Purification of Laboratory Chemicals* 3a Ed. Pergamon Press: Oxford **1989**.
- ³⁴ a) Alan Carrasco-Carballo, María Guadalupe Hernández-Linares, Maura Cárdenas-García, Jesús Sandoval-Ramírez. *Steroids* **2021**, *166*, 108787 <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108787>
b) Martínez-Gallegos, A.; Guerrero-Luna, G.; Ortiz-González, A.; Cárdenas-García, M. Bernès, S.; **Hernández-Linares, M.G.** *Steroids* **2021**, *166*, 108777 doi: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108777>. c) 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. *Molecules* **2016**, *21*(11), 1533.
- ³⁵ Kaufman, S.; Rosenkranz, G., *J. Org. Chem.* **1978**, *70*, 3502.
- ³⁶ Marker, R.E.; D. L. Turner, D.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, *63* (3), 767-771.
- ³⁷ Iglesias-Arteaga, M.A.; Símuta-López, E.M.; Xochihua-Moreno, S.; Viñas-Bravo, O.; Montiel Smith, S.; Meza Reyes, S.; Sandoval-Ramírez, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 381-385.
- ³⁸ Rajnikant, V., Goswami, K. N., Gupta, V. K., Bhutani, K. K., Magotra, D. K. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. C*, **2000**, *12*, 101-110.
- ³⁹ Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001** *46*, 3-26.
- ⁴⁰ Gandalovičová, A., Rosel, D., Fernandes, M., Veselý, P., Heneberg, P., Čermák, V., Petruželka, L., Kumar, S., Sanz-Moreno, V., & Brábek, J. (2017). Migrastatics-Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends in cancer*, *3*(6), 391-406. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.008>
- ⁴¹ Pazo Cid, R. A., Álvarez Alejandro, M., Cebollero De Miguel, A., Agustín, M. J., Martínez Lostao, L., Anel Bernal, A., Pérez Gracia, J. L., & Antón Torres, A. (2012). Apoptosis. *cáncer & Co. Rev Int Grupos Invest Oncol.*, *1*(1), 23-28.
- ⁴² Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther* *5*, 28 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- ⁴³ Diaztagle, J. J., Castro, C. A., & Buitrago, D. C. (2019). Experiencia en la utilización de hipolipemiantes en una cohorte de pacientes en 12 ciudades colombianas. *Revista Médica UIS*, *32*(1), 13-20. <https://doi.org/10.18273/revmed.v32n1-2019002>
- ⁴⁴ Ramírez, A. S., Kowal, J., & Locher, K. P. (2019). Cryo-electron microscopy structures of human oligosaccharyltransferase complexes OST-A and OST-B. *Science*, *366*(6471), 1372-1375. <https://doi.org/10.1126/science.aaz3505>
- ⁴⁵ Xiao, N., & Le, Q. T. (2015). Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *64*(2), 89-99. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0376-4>
- ⁴⁶ Reyes Revuelta, J. F. (2018). Fármacos potenciadores del rendimiento: Un fenómeno emergente en salud laboral. *Revista Enfermería del Trabajo*, *8*(2), 81-83.
- ⁴⁷ Schoot, T. S., Kerckhoffs, A. P. M., Hilbrands, L. B., & Van Marum, R. J. (2020). Immunosuppressive Drugs and COVID-19: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01333>
- ⁴⁸ Kaur, R., & Sinha, V. (2018). Antidepressants as antipruritic agents: A review. *European Neuropsychopharmacology*, *28*(3), 341-352. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.01.007>
- ⁴⁹ Padala, S. K., Lavelle, M. P., Sidhu, M. S., Cabral, K. P., Morrone, D., Boden, W. E., & Toth, P. P. (2017). Antianginal Therapy for Stable Ischemic Heart Disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, *22*(6), 499-510. <https://doi.org/10.1177/1074248417698224>
- ⁵⁰ Montañó, A. M., Lock-Hock, N., Steiner, R. D., Graham, B. H., Szlago, M., Greenstein, R., Pineda, M., Gonzalez-Meneses, A., Çoker, M., Bartholomew, D., Sands, M. S., Wang, R., Giugliani, R., Macaya, A., Pastores, G., Ketko, A. K., Ezgü, F., Tanaka, A., Arash, L., Beck, M., ... Sly, W. S. (2016). Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII). *Journal of medical genetics*, *53*(6), 403-418. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103322>
- ⁵¹ Simpson, J. L. (2013). Disorders of the Gonads, Genital Tract, and Genitalia. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, 1-45. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-383834-6.00092>
- ⁵² George, M. M., New, M. I., Ten, S., Sultan, C., & Bhangoo, A. (2010). The Clinical and Molecular Heterogeneity of 17βHSD-3 Enzyme Deficiency. *Hormone Research in Paediatrics*, *74*(4), 229-240. <https://doi.org/10.1159/000318004>.

8. ANEXOS



data reports



IUCrData

ISSN 2414-3146

Received 20 August 2020
Accepted 31 August 2020

Edited by O. Blacque, University of Zürich,
Switzerland

Keywords: crystal structure; steroids; diosgenin;
polymorphism.

CCDC reference: 2026501

Structural data: full structural data are available
from iucrdata.iucr.org

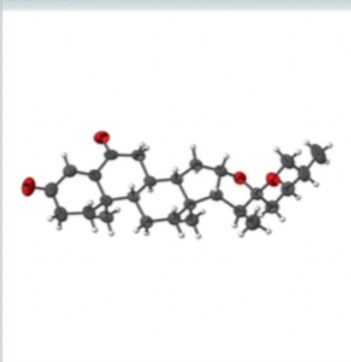
Diosgenin-3,6-dione: second polymorph in space group $P2_12_12_1$

Gabriel Guerrero-Luna,^a Jaquelin Reyes Melchor,^b Sylvain Bernès^{c*} and
María-Guadalupe Hernández-Linares^{d,e}

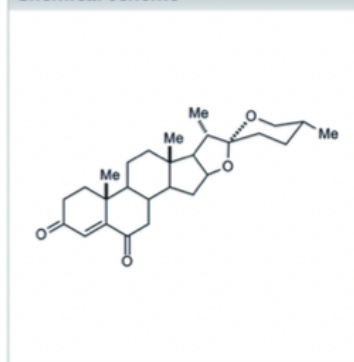
^aFacultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., Mexico,
^bLicenciatura en Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., Mexico, ^cInstituto de Física, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., Mexico, ^dCentro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., Mexico, and ^eLaboratorio de Investigación, Herbario y Jardín Botánico Universitario, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., Mexico.
*Correspondence e-mail: sylvain_bernes@hotmail.com

The title steroid, [(25*R*)-spirost-4-en-3,6-dione, C₂₇H₃₈O₄], is obtained by oxidation of diosgenin, using the Jones reagent (CrO₃/H₂SO₄). The crystal structure was previously reported in space group $P2_12_12_1$, but nonetheless with the wrong absolute configuration and omitting positions for H atoms [Rajnikant *et al.* (2000). *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. C*, **12**, 101–110]. The diffraction data set reported herein is for a second polymorph in the same space group, as evidenced by simulated powder patterns. Both forms are characterized by a similar orthorhombic unit cell, and a similar arrangement of the molecules in the crystal structure. However, the conformation of the A/B rings in the steroid nucleus is slightly modified, leading to the observed polymorphism.

3D view



Chemical scheme



Structure description

Diosgenin [(3*β*,25*R*)-spirost-5-en-3-ol, C₂₇H₄₂O₃] is a natural product that has played a pivotal role in the early stages of the industry of steroidal compounds, including the large-scale synthesis of cortisone, and the manufacturing of the first combined oral contraceptive pills, at Syntex S.A., in Mexico (Djerassi, 1992). Diosgenin treated with the Jones reagent gives the expected oxidation product, with carbonyl groups at C3 and C6. This compound was characterized by X-ray crystallography, and its structure reported twenty years ago (Rajnikant *et al.*, 2000). The reported refinement is rather technically unsound, since all H atoms were omitted in the model and the wrong absolute configuration was assigned to the molecule (see refcode QUPKUH in the CSD; Groom *et al.*, 2016). Since



OPEN ACCESS

IUCrData (2020). 5, x201200

<https://doi.org/10.1107/S2414314620012006> 1 of 3