



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-
Instituto de Ciencias**

Posgrado en Ciencias Químicas

**“Síntesis y Evaluación Biológica de Nuevos Agentes
Anticancerígenos y Promotores de Crecimiento Vegetal a Partir
de Sapogeninas Esteroidales”**

Tesis presentada para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Químicas

En el área de Química Orgánica

Presenta:

I.Q. Alan Carrasco Carballo

Director de Tesis:

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Co-directora de Tesis:

Dra. Ma. Guadalupe Hernández Linares

Puebla, enero 2018



Este trabajo de tesis de maestría fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación del Jardín Botánico Universitario bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y la Dra María Guadalupe Hernández Linares. Agradezco al CONACyT (No. de Becario: 598465) por la beca otorgada para la realización de la presente tesis.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



“Esta Investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. José Aurelio Ortiz Márquez, Dr. Jorge R. Juárez Posada, Dr. J. Martín Torres Valencia y la Dra. Penélope Merino Montiel, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Síntesis y evaluación biológica de nuevos agentes anticancerígenos y promotores de crecimiento vegetal a partir de sapogeninas esteroídicas"**, que presenta el alumno **Alan Carrasco Carballo** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los ocho días del mes de enero del año dos mil dieciocho.

ATENTAMENTE

Dr. José Aurelio Ortiz Márquez

Dr. Jorge R. Juárez Posadas

Dr. J. Martín Torres Valencia

Dra. Penélope Merino Montiel

80 AÑOS

DE UNIVERSIDAD

Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCQ 10,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (221) 229 55 00 Ext. 7397
posgrado.quimica@correo.buap.mx

Parte de este trabajo de tesis de investigación fue presentado en los siguientes congresos:

- *XII Congreso de la Academia Mexicana de química Organica*, con el cartel titulado: **“Oximas como alternativa de grupo protector en esteroides”**, el cual se llevo acabo en Silao, Guanajuato del 7 al 11 de marzo del 2016
- *12ª Reunion Internacional de Investigacion en Productos Naturales* con el cartel titulado: **“Optimización de la extracción e hidrólisis química para obtención de sapogeninas esteroidales a partir de Dioscórea composita”**, el cual se llevo acabo en Xalapa, Veracruz del 18 al 20 de mayo del 2016
- *30 años Diseñando Moléculas y Formando Investigadores Dra. Rosa Santillán*, con el cartel titulado: **“Optimización de la Síntesis de Compuestos 6-Oxo Esteroidales”**, el cual se llevo acabo en Orizaba, Veracruz el 20 y 21 de octubre del 2016
- *XIII Congreso de la Academia Mexicana de química Organica*, con el cartel titulado: **“Estrategias Sintéticas Accesibles para la Obtencion de Alcaloides de Laxogenina”**, el cual se llevo acabo en Villahermosa, Tabasco del 3 al 7 de abril del 2017
- *52º Congreso Mexicano de Química, 36º Congreso Nacional de Educación Química*, con la ponencia titulada: **“Optimización de la obtención de compuestos 6-oxoesteroidales empleando un proceso semi-continuo”**, el cual se llevo acabo en Puerto Vallarta, Jalisco del 26 al 29 de septiembre de 2017.

Parte de este trabajo de investigación fue publicado en los siguientes artículos científicos:

- Zefenino-Diaz, R.; Hilario-Martinez, J.C.; Rodriguez-Acosta, M.; **Carrasco-Carballo, A.**; Hernández-Linares, M.G.; Sandoval-Ramirez, J.; Fernandez-Herrera M.A.; *Mimicking Natural Phytohormones: 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as Plant Growth Promoters. Steroids 2017, in press.*
- **Alan Carrasco-Carballo**, Gabriel Guerrero-Luna, Maria Guadalupe Hernández-Linares, Sylvain Bernês. *Crystal structure of (3β,5α,25R)-12-(Hydroxyimino) spirostan-3-yl acetate. IUCrData, 2017, 2, x170491.*
- Sanchez-Sanchez, L.; Hernández-Linares, M.G.; Escobar, M-L.: Lopez-Muñoz, H.; Zenteno, E.; Fernández-Herrera, M.A.; Guerrero-Luna, G.; **Carrasco-Carballo, A.**; Sandoval-Ramirez, J. *Antiproliferative Cytotoxic and Apoptotic Activity of steroidal oximes in Cervicouterine Cell Lines. Molecules 2016, 21(11), 1533.*
- Maria Guadalupe Hernández-Linares, **Alan Carrasco-Carballo**, Gabriel Guerrero-Luna, Sylvain Bernês, Gerardo Aguirre Hernández. *Crystal structure of (25R)-23-Acetyl-3β,16β-diacetoxy-22,26-epoxy-cholestan-5,22-diene n-hexane 0.8-solvate. IUCrData, 2016, 1, x160622.*

Parte de este trabajo genero las siguientes patentes:

- Maria Guadalupe Hernandez Linaes, **Alan Carrasco Carballo**, Gabriel Guerrero Luna, Jesús Sandoval Ramírez, Maricela Rodríguez Acosta; María Antonieta Fernández Herrera, *“Escalamiento a Nivel Multigramos para la Obtencion de la Oxima de 23-Acetildiogenina”*. No. de solicitud de registro: **MX/a/2017/005582**.
- Maria Guadalupe Hernandez Linaes, Luis Sánchez-Sánchez, Gabriel Guerrero-Luna **Alan Carrasco Carballo**, María L. Escobar-Sánchez, Hugo López-Muños, Maria A. Fernández-Herrera, Jesús Sandoval Ramírez, *“Emplero de la oxima del acetato de 23(S)-acetildiogenina como agente anticancerígeno en cáncer cérvicouterino”*. No. de solicitud de registro: **MX/a/2016/013944**.

Dedicatoria

A mis hermanos

José Ángel Carrasco Carballo

Abel Carrasco Carballo

Mi Motor, mi Orgullo, siendo esto muestra de lo que ustedes pueden llegar a hacer y más.

A mis padres

Abel Carrasco Marcos

Nilma Carballo Gómez

Mi soporte, mi motivación, mi formación, por ustedes y para ustedes por cada momento conmigo y su comprensión en mi ausencia, así como su apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez, por la gran oportunidad de dejarme explorar e investigar en este vasto tema de los esteroides, así como por compartir en todo momento su extensa experiencia y conocimientos, permitiéndome crecer cada día.

A la Dra. María Guadalupe Hernández Linares, mi jefa, por la gran oportunidad de permitirme explorar, investigar y jugar en su laboratorio, con su compañía y sus grandes conocimientos, gran parte de lo que soy hoy se lo debo a usted, sobre todo la confianza que me ha otorgado, así como la paciencia.

A la Dra. Maricela Rodríguez y a la M. en C. Paulina por apoyarme con las pruebas biológicas como promotores de crecimiento vegetal.

A la Dra. Maura Cardenas y su grupo de trabajo por abrimme las puertas a su laboratorio para aprender algo nuevo y realizar las pruebas biológicas anticancerígenas.

Al M. en C. Gabriel Guerrero Luna, por su amistad y compañía incondicional en todo momento durante toda esta gran aventura, así como la motivación de ver las cosas de una manera única,

A la Dra. Maria Antonieta Fernandez por permitirme formar parte de su proyecto con promotores de crecimiento vegetal.

A las coordinaciones del posgrado, así como los profesores que me apoyaron y formaron en todo momento permitiéndome expandir mis conocimientos en estos dos años.

A la comisión revisora por sus excelentes aportaciones para la mejora de este trabajo de tesis de maestría.

A Guiz Niza y Daniela mis Kimmy y Steffany por cada uno de los momentos durante este tiempo, así como su amistad incondicional y oídos eternos.

A Iván J. Valdivieso, por tu amistad única e incondicional, por todos esos momentos de alegrías y tristeza, pero siempre ahí aun desde lejos.

A Sarai, Kenneth, Odín, Alberto, David, Erik y Yamilli, por su amistad única y excelentes compañeros de laboratorio haciendo cada momento más divertido aún.

A Cici, Reyna, Bertha y Nagelli por recibirme con los brazos abiertos en mi llegada a Puebla y al laboratorio y compañía estos dos años.

A Paloma, Carlos y Luis, mis compañeros y amigos de clases por esas horas de pláticas, discusiones y risas por cada experiencia en clase y fuera de ellas.

INDICE

ÍNDICE DE ESQUEMAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XVIII
RESUMEN	XIX
ABSTRAC	XXII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Modificaciones esteroidales.....	6
2.2 Esteroides como anticancerígenos.....	13
2.3 Esteroides como promotores de crecimiento vegetal.....	22
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivos particulares	30
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
4.1 Optimización de la obtención de laxogenina.....	31
4.1.1 Ruta A. Obtención de laxogenina vía epoxidación selectiva.....	32
4.1.2 Ruta B. Obtención de laxogenina vía un <i>i</i> -esteroide.....	54
4.1.3 Optimización de la obtención de la oxima del acetato de 23-acetildiosgenina.....	70
4.2 Empleo de las oximas como grupo protector.....	74
4.2.1 Estudio con 5 α -colestanona.....	75
4.2.2 Estudio con acetato de hecogenina.....	77
4.3 Modificaciones de la laxogenina.....	81
4.3.1 Oxima de la (25 <i>R</i>)-3 α ,5-ciclo-espirostan-6-ona (297).....	82
4.3.2 Oxima de laxogenina (298).....	84
4.3.3 Diacetato de (25 <i>R</i>)-26-hidroxi-6-hidroximino-22-oxocolest-3 β ,16 β -diilo (299).....	87
4.3.4 Diacetato de (25 <i>R</i>)-26-hidroxi-6,22-dioxocolest-3 β ,16 β -diilo (300).....	91
4.4 Evaluación biológica de 122 , 285 , 297-300 como anticancerígenos.....	95
4.4.1 Empleando cepas de cáncer de mama línea MCF-7	95
4.4.2 Efecto en células cancerosas de mama MDA-MB-231.....	98
4.5 Evaluación biológica de 291 y 300 como promotores de crecimiento vegetal.....	99
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	102
5.1 Equipos, técnicas y materias primas utilizadas.....	102

5.1.1	Equipos y técnicas de identificación.....	102
5.1.2	Técnicas de purificación	102
5.1.3	Materias primas.....	103
5.2	Optimización de la obtención de laxogenina.	106
5.2.1	Acetato de diosgenina (21)	106
5.2.2	Acetato de (25 <i>R</i>)-5 β ,6 β -epoxi-5 β -espirostan-3 β -ilo (279).....	107
5.2.3	Acetato de (25 <i>R</i>)-5-bromo-6 β -hidroxi-5 α -espirostan-3 β -ilo (283).....	108
5.2.4	Acetato de (25 <i>R</i>)-5-bromo-6-oxo-5 α -espirostan-3 β -ilo (281)	109
5.2.5	Acetato de laxogenina (280)	110
5.2.6	Tosilato de diosgenina (284).....	111
5.2.7	(25 <i>R</i>)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6 β -ol (278).....	112
5.2.8	(25 <i>R</i>)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6-ona (285)	113
5.2.9	Laxogenina (122).....	114
5.2.10	Proceso semi-continuo, Ruta A.....	115
5.2.11	Proceso semi-continuo, Ruta B.....	116
5.3	Empleo de las oximas como grupo protector.....	117
5.3.1	5 α -colestonona (292).....	117
5.3.2	Oxima de 5 α -coleston-3-ona (293)	118
5.3.3	Hidrólisis de la oxima de 5 α -coleston-3-ona.....	119
5.3.4	Oxima del acetato de hecogenina (295).....	120
5.3.5	Hidrólisis de la oxima de acetato de hecogenina.	121
5.3.6	Metodología General del uso de oximas como grupo protector en esteroides.....	122
5.4	Modificaciones de la laxogenina.....	122
5.4.1	Oxima de la (25 <i>R</i>)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6-ona (297).....	122
5.4.2	Oxima de laxogenina (298).....	123
5.4.3	Diacetato de (25 <i>R</i>)-26-hidroxi-6-hidroximino-22-oxo-5 α -colest-3 β ,16 β -diilo (299).....	124
5.4.4	Diacetato de (25 <i>R</i>)-26-hidroxi-6,22-dioxo-5 α -colest-3 β ,16 β -diilo (300).....	126
5.5	Evaluación biológica de 122 , 285 , 297-300 como anticancerígenos.	128
5.5.1	Cultivo celular.....	128
5.5.2	Evaluación de dosis letal media IC ₅₀	128
5.6	Evaluación biológica de 291 y 300 como promotores de crecimiento vegetal.....	128
6.	CONCLUSIONES	129
7.	ANEXOS	133
8.	BIBLIOGRAFÍA	138

Abreviaturas

MCPBA	Acido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
TsOH	Ácido <i>para</i> -toluensulfónico
B ₀	Campo magnético externo
PCC	Clorocromato de piridinio
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
COSY	Correlation Spectroscopy
σ	Desviación estándar
δ	Desplazamiento químico
DMAP	Dimetil amino piridina
DL ₅₀	Dosis letal media
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Spectrum Quantum Correlation
ν	Intervalo de frecuencias, Hz
$\bar{\nu}$	Intervalo de número de onda, cm ⁻¹
IR	Infrarrojo
μm	Micrómetro
cm ⁻¹	Número de onda
ppm	Partes por millón
P.M	Peso Molecular
P.f	Punto de fusión
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
THF	Tetrahidrofurano
BF ₃ .OEt ₂	Trifloururo de boro eterado
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema A. Rutas de reacción esterosselectivas de obtención de laxogenina (122).....	XIX
Esquema B. Rutas de reacción optimizadas para la obtención de laxogenina (122).....	XX
Esquema C. Uso de oximas como grupo protector.....	XX
Esquema D. Nuevas estructuras cetónicas e hidroximínicas esteroidales sintetizadas.....	XXI
Esquema E. Valores de IC ₅₀ en μM para MDA-MB-231 y MCF-7, y su efecto como promotor de crecimiento (100 % HB) vegetal de los esteroides de interés sintetizados.....	XXI
Scheme A. Steroselective routes of reaction for obtaining laxogenin (122).....	XXII
Scheme B. Routes of reaction optimized for obtaining laxogenin (122).....	XXIII
Scheme C. Use of oximes as a protective group.....	XXIII
Scheme D. Structures of new steroidal ketone and hydroxyiminics derivatives synthesized s.....	XXIV
Scheme E. IC ₅₀ values in μM for MDA-MB-231 and MCF-7; and effect as a plant growth promoter (100% HB) of the steroids evaluated.....	XXIV
Esquema 1. Obtención de diosgenina a partir de dioscina por hidrólisis ácida.....	3
Esquema 2. Obtención de cadenas laterales oxigenas de colesterol.....	6
Esquema 3. Oxidaciones selectivas de los anillos A y B de colesterol.....	7
Esquema 4. Modificaciones estereoselectivas en los anillos A y B de colesterol vía i-esteroide.....	7
Esquema 5. Obtención de 11α-hidroxi, 11β-hidroxi y 11-cetopregnenolonas via i-esteroide.....	8
Esquema 6. Síntesis de ecdisteroides vía i-esteroide de diosgenina.....	8
Esquema 7. Obtención de laxogenina mediante epóxido-β,β como precursor.....	9
Esquema 8. Apertura del espiroacetal de sapogeninas en medio ácido.....	9
Esquema 9. Obtención de derivados 22-oxoesteroidales vía dihidropirano.....	10
Esquema 10. Obtención de 6-hidroximinas esteroidales.....	10
Esquema 11. Obtención de oximas α, β insaturadas esteroidales aromáticas.....	11
Esquema 12. Rearreglos de oximas esteroidales.....	12
Esquema 13. Análisis retro-sintético de OSW-1 elaborado por Deng.....	13
Esquema 14. Síntesis de gluco-laxogenina como análogo del OSW-1.....	14
Esquema 15. Datos de IG ₅₀ (μM) de derivados azufrados de estrógenos en la línea celular MCF-7.....	16
Esquema 16. Obtención de oximas, lactamas y tiolactamas con actividad anticancerígena.....	18
Esquema 17. Síntesis de diversos éteres en C-16 de oximas de estrona.....	20
Esquema 18. Síntesis de tiosemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas de oximas esteroidales.....	20
Esquema 19. Síntesis de derivados 3-OBz-26-amino-esteroidales con actividad antiproliferativa en células de cáncer MCF-7 (μM).....	21
Esquema 20. Síntesis de homobrasinólida y análogos, con su porcentaje de actividad como promotor de crecimiento vegetal comparados con la brasinólida (100%) como control.....	23
Esquema 21. Transdormación de un 2,3-epoxibrasinoesteroide aislado del Secale cereale.....	24
Esquema 22. Síntesis de análogos de epibrasinólida sin la sustitución en C-2.....	24
Esquema 23. Síntesis de análogos epoxidados de brasinoesteroides.....	25
Esquema 24. Síntesis de análogos 7 oxigenados esteroidales de brasinoesteroides.....	26
Esquema 25. Análogos 5-hidroxilados de brasinoesteroides.....	27
Esquema 26. Síntesis de análogos de brasinoesteroides con la cadena lateral flourada.....	28
Esquema 27. Obtención de laxogenina (122).....	31
Esquema 28. Mecanismos de epoxidación de acetato de diosgenina.....	38
Esquema 29. Obtención de laxogenina ruta A.....	48
Esquema 30. Epoxidación estereoselectiva de acetato de diosgenina.....	48

<i>Esquema 31. Apertura del epóxido 279 con HBr.</i>	49
<i>Esquema 32. Oxidación del derivado bromado 283.</i>	50
<i>Esquema 33. Reducción del Bromo para la obtención de acetato de laxogenina.</i>	51
<i>Esquema 34. Hidrólisis básica del acetato de laxogenina (280).</i>	52
<i>Esquema 35. Proceso semi-continuo de obtención de laxogenina (122) por Ruta A.</i>	52
<i>Esquema 36. Mecanismo de formación del derivado 278.</i>	59
<i>Esquema 37. Apertura del i-esteroide 285 en medio ácido.</i>	64
<i>Esquema 38. Obtención de laxogenina por ruta B.</i>	66
<i>Esquema 39. Tosilación de diosgenina.</i>	66
<i>Esquema 40. Formación del i-esteroide 278.</i>	67
<i>Esquema 41. Formación del i-esteroide 285.</i>	68
<i>Esquema 42. Apertura en medio ácido de 285.</i>	69
<i>Esquema 43. Obtención de laxogenina por ruta B: proceso semi-continuo.</i>	69
<i>Esquema 44. Obtención de la oxima del acetato de 23-acetil diosgenina (289).</i>	70
<i>Esquema 45. Derivado enol acetilado esteroidales.</i>	74
<i>Esquema 46. Uso de oximas como grupo protector.</i>	74
<i>Esquema 47. Oxidación de colestanol (296).</i>	75
<i>Esquema 48. Rutas para la obtención de la oxima de laxogenina (298).</i>	81
<i>Esquema 49. Obtención del derivado 300.</i>	87
<i>Esquema 50. Obtención de 122 mediante epoxidación estereoselectiva.</i>	115
<i>Esquema 51. Obtención de 122 via un i-esteroide.</i>	116
<i>Esquema 52. Hidrólisis de oxima 293.</i>	119
<i>Esquema 53. Hidrólisis de la oxima 295.</i>	121
<i>Esquema 54. Rutas de reacción de obtención de laxogenina (122).</i>	129
<i>Esquema 55. Rutas de reacción optimizadas para la obtención de laxogenina.</i>	130
<i>Esquema 56. Uso de oximas como grupo protector.</i>	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dianabol (1).....	1
Figura 2. Estructura del colesterol y del ácido cólico.....	2
Figura 3. Numeración IUPAC para sapogeninas esteroidales, a) representación en un plano, b) representación en forma de silla.....	2
Figura 4. Esteroides más representativos de origen natural.....	3
Figura 5. a) R. Marker en México recolectando barbasco, b) R. Marker en su laboratorio en Pensilvania trabajando en métodos de obtención de progesterona.	4
Figura 6. a) <i>Catharanthus roseus</i> y <i>Brassica napus</i> , fuentes naturales de BS. b) <i>Cinachyrella australiensis</i> fuente de oximas anticancerígenas.....	5
Figura 7. Análogos del OSW-1 con actividad como anticancerígenos.	14
Figura 8. Derivados cardenólidos glucosídicos nitrogenados citotóxicos (A549).....	15
Figura 9. Datos de IC ₅₀ de estructuras análogas del estradiol con actividad anticancerígena en cáncer cervicouterino.	15
Figura 10. Datos de IC ₅₀ (μM) de derivados azufrados y nitrogenados con actividad anticancerígena (MCF-7, MDA-MB-231 y DU-145).	16
Figura 11. Azaesteroides inhibidores de la enzima 5α-reductasa y su porcentaje de inhibición.....	17
Figura 12. Oximas esteroidales con actividad antineoplásica relevante.	17
Figura 13. Oximas esteroidales en anillos A-B con diversas cadenas laterales y datos de su actividad antitumoral.....	19
Figura 14. Tipos de fitohormonas.....	22
Figura 15. Nuevos análogos de brasinoesteroides en el anillo B.....	27
Figura 16. Estructura de 4	32
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H de 4 a 500 MHz.....	32
Figura 18. Espectro de RMN HSQC de 4	33
Figura 19. Espectro de RMN HMBC de 4	34
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C de 4 a 125 MHz.....	34
Figura 21. Estructura de 21	35
Figura 22. Comparación por RMN de ¹ H de la pureza del acetato de diosgenina (21). Arriba) crudo de reacción; abajo) acetato de diosgenina purificado por cromatografía en columna.	36
Figura 23. Espectro RMN COSY del acetato de diosgenina (21).....	37
Figura 24. Espectro de RMN ¹³ C a 125 MHz del acetato de diosgenina (21).....	37
Figura 25. Estructura de 279	38
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H a 500 MHz de 279 : arriba) con MPCBA; abajo) epoxidación estereoselectiva.	39
Figura 27. Distribución espacial de los isómeros del epóxido 279 : a) epóxido alfa, b) epóxido beta.	39
Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C de 279	40
Figura 29. Estructura de 283	40
Figura 30. Optimización de apertura del epóxido 279 : a) cantidad de HBr b) tiempo de reacción.....	41
Figura 31. Espectro de RMN ¹ H a 500 MHz del derivado 283	41
Figura 32. Distribución espacial del derivado 283	42

Figura 33. Estructura de 281	42
Figura 34. Espectro RMN de ^1H a 500 MHz de 281	43
Figura 35. Estructura de mínima energía método MM2 a) 283 : $E_{\text{total}}=108.28$ Kcal/mol, b) 281 : $E_{\text{total}}=99.84$ Kcal/mol	43
Figura 36. Estructura de 280	44
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del acetato de laxogenina (280).....	44
Figura 38. Espectro de RMN-HSQC del acetato de laxogenina (280).....	45
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del acetato de laxogenina (280).....	45
Figura 40. Estructura de 122	46
Figura 41. Gráficas de optimización de la hidrólisis de acetato de laxogenina (122).....	46
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de laxogenina (122).	47
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la laxogenina (122).	48
Figura 44. Diagrama de flujo del sistema de eliminación del oxidante-humedad de reacción de epoxidación estereoselectiva de acetato de diosgenina.....	49
Figura 45. Gráfica tiempo vs rendimiento para la obtención de acetato de laxogenina.	51
Figura 46. Diagrama de bloques del proceso semi-continuo de obtención de laxogenina (122) ruta A. .	53
Figura 47. Estructura de 284	54
Figura 48. Gráfica de tiempo de reacción y relación molar de reactivos para la tosilación de diosgenina.	55
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del tosilato de diosgenina (284).....	56
Figura 50. Expansión del espectro de RMN ^1H a 500 MHz del tosilato de diosgenina (284).	56
Figura 51. Espectro de RMN HSQC del tosilato de diosgenina (284).....	57
Figura 52. Espectro RMN COSY del tosilato de diosgenina (284).	58
Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C a 125 MHz del tosilato de diosgenina (284).	58
Figura 54. Estructura de 278	59
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de 278	60
Figura 56. Estructura de mínima energía (método MM2) de 278	61
Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del 278	61
Figura 58. Estructura de 285	61
Figura 59. Análisis del tiempo de reacción con la selectividad y rendimiento de la oxidación de (285). .	62
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de (285).	63
Figura 61. Espectro RMN COSY de 285	63
Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de 285	64
Figura 63. Apertura de 285 , izquierda: ácido acético; derecha: agua en H_2SO_4	65
Figura 64. Optimización de la tosilación de diosgenina: a) volumen de piridina mínimo, b) tiempo óptimo.	67
Figura 65. Análisis de la temperatura y tiempo para la oxidación básica del i-esteroide 278	68
Figura 66. Diagrama de bloques del proceso de obtención de laxogenina por ruta B.....	70
Figura 67. Diagrama de bloques para la obtención de la oxima del acetato de 23-acetil diosgenina (289)	71
Figura 68. Seguimiento de reacción por IR de la obtención del derivado 289	72
Figura 69. Diagrama Ortep del derivado epoxicolesténico 286	73
Figura 70. Diagrama Ortep del derivado epoxicolesténico 290	73
Figura 71. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de colestanol (296) y colestano (292).	75

Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de: a) colestanol (296), b) colestanona (292).....	76
Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de la oxima de colestanona (293).	76
Figura 74. Estudio de reversibilidad de oximas esteroidales en función del pH y la temperatura.....	77
Figura 75. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de acetato de a) hecogenina y b) su oxima correspondiente.....	78
Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la oxima del acetato de hecogenina.	79
Figura 77. Diagrama ortep de la oxima del acetato de hecogenina (295).....	79
Figura 78. Graficas del Estudio de reversibilidad de la oxima del acetato de hecogenina.	80
Figura 79. Diagrama de flujo para la desprotección de oximas esteroidales.....	80
Figura 80. Estructura de 297	82
Figura 81. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz de la oxima 297	82
Figura 82. Espectro de RMN HMBC de la oxima 297	83
Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C de la oxima 297	83
Figura 84. Oxima de laxogenina (298).....	84
Figura 85. Experimento de RMN de ^1H a 500 MHz de la oxima de laxogenina (298).....	85
Figura 86. Estructura optimizada de la oxima de laxogenina (298) por MM2.....	85
Figura 87. Experimento de RMN HSQC de la oxima de laxogenina (298).....	85
Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la oxima de laxogenina (298).....	86
Figura 89. Experimento de RMN HMBC de la oxima de laxogenina (298).....	86
Figura 90. Diacetato de (25R)-26-hidroxi-6-hidroximin-22-oxocolest-3 β ,16 β -diilo (299).	87
Figura 91. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de 299	88
Figura 92. Espectro RMN COSY de 299	89
Figura 93. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de 299	89
Figura 94. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de 301	90
Figura 95. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del oxo 26 OH de oxima de laxogenina.	90
Figura 96. Diacetato de (25R)-26-hidroxi-6,22-dioxocolest-3 β ,16 β -diilo (300).	91
Figura 97. Espectro RMN de ^1H a 500 MHz de 300	92
Figura 98. Espectro RMN HMBC de 300	92
Figura 99. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de 300	93
Figura 100. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de 291	93
Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de 291	94
Figura 102. Estructuras seleccionadas para el estudio citotóxico en cáncer de mama.....	95
Figura 103. Estudio del IC_{50} de los derivados esteroidales seleccionados.	96
Figura 104. Estudio de proliferación celular en función del tiempo.....	97
Figura 105. Estudio citotóxico de derivados espiroestánicos cetónicos a concentraciones altas.	97
Figura 106. Estudio del IC_{50} de los derivados esteroidales seleccionados.	98
Figura 107. Estudio a dosis altas de las oximas esteroidales como promotores de la proliferación celular.	99
Figura 108. Ensayo de inclinación de lámina de arroz con variedad Morelos A06.....	100
Figura 109. Ensayo de inclinación de lámina de arroz con variedad Morelos A08.....	100
Figura 110. Estructura de 4	103
Figura 111. Estructura de 294	104
Figura 112. Estructura de 296	105
Figura 113. Estructura de 21	106

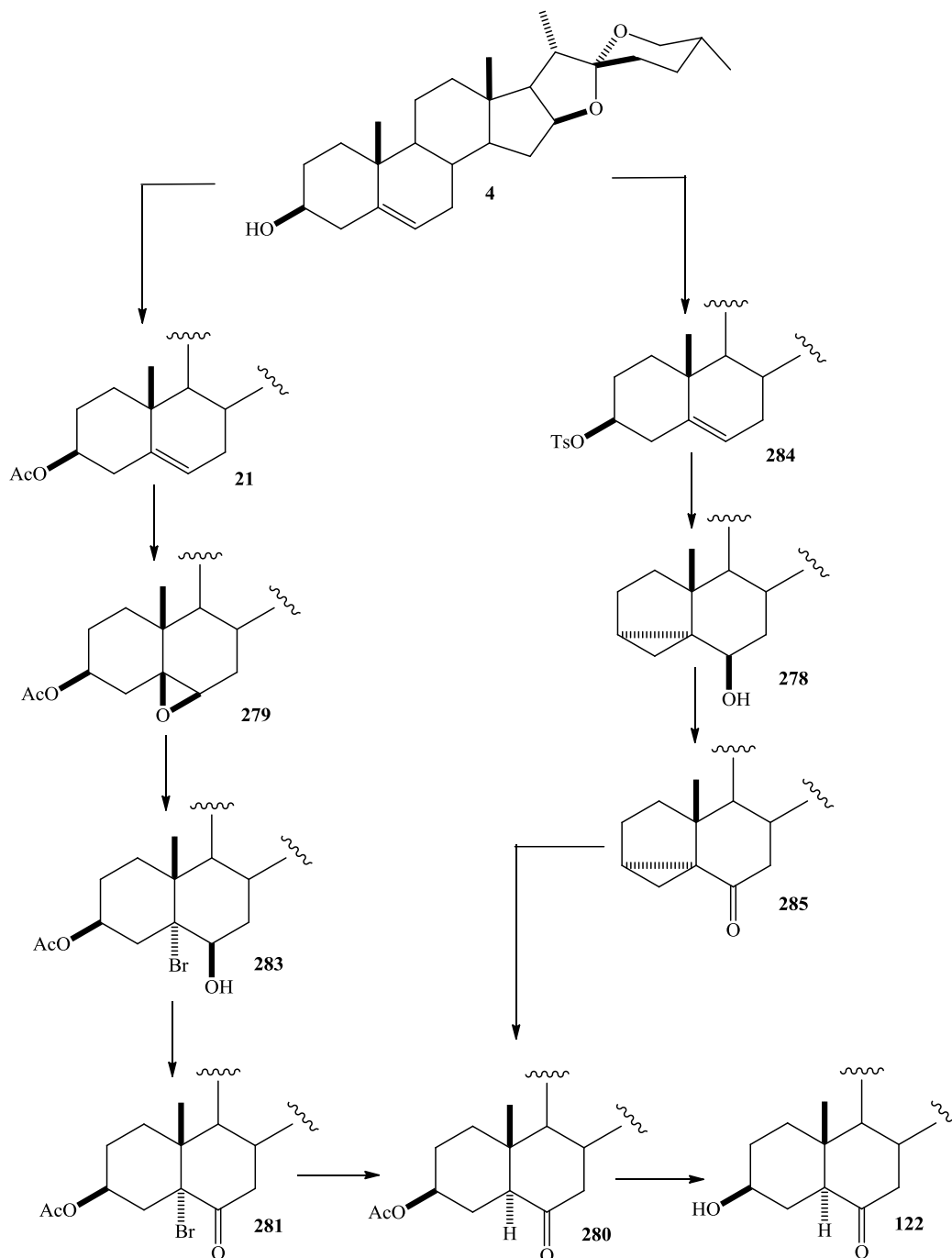
Figura 114. Estructura de 279	107
Figura 115. Estructura de 283	108
Figura 116. Estructura de 281	109
Figura 117. Estructura de 280	110
Figura 118. Estructura de 284	111
Figura 119. Estructura de 278	112
Figura 120. (25R)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6 β -ol (285).	113
Figura 121. Estructura de 122	114
Figura 122. Estructura de 292	117
Figura 123. Estructura de 293	118
Figura 124. Estructura de 295	120
Figura 125. Estructura de 297	122
Figura 126. oxima de laxogenina (298).....	123
Figura 127. Estructura de 299	124
Figura 128. Diacetato de (25R)-26-hidroxi-6,22-dioxocolest-3 β ,16 β -diilo (300).	126
Figura 129. Nuevas estructuras cetónicas e hidroximínicas esteroideas sintetizadas.	131
Figura 130. Efecto como promotor de crecimiento vegetal de los derivados colestánicos de laxogenina (100 %, HB).	132

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Optimización de condiciones de la obtención de acetato de diosgenina (21).</i>	35
<i>Tabla 2. Análisis de oxidantes para la obtención de 281.</i>	42
<i>Tabla 3. Análisis de la oxidación del derivado bromado 283.</i>	50
<i>Tabla 4. Análisis del efecto del disolvente de reacción en la tosilación de diosgenina.</i>	54
<i>Tabla 5. Comparación de metodologías de obtención de laxogenina (122) a partir de 285.</i>	65
<i>Tabla 6. Análisis del efecto de la base para la obtención del derivado i-esteroideo 278.</i>	67
<i>Tabla 7. Estudio de oxidantes para la formación del i-esteroideo 285.</i>	68
<i>Tabla 8. Estudio de obtención de oxima de laxogenina a partir de 285.</i>	84
<i>Tabla 9. Valores de IC₅₀ de los esteroides en las líneas celulares de cáncer estudiadas.</i>	131

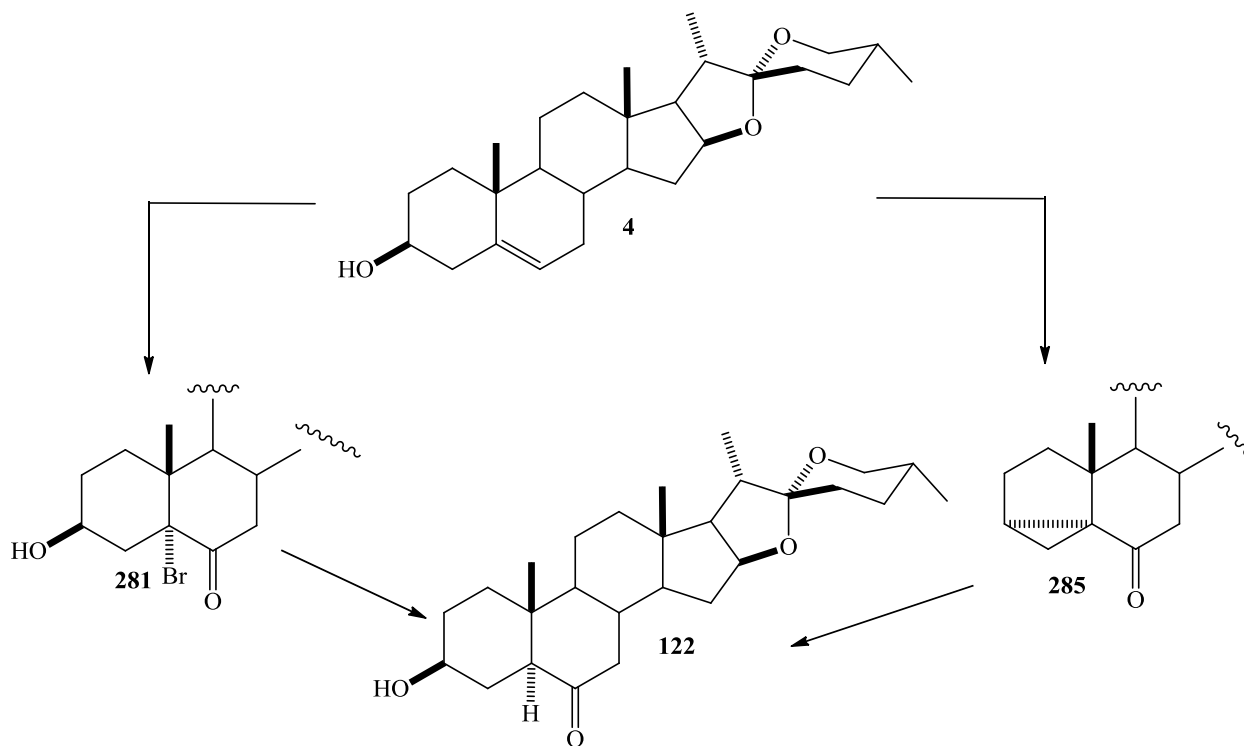
RESUMEN

El presente trabajo de tesis de maestría se divide en 5 etapas, la primera que consiste en la síntesis de laxogenina a partir de diosgenina (1), mediante la implementación de dos metodologías estereoselectivas.



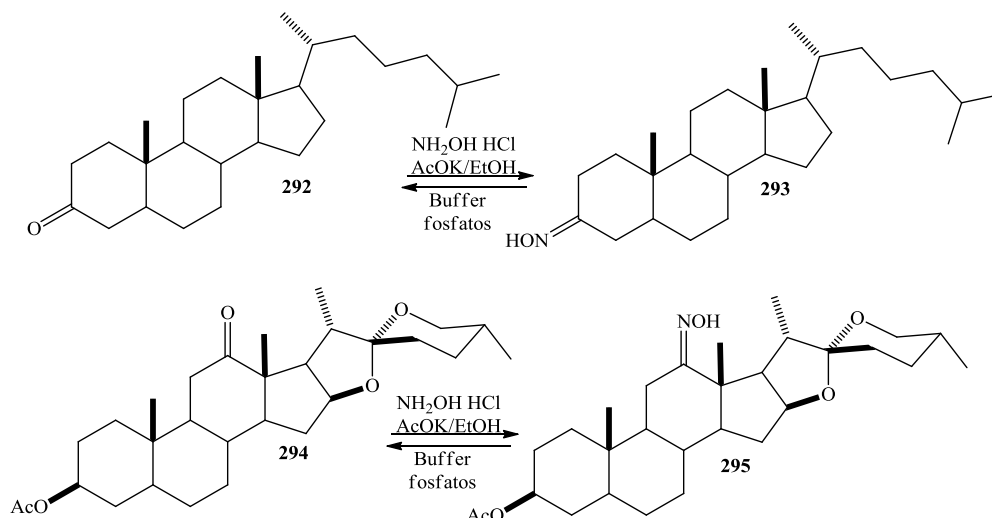
Esquema A. Rutas de reacción estereoselectivas de obtención de laxogenina (122).

La segunda etapa consistió en la optimización de las dos rutas de reacción antes descritas, en ambos casos mediante el empleo de procesos semi-continuos, los cuales fueron diseñados analizando la compatibilidad de reacciones consecutivas, incrementando así de 70% a 82% y de 65% a 75% el rendimiento respectivamente cada ruta, permitiendo así aumentar la disposición de este derivado esteroideo.



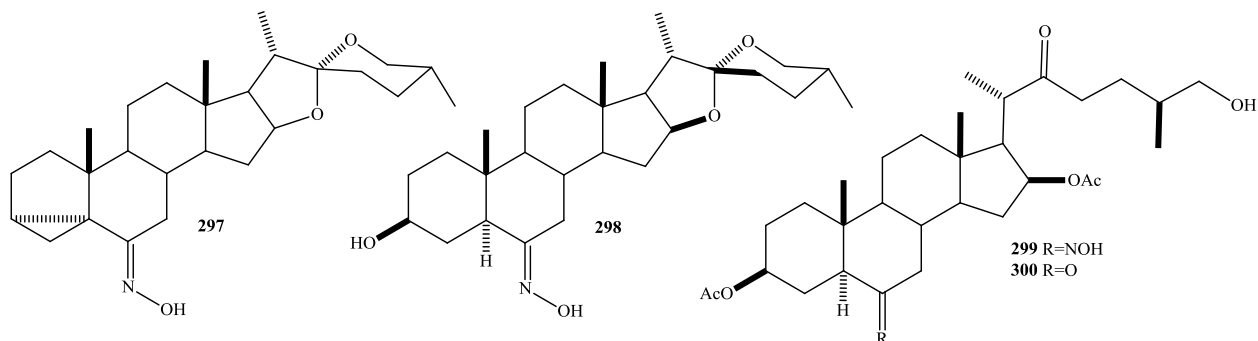
Esquema B. Rutas de reacción optimizadas para la obtención de laxogenina (122).

En la tercera etapa se diseñó una nueva metodología de protección-deprotección del grupo carbonilo de ceto-esteroides para evitar su enolización- acetilación, mediante la formación de una oxima.



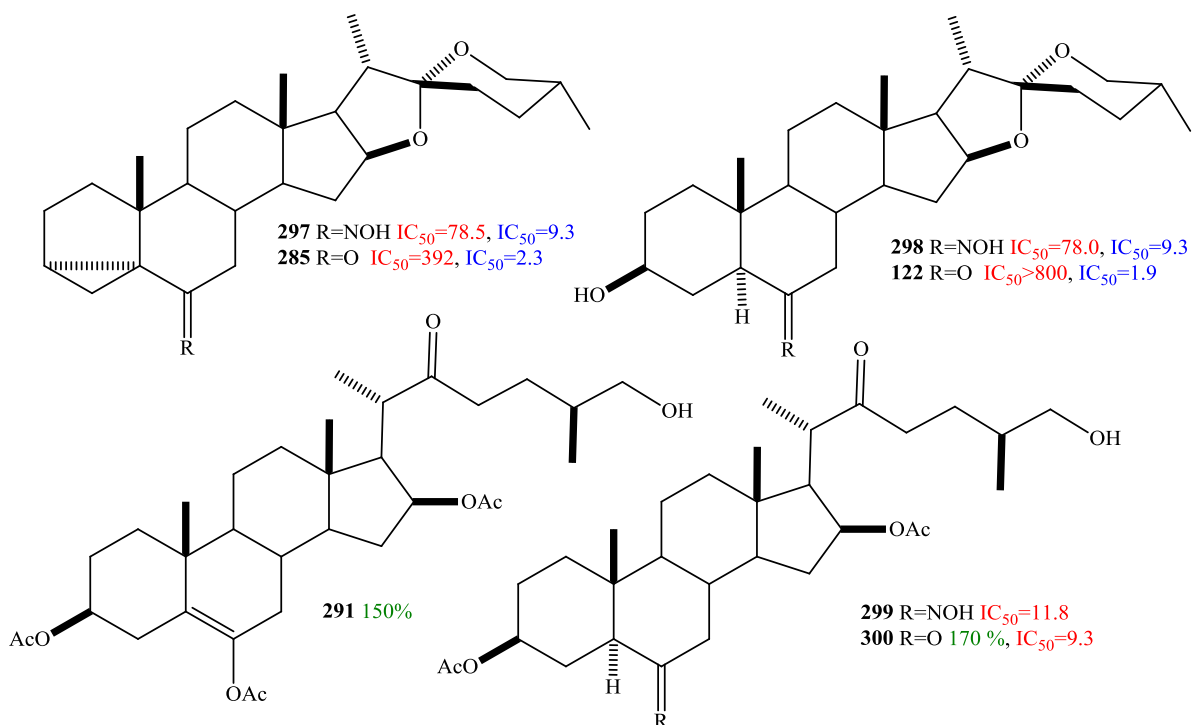
Esquema C. Uso de oximas como grupo protector.

La cuarta etapa se dedicó a la síntesis de nuevos derivados cetónicos e hidroximínicos esteroidales mismos que fueron debidamente caracterizados por técnicas espectroscópicas, optimizando cada una de las reacciones de obtención de estos derivados con la finalidad de aumentar la disponibilidad de los mismos para su evaluación biológica.



Esquema D. Nuevas estructuras cetónicas e hidroximínicas esteroidales sintetizadas.

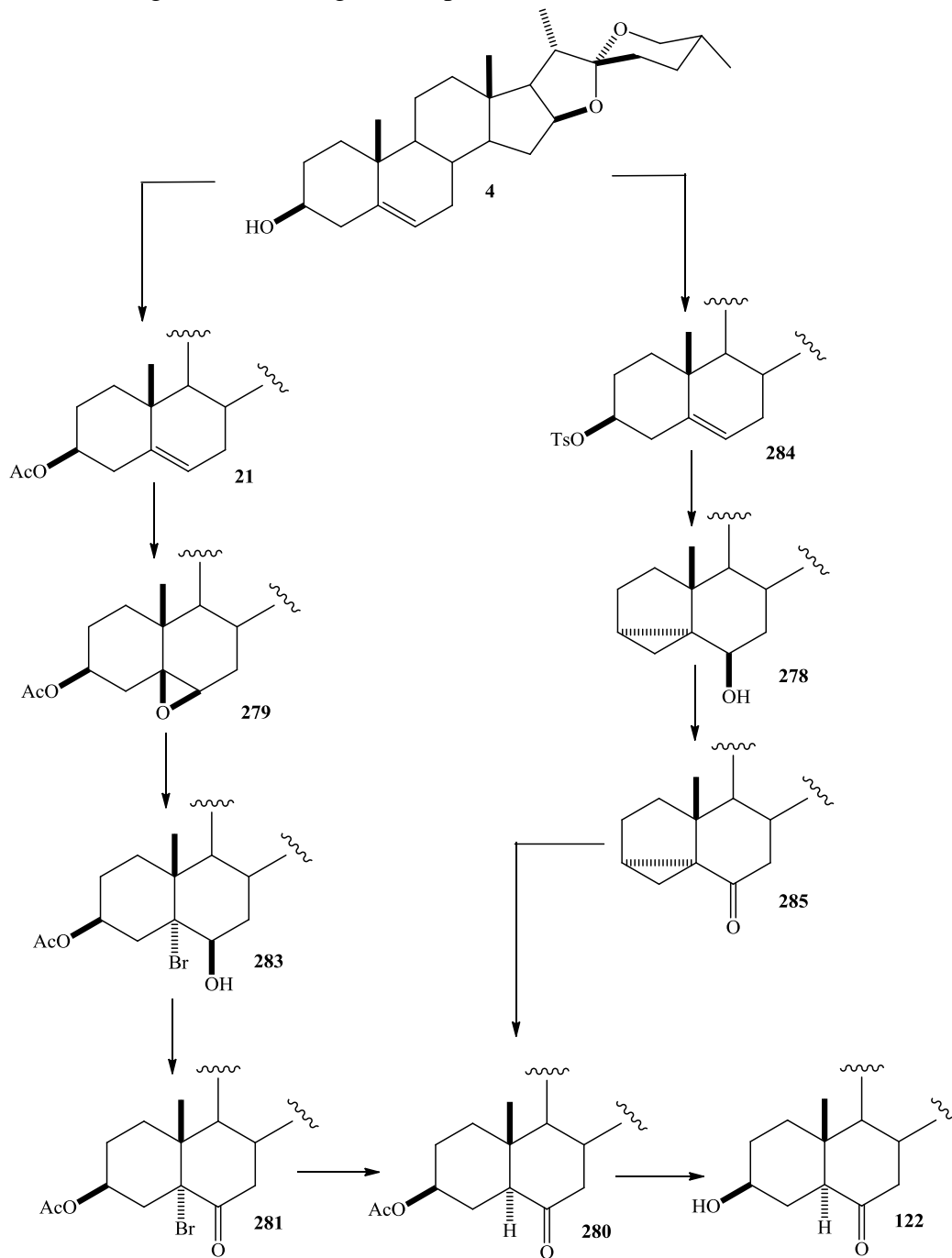
La etapa final consistió en la evaluación biológica de los derivados de interés sintetizados en las etapas previas, en dos dianas de interés: contra cáncer de mama y la evaluación de la actividad promotora de crecimiento vegetal. En cáncer de mama se utilizaron dos líneas celulares: la línea MDA-MB-231 (triple negativo) y la línea celular MCF-7 (cáncer maligno típico) obteniendo sus DL_{50} analizando la importancia estructural de estructuras colestánicas o espiroestánicas y su respuesta citotóxica. La segunda diana de interés fue como promotor de crecimiento vegetal utilizando como modelo de estudio el ensayo de inclinación de lámina de arroz para los compuestos de mayor importancia.



Esquema E. Valores de IC_{50} en μM para *MDA-MB-231* y *MCF-7*, y su efecto como promotor de crecimiento (100 % HB) vegetal de los esteroides de interés sintetizados

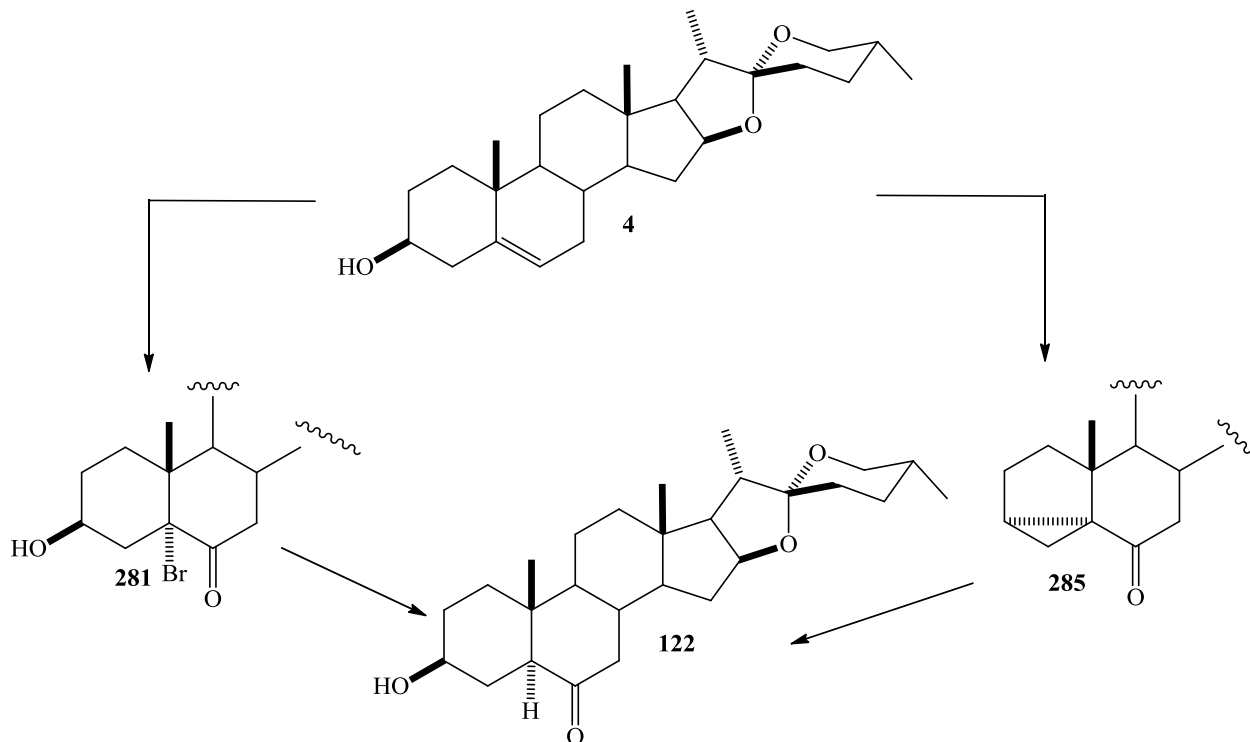
ABSTRACT

The present master's thesis work is divided into 5 parts, the first consisting of the synthesis of laxogenin from diosgenin (**1**), through the implementation of two stereoselective methodologies.



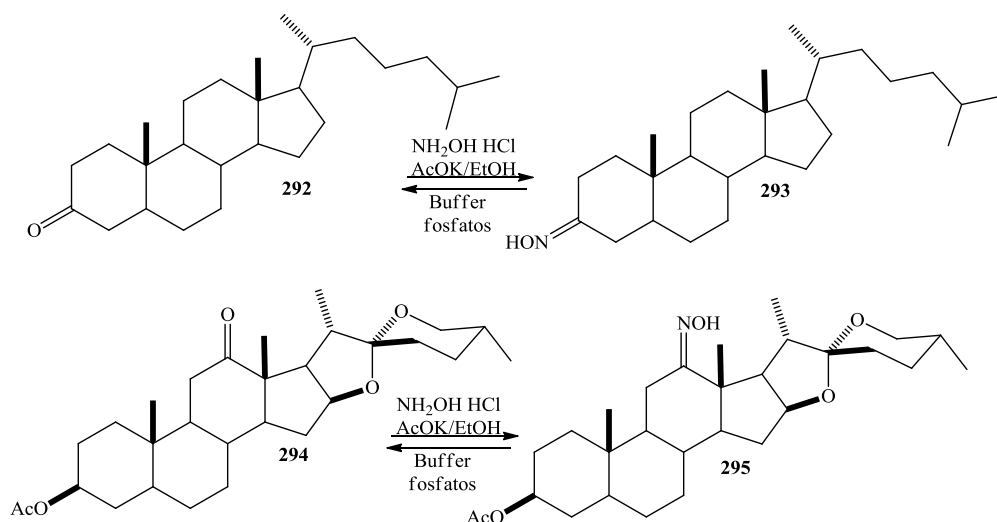
*Scheme A. Stereoselective routes of reaction for obtaining laxogenin (**122**).*

The second part consisted of the optimization of the two routes of reaction described above -in both cases using semi-continuous processes- which were designed analyzing the compatibility of consecutive reactions, therefore increasing from 70% to 82%, and from 65 % to 75% yield respectively in each route, allowing to increase the disposition of this steroidal derivative.



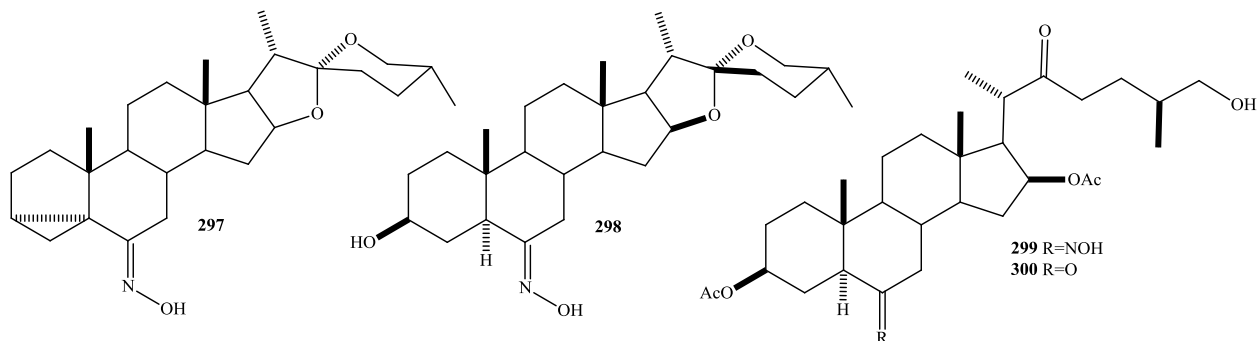
Scheme B. Routes of reaction optimized for obtaining laxogenin (122).

In the third part, a new protection-deprotection methodology for the keto-steroid carbonyl group was designed to prevent the enolization-acetylation side reaction, through the formation of oxime moiety.



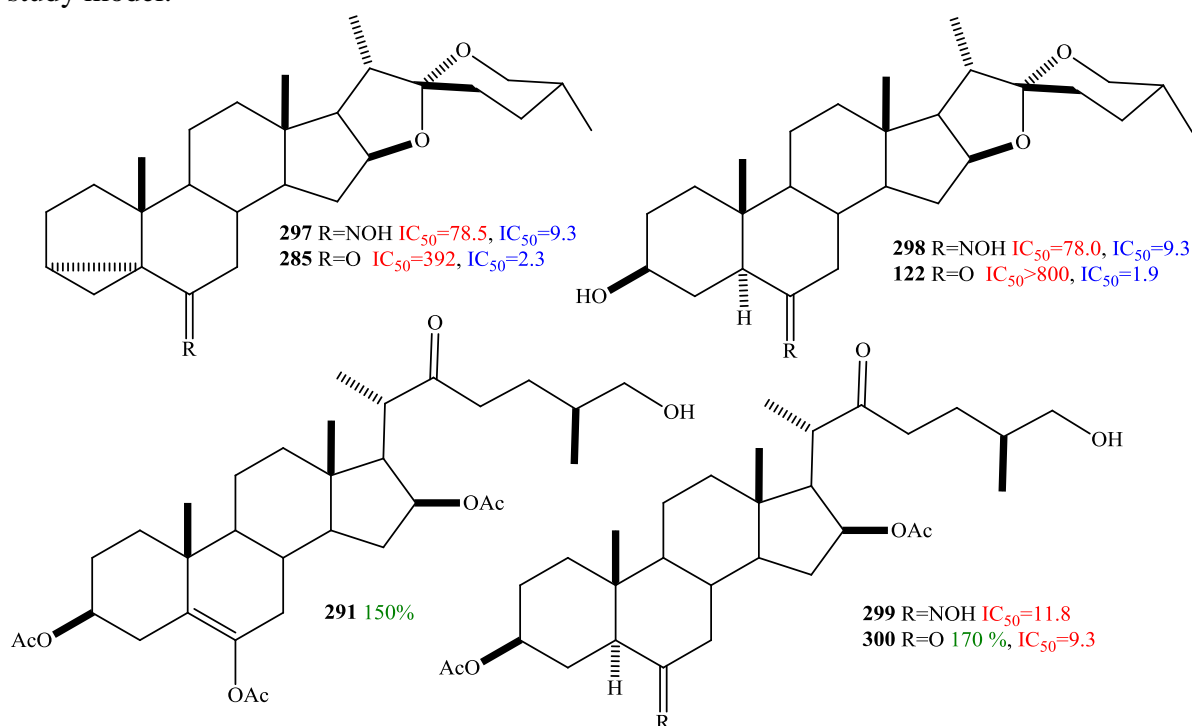
Scheme C. Use of oximes as a protective group.

The fourth part was dedicated to the synthesis of new steroidal ketone and hydroxyimminics derivatives that were whole characterized by spectroscopic techniques, optimizing all the reactions of obtaining these derivatives to increase their availability for their biological evaluation.



Scheme D. Structures of new steroidal ketone and hydroxyimminics derivatives synthesized.

The final part consisted in the biological evaluation of the derivatives synthesized in the previous parts in two targets of interest: against breast cancer and plant growth promoter activity. In breast cancer, two cell lines were used: the MDA-MB-231 cell line (triple negative) and the MCF-7 cell line (typical malignant cancer), obtaining their IC_{50} by analyzing the structural importance of cholestanic or spirostane framework and their cytotoxic response. The second target of interest was as a plant growth promoter using the rice leaf tilt test for the most important compounds as a study model.



Scheme E. IC_{50} values in μM for *MDA-MB-231* and *MCF-7*; and effect as a *plant growth promoter* (100% *HB*) of the steroids evaluated.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la época de los griegos (776 a. c. – 393 a. c.) en los antiguos juegos olímpicos, se ha mencionado el uso de extractos de hierbas para mejorar el rendimiento físico de los atletas [1] [2]. También los romanos (100 d.c.) utilizaban ciertas sustancias para mejorar el rendimiento de sus caballos durante peleas y juegos en el coliseo romano [2]. En los juegos de años modernos es muy común escuchar el término de dopaje, haciéndose notorio que en 1936 los nazis probaron sustancias sobre prisioneros con la finalidad de mejorar el rendimiento no solo de atletas sino también de su cuerpo militar, experimentando ya no con extractos de plantas, sino con compuestos puros como lo fue la testosterona [1][3], sustancias que fueron definidas como esteroides anabólicos. La investigación continuó inclusive después de la caída de los nazis; en 1958 el Dr. John B. Zueglar creó un esteroide anabólico llamado dianabol (**1**), el cual resultó ser un éxito en el equipo de levantamiento de pesas de Estados Unidos contra Rusia, que utilizaban testosterona, pero poco tiempo después se arrepintió de su invención debido a las muertes que éste ocasionó, por lo que el uso de esteroides se prohibió en todas las competencias deportivas, además de generar sistemas de detección de este tipo de sustancias [4].

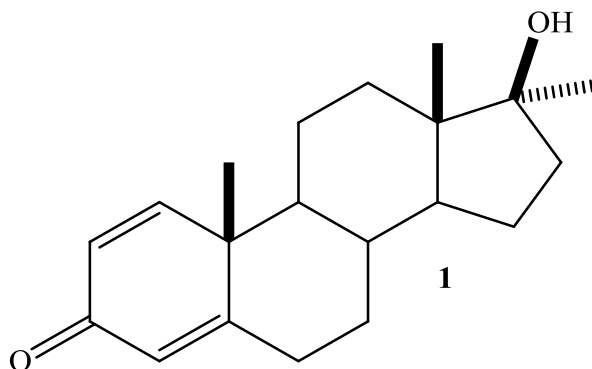


Figura 1. Dianabol (**1**).

Los esteroides han sido objeto de interés de estudio desde hace ya dos siglos, donde el compuesto que dio inicio fue el colesterol (**2**), compuesto descubierto por Michel Eugène Chevreul en 1812, quien diferenció por primera vez lípidos saponificables de los no saponificables de origen animal [5]; pero no fue sino hasta que Fischer, debido que este nuevo compuesto se encontraba en mezclas con los ácidos biliares, llegó a la conclusión de que los esteroides y los ácidos biliares, como el ácido cólico (**2**), tenían una gran similitud, que se determinó su base estructural a partir de estos [5], como se observa en la figura 2.

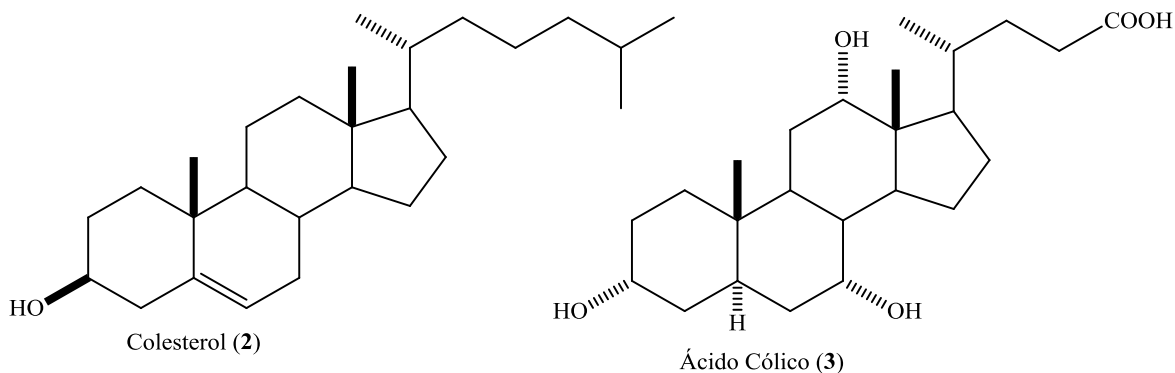


Figura 2. Estructura del colesterol y del ácido cólico.

La estructura de muchos esteroides fue completamente definida, gracias a grandes especialistas, entre los que descato el Dr. D. H. R. Barton, en base a sus estudios conformacionales de ciclohexanos fusionados [5] [6]. La numeración IUPAC, se presenta en la figura 3 [7].

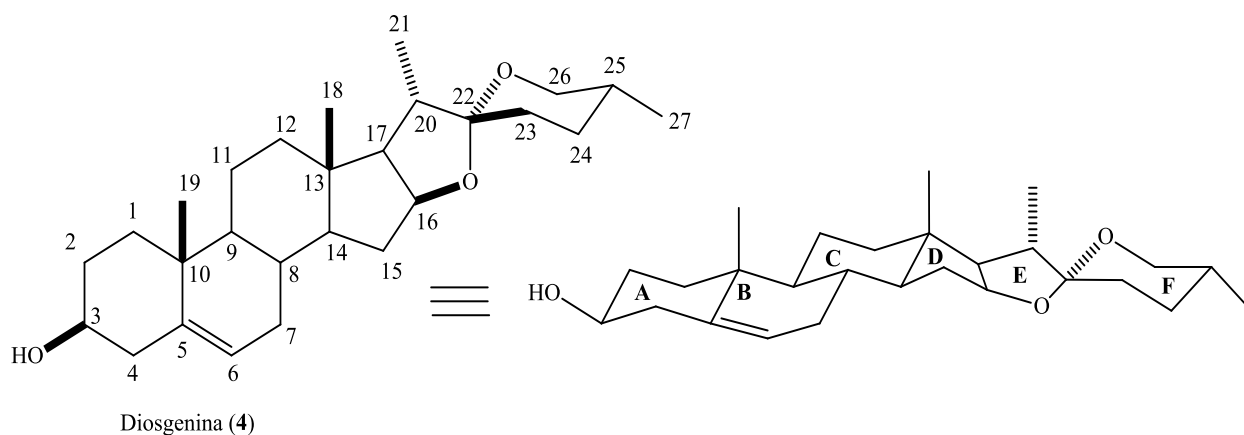


Figura 3. Numeración IUPAC para saponinas esteroidales, a) representación en un plano, b) representación en forma de silla.

Los esteroides incluyen una gran variedad de compuestos de origen natural, entre los que se encuentran los esteroides, ácidos biliares, hormonas sexuales, hormonas adrenocorticales, vitaminas D, saponinas y saponinas esteroidales, ecdisteroides, hormonas de crecimiento vegetal brasinoesteroides, alcaloides esteroidales, entre otros [5] [8] (figura 4).

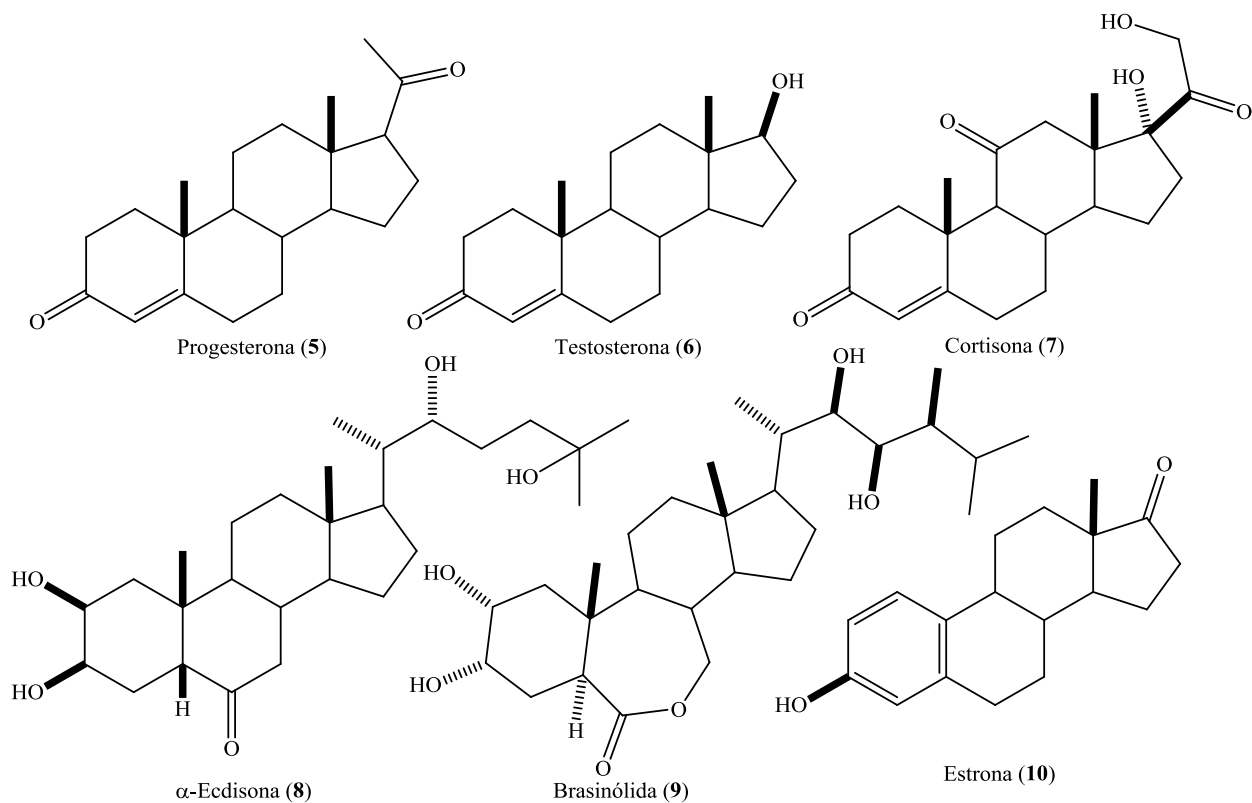
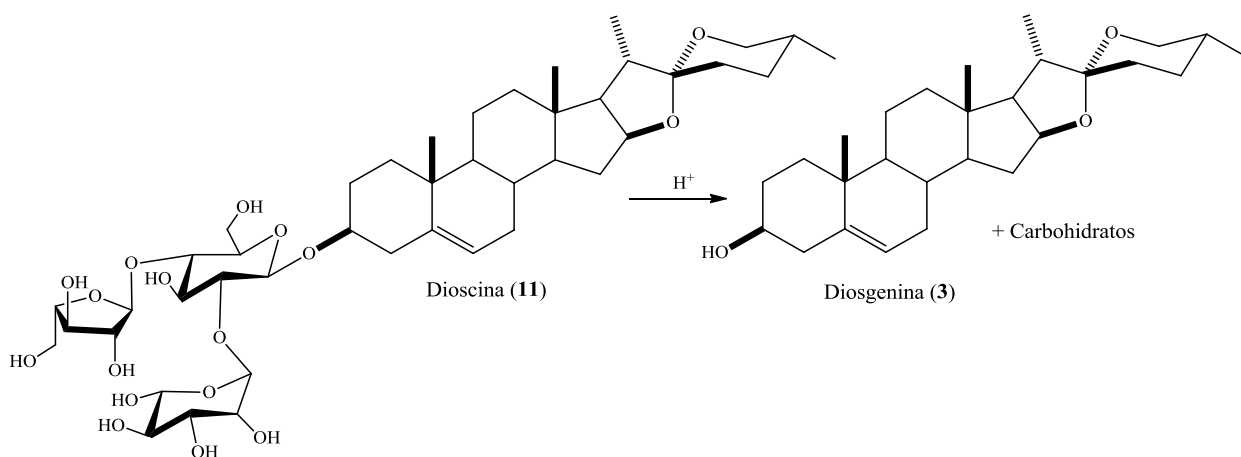


Figura 4. Esteroides más representativos de origen natural

Aunque cabe destacar que en la naturaleza la mayoría de los esteroides se encuentran en forma de saponinas (moléculas que están conformadas por una parte que contiene diversos carbohidratos y una aglicona denominada sapogenina); un ejemplo claro es la dioscina (saponina contenida en la *Dioscorea composita*) de la cual se obtiene diosgenina, como se observa en el esquema 1 [9].



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

Las saponinas se encuentran en una gran variedad de plantas de las familias de las agaváceas, liláceas y dioscoreáceas; estas últimas en los años 40s en México tuvieron una gran importancia. Debido a que en sus expediciones el Dr. Russell Marker descubrió que el barbasco (*Dioscorea composita*) contiene una alta concentración de diosgenina (figura 5), misma que se utilizó en la explotación industrial de progesterona [10].

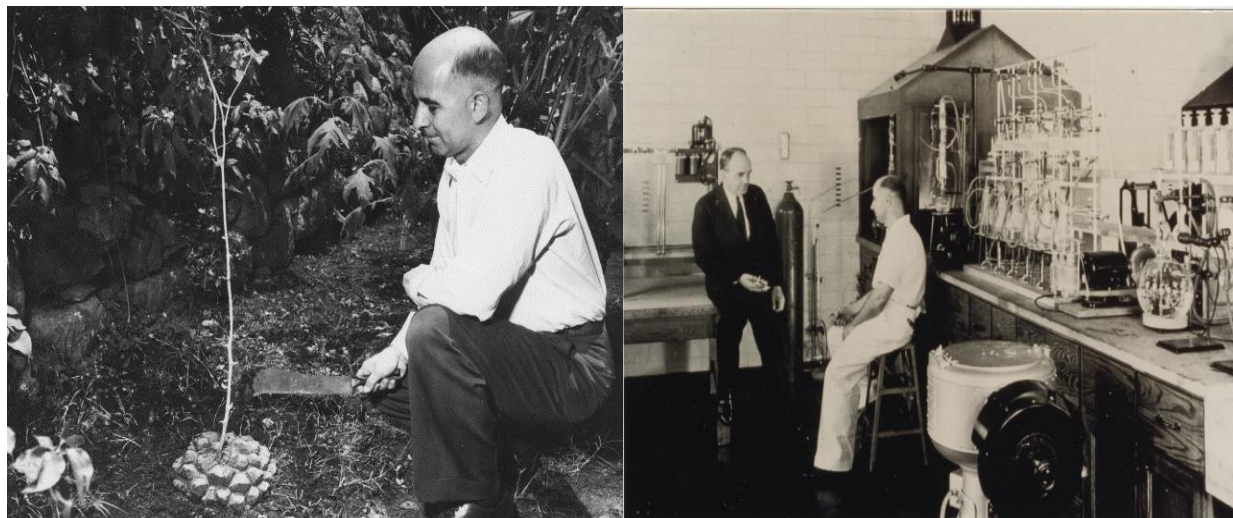


Figura 5. a) R. Marker en México recolectando barbasco, b) R. Marker en su laboratorio en Pensilvania trabajando en métodos de obtención de progesterona.

A partir de este punto la investigación en México generó gran interés y adquirió relevancia en el estudio de los esteroides, dentro de esta familia destacan dos tipos de aplicaciones para los mismos, como brasinoesteroides y anticancerígenos. Los primeros compuestos de estructura similar a la brasinólida, que han mostrado mejorar la elongación celular vegetal y acelerar los procesos de maduración en ciertos tipos de cultivos, pero se obtienen de origen natural en proporciones muy pequeñas, ver figura 6, haciendo poco rentable su aplicación; de aquí que diversos grupos de investigación han buscado el diseño y síntesis de promotores de crecimiento vegetal de este tipo, a fin de mejorar su disposición [11]. Por otro lado, los esteroides anticancerígenos han mostrado importante actividad contra cáncer de tipo hormona dependientes, disminuyendo la reproducción celular de células tumorosas, o induciendo muerte específica en este tipo de células, sin afectar células sanas [12], observando que la inserción de heteroátomos al núcleo esteroideal aumenta esta actividad.



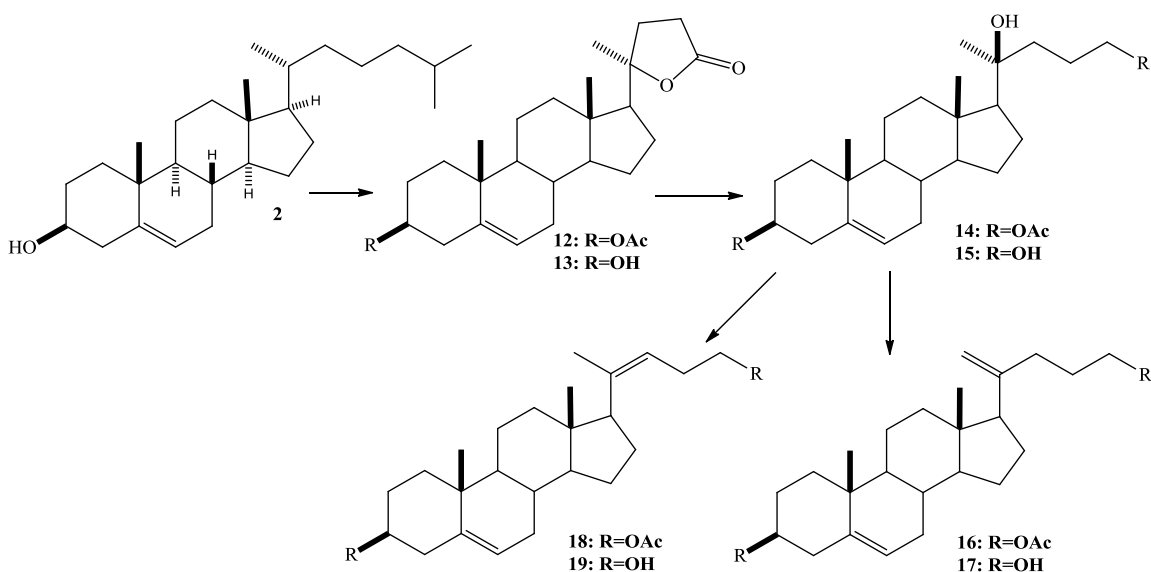
Figura 6. a) *Catharanthus roseus* y *Brassica napus*, fuentes naturales de *Brasinoesteroides* (BS). b) *Cinachyrella australiensis* fuente de oximas anticancerígenas.

La modificación de esteroides permite proseguir con una investigación multidisciplinaria que, en conjunto con pruebas biológicas, nos permitirá generar nuevas alternativas a dos de las necesidades primarias del ser humano: la salud y la alimentación; esto será posible a través del tratamiento de enfermedades (como el cáncer hormona-dependiente) con esteroides nitrogenados, y la obtención nuevos promotores de crecimiento vegetal para cultivos primarios. La estrategia que seguimos para lograr estos objetivos y contar con cantidades suficientes para el ensayo biológico, fue combinar las habilidades y experiencia en síntesis orgánica con técnicas ingenieriles de optimización para mejorar la producción y así la disponibilidad de estos nuevos compuestos.

2. ANTECEDENTES

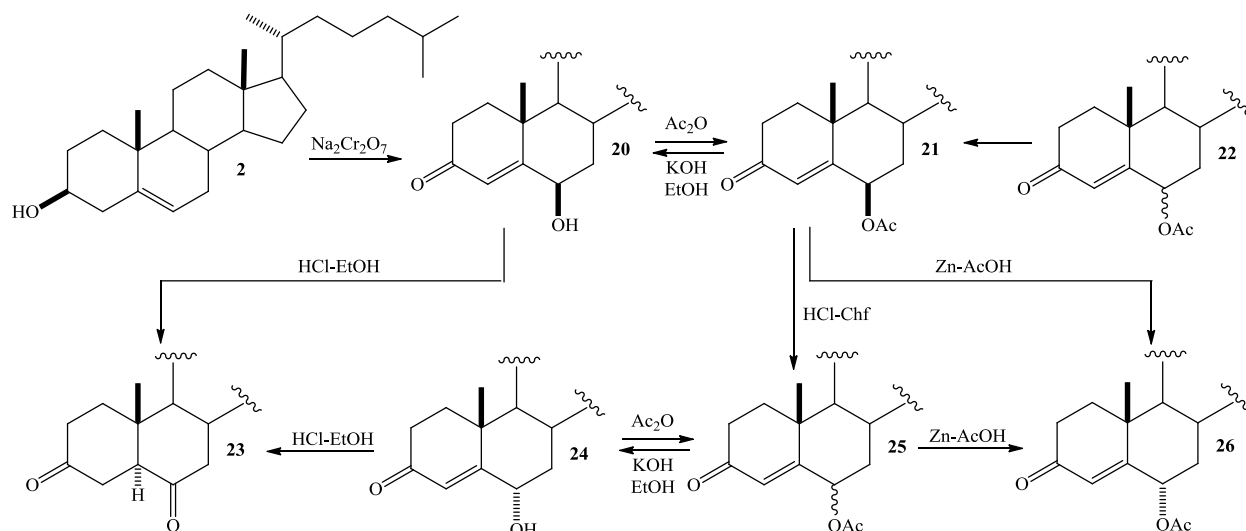
2.1 Modificaciones esteroideas.

Las primeras modificaciones realizadas sobre colesterol (**2**) fueron mediante reacciones de oxidación, un ejemplo interesante es el de Ryer y Genert quienes a partir de colesterol mediante una oxidación selectiva de la cadena lateral obtienen 22-hidroxlactonas (**12,13**) para posteriormente convertirlas en compuestos 26-oxigenados (**16-19**), modificando así una cadena lateral alifática a una cadena funcionalizada [13], como se observa en el esquema 2.



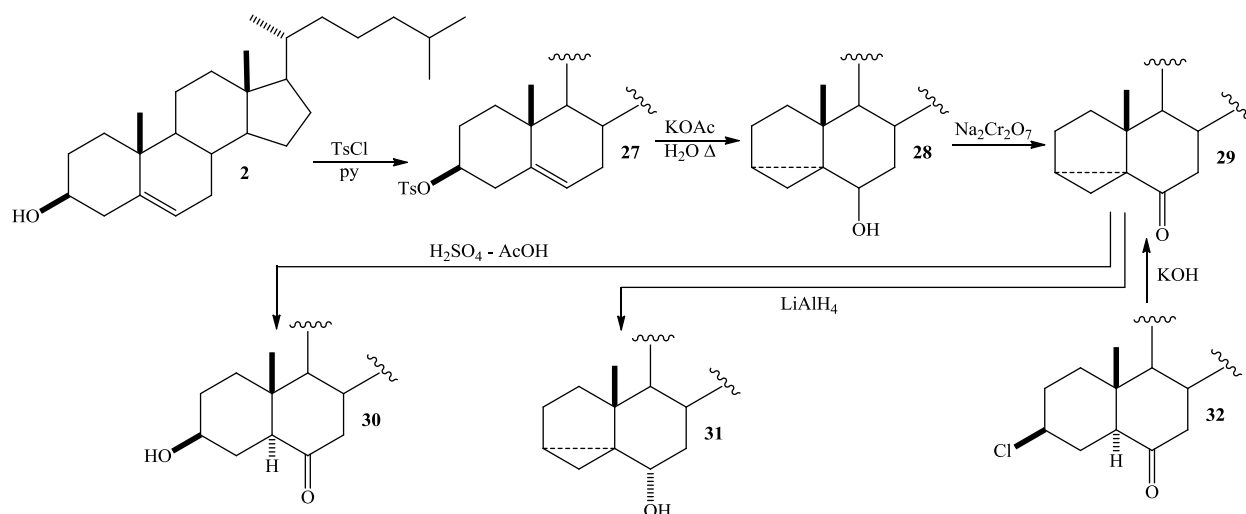
Esquema 2. Obtención de cadenas laterales oxigenas de colesterol.

De igual forma la modificación de los anillos A y B mediante oxidaciones ha sido de gran interés, sobre todo con oxidaciones controladas sin la ruptura de dobles enlaces, permitiendo generar un hidroxilo en la posición 6 del colesterol, mismo que en condiciones específicas como se observa en el esquema 3, se pueden oxidar, acetilar y/o eliminar selectivamente; además en medio ácido fue posible la isomerización de dobles enlaces para conducir a una variedad de compuestos oxigenados en posiciones 3 y 6 [5] [14].



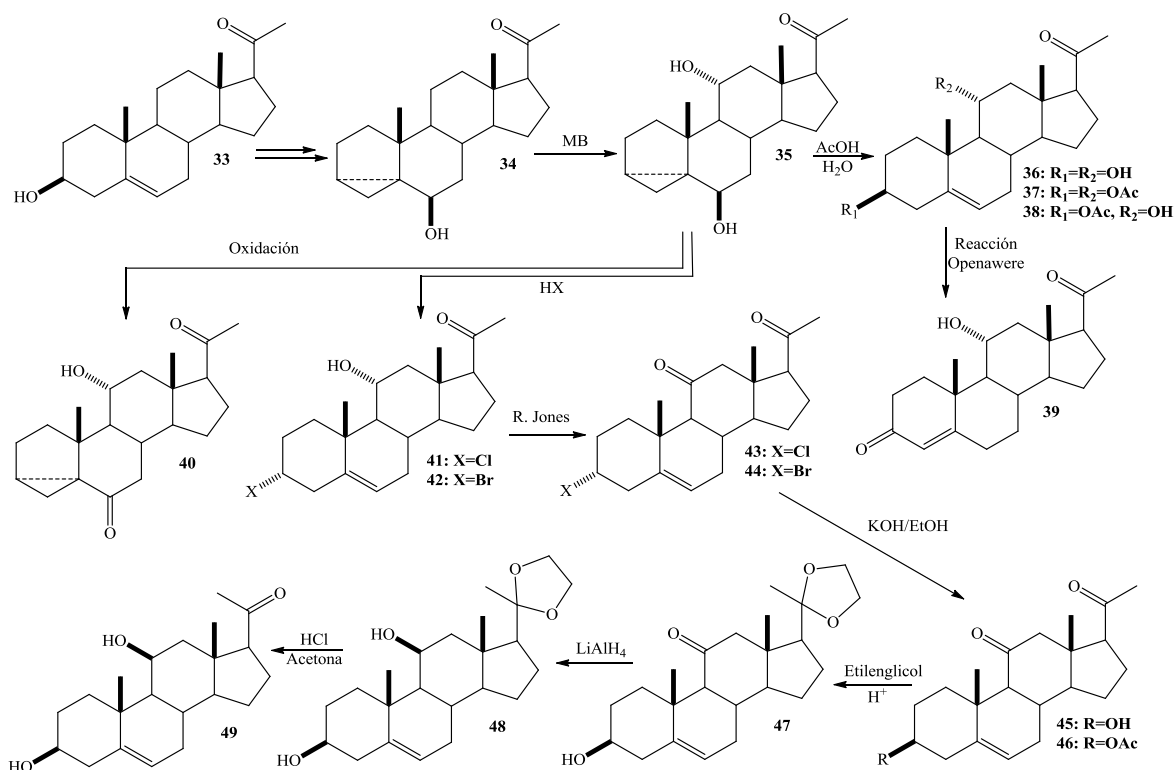
Esquema 3. Oxidaciones selectivas de los anillos A y B de colesterol.

Por lo que modificar selectivamente el anillo A y B de los esteroides se vuelve de interés por las repercusiones sintéticas. Otro método de modificación, es el empleo de *i*-esteroides, como lo realizó Wallis y colaboradores, obteniendo derivados 6-oxoesteroidales de colesterol, con la ventaja de ser reacciones estereoselectivas, que permiten la formación de nuevos productos hidroxilados estereoespecíficos, como se observa en el esquema 4 [15] [16].



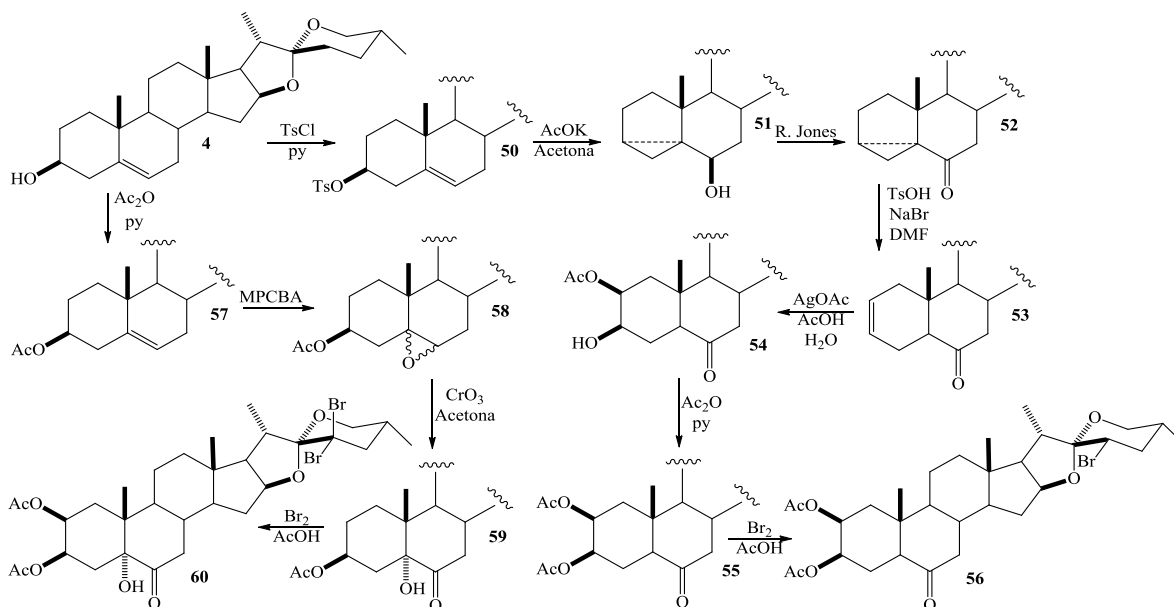
Esquema 4. Modificaciones estereoselectivas en los anillos A y B de colesterol vía *i*-esteroide.

Pero cabe destacar que la aplicación de estas metodologías no se limita al colesterol, por ejemplo Wechter y Murray modificaron pregnenolona, formando el *i*-esteroide en el anillo A, y a partir de este compuesto funcionalizar la posición 11 sin afectar los anillos A y B, que posteriormente condujo a la obtención de 11 α -hidroxi, 11 β -hidroxi y 11-cetopregnenolonas, como se observa en el esquema 5 [17].



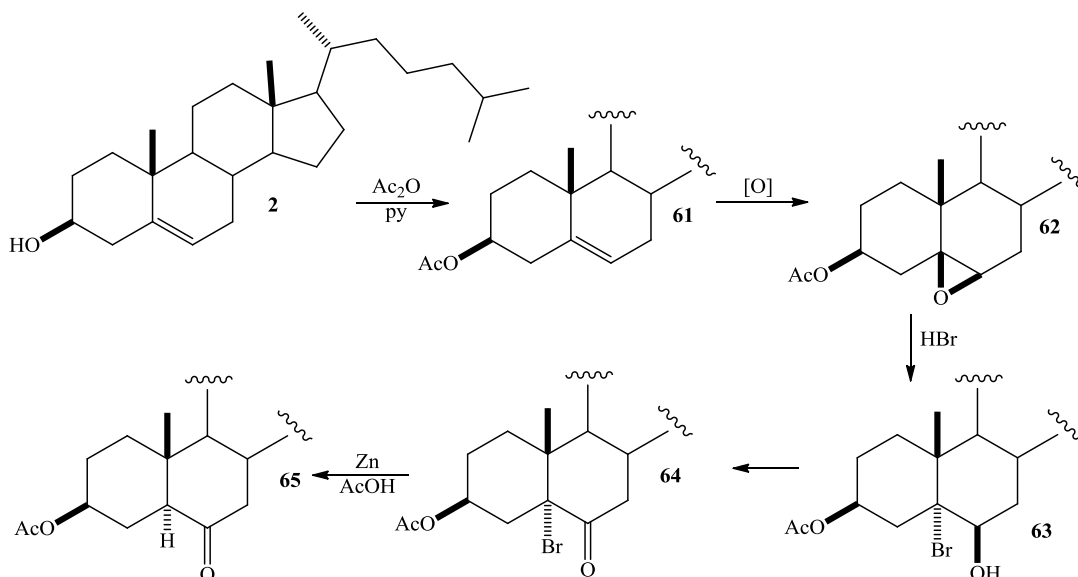
Esquema 5. Obtención de 11 α -hidroxi, 11 β -hidroxi y 11-cetopregnenonas via *i*-esteroide.

De igual forma la diosgenina ha sido modificada por este tipo de metodologías como nos muestra Zaldo y colaboradores, quienes obteniendo el *i*-esteroide de diosgenina, procedieron a realizar no solo oxidaciones en la posición 6, también les permitió obtener compuestos $\Delta^{2,3}$ y derivados 2,3-dihidroxiados con la finalidad de obtener ecdisteroides, identificados por sus significativas actividades biológicas [18], como se puede observar en el esquema 6.



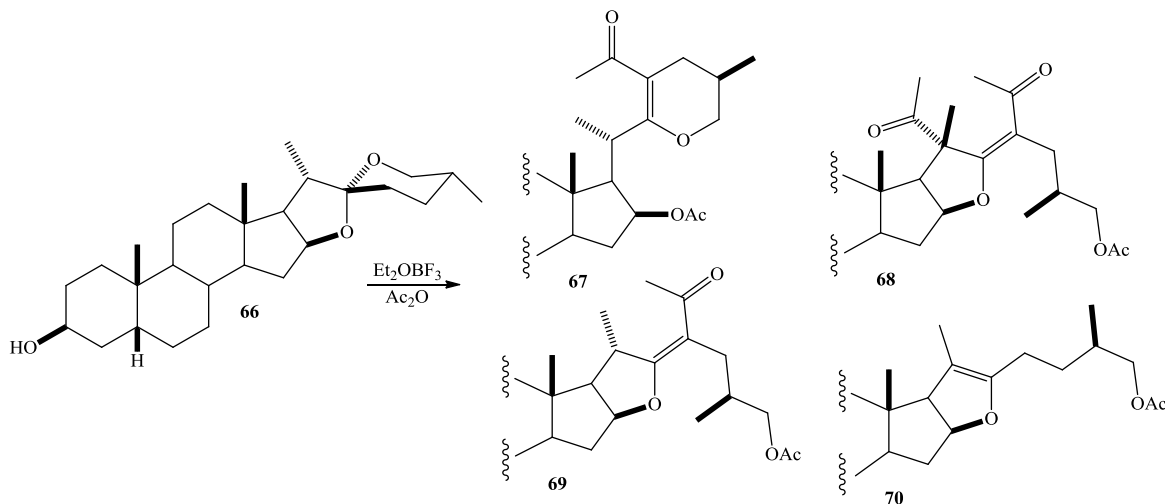
Esquema 6. Síntesis de ecdisteroides vía *i*-esteroide de diosgenina.

Pero cabe destacar que esta metodología vía *i*-esteroide no es la única para obtener compuestos 6-oxoesteroideos estereoselectivamente. En el reporte de Iglesias y colaboradores, se muestra una ruta de síntesis que implica la obtención estereoselectiva de un epóxido sobre el doble enlace tanto del colesterol como de diosgenina, con posteriores reacciones selectivas, llevando a obtener derivados 6-oxocolestánicos con el H-5 α característico [19], como se observa en el esquema 7.



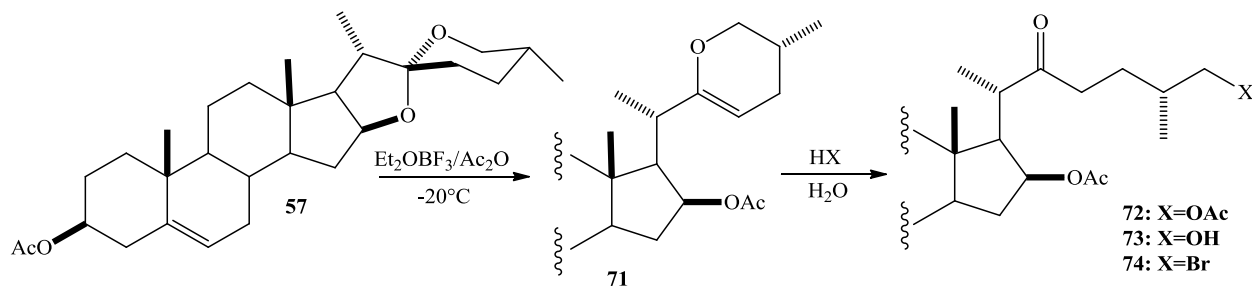
Esquema 7. Obtención de laxogenina mediante epóxido- β,β como precursor.

No obstante los esteroides espiroestánicos, dada su particular reactividad en los anillos E y F permiten transformaciones para la obtención de derivados furosténicos por apertura en medio ácido; Sandoval y colaboradores han reportado ampliamente este tipo de modificaciones, probando no solo diversos ácidos de Lewis sino también diversas sapogeninas, y en base a la relación de estos se pueden obtener diversos productos [20] [21], como se observa en el esquema 8.



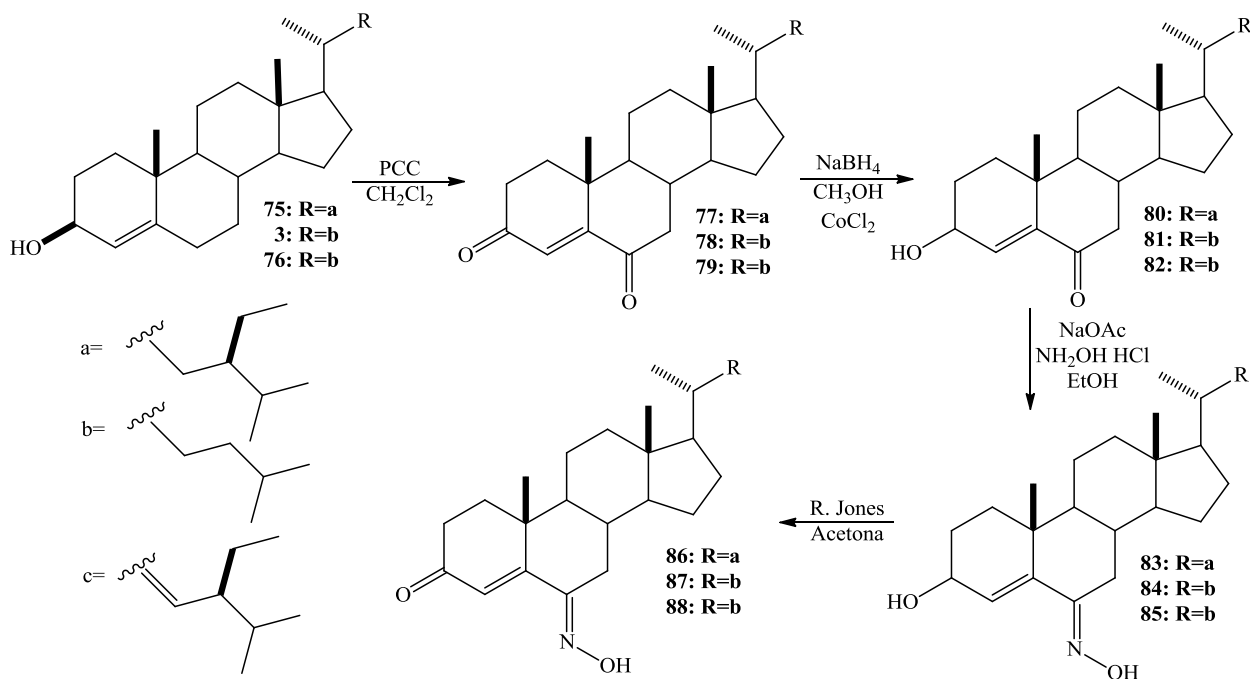
Esquema 8. Apertura del espiroacetal de sapogeninas en medio ácido.

Recientemente Sandoval y colaboradores han desarrollado una metodología de apertura del espirocetal para la obtención de compuestos 22-oxoesteroideos, que han demostrado gran interés debido a su similitud estructural con los brasiñoesteroides, mismas reacciones que a bajas temperaturas se aísla un intermediario dihidropiránico, lo que da pauta a la explicación del mecanismo de formación de este tipo de compuestos [22], como se observa en el esquema 9.



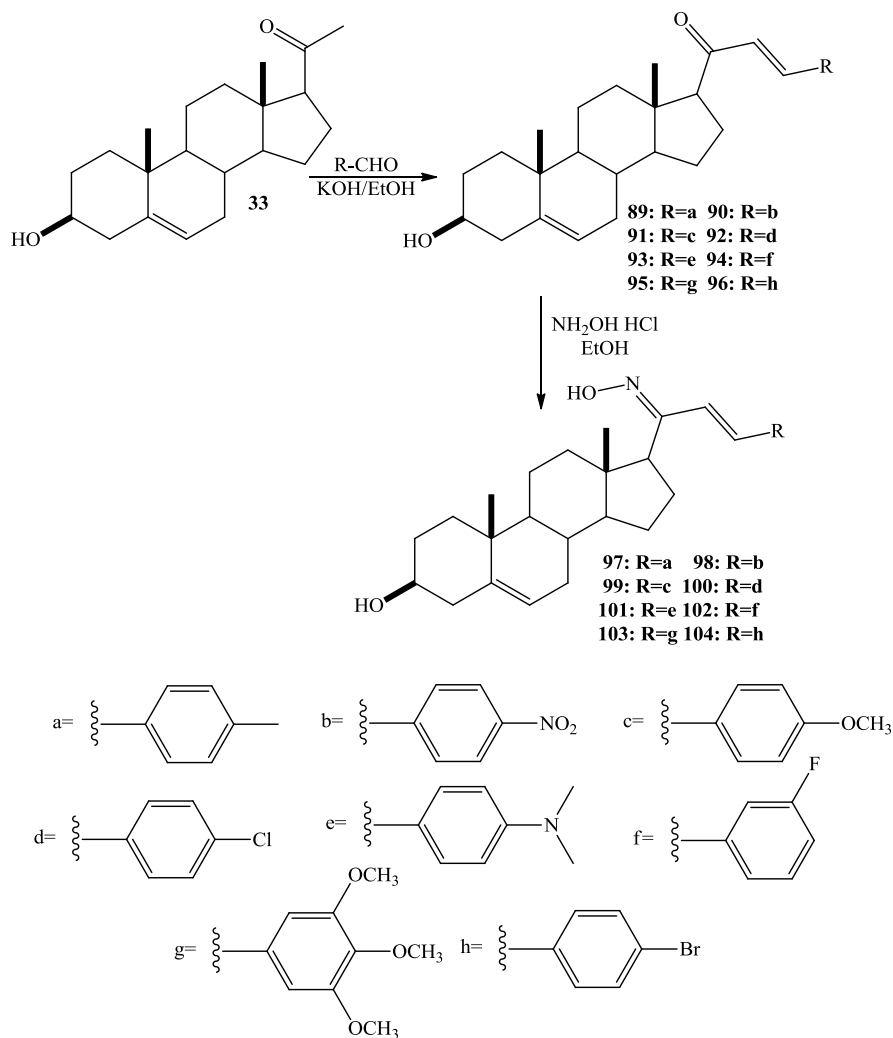
Esquema 9. Obtención de derivados 22-oxoesteroideos vía dihidropirano.

Los compuestos cetónicos han mostrado gran importancia debido a sus actividades biológica que presentan, pero también son excelentes materias primas para diversas reacciones químicas, un ejemplo de este tipo de reacciones son las reacciones de condensación, donde un caso específico es la formación de oximas esteroideas, como lo realizó Cui y colaboradores, quienes sintetizaron 6 hidroximas esteroideas, mimetizando a oximas de origen natural del género *Cinanchyrella spp.* mediante una condensación selectiva en el carbonilo en posición 6 de diversos colestanos [23], como se observa en el esquema 10.



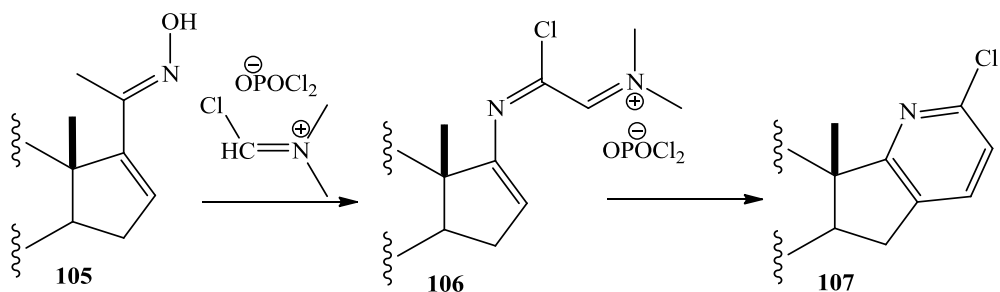
Esquema 10. Obtención de 6-hidroximas esteroideas.

Inclusive recientemente Lone y colaboradores han sintetizado oximas α,β -insaturadas esteroidales a partir de pregnenolona obteniendo una variedad de compuestos hidroximínicos aromáticos, como se observa en el esquema 11, donde además observó que dichos compuestos presentaban actividad biológica importante como antimicrobianos y antioxidantes, dando así pauta a la actividad biológica de este tipo de derivados esteroidales [24].

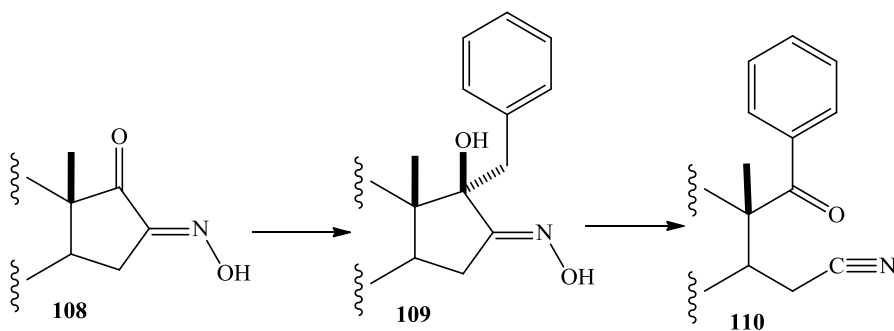


Esquema 11. Obtención de oximas α, β insaturadas esteroidales aromáticas.

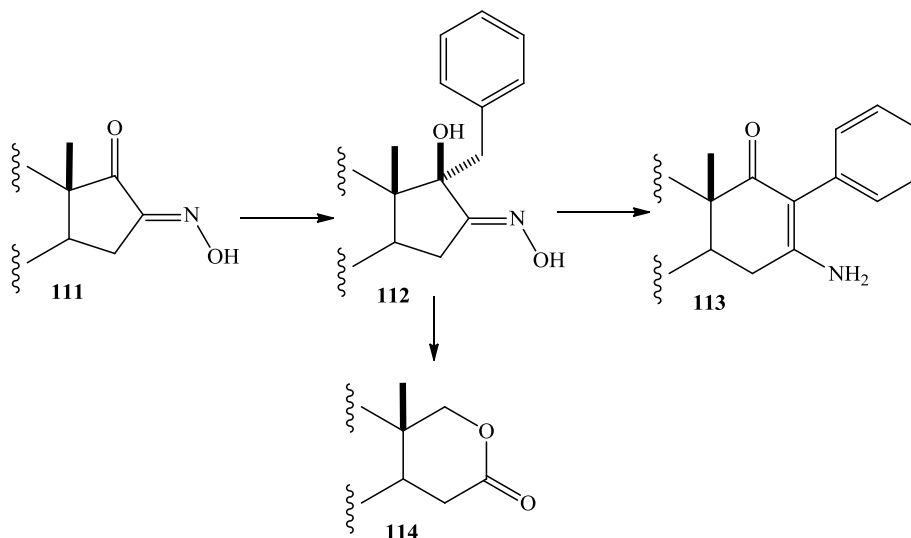
Además las oximas han sido de interés en el estudio sintético debido a los rearrreglos que con ellas se pueden realizar, no solo el rearrreglo de Beckmann, como realizaron Abmen y colaboradores a partir de una oxima α,β -insaturada obtuvieron un compuesto aromático [25] (ver esquema 12a), como Miljković y colaboradores quienes a partir de una α -ceto oxima obtienen un grupo nitrilo [26] (ver esquema 12b), o en condiciones diferentes logran una ciclación de una α -hidroxioxima [27] (ver esquema 12c), mostrando la gran reactividad del grupo hidroximino en un esteroide.



Esquema 12a. Rearreglos de oximas esteroidales.



Esquema 12b. Rearreglos de oximas esteroidales.

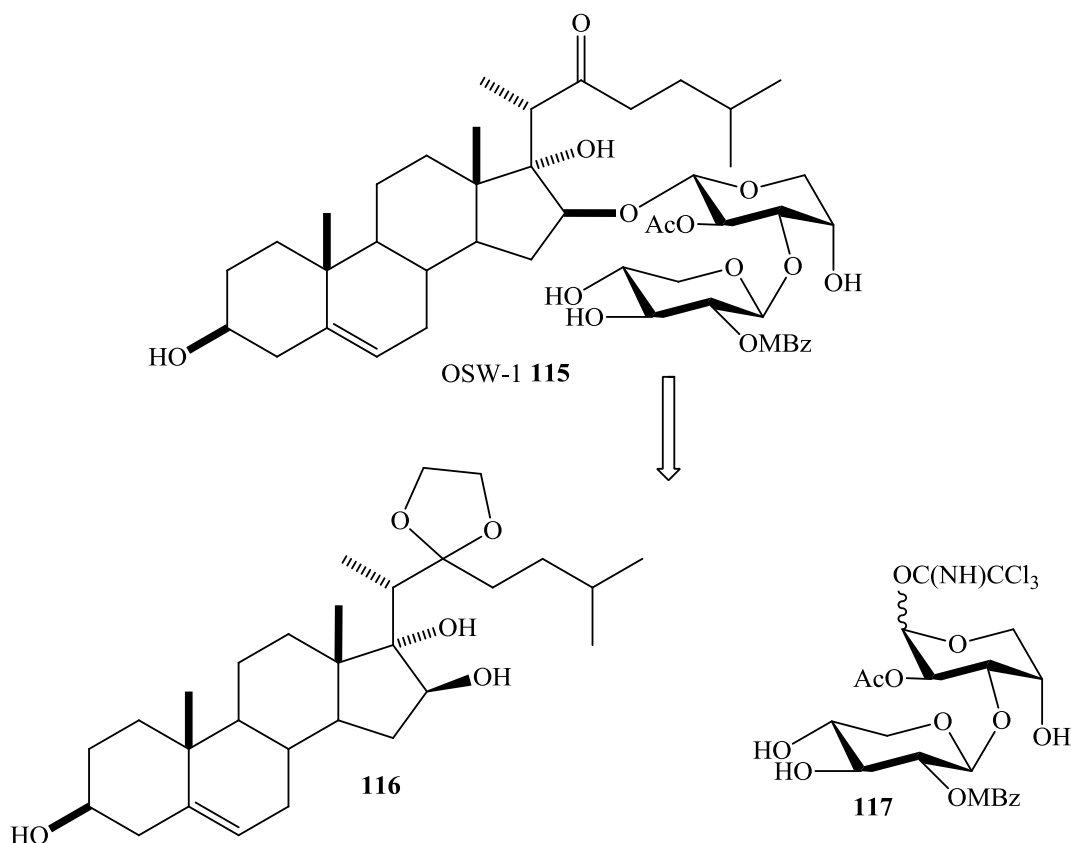


Esquema 12c. Rearreglos de oximas esteroidales.

La modificación esteroidal para la obtención de nuevos compuestos se vuelve de interés, donde la optimización de las etapas de preparación de materias primas cobra relevancia, debido a que la aplicación y aprovechamiento de compuestos con alto valor químico-biológico depende de la capacidad de producción, por lo que la inserción de procesos semi-continuos a nivel laboratorio se vuelve objeto de investigación de interés.

2.2 Esteroides como anticancerígenos.

A nivel mundial se busca aportar nuevos agentes terapéuticos con farmacóforos idóneos para abatir diversos tipos de cáncer, dando paso al descubrimiento de una gran variedad de moléculas esteroidales con actividad anticancerígena. Lamentablemente, la extracción de fuentes naturales y/o la síntesis total de compuestos esteroidales no ha proporcionado cantidades suficientes para su ensayo biológico, donde la síntesis parcial puede ser la solución a este problema. Uno de los compuestos que ha mostrado importante actividad anticancerígena es el OSW-1, mismo que fue aislado por primera vez por Kubo y colaboradores en 1992, de los bulbos de la *Ornithogalum saundersiae*, evaluando su actividad como inhibidor del ciclo de fosfodiesterasa AMP, obteniendo un valor de IC_{50} 6 veces mejor que la papaverina (inhibidor por excelencia) mostrando ser así un compuesto con asombrosa actividad anticancerígena [28]; la limitante para su estudio se debía a su baja biodisponibilidad en el bulbo, por lo que años después Deng y colaboradores reportan la primera síntesis del OSW-1 a partir de la dihidroandrosterona, con 14 etapas de reacción y con un rendimiento neto del 6% [29], como se aprecia en el esquema 13.



Esquema 13. Análisis retro-sintético de OSW-1 elaborado por Deng.

Debido a la poca disponibilidad y bajos rendimientos en la obtención de este compuesto, fue difícil continuar su investigación, pero eso no impidió que otros grupos como el de Morzycki y colaboradores diseñaran nuevas metodologías de síntesis de este producto natural reduciendo la síntesis a 7 pasos; no obstante, durante esta búsqueda se encontraron nuevos análogos al OSW-1 (ver figura 7) que acertadamente fueron evaluados biológicamente a la par con éste en diversas líneas celulares de cáncer, dando resultados sorprendentes en estos análogos, abriendo así el panorama de investigación no solo a la síntesis del OSW-1 sino a la búsqueda de análogos con actividad similar o mejorada [30].

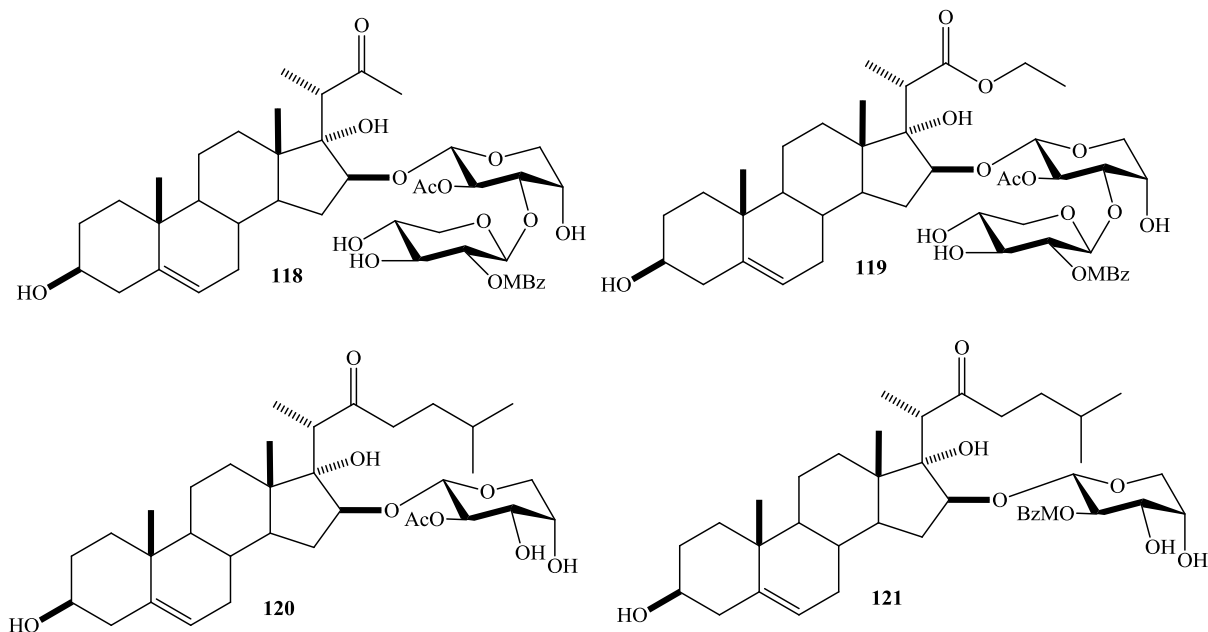
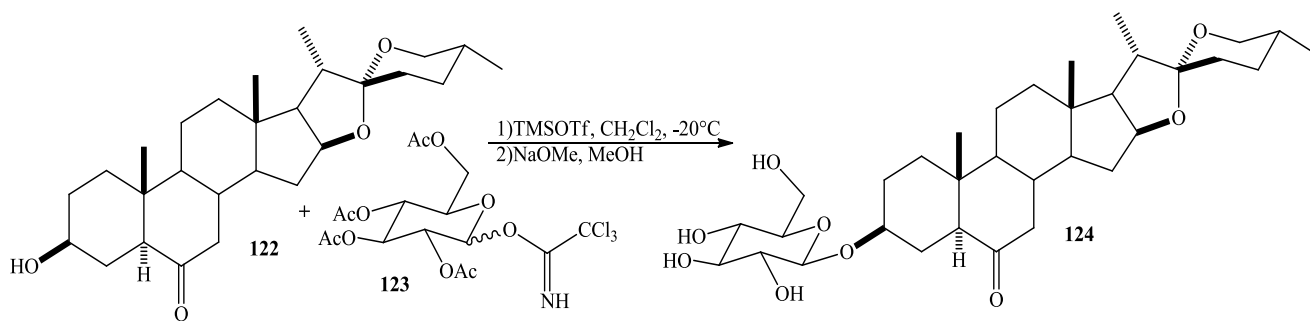


Figura 7. Análogos del OSW-1 con actividad como anticancerígenos.

Recientemente se ha buscado la síntesis de nuevos análogos del OSW-1, por lo que Sandoval y colaboradores, sintetizaron un nuevo análogo a partir de laxogenina, insertando una molécula de glucosa en la posición 3, evaluándolo en líneas celulares de cáncer cervicouterino, CaSki, HeLa y ViBo, obteniendo buenos resultados con un efecto 50% mayor al control, permitiendo generar nuevos compuestos con potencial actividad anticancerígena [31].



Esquema 14. Síntesis de gluco-laxogenina como análogo del OSW-1.

En la búsqueda de nuevos análogos no solo se ha buscado modificar la base esteroidal, sino también los carbohidratos, como lo fue en el caso de Zhang y colaboradores que sintetizaron derivados de digitoxigenina con carbohidratos en la posición 3, carbohidratos en los que uno de sus grupos hidroxilos fue sustituido por grupos amino o grupos azida (ver figura 8), mostrando que la posición 3' al ser sustituida por uno de estos grupos, su actividad biológica aumenta considerablemente, y es mayor aun si el grupo sustituyente es el grupo amino, donde ellos por medio de cálculos teóricos explican que se debe a una mejor interacción con los receptores humanos del NKA con los cardenólidos neo-glucosídicos debido a los puentes de hidrógenos formados, facilitando la muerte celular por apoptosis de células cancerígenas [32].

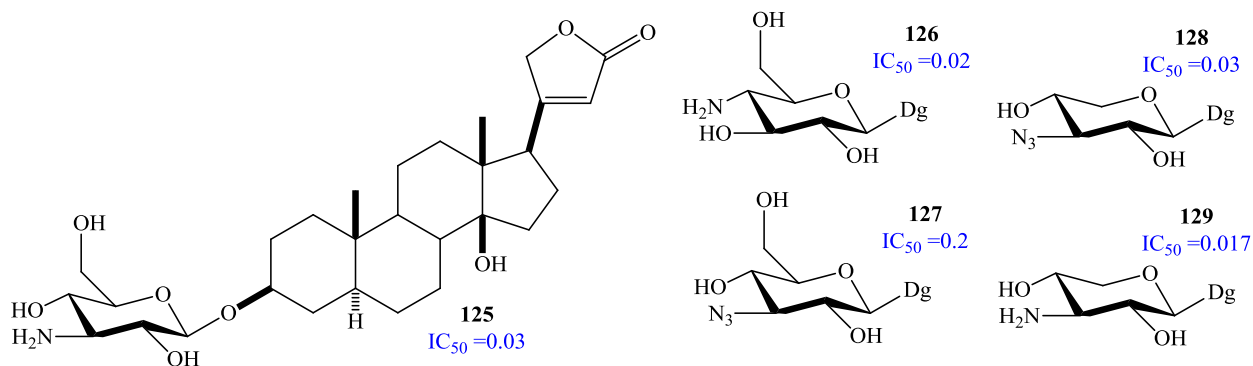


Figura 8. Derivados cardenólidos glucosídicos nitrogenados citotóxicos (A549).

Pero cabe destacar que no solo los compuestos con carbohidratos unidos a esteroides han mostrado actividad importante como anticancerígenos, un ejemplo son los derivados de estradiol (ver figura 9), los cuales además con un análisis cuantitativo de relación estructura-actividad realizado por Muranaka, permitió predecir la actividad de compuestos que aún no se habían sintetizado, dando inicio a la combinación de dos áreas con el fin de diseñar compuestos con presumible actividad biológica destacada y modelarlos, antes de llevar a cabo su síntesis [33].

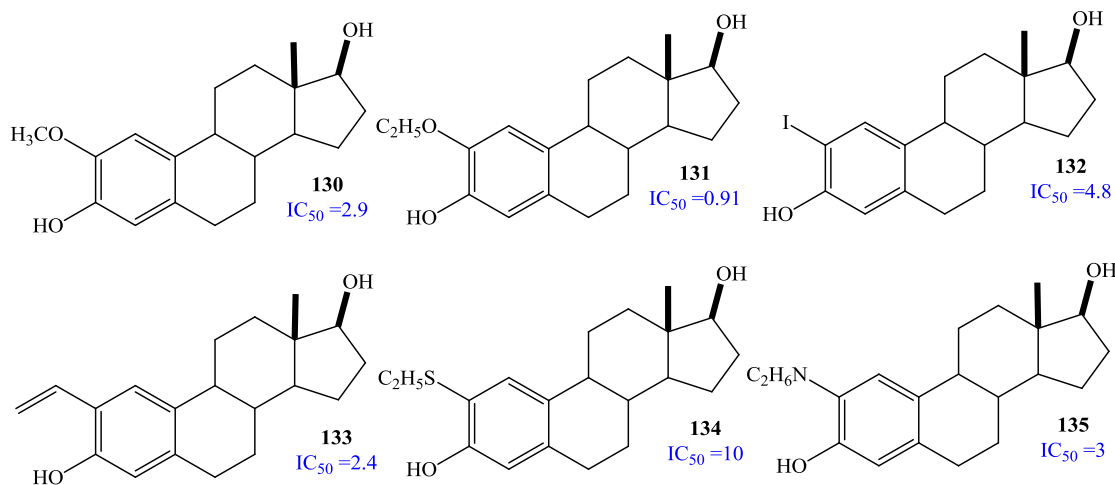
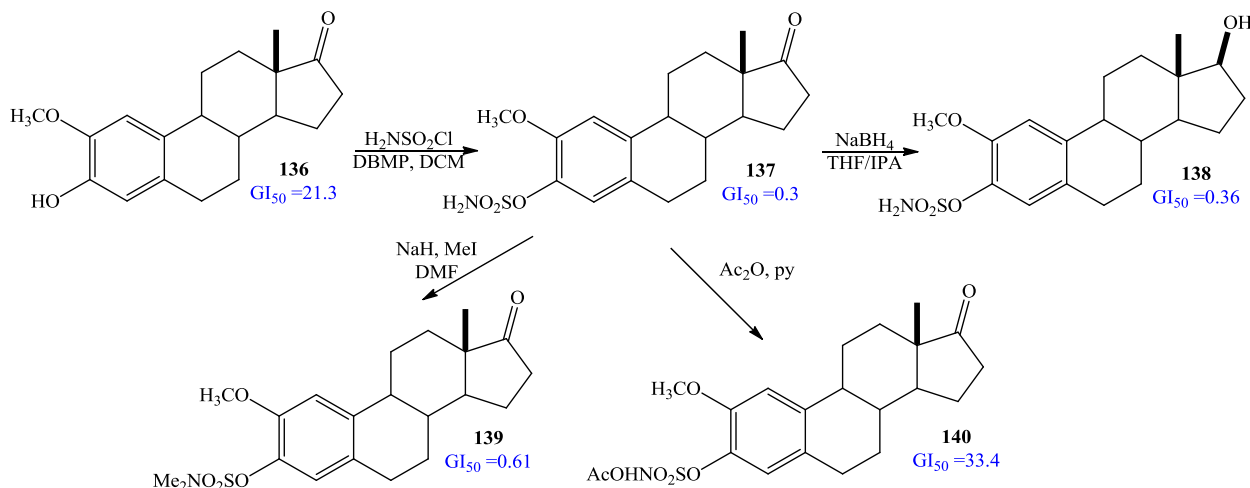


Figura 9. Datos de IC_{50} (μM) de estructuras análogas del estradiol con actividad anticancerígena en cáncer cervicouterino.

Paralelamente, Leese y colaboradores trabajaron sintetizando derivados azufrados de estrógenos (ver esquema 15) los cuales fueron evaluados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 obteniendo resultados prometedores, generando compuestos que causan más del 50 % de inhibición del crecimiento celular a concentraciones menores de 10 μM , ensayos que continuaron con estos compuestos en diversas líneas celulares de cáncer, observando que en cáncer de ovario, próstata y melanoma, mostraron resultados similares, siendo todos estos cáncer del tipo hormona-dependiente; sin embargo no descartaron que fueran activos en otros tipo de cáncer, dado que mostraban buenos resultados, aunque no de la misma magnitud [34].



Esquema 15. Datos de IG_{50} (μM) de derivados azufrados de estrógenos en la línea celular MCF-7.

Con estos resultados en el anillo A, Leese y colaboradores continuaron trabajando modificando el anillo D, en específico agregando grupos CN en el C-17 de manera directa o indirecta obteniendo nuevos derivados azufrados y además nitrogenados, que al evaluarlos en las líneas celulares de cáncer MCF-7 y MDA MB-231 obtuvieron concentraciones inhibitorias mejores que los primeros compuestos y además menores en un 30 % a la línea celular DU-145, la cual es un control de citotoxicidad a células sanas en el área de cáncer de mama, como se observa en la figura 10, permitiendo así obtener dosis efectivas para estos tipos de cáncer en un rango de operación aceptable para su estudio *in vivo* [35].

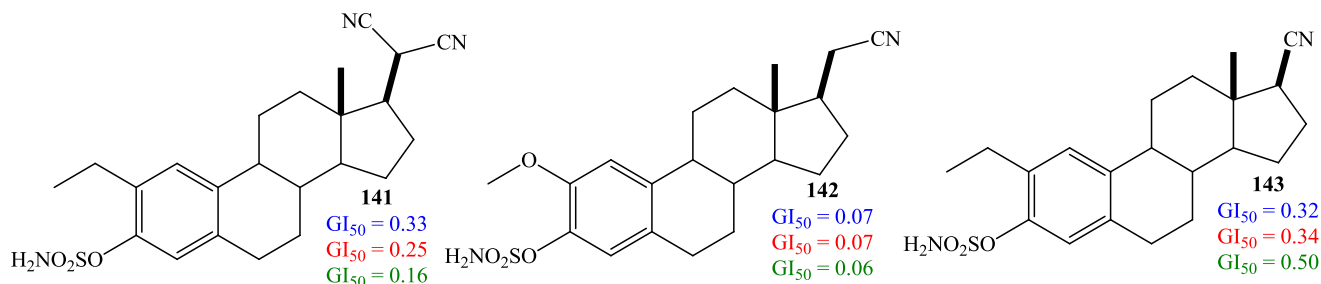


Figura 10. Datos de IC_{50} (μM) de derivados azufrados y nitrogenados con actividad anticancerígena (MCF-7, MDA-MB-231 y DU-145).

Como se ha observado átomos de nitrógeno tienden a potenciar la actividad como anticancerígenos cuando se insertan en compuestos esteroidales; de tal forma que Robinson y colaboradores observaron que compuestos nitrogenados esteroidales (ver figura 11), tenían la capacidad de inhibir la enzima 5α -reductasa, enzima vital para la reproducción de células de cáncer de tipo hormona-dependiente, ya que metaboliza la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), siendo esta última muy fácilmente reconocido por receptores androgénicos, a los cuales se les atribuye estar presentes en muchos tipos de cáncer hormona-dependiente, por lo que al inhibir esta enzima se limita indirectamente la producción de DHT, donde los esteroides nitrogenados mostraron altos porcentajes de inhibición en derivados 2 y 3 azaesteroidales [36].

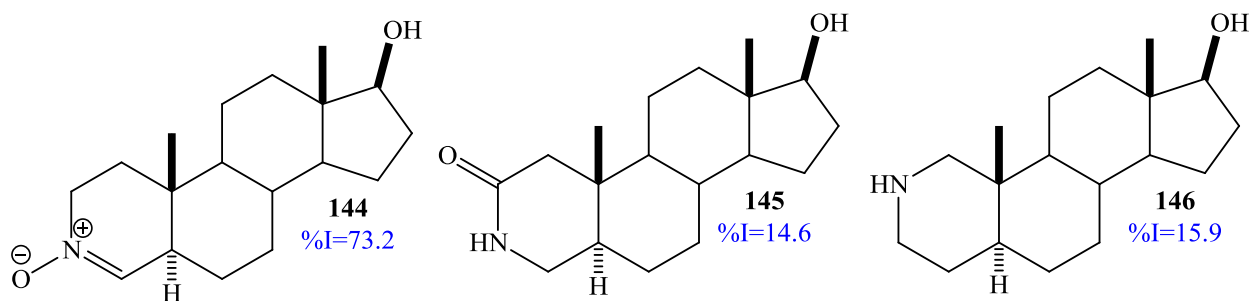


Figura 11. Azaesteroides inhibidores de la enzima 5α -reductasa y su porcentaje de inhibición.

Simultáneamente Jindal y colaboradores sintetizaron alquilamino derivados de oximas esteroidales a partir de **147** mediante condensación con hidroxilamina, como se muestra en la figura 12 y posterior alquilación, los cuales fueron evaluados *in vitro* como antineoplásicos en más de 60 líneas celulares, donde los compuestos **148-152** sobresalieron por presentar LC_{50} muy prometedores para ser considerados en pruebas biológicas *in vivo*, observando que el grupo hidroximino aun en el anillo A o el D aumenta considerablemente la actividad biológica [37].

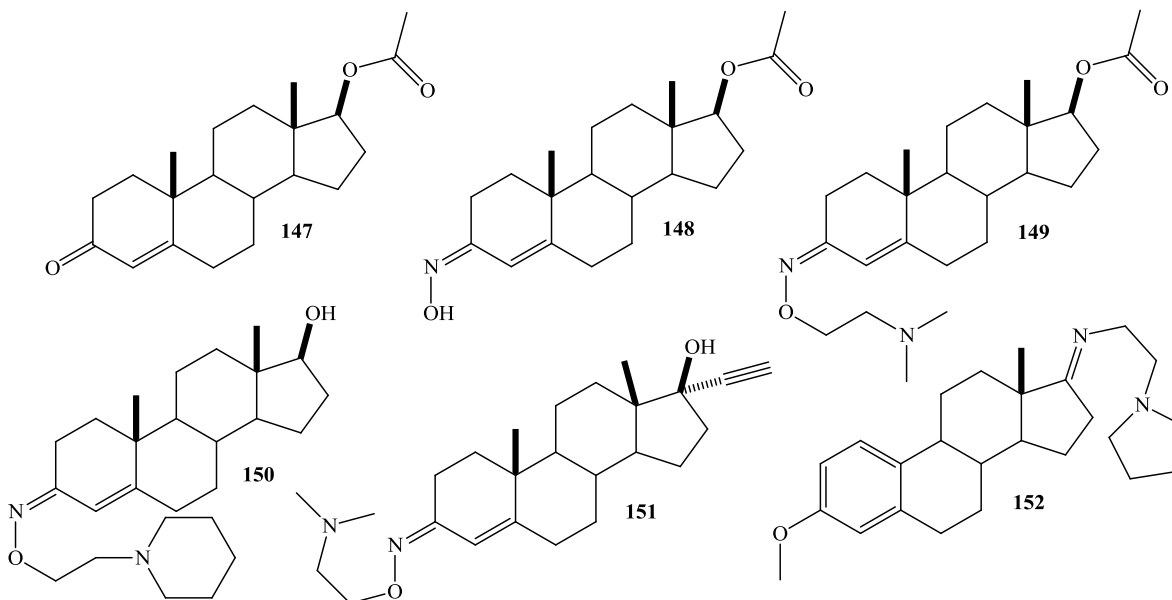
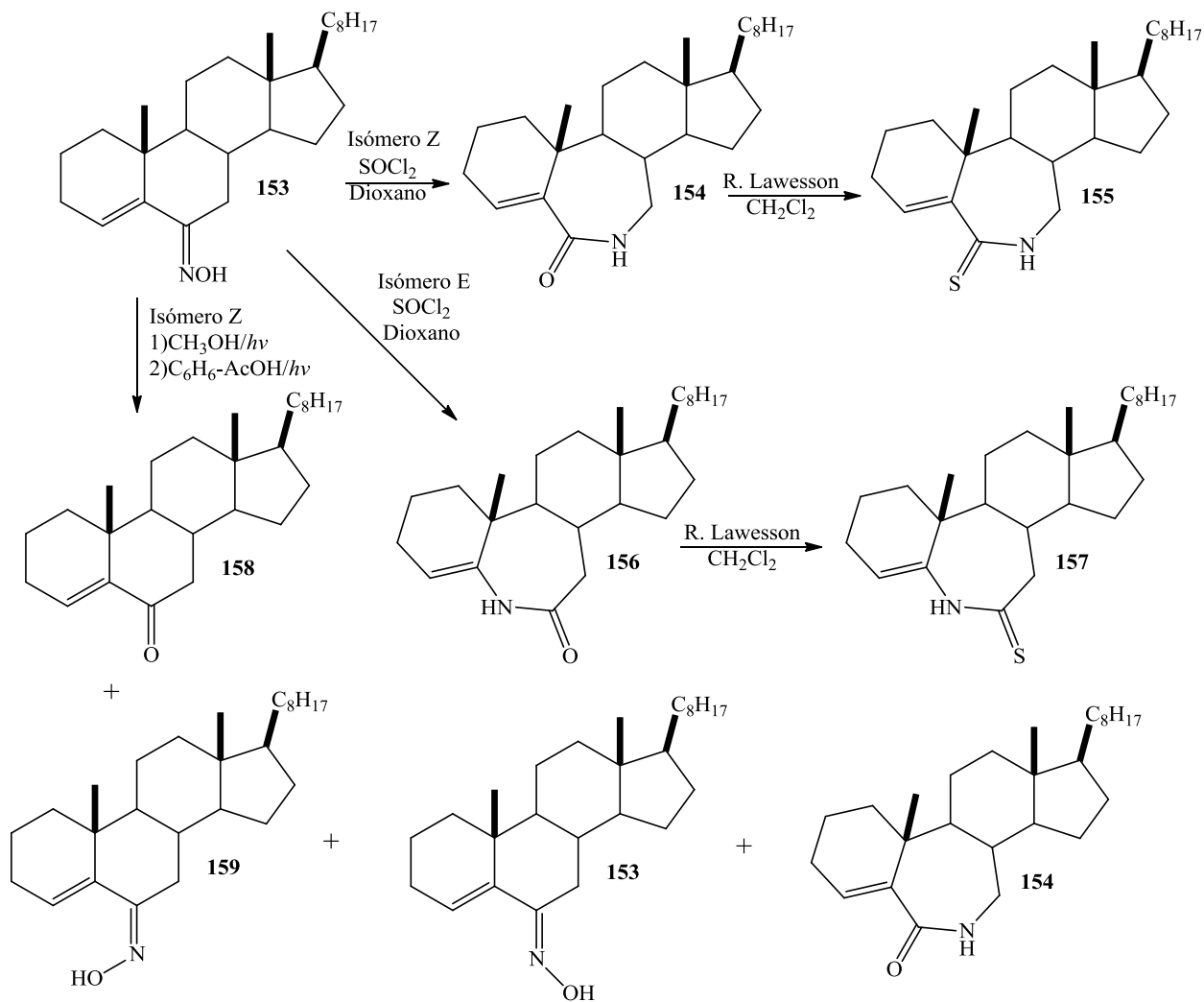


Figura 12. Oximas esteroidales con actividad antineoplásica relevante.

Debido a que las oximas esteroidales han mostrado importante actividad biológica, ha crecido el interés en su síntesis y evaluación biológica, por lo que Krstić y colaboradores sintetizaron nuevas oximas esteroidales las cuales convirtieron en sus respectivas lactamas y posteriormente en tiolactamas a partir de **153** (ver esquema 16), compuestos que además fueron evaluados en líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa y CML K562 en los que se demostró que las lactamas y las oximas eran las que presentaban mejor actividad biológica, mostrando que no era necesario realizar más modificaciones a las oximas, ya que estos compuestos por sí solos presentan una importante actividad biológica propia [38].



Esquema 16. Obtención de oximas, lactamas y tiolactamas con actividad anticancerígena.

Con el amplio espectro de actividad biológica que han mostrado las oximas, cobró relevancia conocer si la posición del grupo oxima era importante para la misma, por lo que Cui y colaboradores realizaron un amplio estudio sobre la actividad anticancerígena de las oximas, no solo variando la posición de éstas, sino también la cadena lateral de los esteroides empleados, observándose primero que las oximas en la posición 6 aumentan considerablemente la actividad biológica, sin embargo en la posición 3 o 7 disminuye considerablemente; por otro lado cadenas

laterales saturadas favorecen dicha actividad anticancerígena, como se observa en la figura 13 [39] [40].

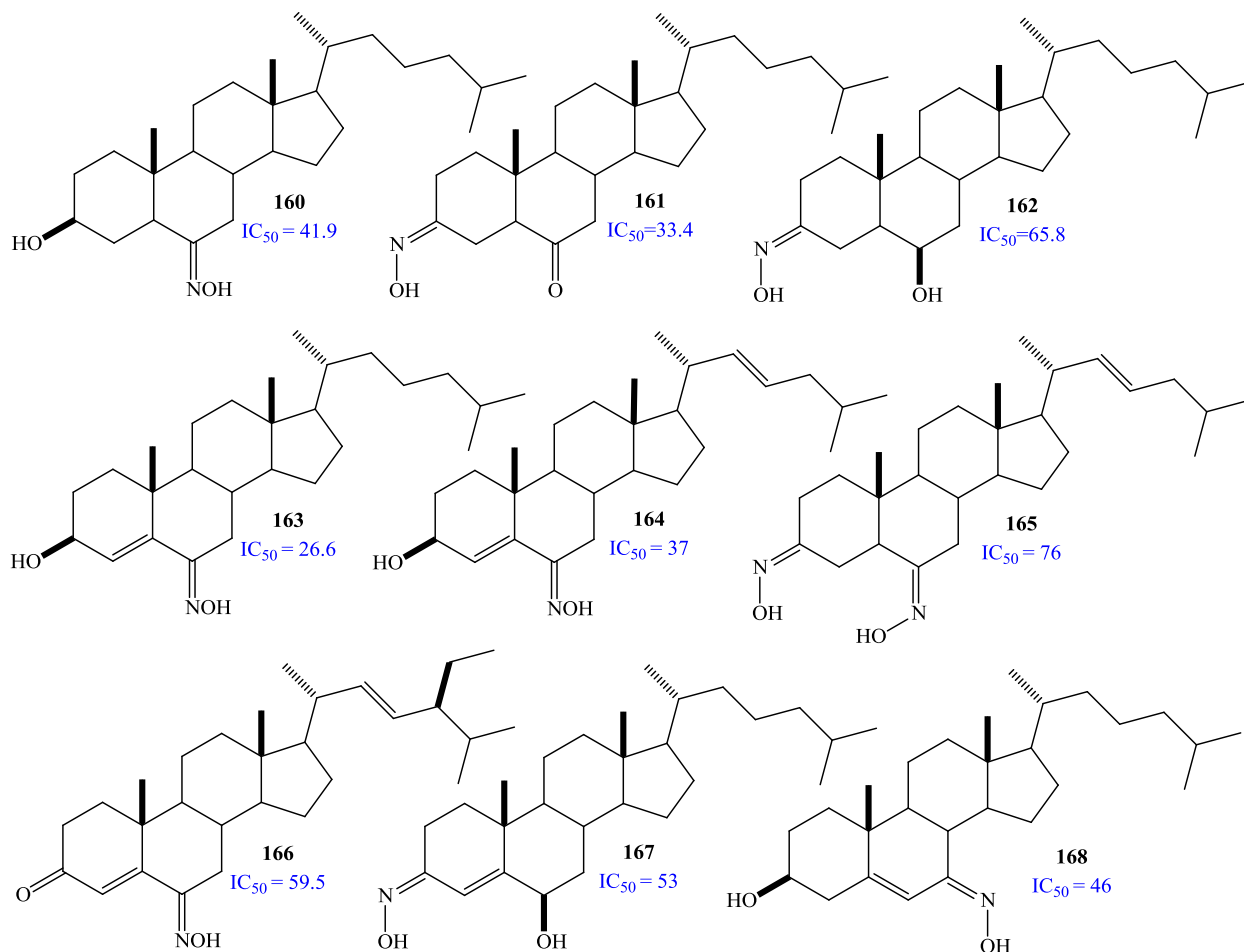
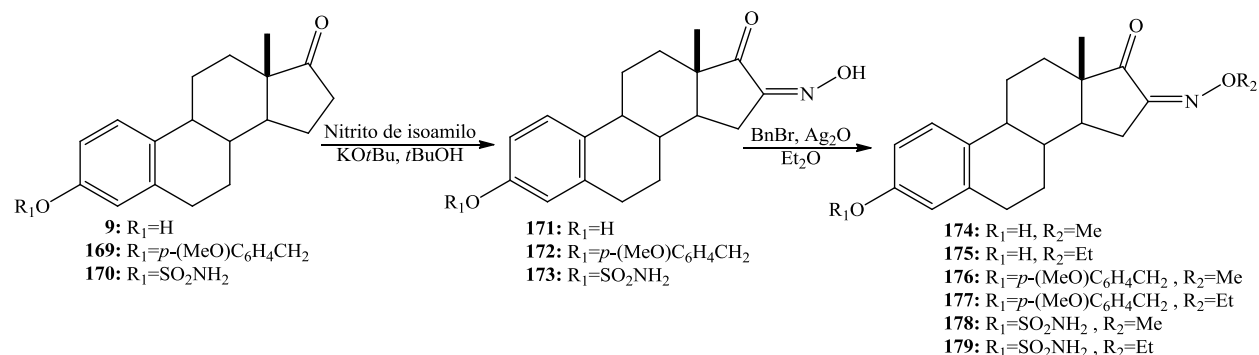


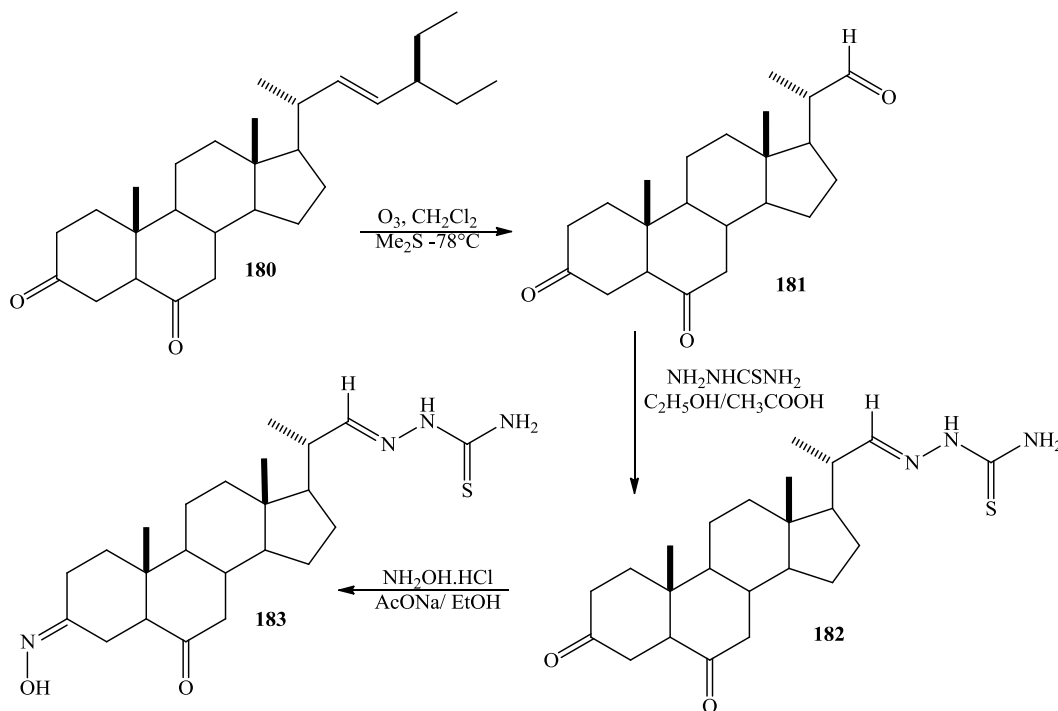
Figura 13. Oximas esteroidales en anillos A-B con diversas cadenas laterales y datos de su actividad antitumoral.

Recientemente, en la química de los esteroides a nivel mundial, ha tenido un repunte la obtención de oximas esteroidales, no solo a través de su síntesis directa, sino también se han realizado derivatización, como se aprecia en el reporte del grupo de Berényi y colaboradores, que sintetizaron éteres de 16-oximas de estrona, como se observa en el esquema 17, mismas que fueron evaluadas en líneas de cancer cervicouterino (HeLa) y en cáncer de mama (MCF-7), mostrando interesantes resultados; resaltando los porcentajes de inhibición de las oximas, donde se observó una inhibición mayor al 80 % en concentraciones de 3 μ M, mientras que los éteres correspondientes, a esta misma concentración, solo mostraban una inhibición alrededor del 60 %, reafirmando que el hidroxilo de la oxima tiene un papel importante para la actividad antiproliferativa de estos compuestos [41].



Esquema 17. Síntesis de diversos éteres en C-16 de oximas de estrona.

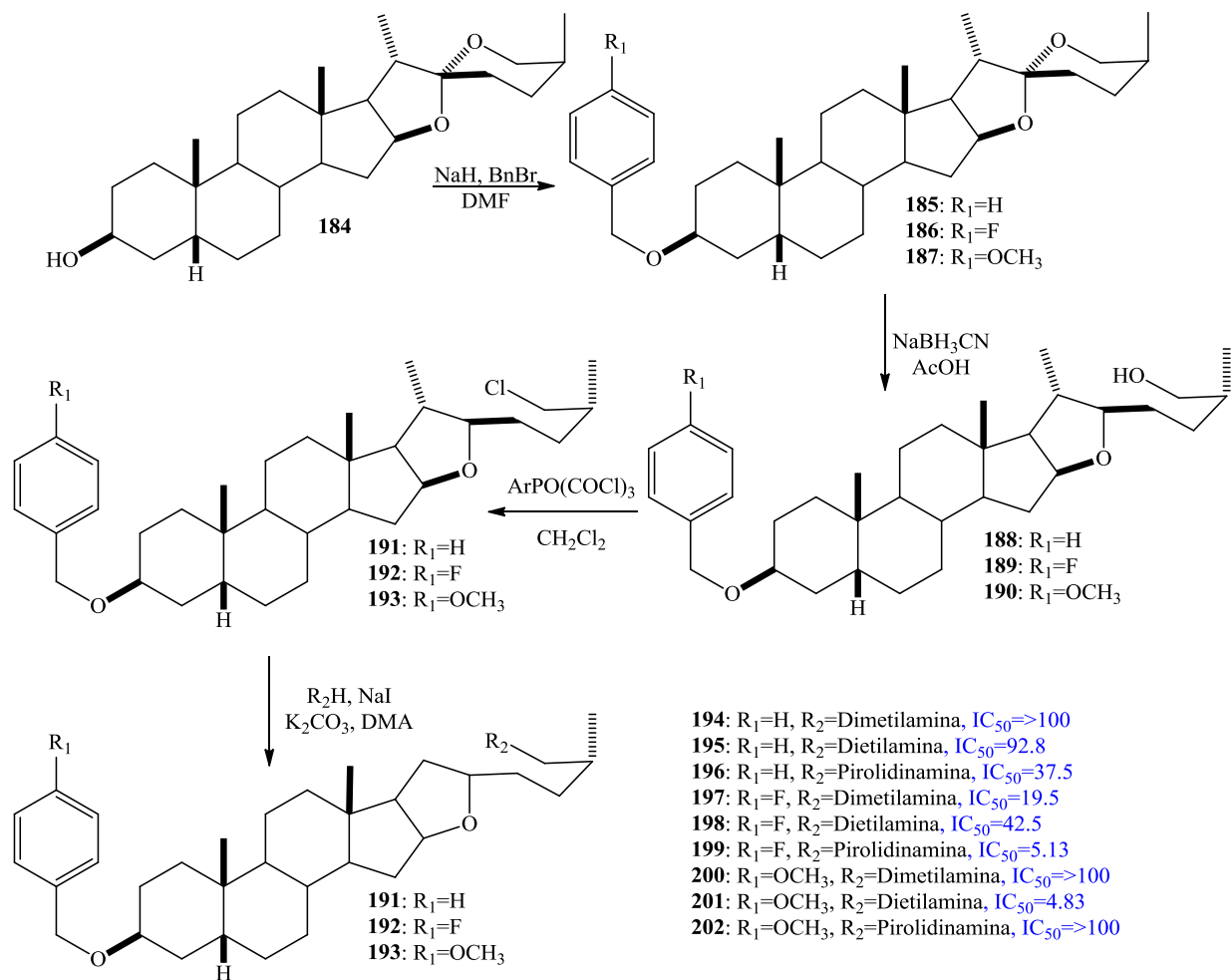
Debido a este tipo de resultados Cui y colaboradores, decidieron sintetizar oximas agregando además tiosemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas, como se observa en el esquema 18, con la finalidad de observar si se podía aumentar la actividad antiproliferativa a las oximas ya reportadas previamente por ellos [39] [40], obteniendo compuestos con valores de IC₅₀ mejores a los del cisplatino (medicamento de uso terapéutico) al momento de combinar estos grupos, respetando el grupo hidroxiimino, demostrando una sinergia entre estos grupos [42].



Esquema 18. Síntesis de tiosemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas de oximas esteroidales.

No obstante, al estudiar este tipo de estructuras se observa que tienen en común ser de base androstánica, pero se debe destacar que los compuestos colestánicos también presentan importante actividad biológica. Como se mencionó anteriormente, los esteroides espiroestánicos son excelente

materia prima para la síntesis de aminoesteroides, como lo realizó Wang y colaboradores, quienes a partir de sarsasapogenina obtuvieron compuestos 3-OBz-26-amino-esteroidales, como se observa en el esquema 19, compuestos que al evaluarlos en diversas líneas celulares de cáncer, entre la que destaca la MCF-7 mostrando resultados sorprendentes no solo en bajos valores de IC₅₀ (~ 5 µM) sino que también se comprobó que inducen a muerte por apoptosis, evitando así el daño a células no cancerosas.



Esquema 19. Síntesis de derivados 3-OBz-26-amino-esteroidales con actividad antiproliferativa en células de cáncer MCF-7 (µM)

Como se observó en estos antecedentes el nitrógeno en esteroides, más específicamente el grupo hidroximino, ha demostrado tener gran relevancia al momento de potenciar la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer, tanto los que son hormona-dependiente como los que no, paralelamente los compuestos espiroestánicos han sido utilizados como materias primas para la obtención de compuestos colestánicos, pero aún queda la ventana de estudio de la actividad biológica de este tipo de compuestos, lo que justifica la continua investigación de este tipo de compuestos, que han cobrado importancia los últimos años debido a su potencial biomédico.

2.3 Esteroides como promotores de crecimiento vegetal.

Existen diversos mecanismos mediante los cuales las plantas encaran los diversos tipos de estrés abiótico que afectan los rendimientos de cultivos. Cada estrés provoca una compleja y única respuesta celular y molecular en la planta. Asimismo, las plantas poseen la capacidad de sintetizar una gran variedad de esteroides con una función promotora del crecimiento y protectora. Anteriormente se habían descrito 5 tipos de fitohormonas: las auxinas, las citocinas, las giberelinas, los ácidos abscísicos y el etileno [11] (ver figura 14), pero desde 1930 se tenía noción de nuevos compuestos esteroidales identificados en insectos que ayudaban al crecimiento vegetal, pero no fue sino hasta 1979 cuando fue descubierta la Brasinólida, obtenida del polen de la *Brassica napus L.*, compuesto que en bajas proporciones mejoraba considerablemente el crecimiento vegetal [43]. Pero no se detuvo en este compuesto, fueron aislados otros tipos de compuestos similares en estructura y actividad, como lo fue la castasterona, aislada del castaño japonés *Castanea crenata spp*, por lo que estos nuevos compuestos fueron nombrados brasinoesteroides [11] [44].

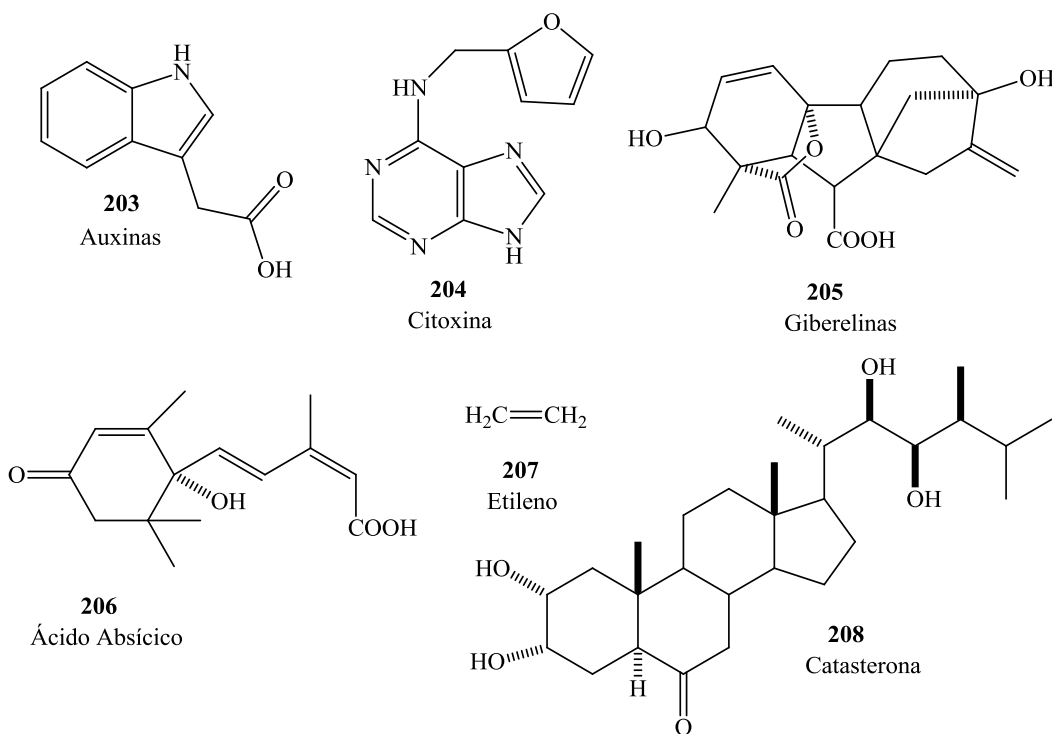
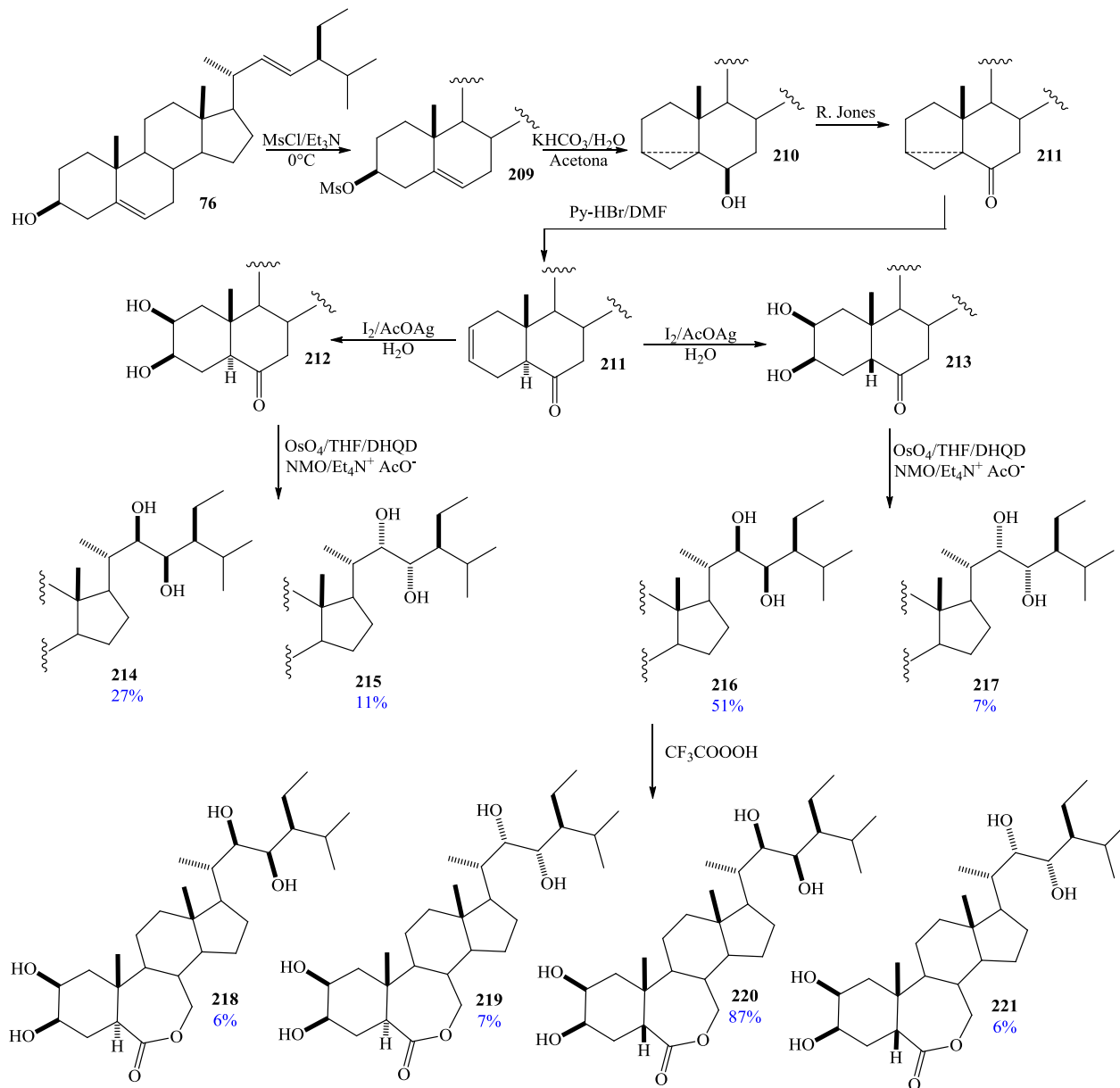


Figura 14. Tipos de fitohormonas.

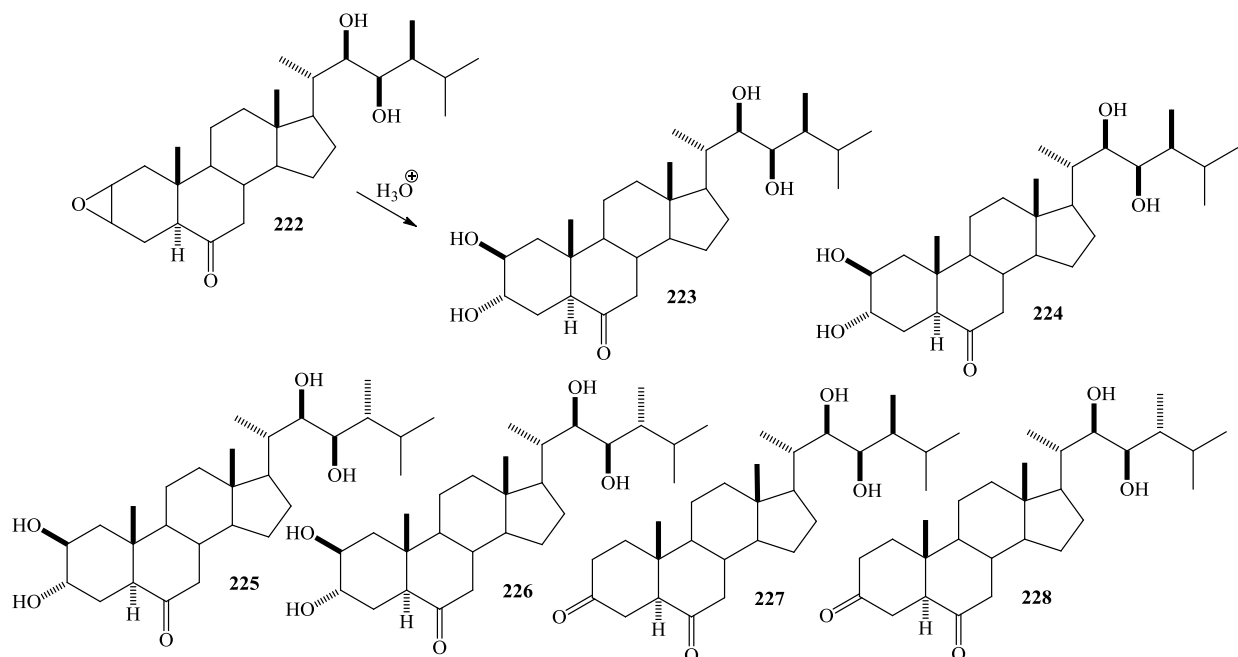
Actualmente existen siete clases de promotores de crecimiento vegetal: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, etileno, ácido jasmónico y brasinoesteroides, los cuales participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta. Pero debido al bajo contenido de estos brasinoesteroides en sus fuentes naturales, además de sus difíciles procesos de extracción, la investigación de estos compuestos fue pausada, por lo que diversos grupos de investigación decidieron diseñar rutas de síntesis para este tipo de compuestos; destaca el trabajo que Brosa y colaboradores, donde realizaron la obtención de la homobrasinólida a partir de estigmasterol [45], aunque este grupo no solo busco la síntesis, sino al mismo tiempo encontrar una relación entre la

estructura del derivado y análogos con la actividad biológica, concluyendo su estudio que se necesitaban grupos hidroxilos o polares en las posiciones 2 y 3, un grupo carbonilo en la posición 6, y una cadena lateral hidroxilada para favorecer la actividad como promotor de crecimiento vegetal [46], como se observa en el esquema 20.



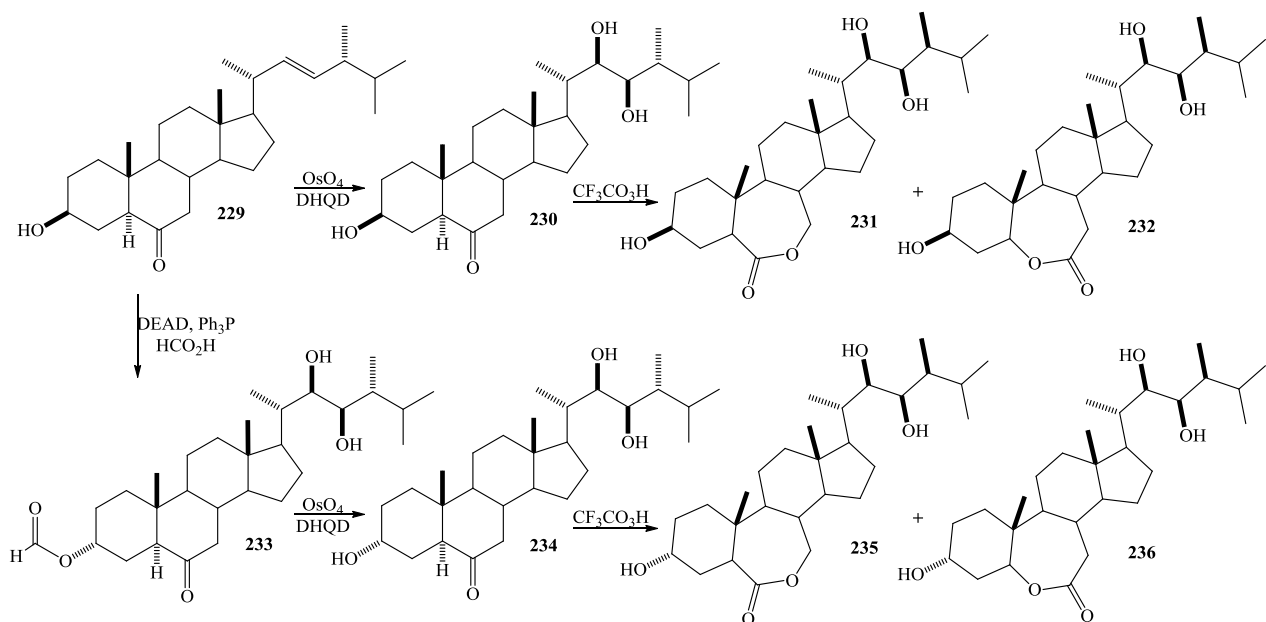
Esquema 20. Síntesis de homobrasinólida y análogos, con su porcentaje de actividad como promotor de crecimiento vegetal comparados con la brasinólida (100%) como control.

Paralelamente, otros grupos de investigación continúan buscando nuevos brasinoesteroides, como Schmidt y colaboradores, que aislaron un 2,3-epoxibrasinoesteroide del *Secale cereale*, mismo que modificaron para tener compuestos 2,3,22,23-hidroxilados, pero con un grupo cetónico en 6 (esquema 21). En este caso ellos analizaron el efecto de la estereoquímica sobre la actividad biológica, observando que juega un papel importante [47].



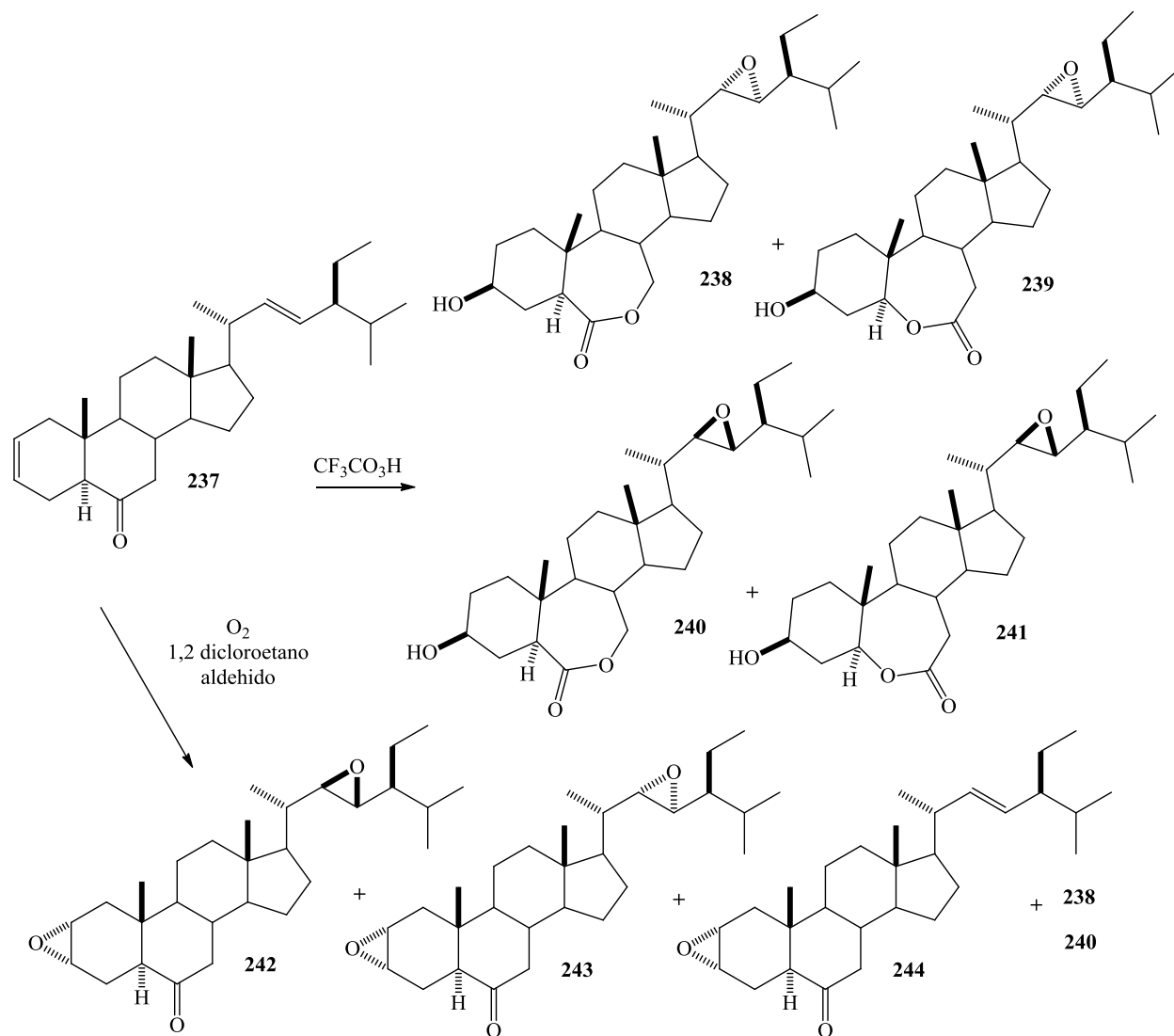
Esquema 21. Transformación de un 2,3-epoxibrasinoesteroide aislado del *Secale cereale*.

Por otro lado Voigt y colaboradores, decidieron estudiar el efecto de la ausencia del hidroxilo en la posición 2 para la actividad como promotor de crecimiento vegetal, sintetizando análogos de la brasinólida sin el hidroxilo en 2, como se observa en el esquema 22, comparando la actividad de sus nuevos compuestos con la epibrasinólida, obteniendo resultados cercanos pero no mayores a este estándar, con la ventaja de un menor número de pasos de reacción y por primera vez por medio de reacciones estereoselectivas, facilitando la purificación [48].



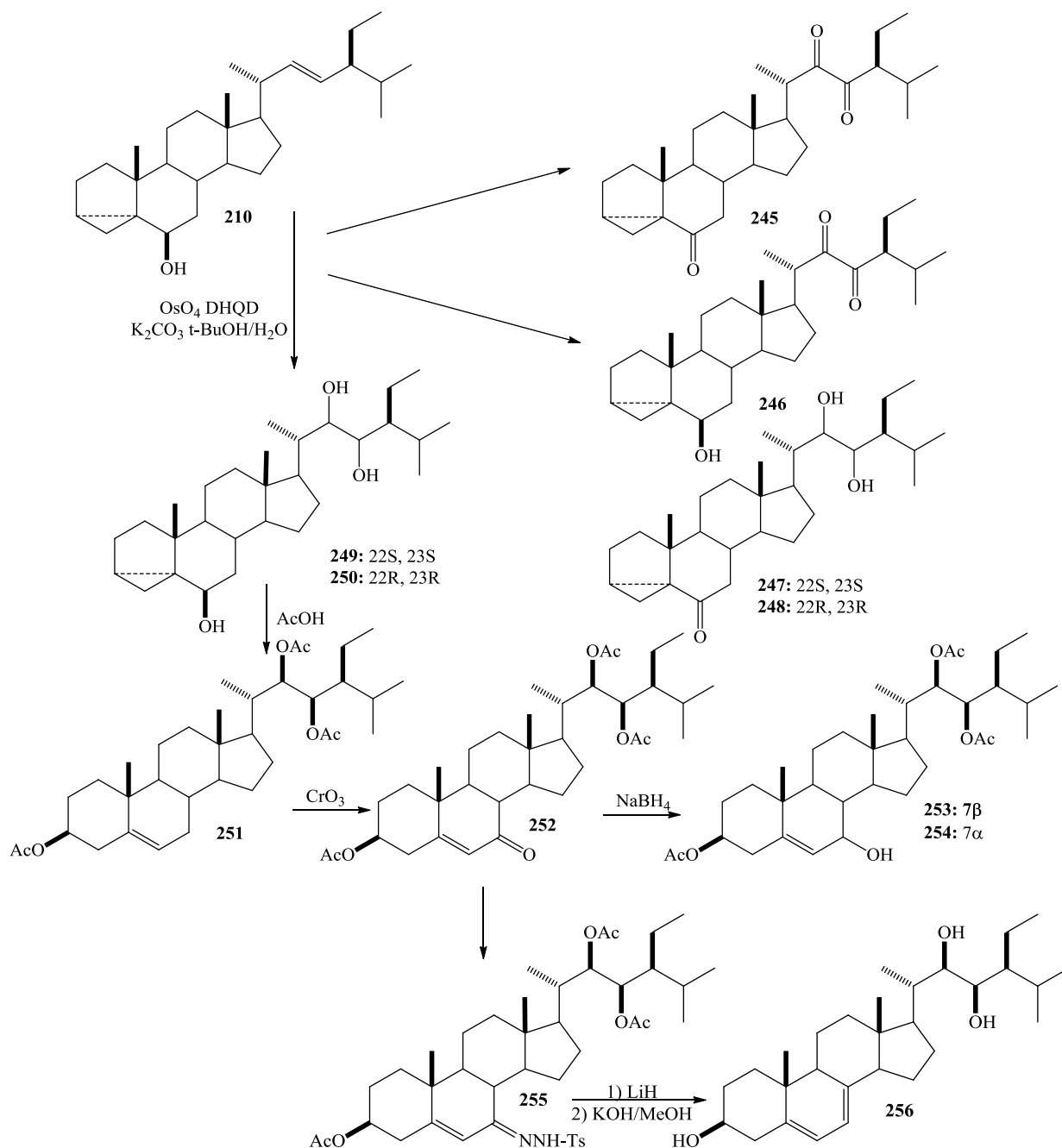
Esquema 22. Síntesis de análogos de epibrasinólida sin la sustitución en C-2.

De igual forma Brosa y colaboradores incursionaron en la síntesis de nuevos análogos epoxidados en las posiciones 2,3 y 22,23, reacción que realizaron simultáneamente con la formación de la lactona a partir de la cetona en C-6, minimizando los pasos de reacción, permitiendo realizar estas reacciones simultáneamente, mediante una oxidación de Bayer-Villiger generando una nueva familia de candidatos a promotores de crecimiento vegetal [49].



Esquema 23. Síntesis de análogos epoxidados de brasinoesteroides

En la continua búsqueda de nuevos promotores de crecimiento vegetal Hellrung y colaboradores, sintetizaron nuevos análogos $\Delta^{5,6}$ y 7-oxygenados con la finalidad de observar su actividad biológica, obteniendo nuevos compuestos 7-oxo y 7-hidroxi, pero observaron que la actividad biológica disminuía comparado con los compuestos 6-oxoesteroidales previamente evaluados, pero paralelamente se concluyeron que compuestos α , β -insaturados mejoraban dicha actividad como se observa en el esquema 24 [50].



Esquema 24. Síntesis de análogos 7 oxigenados esteroidales de brasinoesteroides.

Al observar todo este tipo de estudios se volvió de interés actualizar los estudios de relación estructura-actividad, por lo que Baron y colaboradores, ahora no sólo analizaron análogos de la brasinólida, también ensayaron compuestos con modificaciones en el heteroátomo de la lactona, insertando átomos de nitrógeno, azufre o carbono en esta posición, observando que al insertar el nitrógeno, convirtiendo la lactona en lactama (ver figura 15), aumenta significativamente la actividad biológica; en cambio, al insertar carbono en esta posición, la actividad disminuye drásticamente, por lo que concluyeron que es importante y determinante la presencia de un grupo polar en esta posición para mejorar dicha actividad [51].

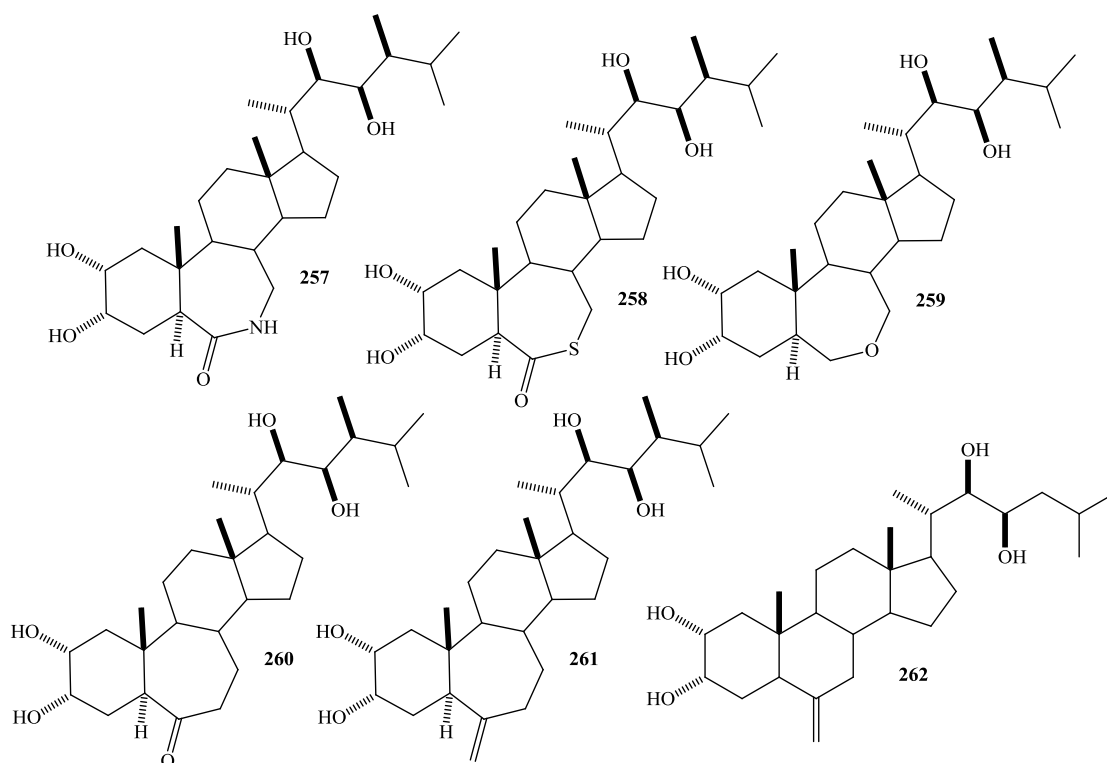
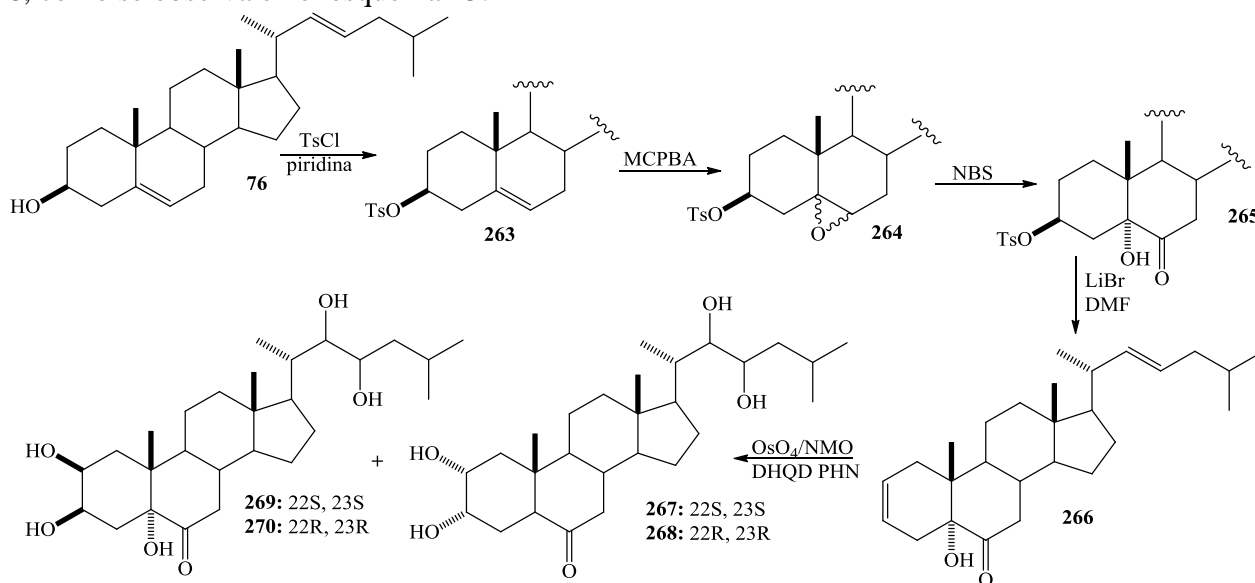


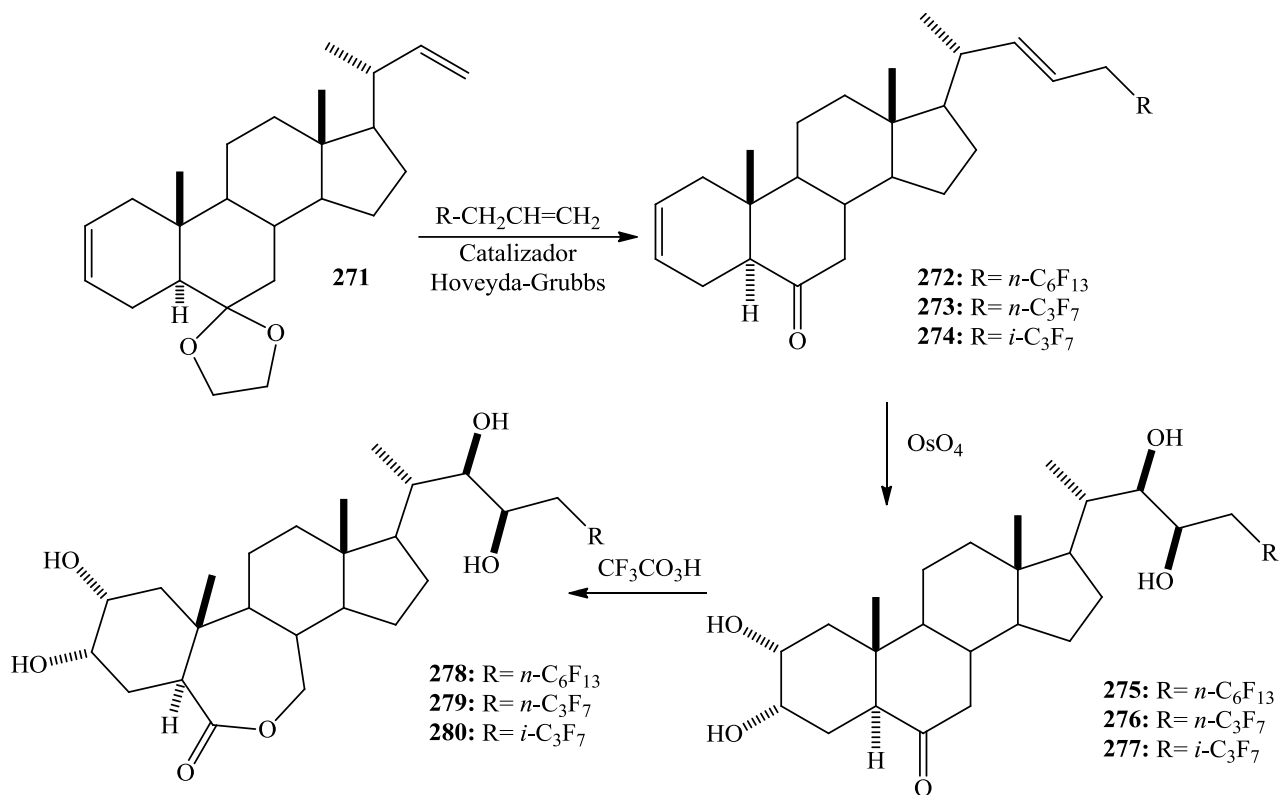
Figura 15. Nuevos análogos de brasinoesteroides en el anillo B

De igual manera Brosa y colaboradores, actualizaron sus estudios de relación estructura actividad, pero en este caso con la inserción de un grupo hidroxilo en la posición 5 de ergosterol, con la finalidad de obtener análogos de la homobrasinólida [52]. Sin embargo, fue hasta que Ramírez y colaboradores reportaron que dichos compuestos fueron analizados biológicamente, observando un incremento significativo en la actividad biológica [53], lo que reafirma que la inserción de grupos polares mejora dicha actividad, en posiciones particulares como son 2, 3, 5 y 6, como se observa en el esquema 25.



Esquema 25. Análogos 5-hidroxilados de brasinoesteroides.

Debido a estos sorprendentes resultados, muchos grupos de investigación se han dado a la tarea de insertar grupos polares. Por ejemplo, Eihnerová y colaboradores, quienes insertaron grupos fluorados en la posición 24 de la brasinólida, homobrasinólida y epibrasinólida, observando un ligero incremento en la actividad como promotor de crecimiento vegetal, pero lo sorprendente fue que estos nuevos compuestos, presentaban propiedades anticancerígenas, dando mayor importancia a este tipo de esteroides, y una nueva e importante aplicación [54].



Esquema 26. Síntesis de análogos de brasinoesteroides con la cadena lateral fluorada.

Dada la importante actividad biológica que han demostrado tener estos derivados esteroidales, en los últimos años se han desarrollado estudios a nivel molecular de la acción que ejercen los brasinoesteroides en plantas, estudios que han abordado diversos grupos de investigación para descifrar dicho funcionamiento, por lo que Oklestkova y colaboradores, no sólo diseñaron nuevas rutas de síntesis para los brasinoesteroides que más importancia biológica han presentado, sino que a su vez estudiaron los mecanismos de acción, observando que estos compuestos funcionan como reguladores de la elongación celular y de la reproducción celular, a nivel genético identificando al gen BRI-1 con una expresión atípica, por lo que mediante el uso de una mutante insensible a este gen, los brasinoesteroides no mostraban su importante actividad por lo que se definió que los brasinoesteroides tienen la característica de expresar este gen.

Sin embargo, además de la necesidad de saber cómo actúan los brasinoesteroides y sus análogos, contar con cantidades suficientes para su ensayo y estudio es primordial. La síntesis química a partir de sapogeninas esteroidales ha sido una de las principales estrategias en la obtención de nuevos compuestos con alto potencial de actividad biológica promotora del crecimiento vegetal. En el grupo del Dr. Sandoval Ramírez hemos reportado trabajos para generar nuevos análogos con actividad biológica promotora de crecimiento vegetal.

Cómo se mencionó antes, los promotores de crecimiento vegetal pueden presentar actividad diversa, como por ejemplo anticancerígena, por lo que los derivados propuestos en este trabajo de tesis fueron ensayados y valorados como promotores de crecimiento vegetal y como anticancerígenos en líneas de cáncer mamario.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Sintetizar y evaluar biológicamente nuevos derivados esteroidales como agentes anticancerígenos y promotores de crecimiento vegetal a partir de sapogeninas esteroidales

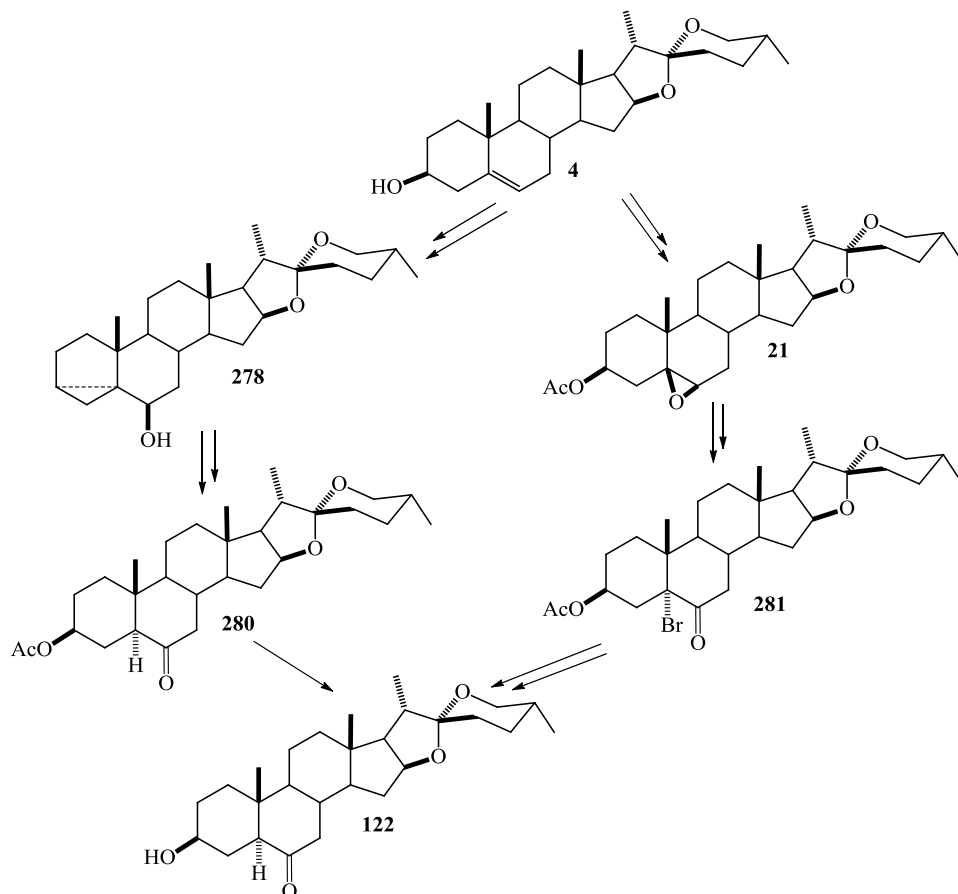
3.2 Objetivos particulares

- Sintetizar derivados hidroximínicos esteroidales a partir de sapogeninas esteroidales.
- Establecer condiciones de reacción para el uso de las oximas como grupo protector.
- Generar nuevas estructuras esteroidales cetónicas e hidroximínicas para su evaluación biológica como promotores de crecimiento vegetal y anticancerígenos.
- Caracterizar espectroscópica y físicamente los nuevos derivados esteroidales obtenidos.
- Proponer mecanismos de reacción para la obtención de los nuevos productos.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Optimización de la obtención de laxogenina.

La obtención de materias primas es fundamental para el desarrollo de nuevos productos y, por lo tanto, para la investigación. Si bien la forma más común de obtener esteroides es por medio de extracción de fuentes naturales [9], algunos esteroides como es el caso de la laxogenina (**122**), se encuentran en muy baja proporción en sus fuentes naturales [55], lo que normalmente conduce a la búsqueda de nuevas rutas de reacción para la obtención a partir de esteroides de mayor disponibilidad. Sin embargo, hay otra opción poco explorada, que es la optimización de rutas existentes, donde mediante el análisis de compatibilidad de reacciones, es posible diseñar procesos semi-continuos para optimizar el rendimiento y abatir el tiempo de obtención de materias primas. En el presente trabajo de tesis, se estudiaron dos rutas de reacción para la obtención de laxogenina, una que involucra la epoxidación selectiva al doble enlace y otra mediante la formación de un *i*-esteroide como intermediario (ver esquema 27), con la finalidad de analizar para así diseñar un proceso semi-continuo; se llevaron a cabo las reacciones etapa a etapa en proceso batch con la finalidad de caracterizar cada uno de los compuestos obtenidos.



Esquema 27. Obtención de laxogenina (**122**).

4.1.1 Ruta A. Obtención de laxogenina vía epoxidación selectiva.

➤ Diosgenina.

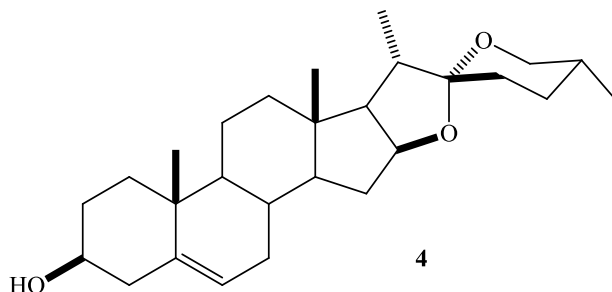


Figura 16. Estructura de la diosgenina (**4**).

La materia prima para la obtención de laxogenina (**122**) seleccionada fue la diosgenina (**4**), obtenida a partir de extracción de barbasco del estado de Puebla y posterior hidrólisis del extracto, la cual fue caracterizada por diversas técnicas espectroscópicas, dentro de las que destaca la RMN. Debido a que en muchas de las reacciones realizadas los cambios estructurales son muy específicos y centralizados, es importante la caracterización absoluta de la materia prima, que a través de la comparación de los espectros permitirá analizar y elucidar la estructura de los productos obtenidos.

Para la diosgenina con fórmula molecular $C_{27}H_{42}O_3$, 34 de los 42 protones se catalogan como diferentes, por lo que se esperaría 34 señales en el espectro de 1H , aunque la limitante se encuentra que la mayoría están entre 1.0 y 2.0 ppm por el ambiente químico que presentan; claro que en estos casos es la RMN en dos dimensiones la que tiene un papel importante para la asignación de este tipo de señales. Aunque en el espectro de 1H , si es posible asignar protones característicos cercanos a grupos electronegativos y aquellos que, aunque caen en el intervalo antes mencionado, se pueden diferenciar debido a su multiplicidad o integración como en el caso de los protones metilos, como se observa en la figura 17.

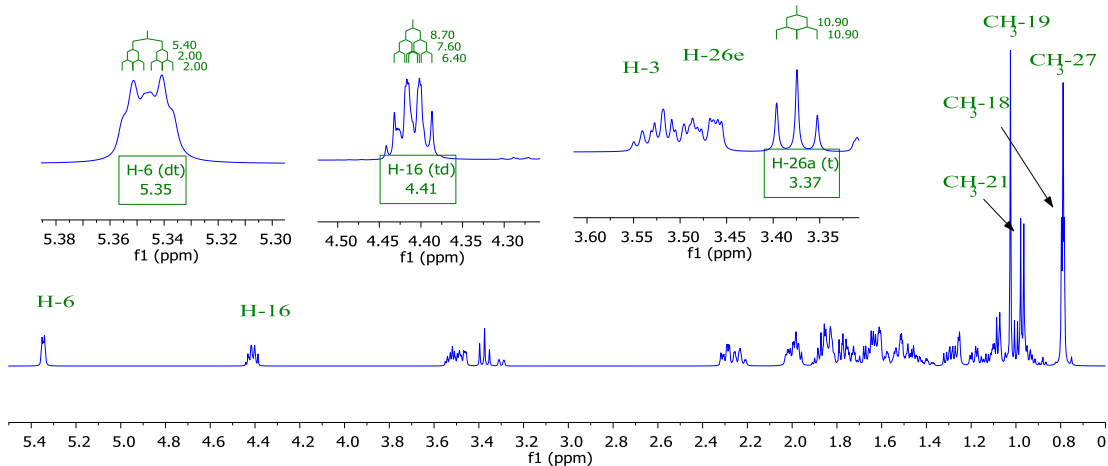


Figura 17. Espectro de RMN 1H de diosgenina (**4**) a 500 MHz

Se puede observar una señal en 5.35 ppm que corresponde al protón vinílico del carbono 6 el cual presenta una multiplicidad *dt* aparentemente, aunque realmente es una señal *ddd*, la cual presenta un acoplamiento a tres enlaces con los protones en 7 con $J_{6-7}=5.4$ Hz, y dos acoplamientos a larga distancia tipo *w* con los protones en 4 y 8 con $J_{6-4}=J_{6-8}=2.0$ Hz, a frecuencias más bajas en 4.41 ppm encontramos una señal *ddd* con $J_{16-17}=8.7$ Hz, $J_{16-15a}=7.6$ Hz, $J_{16-15e}=6.4$ Hz. En 3.52 ppm se observa una señal múltiple que se asignó al protón base de oxígeno en 3, junto a esta señal en 3.48 ppm se encuentra una señal múltiple que corresponde al protón diasterotópicos 26e y a frecuencias más bajas en 3.37 ppm se encuentra una señal *dd* que corresponde al protón diasterotópicos 26a, con $J_{gem}=J_{26e-25a}=10.8$ Hz, que al tener constantes de acoplamiento iguales se observa como un *t*. Para constatar la presencia de estos protones diasterotópicos en el experimento de HSQC se puede observar como ambas señales acoplan con el mismo carbono, como se observa en la figura 18.

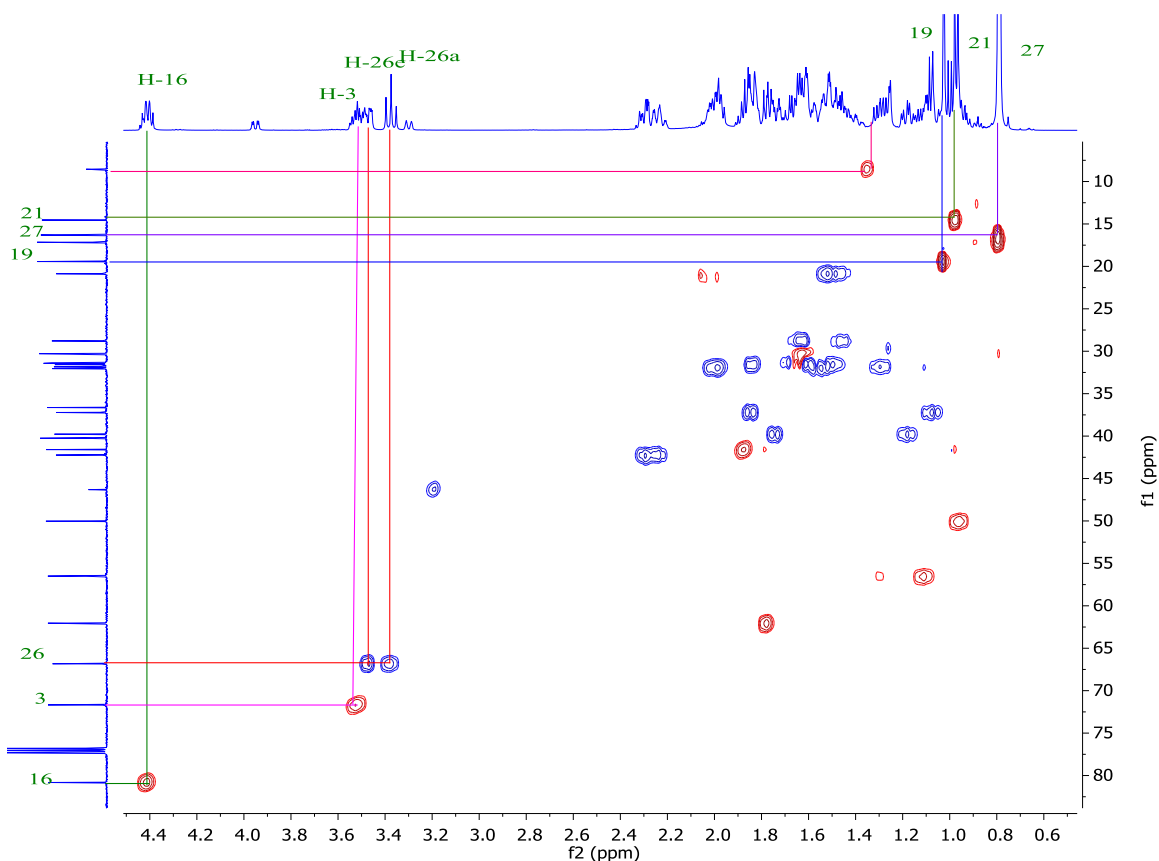


Figura 18. Espectro de RMN HSQC de diosgenina (4).

De igual forma para la asignación y diferenciación de los metilos 18 y 19, mediante el experimento HMBC, permitió diferenciar entre estas dos señales simples, debido a que los protones del metilo 19 se encuentran a una distancia de 4 enlaces del carbono 5 del doble enlace, así mismo se asignaron los protones en 4 y los protones en 7, ya que estos se verán afectados durante las modificaciones realizadas dentro de este trabajo, como se observa en la figura 19.

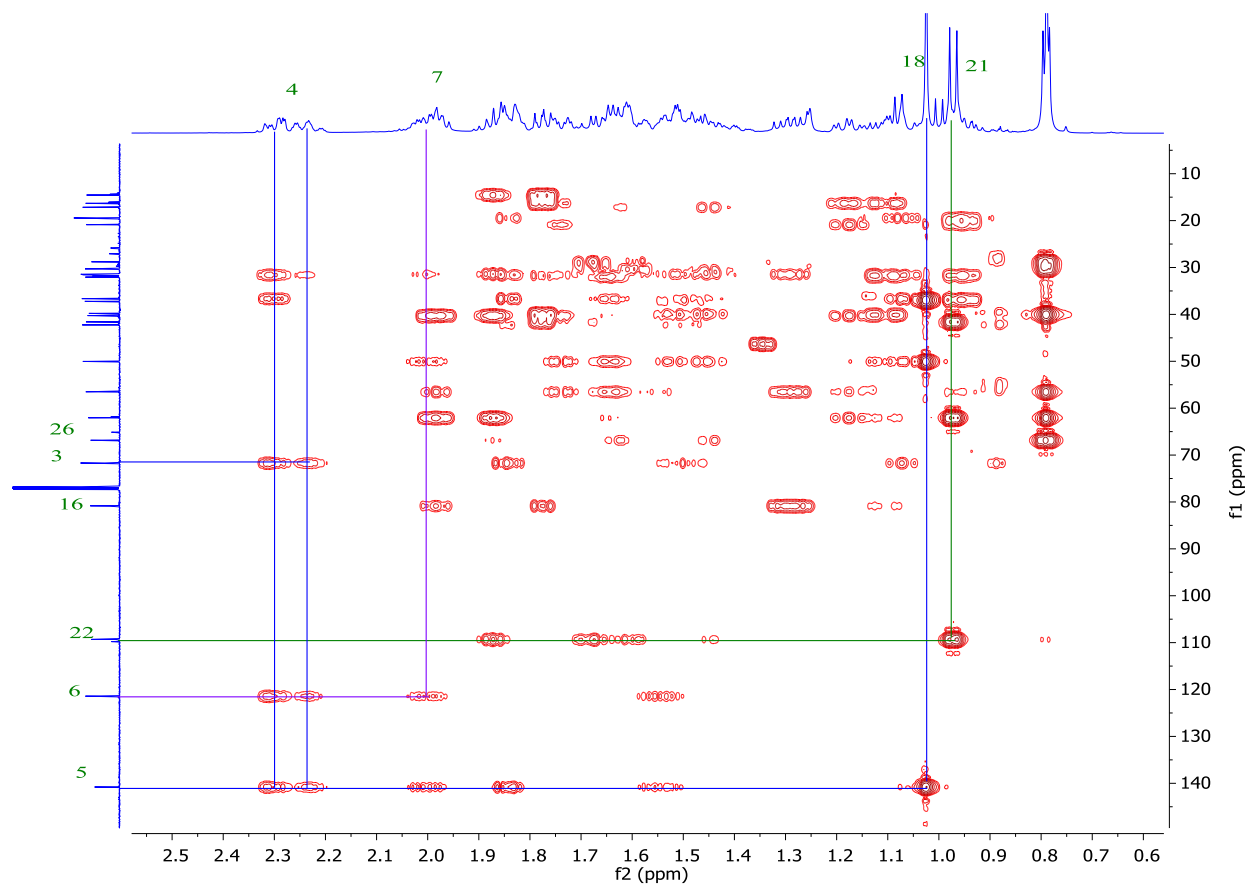


Figura 19. Espectro de RMN HMBC de diosgenina (4).

En base a la información obtenida de estos experimentos, se continuó con la asignación del espectro de ^{13}C de diosgenina (4), donde algunas señales características fueron asignadas, como lo es la señal en 109.3 ppm correspondiente al carbono 22 del espiroacetal, así como las señales del doble enlace en 140.8 y 121.4 ppm que corresponde al C-5 y C6 respectivamente. De igual manera con el empleo del espectro de HMBC se logró diferenciar entre los diversos carbonos base de oxígeno, identificando las señales en 71.7 ppm, 80.8 ppm y 66.8 ppm que corresponden a C3, C16, y C26 respectivamente, como se observa en la figura 20.

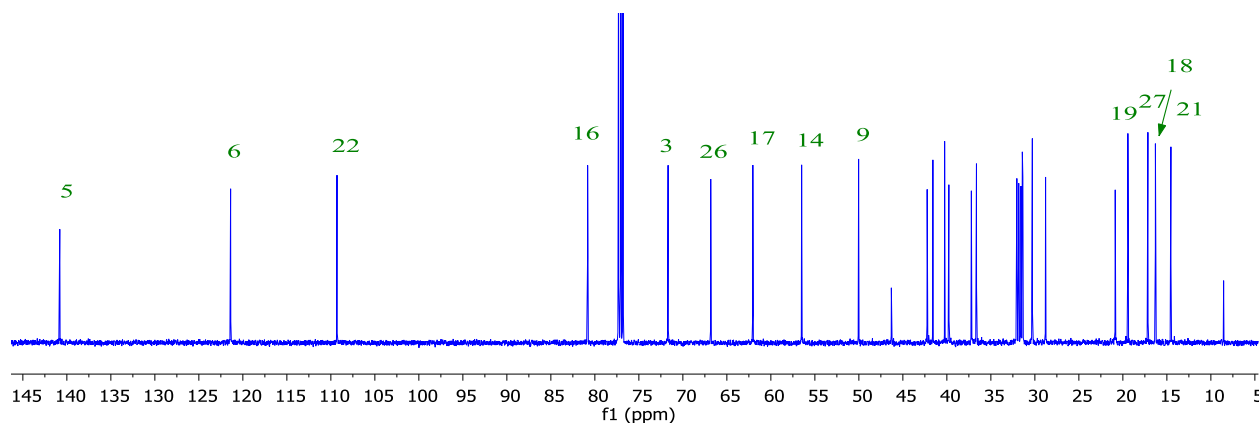


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C de diosgenina (4) a 125 MHz.

➤ Acetato de diosgenina (**21**).

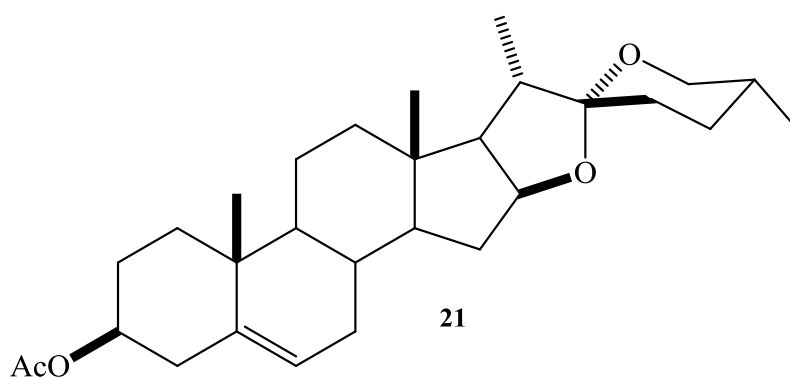


Figura 21. Estructura de **21**.

Con la finalidad de proteger el grupo hidroxilo en la posición 3 del esteroide, al momento de llevar a cabo las oxidaciones, se procedió a realizar una acetilación. Existen muchas metodologías reportadas para llevar a cabo esta reacción de esterificación, inicialmente se realizaba directamente con ácido acético [5], pero debido al bajo rendimiento por el medio ácido y largos tiempos de reacción, se han realizado modificaciones a dichas metodologías; la mejor opción fue utilizar anhídrido acético con una base como piridina o dimetil amino piridina (DMAP), pero dificultado en la purificación la eliminación de estas bases nitrogenadas, por lo que se buscó condiciones libres de estas bases, como se puede observar en la tabla 1, encontrando condiciones óptimas para la protección de este compuesto.

Tabla 1. Optimización de condiciones de la obtención de acetato de diosgenina (**21**).

Condición	1*	2*	3	4	5	6	7
Base	--	DMAP	DMAP	Piridina	--	--	--
Tiempo	12 h	4 h	1 h	1 h	45 min	1.5 h	3 h
Temperatura	Reflujo	Ambiente	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo
Fuente del acetilo	AcOH	Ac ₂ O	Ac ₂ O	Ac ₂ O	Ac ₂ O	Ac ₂ O	Ac ₂ O
Rendimiento	50 %	88 %	99 %	92 %	78 %	98 %	98 %

* obtenido de fuente [5]

Después de la optimización, se procedió a la caracterización del compuesto obtenido; primero por CCF, se observó una alta pureza del compuesto, aunque presentaba un ligero color crema, por lo que se procedió a obtener el espectro de ¹H del crudo de reacción para comparar con el compuesto purificado por cromatografía en columna cromatográfica, como se puede observar en la figura 22, mostrando una gran pureza y selectividad de esta reacción en estas condiciones.

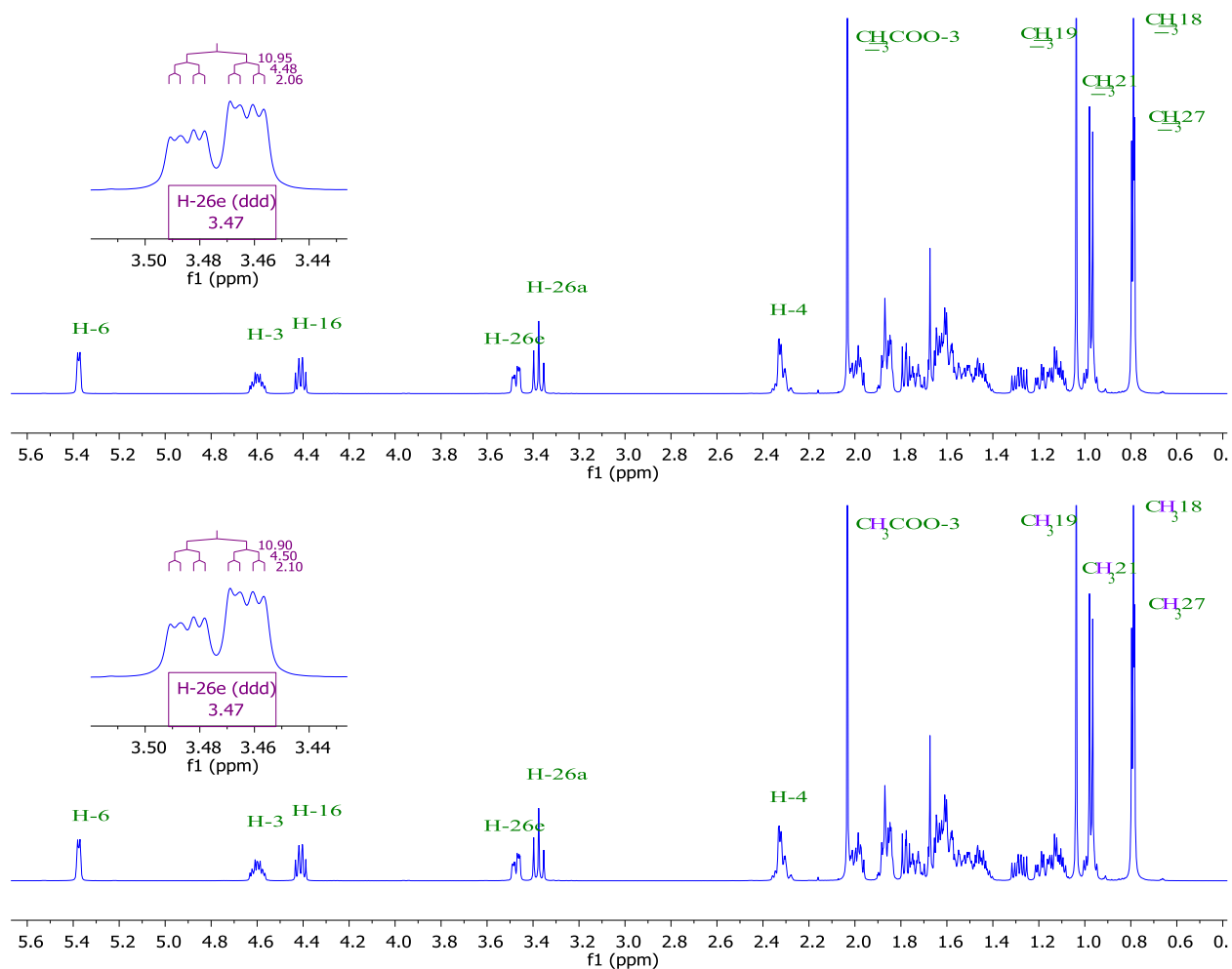


Figura 22. Comparación por RMN de ^1H de la pureza del acetato de diosgenina (**21**). Arriba) crudo de reacción; abajo) acetato de diosgenina purificado por cromatografía en columna.

Como se puede observar en el espectro de ^1H los cambios con respecto a la diosgenina son mínimos pero significativos; primero podemos observar una señal múltiple en 4.60 ppm que corresponde al H-3 base del acetato, podemos observar cómo debido al cambio de protección generado ahora por el acetato en vez del hidroxilo esta señal se desplaza a frecuencias altas, así mismo este efecto genera que la señal del H-26e quede libre permitiendo analizar y asignar la señal, como se observa en la figura 22b, definiendo la señal como una *ddd*, con $J_{\text{gem}} = 10.9 \text{ Hz}$, $J_{26e-25a} = 4.9 \text{ Hz}$, $J_{26e-24a} = 2.1 \text{ Hz}$, así mismo se observa una señal simple característica en 2.04 ppm que integra para 3H correspondiente al metilo del grupo acetilo agregado, lo cual confirma la obtención del producto esperado; por otro lado para la asignación y confirmación de los protones H-4 y H-7 se utilizó el experimento COSY (figura 23) para ver la correlación entre el protón H-3 y los protones H-4 en los cuales se observó que eran dos señales ligeramente diferentes, esto se explica a que estos protones son diastereotópicos, pero con desplazamientos muy cercanos generando traslape de las señales, de igual manera se utilizó la señal del protón vinílico H-6 para encontrar la señal de los protones en 7.

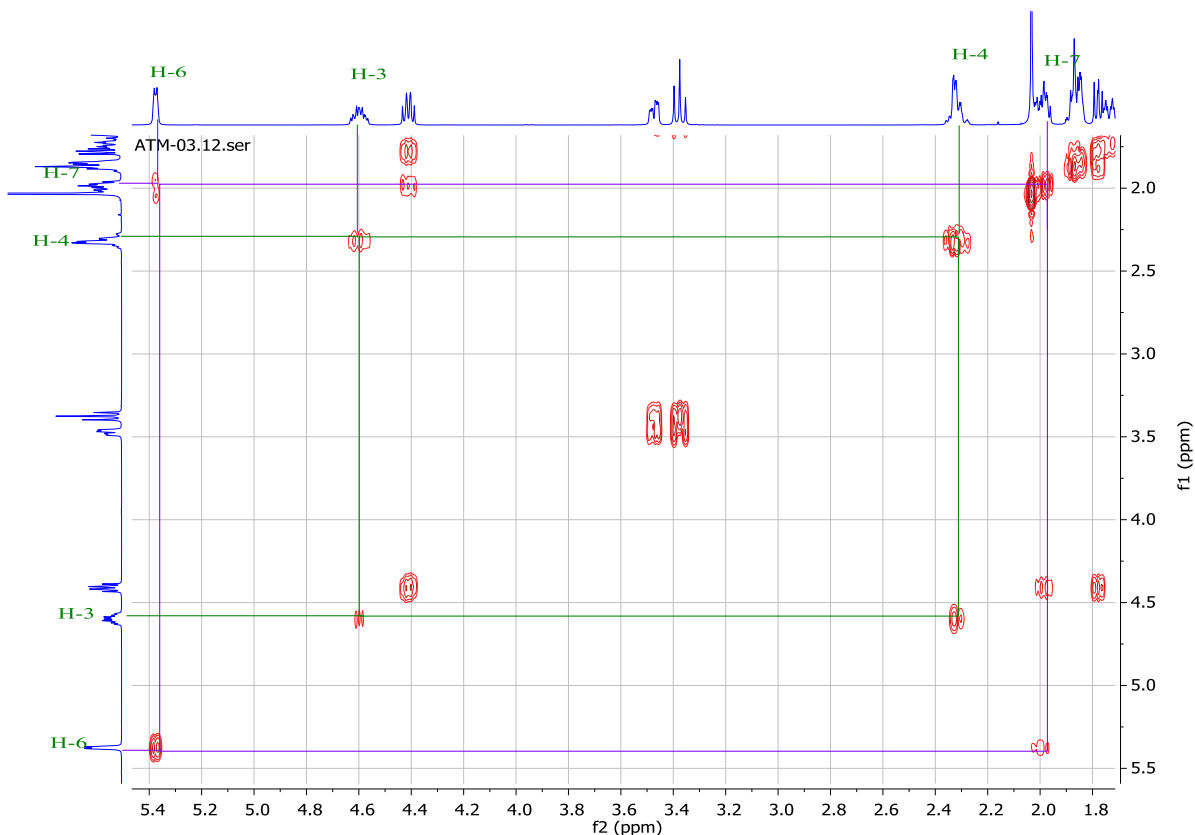


Figura 23. Espectro RMN COSY del acetato de diosgenina (21).

Por otra parte en el espectro de RMN de ^{13}C , de manera análoga existe una gran similitud con el espectro de la materia prima, excepto por una señal en 170.2 ppm característica del carbonilo del éster del acetato; así mismo se observa un ligero cambio en la señal correspondiente al C-3 aumentando su desplazamiento en 2.5 ppm, como resultado del cambio de grupo en este carbono, a partir de este punto no se observan cambios aparentes en las señales de los demás carbonos de la molécula, esto debido a que el cambio de grupo funcional es muy aislado, lo que impide otro tipo de interacciones, como se observa en la figura 24.

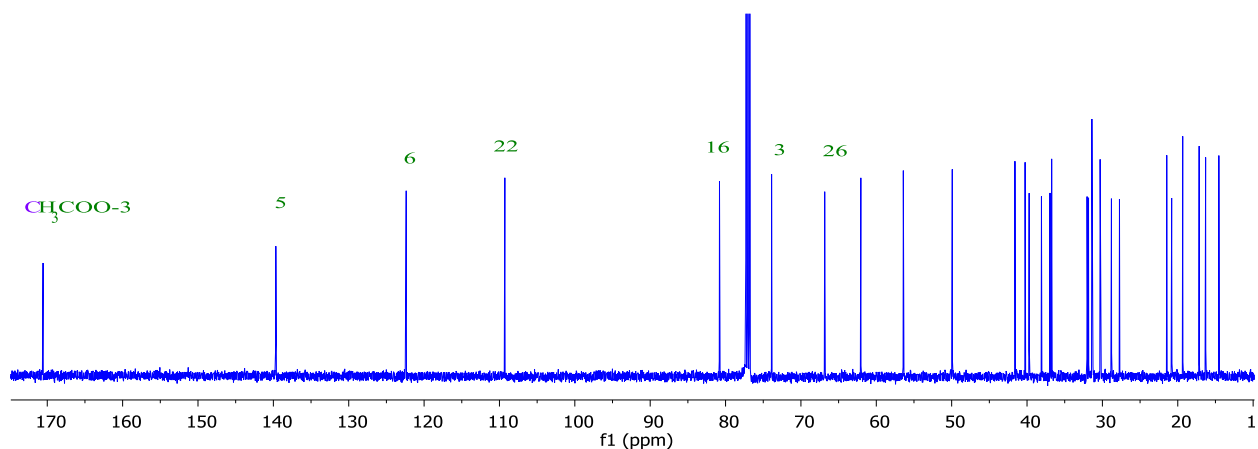


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C a 125 MHz del acetato de diosgenina (21).

➤ acetato de (25*R*)-5β, 6β-epoxi-5α-espirostan-3β-ilo (**279**).

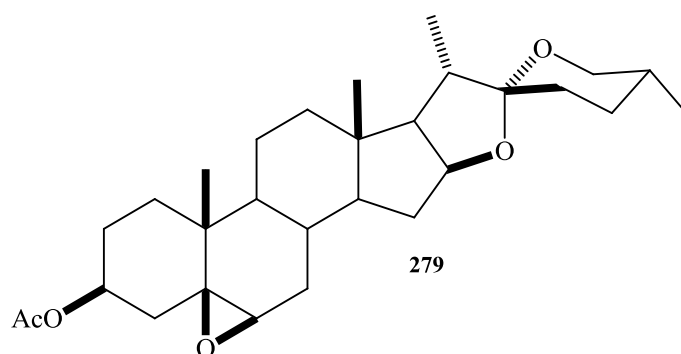
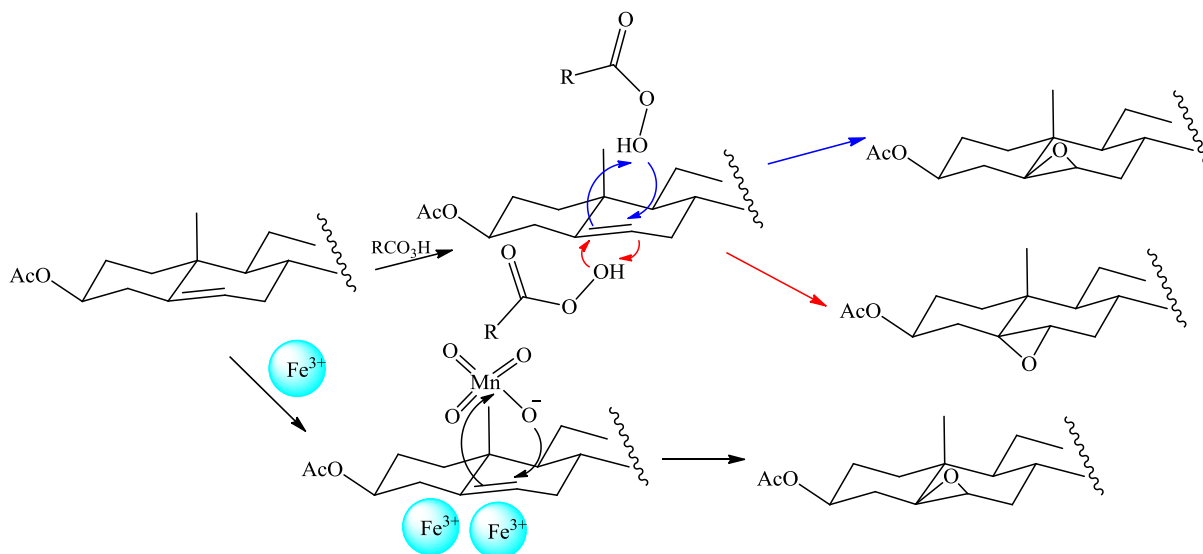


Figura 25. Estructura de **279**.

La formación del epóxido del acetato de diosgenina ha sido una reacción muy utilizada para la funcionalizar el doble enlace. Las metodologías más aplicadas para su obtención lo hacen utilizando MCPBA, las cuales no resultan ser estereoselectiva, obteniéndose una mezcla de los epóxidos α y β , predominando el epóxido α , debido a la disposición espacial de esta cara al momento de llevar a cabo la oxidación, como se puede observar en el esquema 28; en cambio, utilizando un ácido de Lewis, como lo es el ion Fe^{3+} , mismo que se soporta en la cara α , dirige la reacción hacia la cara β , permitiendo obtener estereoselectivamente este compuesto.



Esquema 28. Mecanismos de epoxidación de acetato de diosgenina.

Para caracterizar este compuesto y principalmente comprobar la alta estereoselectividad de la reacción, se comparó el espectro de RMN de ^1H del producto obtenido con MPCBA con el de la mezcla oxidante soportada en sulfato férrico, como se observa en la figura 26, presentándose un juego de señales correspondientes al H-3, una en 4.95 ppm y otra desplazada a menor frecuencia en 4.78 ppm, esta última corresponde cuando el hidrogeno se encuentra en α , debido a que el oxígeno del epóxido no genera un efecto directo sobre este protón, en cambio cuando se encuentra

en β existe efecto electrónico a través del espacio con este oxígeno, generando que este último se desplace a menor frecuencia (ver figura 27), efecto opuesto si analizamos el H-6, y como se esperaba el H-6 que se encuentra en α se desplace a mayor frecuencia que el que se encuentra en β .

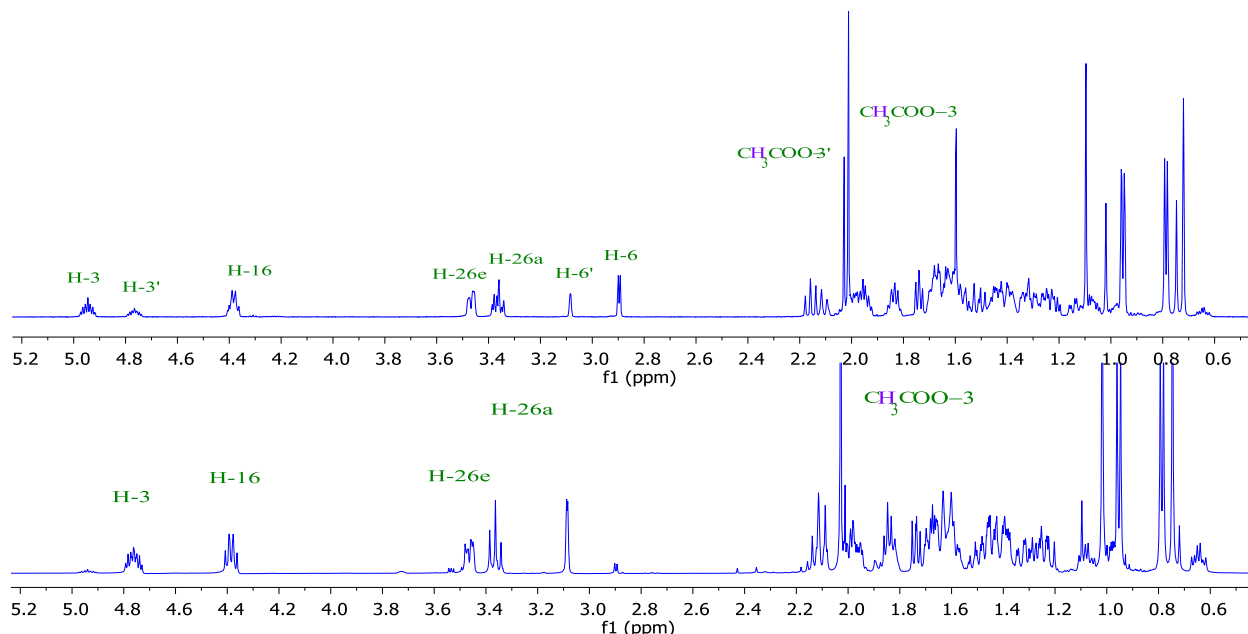


Figura 26. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz de **279**: arriba) con MPCBA; abajo) epoxidación estereoselectiva.

Otro efecto mostrado muy característico fue en el desplazamiento del metilo del acetato, el cual se desplace a frecuencias más altas cuando el epóxido se encuentra en la cara β , ya que hay una interacción más directa a través del espacio; así mismo podemos observar en el espectro del epóxido β puro que no se observan las señales correspondientes a su diastereoisómero, demostrando además una gran pureza de esta especie, así mismo se observa como la señal en 3.15 ppm correspondiente al H-6 cambia su desplazamiento y su multiplicidad comparada con la materia prima, esto debido al cambio de hibridación, generando solo una señal doble con $J_{6-7a}=2.3$ Hz, efecto debido, como se observa en la distribución espacial, a que el ángulo diedro entre estos protones disminuye el valor de esta constante y elimina el acoplamiento con el H-7e, ensanchando la señal debido además a los acoplamientos a larga distancia.

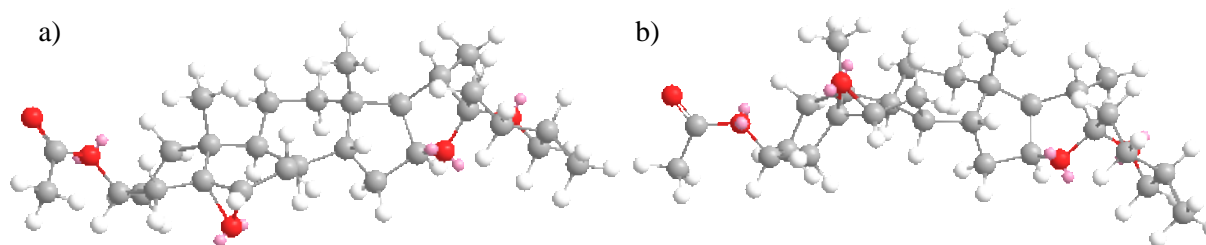


Figura 27. Distribución espacial de los isómeros del epóxido **279**: a) epóxido alfa, b) epóxido beta.

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C de este producto podemos apreciar que en la región de 120-150 ppm han desaparecido las señales correspondientes al doble enlace lo que confirma la formación del producto, así mismo se puede observar que en 72.5 ppm y 64.3 ppm, aparecen dos señales nuevas correspondientes a los carbonos 5 y 6 del epóxido, observando que C5 se desplaza a frecuencia más alta debido a la tensión y torsión del anillo que existe en este carbono cuaternario.

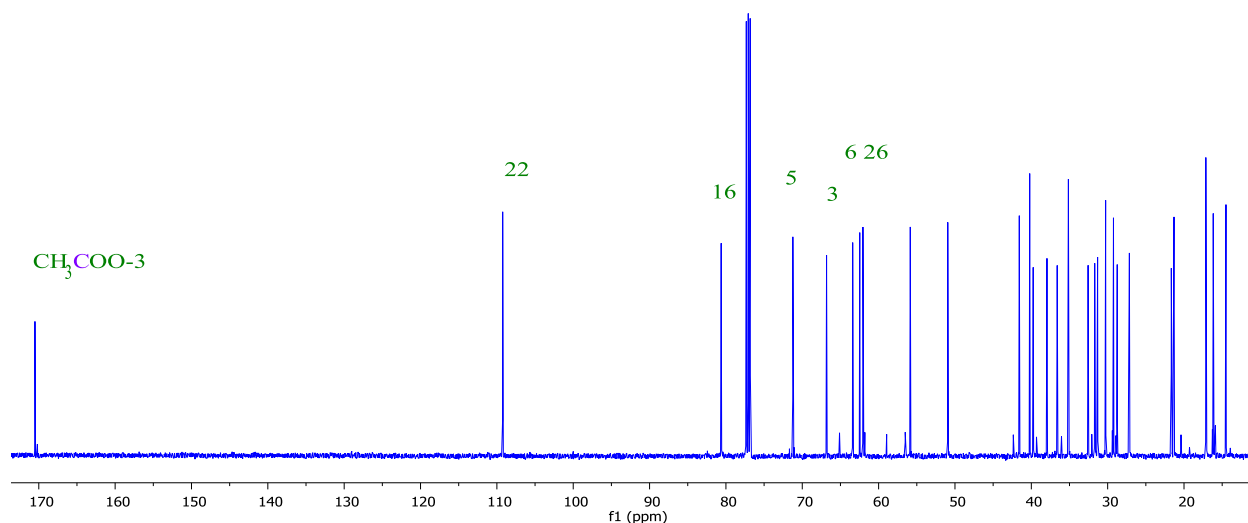


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C de 279.

➤ Acetato de (25*R*)-5-bromo-6β-hidroxi-5α-espirostan-3β-ilo (283).

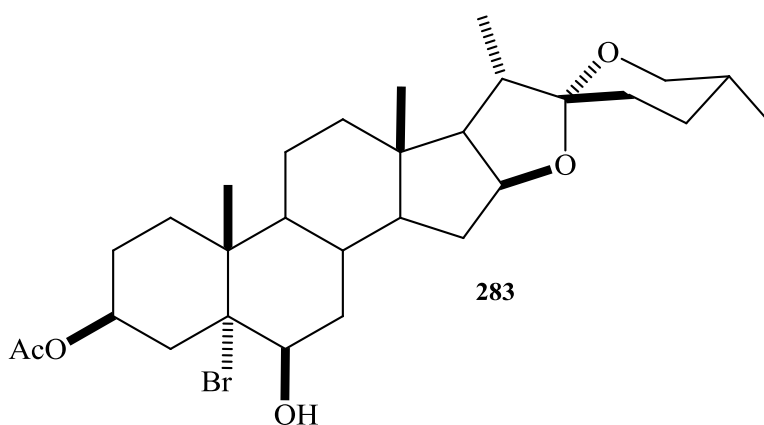


Figura 29. Estructura de 283.

Al momento de realizar la apertura del epóxido en medio ácido con $\text{HBr}_{(\text{ac})}$ se modificó la reacción de manera que se encontrara la cantidad mínima de HBr necesaria para realizar la apertura sin afectar el rendimiento de la reacción. En la gráfica de la figura 30, podemos observar una dependencia exponencial entre el rendimiento y la cantidad de HBr necesario; por otro lado, se analizó el rendimiento en función del tiempo de reacción permitiendo encontrar el tiempo y la cantidad de reactivo óptimo para esta reacción, mejorando así la metodología.

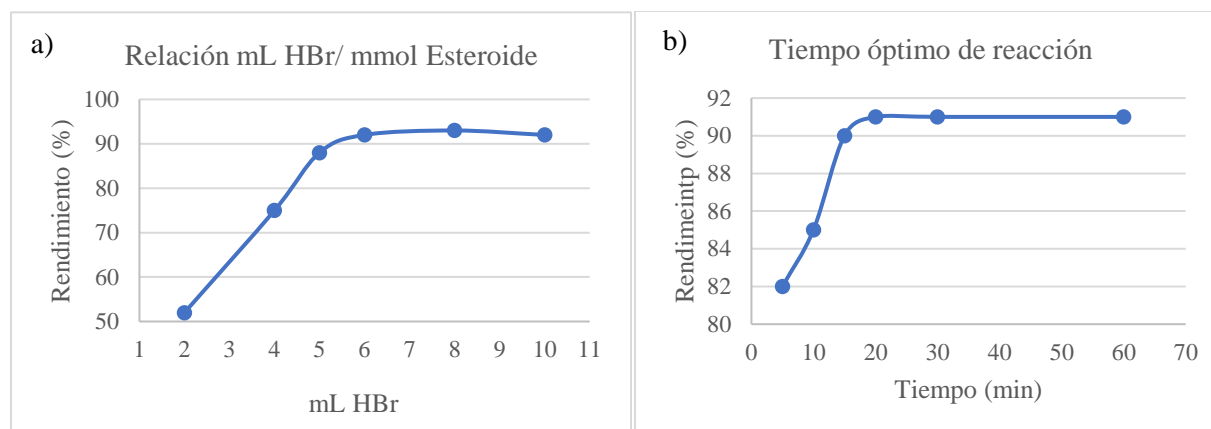


Figura 30. Optimización de apertura del epóxido 279: a) cantidad de HBr b) tiempo de reacción.

En la caracterización de este producto, el espectro de ^1H muestra gran similitud con la materia prima, pero con algunos cambios muy particulares; en primera, la señal del H-3 se distorsiona generando que la señal sea asignada como un multiplete, esto debido al efecto del átomo de bromo que distorsiona la molécula (figura 32). De igual manera en 4.2 ppm aparece una nueva señal que corresponde al H-4 desplazada a frecuencias altas por la presencia del bromo, efecto que conduce a que en 2.40 ppm aparezca una señal correspondiente a los H-7, con la limitante que estas señales se resuelven como multiplete debido al gran tamaño del átomo de Br insertado, mismo efecto que explica la gran reactividad del compuesto, conduciendo a la fácil descomposición del mismo.

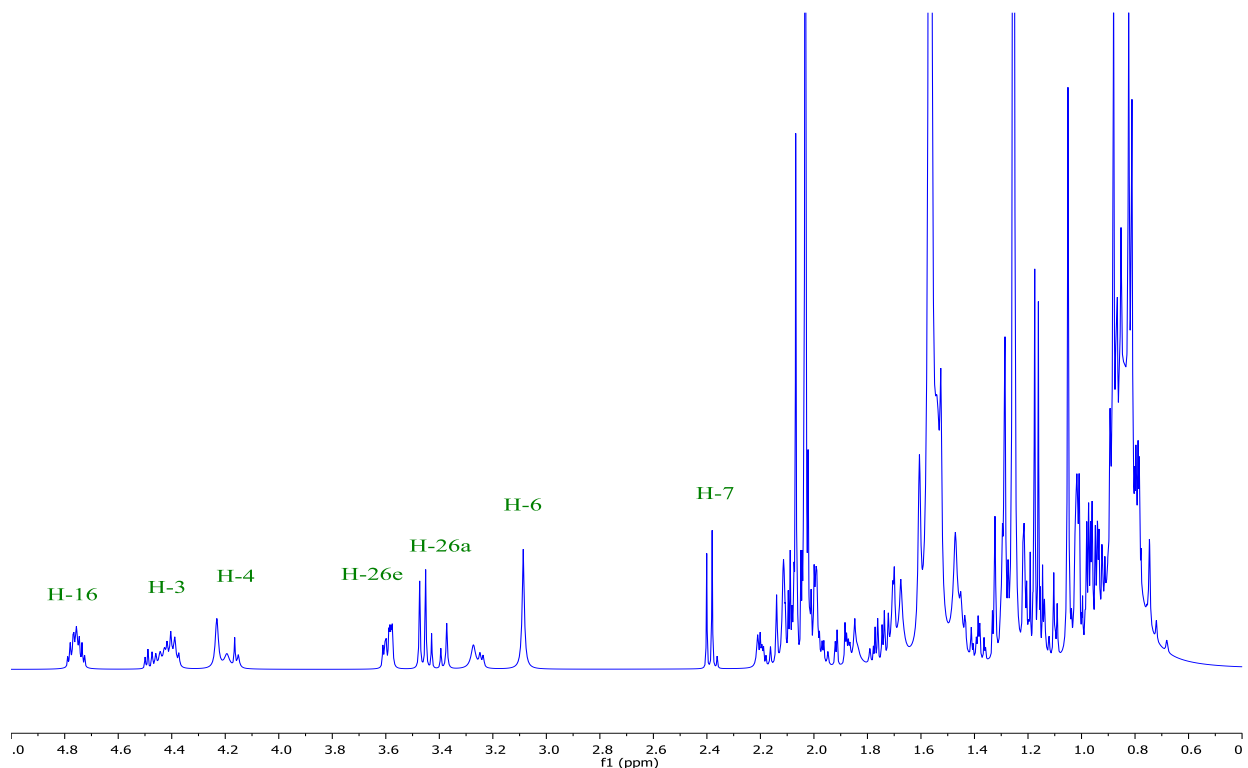


Figura 31. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz del derivado 283.

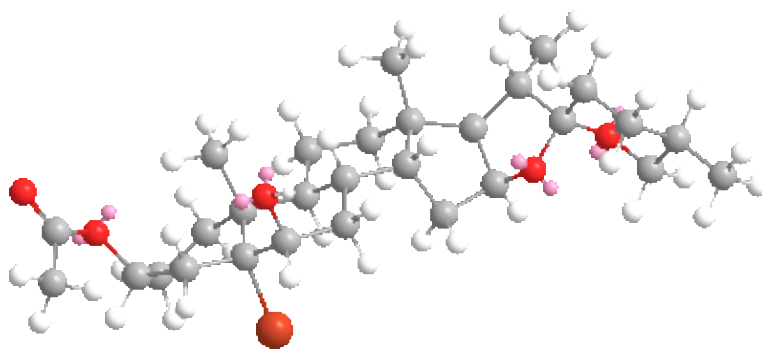


Figura 32. Distribución espacial del derivado 283.

- Acetato de (25*R*)-5-bromo-6-oxo-5α-espirostan-3β-ilo (281)

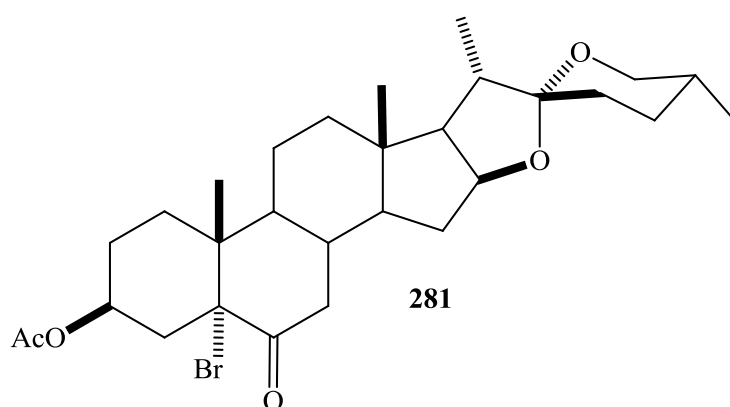


Figura 33. Estructura de 281

En este paso en la síntesis, fue utilizada como materia prima la bromohidrina para realizar la oxidación del grupo hidroxilo en el C-6, analizándose diversos oxidantes a fin de optimizar la reacción. En la tabla 2 podemos observar que el reactivo de Jones a baja temperatura presenta mayor selectividad a un tiempo más largo; en cambio, al momento de realizar la oxidación con reactivo de Collins, el tiempo disminuye al igual que la selectividad, lo cual se explica debido a que el reactivo de Collins es más soluble y está más en contacto con el sustrato, lo que facilita la oxidación, pero también da lugar a productos secundarios.

Tabla 2. Análisis de oxidantes para la obtención de 281.

Oxidante	R. Jones	R. Jones	R. Collins	R. Collins	KMnO ₄	KMnO ₄
Tiempo	30 min	30 min	15 min	25 min	10 min	20 min
Temperatura	25 °C	0 °C	25 °C	0 °C	25 °C	25 °C
Rendimiento	92 %	98 %	75 %	83 %	72 %	63 %

En la caracterización de este compuesto por RMN en el espectro de ^1H podemos observar una gran similitud con la materia prima, con la única diferencia que la señal en 2.3 ppm desaparece debido a la oxidación de este carbono, observándose además un ligero desplazamiento hacia frecuencias altas de la señal correspondiente a los H-7, debido al nuevo grupo carbonilo, con la ventaja que el espectro se observa más resuelto. Esto se debe al cambio de conformación generado por el cambio de hibridación del C-6, como podemos observar en la figura 35 al momento de analizar la estructura de energía mínima hay un mayor espacio disponible para el átomo de Br lo que minimiza los efectos generados por la tensión y efectos estéricos en esta región de la molécula.

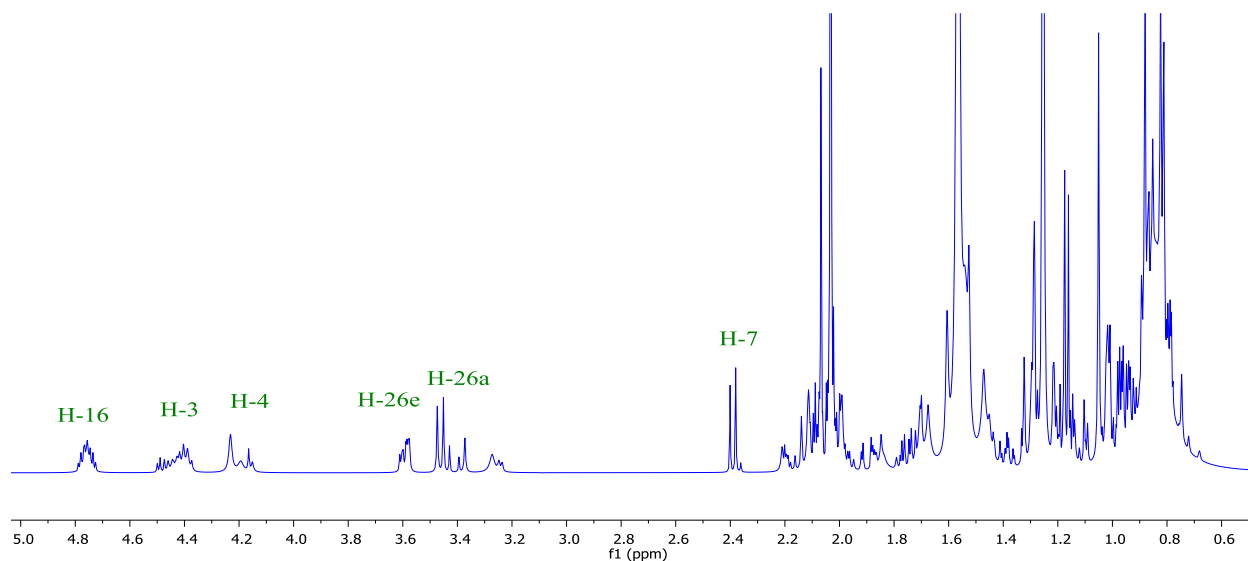


Figura 34. Espectro RMN de ^1H a 500 MHz de **281**.

Así mismo, si observamos la energía total de las moléculas, el derivado cetónico resulta ser la estructura de menor energía, lo que explica una mayor estabilidad. Otro parámetro interesante al momento de minimizar la estructura fue la energía de interacción dipolo/dipolo siendo un 50 % mayor en el derivado **283**, confirmando que la interacción entre el átomo de Br y los átomos electronegativos adyacentes es mayor en la forma reducida que en la forma oxidada, esto debido al cambio de hibridación después de la oxidación generando un aumento del espacio disponible para este átomo, tanto electronegativo como voluminoso, como se puede observar en la figura 35; además esto ayuda a explicar la mayor estabilidad del derivado oxidado con respecto al reducido.

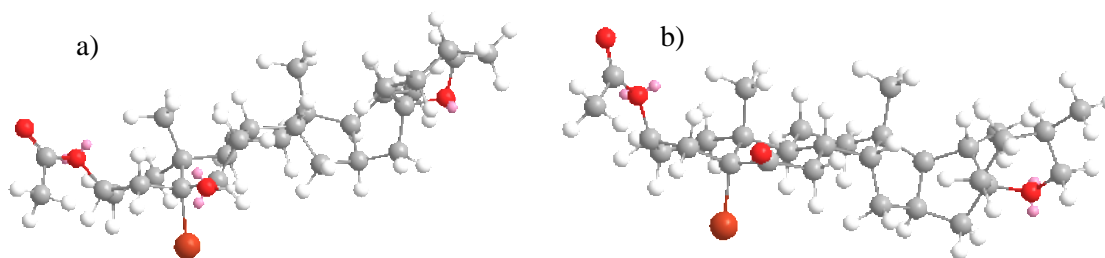


Figura 35. Estructura de mínima energía método MM2 a) **283**: $E_{total}=108.28$ Kcal/mol, b) **281**: $E_{total}=99.84$ Kcal/mol

➤ Acetato de laxogenina, (25*R*)-3β-acetato de 5α-espirostan-6-ona (**280**)

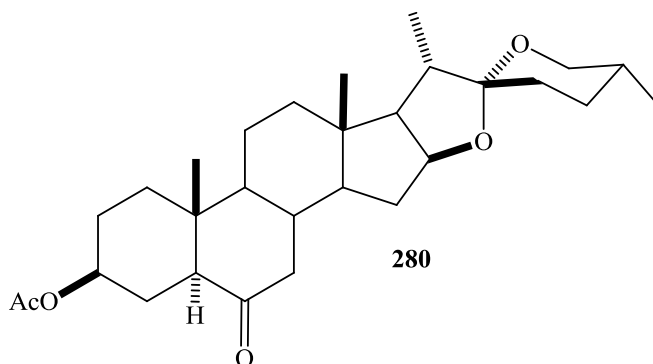


Figura 36. Estructura de **280**.

Para la eliminación del átomo de Br se decidió trabajar con una reacción de reducción con metal en medio ácido, en específico con Zn en ácido acético, debido a que en este proceso la estructura del esqueleto esteroide no se ve modificada [56], es decir se mantiene la estereoquímica de los carbonos, obteniendo así estereoselectivamente el acetato de laxogenina. En la caracterización de **280** por RMN de ^1H , es posible apreciar como la señal del H-4 cambia su desplazamiento drásticamente, debido a la del átomo de Br, pero en 2.26 ppm una señal *dd* con $J_{5-4a} = 12.6 \text{ Hz}$ y $J_{5-4e} = 3.1 \text{ Hz}$ se asigna al H-5 agregado y en 2.34 ppm aparece una señal múltiple que corresponde al H-7e, el cual queda fuera del campo de protección del carbonilo haciendo que se desplace a frecuencia más alta que el axial, de forma análoga se corroboró la diasterotopía de estos protones mediante el experimento de HSCQ, donde se observa como el C-7 se acopla con dos señales que corresponderían a los dos protones en 7 (figura 38), en cambio, la señal de H-5 solo existe una correlación con el C-5 confirmando que es un CH.

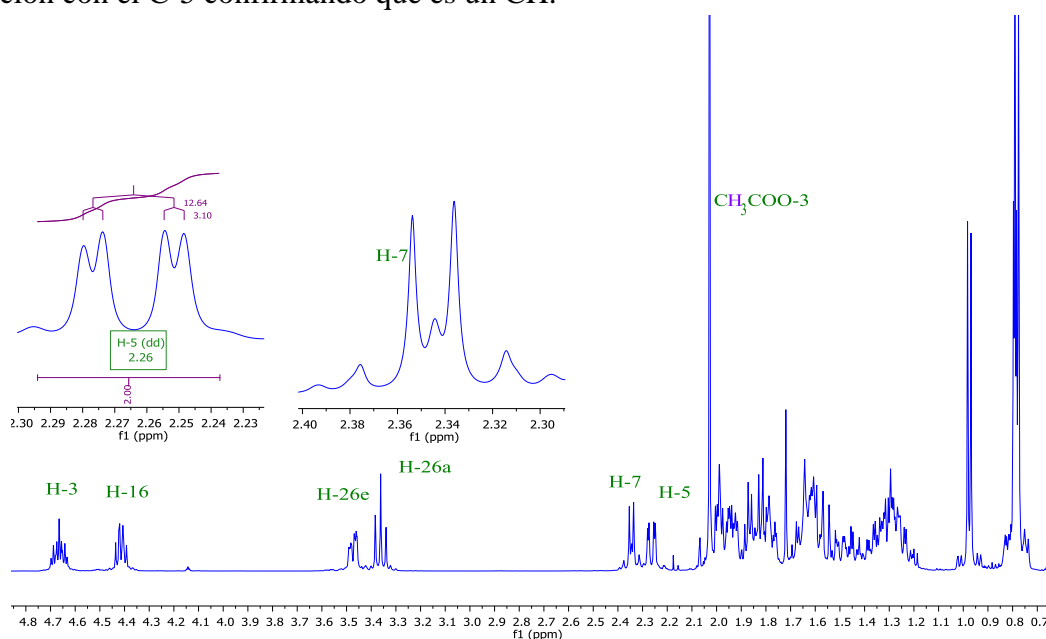


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del acetato de laxogenina (**280**).

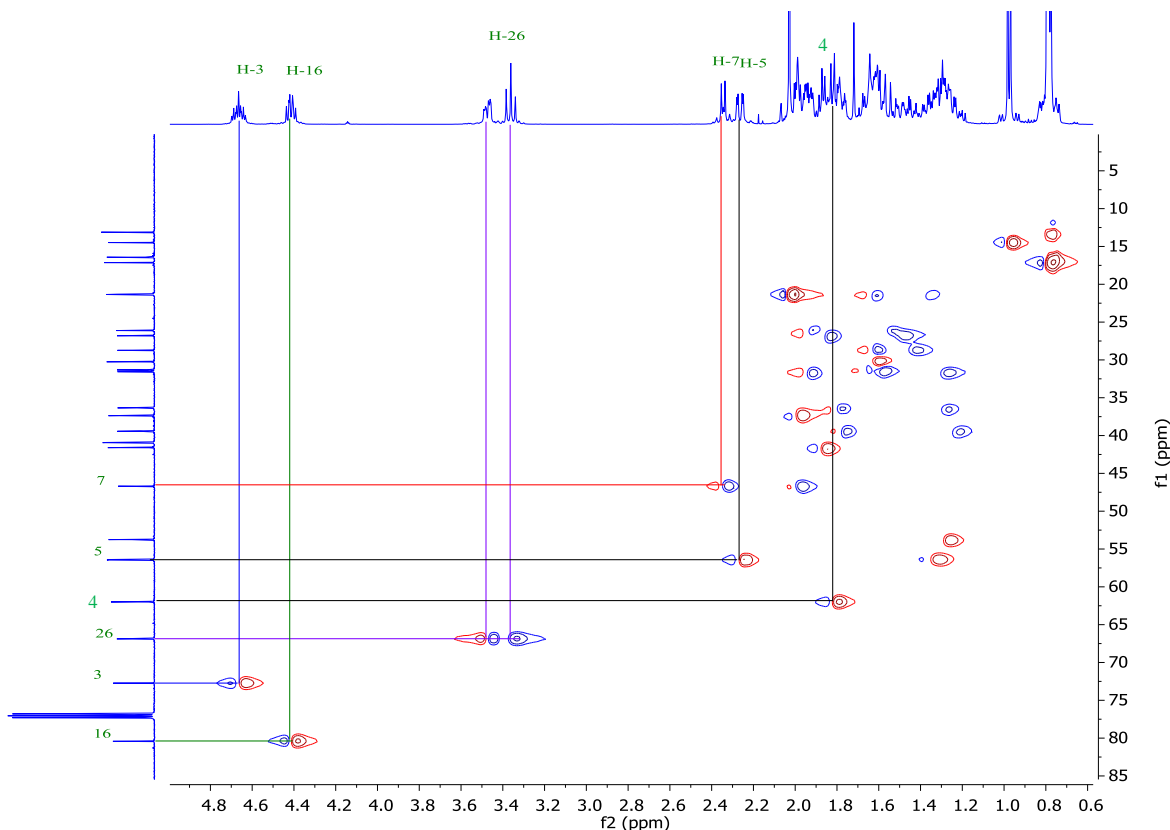


Figura 38. Espectro de RMN-HSQC del acetato de laxogenina (280).

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C se puede observar claramente en 210.3 ppm la señal correspondiente al C-6 de carbonilo y en 170.6 ppm la señal del acetato en C-3, mostrando la obtención del producto, además en 109.2 ppm se encuentra la señal del C-22 típica en este desplazamiento cuando se encuentra el espiroacetal intacto en el esteroide; otras señales características se parecían en 72.6 ppm y 66.2 ppm para los carbonos 3 y 26, el primero desplazado a frecuencias más altas por estar sustituido por un acetato, (figura 39).

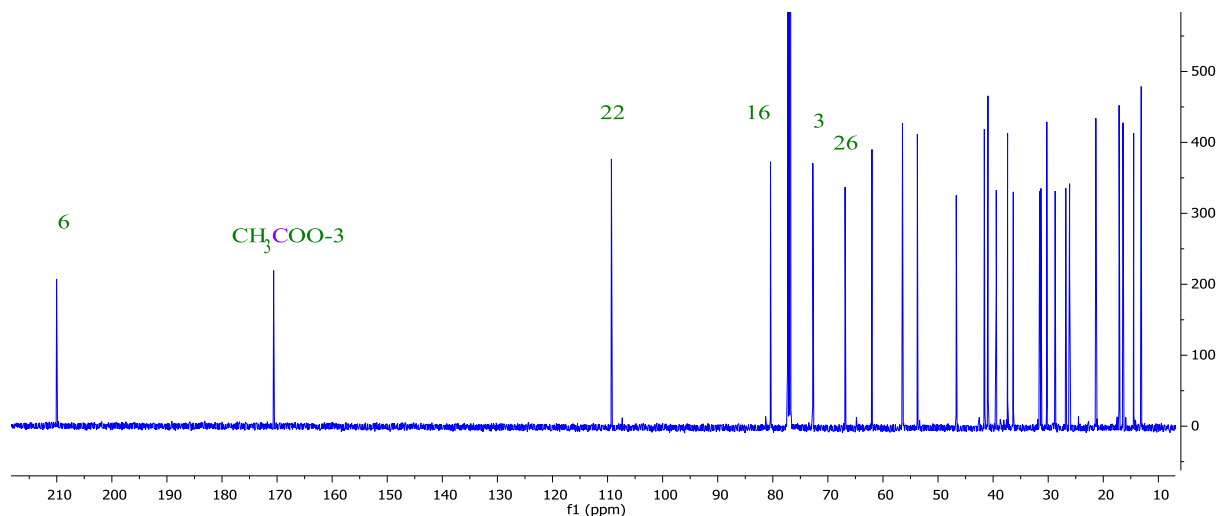


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del acetato de laxogenina (280).

➤ Laxogenina, (25R)-5 α -espirostan-6-ona (**122**)

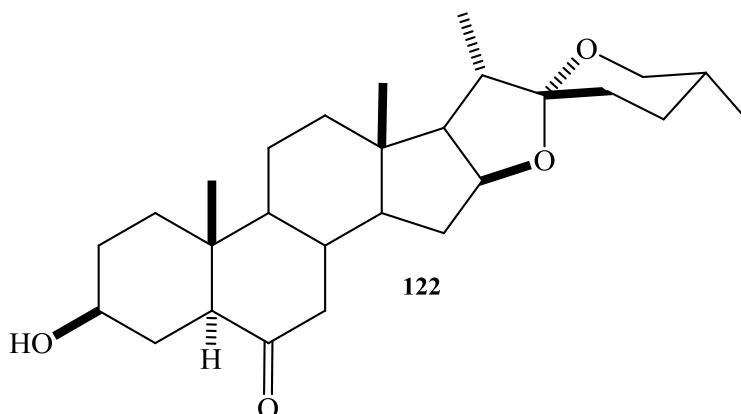


Figura 40. Estructura de **122**.

Finalmente para desproteger el OH-3 y obtener la laxogenina por esta ruta de reacción, se procedió a realizar una hidrólisis básica con una solución alcohólica de KOH, para lo cual se analizaron el efecto de la concentración y la temperatura con respecto al tiempo necesario para realizar la hidrólisis; en la gráficas de la figura 41 podemos notar como con concentraciones mayores del 30 % la transformación llega a un máximo, pero al momento de modificar la temperatura podemos ver como la reacción se acelera considerablemente con una temperatura de 45 °C, ya que a mayor temperatura no se veía aumento de la reacción, al realizar un cruce de condiciones de reacción se puede establecer que a 45 °C durante 1 h son las condiciones óptimas para la obtención de este producto.

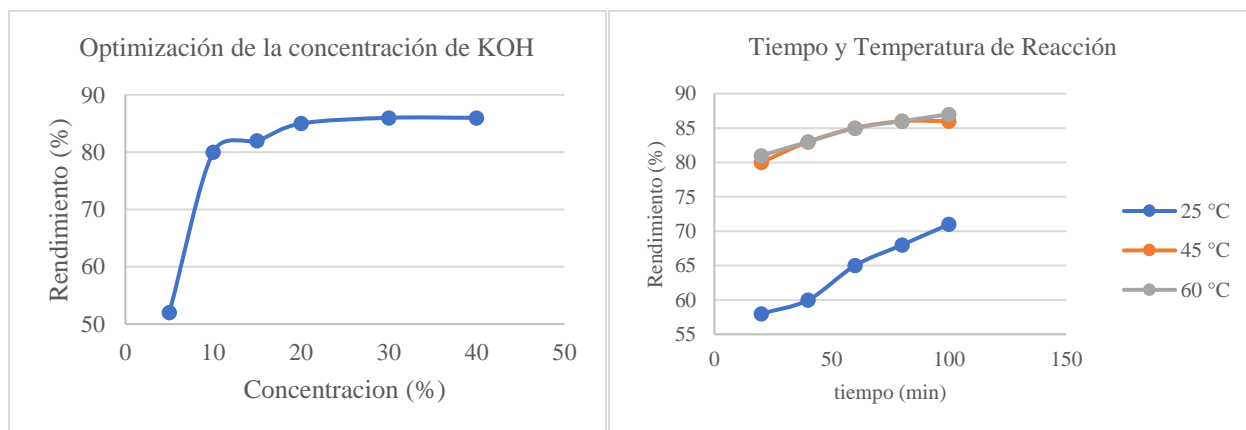


Figura 41. Gráficas de optimización de la hidrólisis de acetato de laxogenina (**122**).

En el caso de la caracterización de este producto, se puede apreciar que se llevó a cabo la hidrólisis del acetato en C-3, los cambios más notables en el espectro de ^1H son la desaparición de la señal simple en 2.05 ppm correspondiente a los protones del metilo del grupo acetato, y la señal correspondiente al H-3, la cual se desplaza a 3.58 ppm debido al cambio de grupo funcional (base de OH), desplazamiento característico observado previamente en la acetilación de diosgenina.

Desde el punto de vista de la asignación espectroscópica, se observó que la desprotección del hidroxilo mejoró el ambiente magnético alrededor de las señales de H-7, lo que permitió que se resolvieran mejor las señales y calcular las constantes de acoplamientos de ambas señales, primero en 2.35 ppm tenemos una señal *dd* con $J_{gem} = 8.54 \text{ Hz}$ y $J_{7a-8} = 2.27 \text{ Hz}$, que corresponde al H-7e ya que este permite el acoplamiento con el H-8, así mismo en 1.98 ppm encontramos la señal *d* con $J_{gem} = 8.54 \text{ Hz}$ del H-7a el cual solo tiene acoplamiento geminal ya que el ángulo que forma con el H-8 elimina el acoplamiento con el mismo.

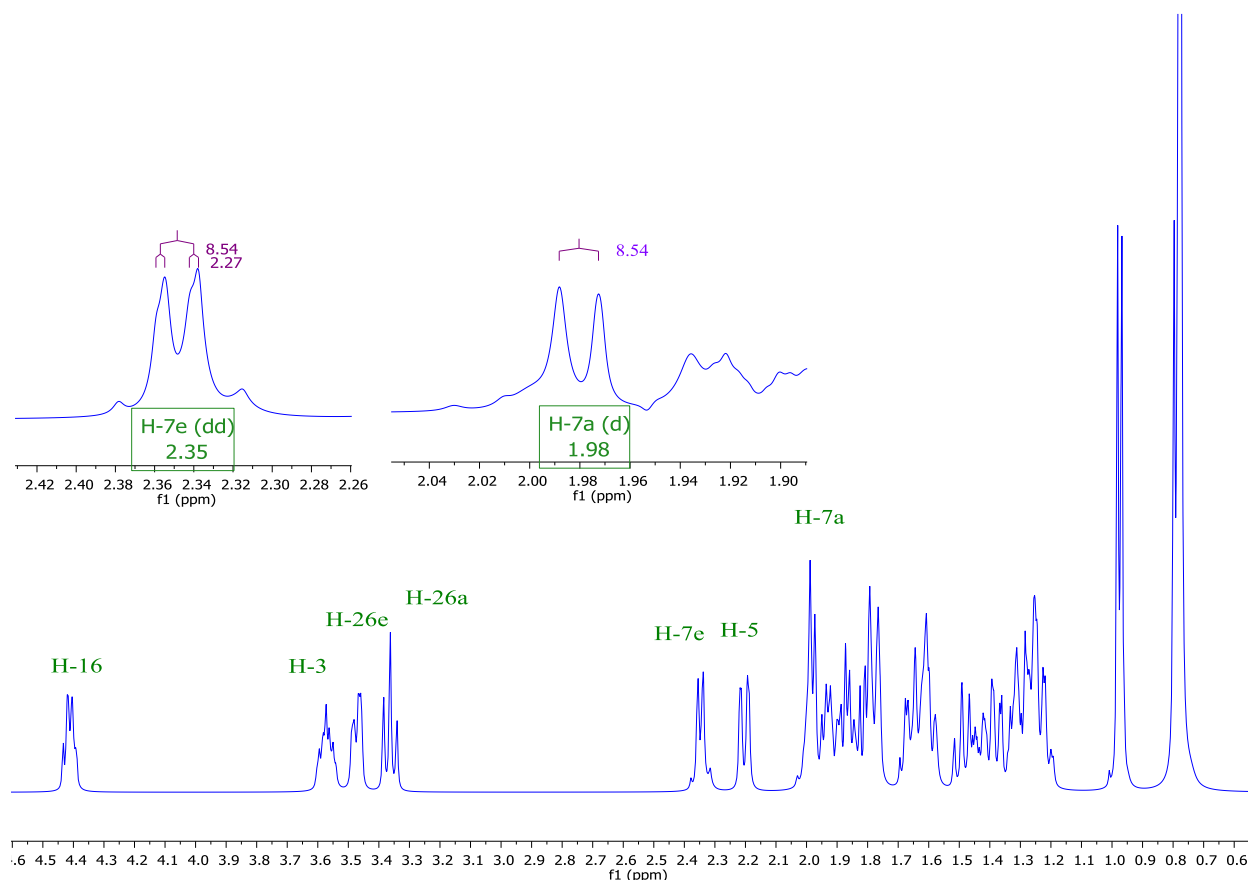


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de laxogenina (**122**).

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C podemos observar análogamente una gran similitud con la materia prima, con la diferencia de que desaparece la señal en 170 ppm correspondiente al C del C=O del éster, así mismo la señal que corresponde al C-3 se desplaza a menor frecuencia debido al cambio de grupo funcional, además con la nueva información obtenida en el espectro de ^1H en conjunto con el experimento de HSQC, permitió asignar los C-5 y C-7.

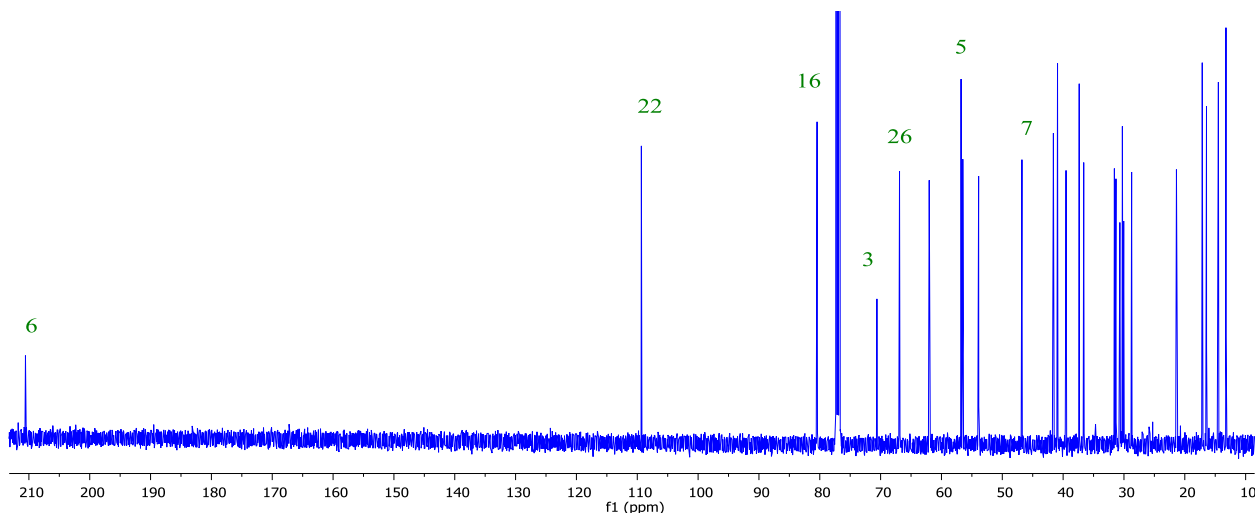
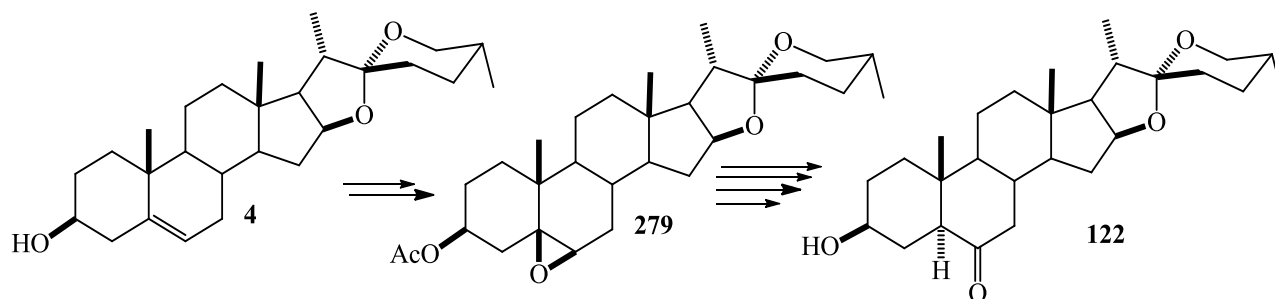


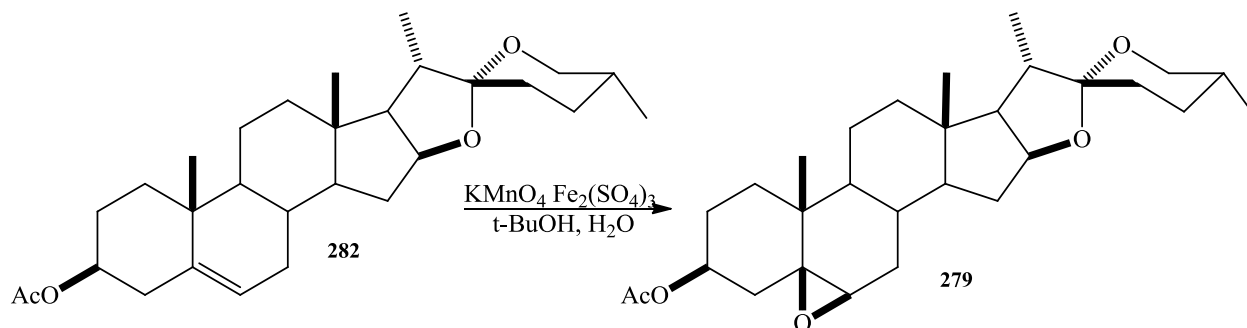
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la laxogenina (122).

➤ Diseño del proceso semi-continuo de la obtención de laxogenina ruta A.



Esquema 29. Obtención de laxogenina ruta A.

A partir de los compuestos debidamente caracterizados y optimizadas cada una de las reacciones por separado se puede proceder a analizar las características de cada una, con la finalidad de diseñar un proceso continuo o en su defecto semi-continuo según los resultados del análisis, debido a que un proceso de esta índole se identifica por unir en reacciones consecutivas diversos pasos de síntesis, minimizando así en muchos casos etapas de purificación y tratamientos de reacción que generan pérdida de intermediarios y/o productos, abatiendo directamente el tiempo de reacción.



Esquema 30. Epoxidación estereoselectiva de acetato de diosgenina.

En primera instancia, al analizar la reacción de epoxidación selectiva denota que en esta reacción su principal inconveniente es la eliminación del oxidante al terminar la reacción; normalmente este se elimina con una cama de gel de sílice, la cual funciona como adsorbente para el mismo, pero en este caso existe la problemática del agua y el *t*-Butanol en la reacción, que hace difícil su tratamiento, por lo que se incorporó una etapa con una cama de Na₂SO₄ anhidro para eliminar el agua, posteriormente una capa de gel de sílice para eliminar la mayor parte de oxidante, y finalmente una última etapa de una mezcla 50/50 de Na₂SO₄ y gel de sílice para retirar el resto de oxidante y humedad filtrada por las primeras etapas. En la figura 44 podemos observar el sistema de eliminación de oxidante-humedad en funcionamiento, el cual no afectó el rendimiento ni la pureza observada en la etapa de optimización previa de la reacción.

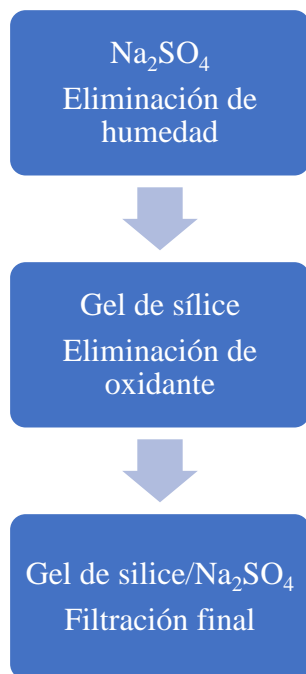
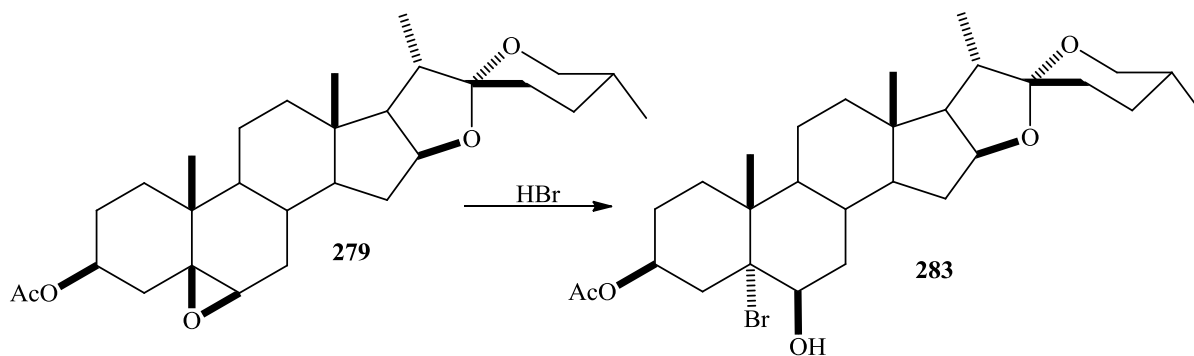
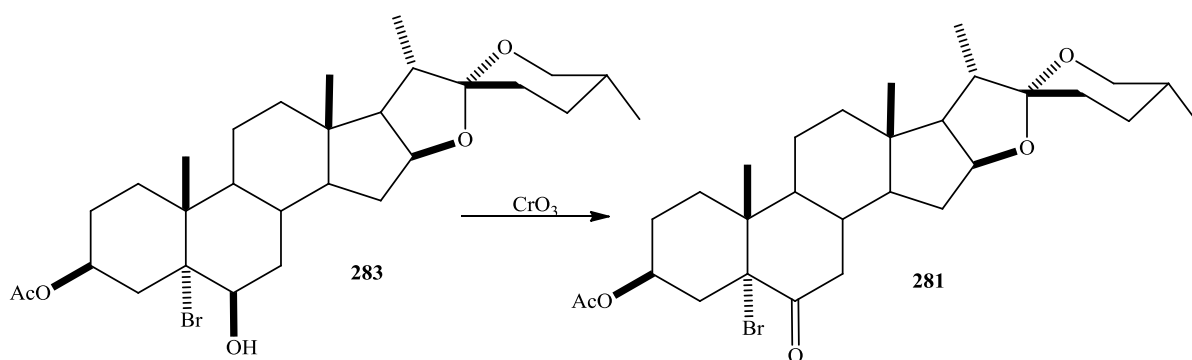


Figura 44. Diagrama de flujo del sistema de eliminación del oxidante-humedad de reacción de epoxidación estereoselectiva de acetato de diosgenina.



Esquema 31. Apertura del epóxido 279 con HBr.

Debido a la alta selectividad en la reacción anterior, se decidió trabajar directamente con el crudo de reacción en el CH_2Cl_2 que se obtenía, donde con el estudio previo que se había realizado sobre la cantidad de HBr necesario y el tiempo de reacción se procedió a preparar un matraz de bola de 250 mL con 10 mL de HBr ; sin embargo observamos que en el tiempo de reacción de media hora aún quedaba parte de materia prima, lo cual se explica debido al efecto de dilución que existe dada la presencia de mayor cantidad de CH_2Cl_2 , por lo que se decidió conectar con el proceso anterior, mediante el mismo matraz con HBr pero colocado en agitación magnética bajo el sistema de filtración de oxidante-humedad diseñado para la etapa anterior del proceso. Al realizar esta modificación, se observó un aumento en la velocidad, debido a que la reacción ocurría en presencia de exceso de HBr por la dosificación que entregaba el sistema de filtración, para lo cual se fue monitoreando la presencia del epóxido por CCF en la salida del sistema de filtración teniendo un tiempo neto de filtración de 1 h hasta que dejó de aparecer el epóxido, mismo tiempo en el que el HBr habría terminado de reaccionar, obteniendo un crudo de reacción listo para la oxidación.

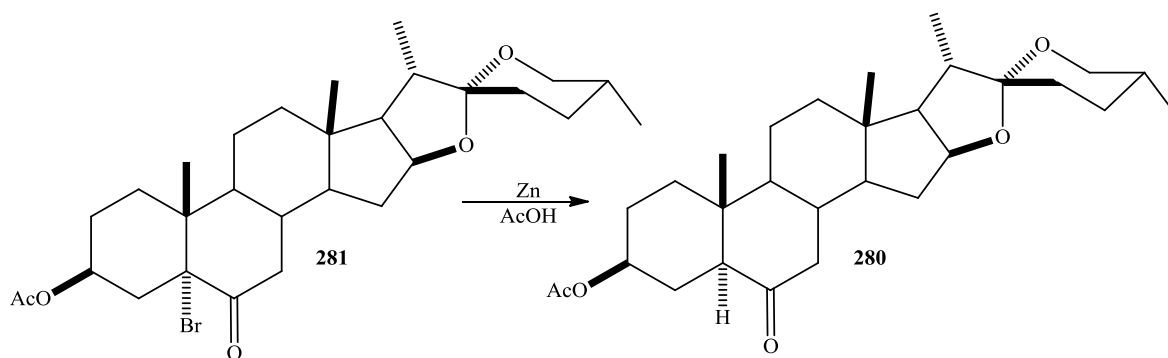


Esquema 32. Oxidación del derivado bromado 283.

A partir del crudo de reacción anterior se analizó la posibilidad de eliminar la etapa de neutralización del HBr excedente, debido a que la reacción normal se lleva a cabo con reactivo de Jones, misma que es en medio ácido. Por lo tanto, se analizaron las condiciones descritas en la tabla 3, observando que con el reactivo de Jones debido al alto pH, el producto tendía a descomponerse, por lo tanto, se eliminó el ácido adicionando únicamente una solución acuosa de CrO_3 modificando la concentración hasta llegar a una solución al 20 % que fue idónea para oxidar todo el esteroide sin dar pie a reacciones secundarias, manteniendo el rendimiento de la reacción y evitando la neutralización de la etapa anterior, minimizando pérdidas de materia prima por estas etapas.

Tabla 3. Análisis de la oxidación del derivado bromado 283

Oxidante	R. Jones	CrO_3 5 %	CrO_3 5 %	CrO_3 10 %	CrO_3 20%	CrO_3 30%
Tiempo	30 min	30 min	1 h	30 min	30 min	30 min
Rendimiento	58 %	76 %	88 %	85 %	91 %	92 %



Esquema 33. Reducción del Bromo para la obtención de acetato de laxogenina.

Debido al cambio drástico de condiciones de reacciones para llevar a cabo la reducción del átomo de carbono con el Bromo, fue necesario la eliminación total de residuos de oxidante, para lo cual se empleó el sistema de eliminación de oxidante-humedad de la primera etapa de este proceso, con la diferencia que al finalizar la filtración se procedió a evaporar todo el solvente orgánico de la reacción, con la finalidad de sustituir este por ácido acético para la siguiente reacción, añadiendo Zn metálico en malla llevando la reacción a reflujo. Se monitoreo y analizó el avance de la reacción en función del tiempo para encontrar el tiempo óptimo, podemos observar en la figura 45 como después 2 h no se presentan cambios considerables en el rendimiento de la reacción.

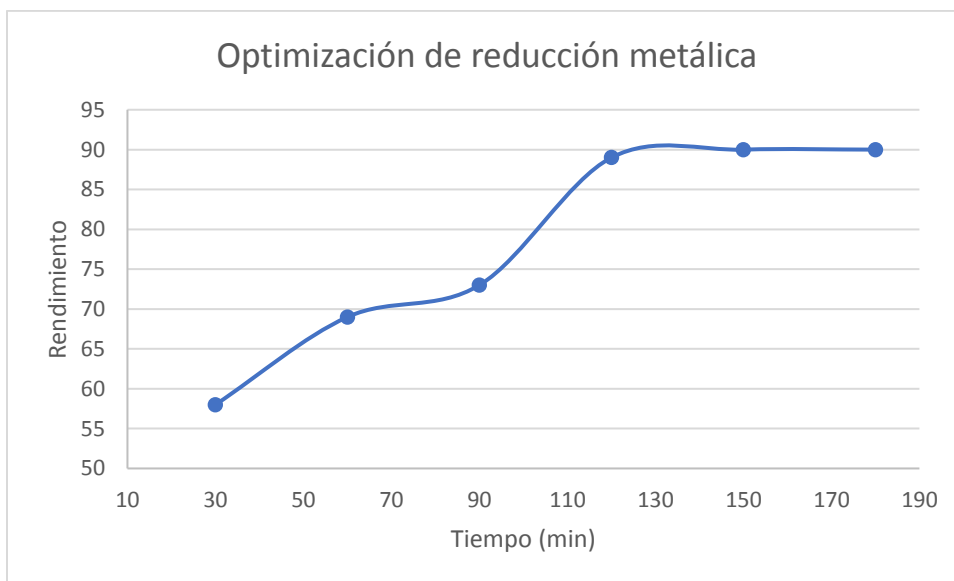
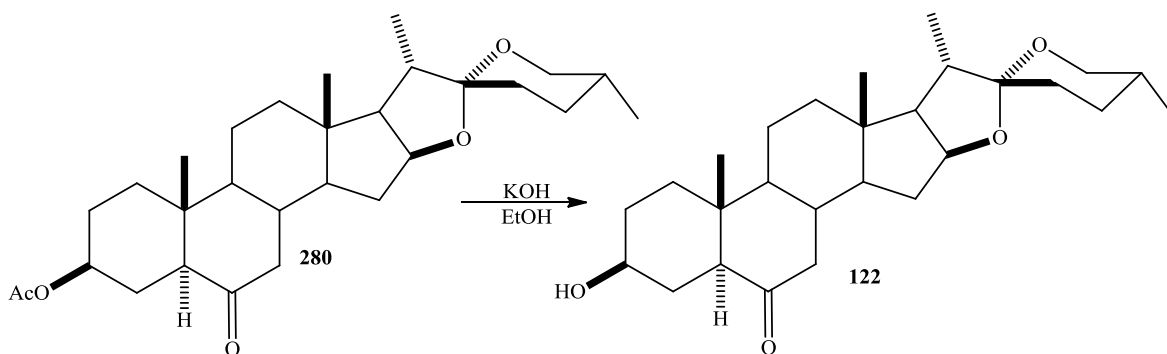
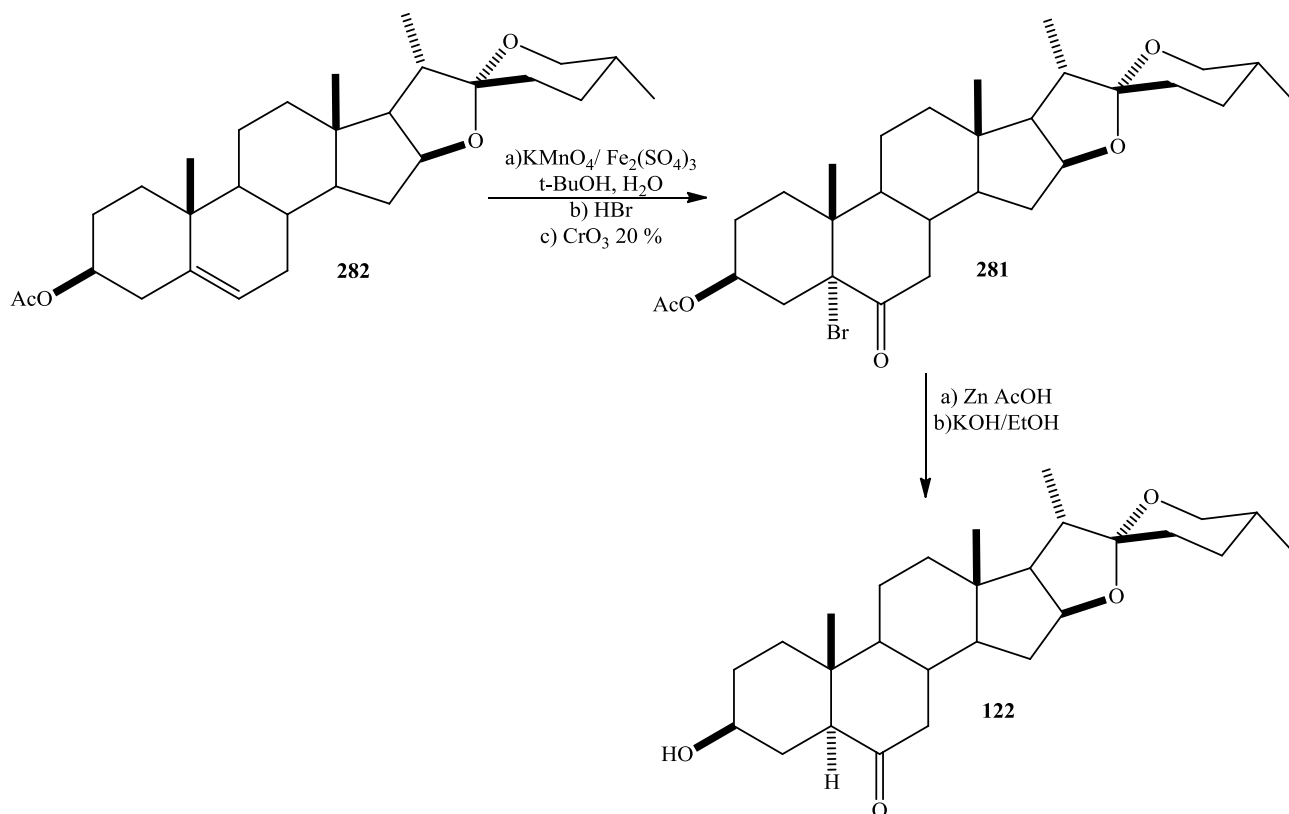


Figura 45. Gráfica tiempo vs rendimiento para la obtención de acetato de laxogenina.



Esquema 34. Hidrólisis básica del acetato de laxogenina (280).

En la última etapa de reacción, es necesario llevar a cabo la hidrólisis básica del acetato en el C-3, para llegar a la obtención de laxogenina (**122**). En etapas previas se observó la necesidad de un ligero calentamiento para mejorar el tiempo de reacción, pero en este caso en particular aún se tenía que eliminar el AcOH del crudo de reacción, por lo que se decidió neutralizar con la solución utilizada para llevar a cabo la hidrólisis del acetato en C-3, ensayando la cantidad de solución necesaria para llevar a cabo ambas reacciones simultáneamente; el calor desprendido por la neutralización permitió aumentar la velocidad de la reacción de desprotección conduciendo a la segunda etapa continua del proceso global de la obtención de laxogenina.



Esquema 35. Proceso semi-continuo de obtención de laxogenina (122) por Ruta A.

Al analizar toda la ruta de síntesis, se puede dividir la ruta de reacción en dos procesos continuos, como se observa en el esquema 35, generando así un proceso semi-continuo que se detalla en el diagrama de bloques de la figura 46, permitiendo no solo una optimización del rendimiento neto de la reacción desde un valor del 70 % hasta un 82 %, pero más importante se presenta una reducción significativa en el tiempo de obtención de 20 h hasta solo 8 h, que no solo aumenta la disponibilidad de esta materia prima, sino que abate el tiempo de obtención y reduce el número de operaciones unitarias requeridas, lo que desde el punto de vista ingenieril hace este proceso rentable y de interés para un estudio a nivel planta piloto.

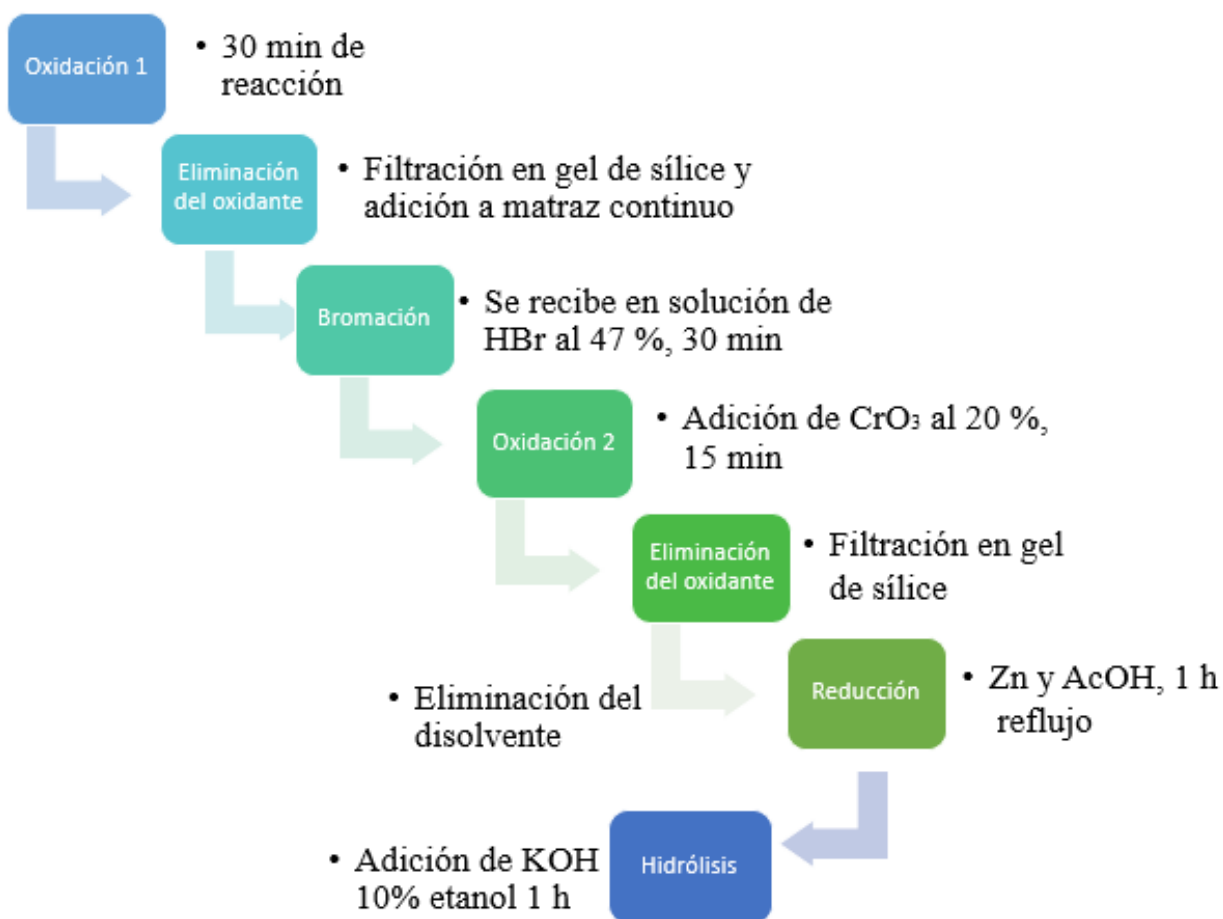


Figura 46. Diagrama de bloques del proceso semi-continuo de obtención de laxogenina (122) ruta A.

4.1.2 Ruta B. Obtención de laxogenina vía un *i*-esteroide.

En la búsqueda de otra metodología alterna para la obtención de laxogenina se exploró la obtención mediante la síntesis de un derivado *i*-esteroidal. Como se observó en los antecedentes [50], la formación de *i*-esteroides da lugar a la adición de nuevos grupos tanto en la posición 6 como en la posición 3 de la estructura esteroidal. A partir de este punto se diseñó una ruta con la finalidad de acortar los pasos y buscar aumentar el rendimiento, con reactivos que dejan menos residuos, iniciando con diosgenina (4) como materia prima y modificando como se describe a continuación.

➤ Tosilato de diosgenina (284)

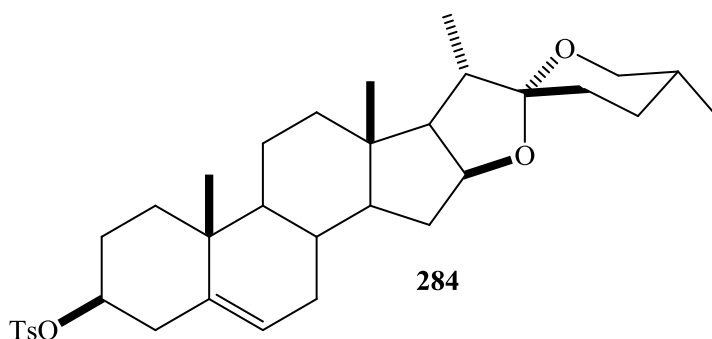


Figura 47. Estructura de 284.

Con la finalidad de permitir la eliminación del grupo hidroxilo del C-3 del esteroide se procedió a realizar la esterificación con cloruro de tosilo (TsCl), reacción ampliamente reportada en condiciones básicas y anhidras [46], debido a lo buen grupo saliente que resulta ser el tosilo; por lo cual se analizaron diversos solventes no nucleofílicos, los cuales se describen en la tabla 4 a diversos tiempos de reacción, siendo la piridina el disolvente ideal tanto en tiempo, como en solubilidad para la obtención de este derivado tosilado inestable, lo que se explica por la alta reactividad del grupo tosilo. Se analizaron las condiciones de reacción, con la finalidad de incrementar al máximo el rendimiento y evitar la descomposición; en la figura 48 podemos observar como a tiempos de 4 h el producto ha alcanzado un alto grado de conversión y pureza con una relación molar 3:1 entre el TsCl y el esteroide.

Tabla 4. Análisis del efecto del disolvente de reacción en la tosilación de diosgenina.

Solvente	Piridina	Piridina	DMF	DMF	Tolueno	Dioxano
Tiempo	8 h	12 h	8 h	24 h	24 h	12 h
Rendimiento	82 %	89 %	69 %	72 %	15 %	65 %

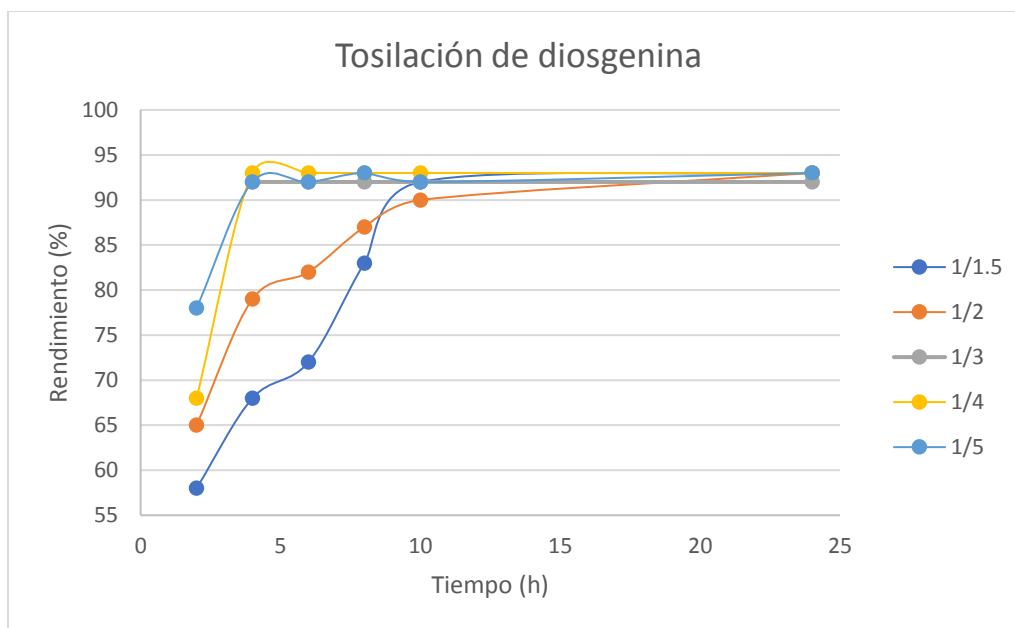


Figura 48. Gráfica de tiempo de reacción y relación molar de reactivos para la tosilación de diosgenina.

Para la caracterización del producto obtenido, fue necesaria su purificación por columna cromatográfica en alúmina neutra para evitar la descomposición del producto. En el espectro de RMN ^1H es posible observar la aparición de señales en la región de los aromáticos como dos señales dobles con $J = 7.81$ Hz, que se debe a las señales correspondiente a los protones del anillo aromático r del grupo tosilo insertado a la molécula; por otra parte se observa una gran similitud con el espectro de ^1H del acetato de diosgenina, observando un desplazamiento a frecuencias altas de la señal correspondiente al H-3 debido al cambio de grupo funcional, pero en este caso la señal de H-3 se observa en 4.3 ppm, a diferencia del grupo acetato donde se desplaza hasta 4.6 ppm, esto se debe a la presencia del grupo azufrado junto con la nube electrónica del anillo aromático, impiden un efecto total sobre este protón por lo que no se desplaza a la misma frecuencia que cuando se trata del grupo acetato, con la ventaja que este desplazamiento permite estudiar esta señal y asignarla como un *tt* con $J_{3-2e} = J_{3-4e} = 4.74$ Hz y $J_{3-2a} = J_{3-4a} = 11.5$ Hz esto se explica debido al ángulo diedro que forma H-3 con ambos ecuatoriales y con ambos axiales, en el caso de los axiales forma un ángulo de 180° maximizando el valor de la constante de acoplamiento, mientras que en ecuatorial, por la distribución espacial, forma un ángulo entre 40° - 60° lo que disminuye el valor de esta constante, sin eliminar dicho valor, efecto que se observaría con un ángulo de 90° de interacción.

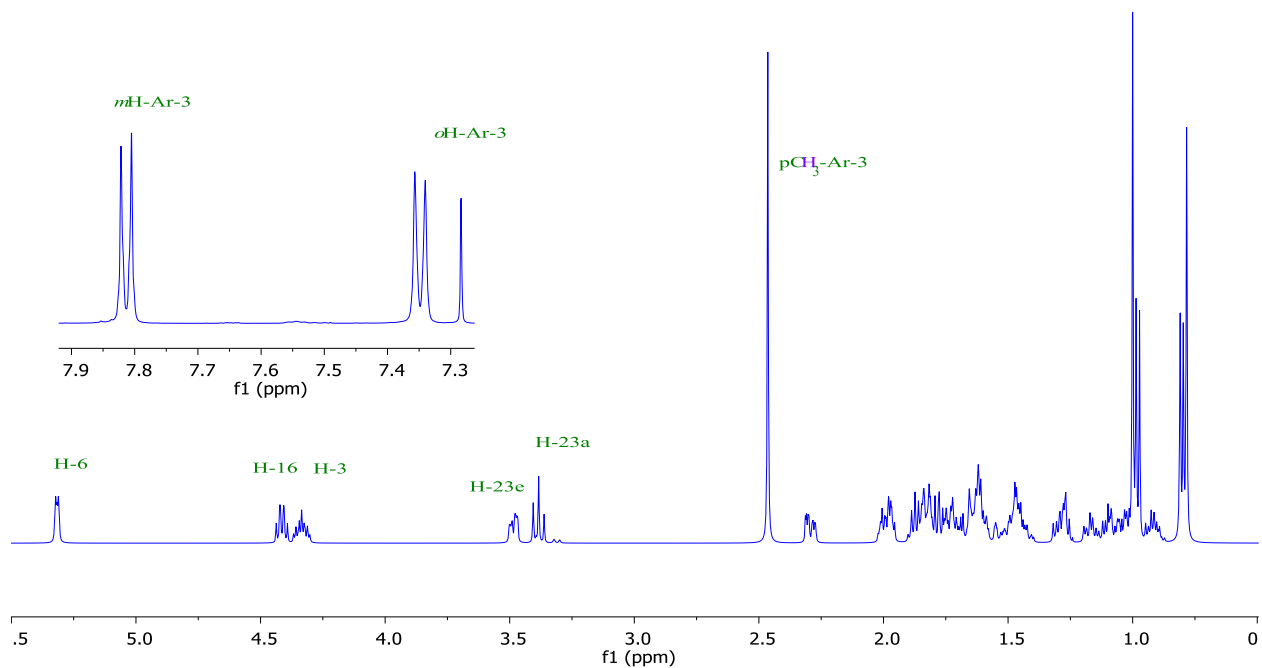


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del tosilato de diosgenina (284).

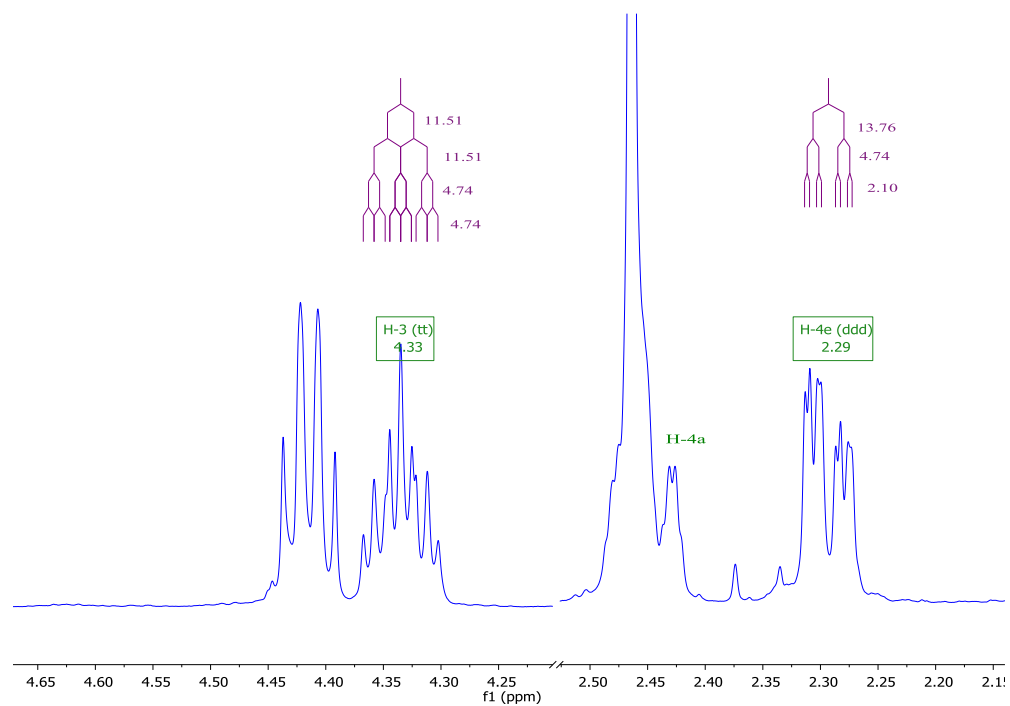


Figura 50. Expansión del espectro de RMN ^1H a 500 MHz del tosilato de diosgenina (284).

Otra señal que se vuelve de interés es la señal correspondiente a los protones en C-4; en la figura 51 podemos observar una señal que integra para un protón y al analizar sus constantes de acoplamiento, podemos observar que tiene una J igual a la observada en el H-3, lo que indica que estos protones se acoplan entre sí, siendo una interrogante por qué solo integra para un protón tratándose de un CH_2 , lo cual puede explicarse al observar el espectro de HSQC, que demuestra que este protón diasterotópico se diferencia del otro que se encuentra traslapado con la señal del metilo en 2.46 ppm, que corresponde al metilo del anillo aromático del grupo tosilo, de la cual como se observa en la figura 50 sobre sale una parte de la señal, aunque debido al tipo de señal se espera sea más compleja, mientras que la señal en 2.29 ppm se describe como una señal *ddd* debido al acoplamiento geminal y con los H-5 y H-4, con valores de $J_{4a-3} = 4.74$ Hz, $J_{gem} = 13.76$ Hz y $J_{4a-5} = 2.10$ Hz.

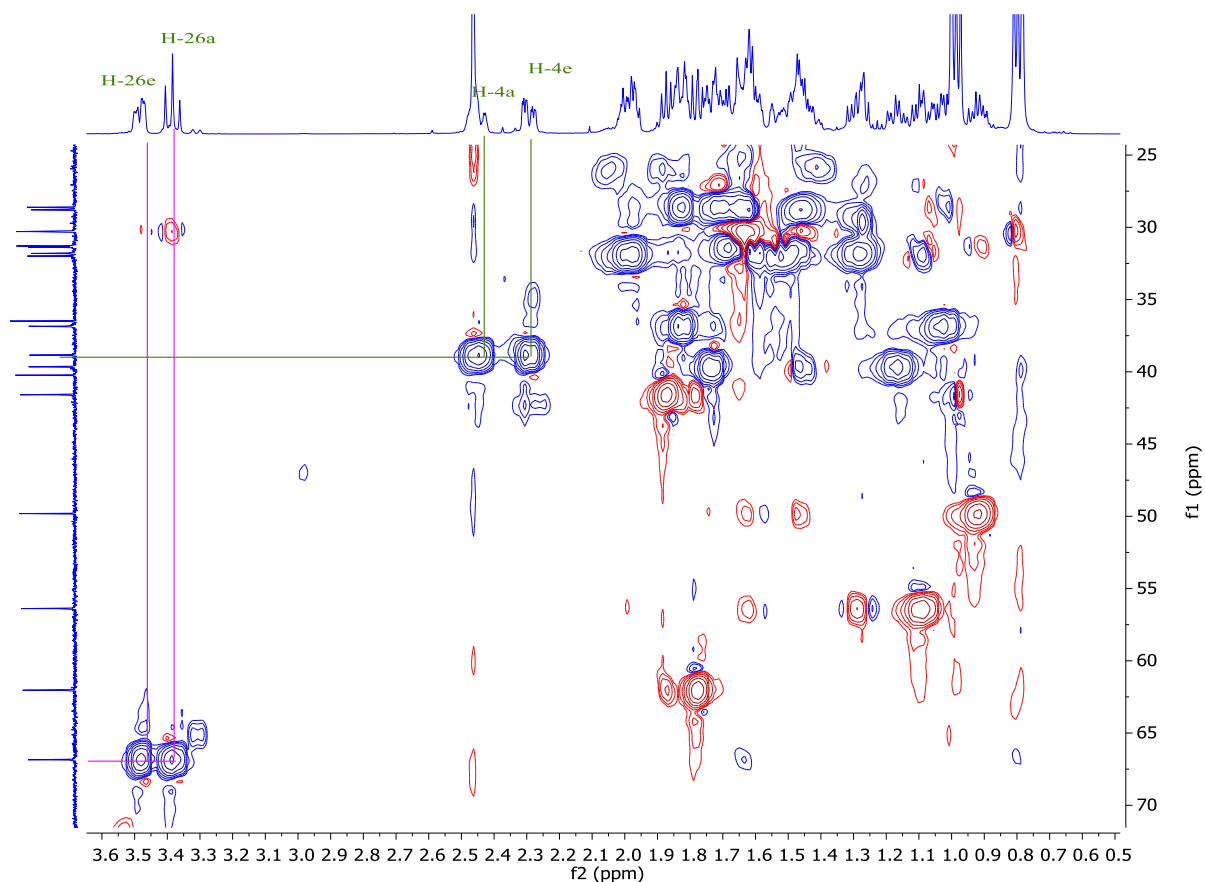


Figura 51. Espectro de RMN HSQC del tosilato de diosgenina (284).

Por otro lado, para la asignación de las señales correspondientes al anillo aromático y distinguir cuales se debían a los protones en *orto* de los *meta*, fue posible hacerlo mediante el experimento COSY. Con la señal previamente asignada el metilo del anillo aromático podemos observar una interacción directa con solo una de las señales del anillo aromático, por lo que ésta se debe a los protones en *meta*, por lo que la otra señal se debe a los *orto*, como se observa en la figura 52.

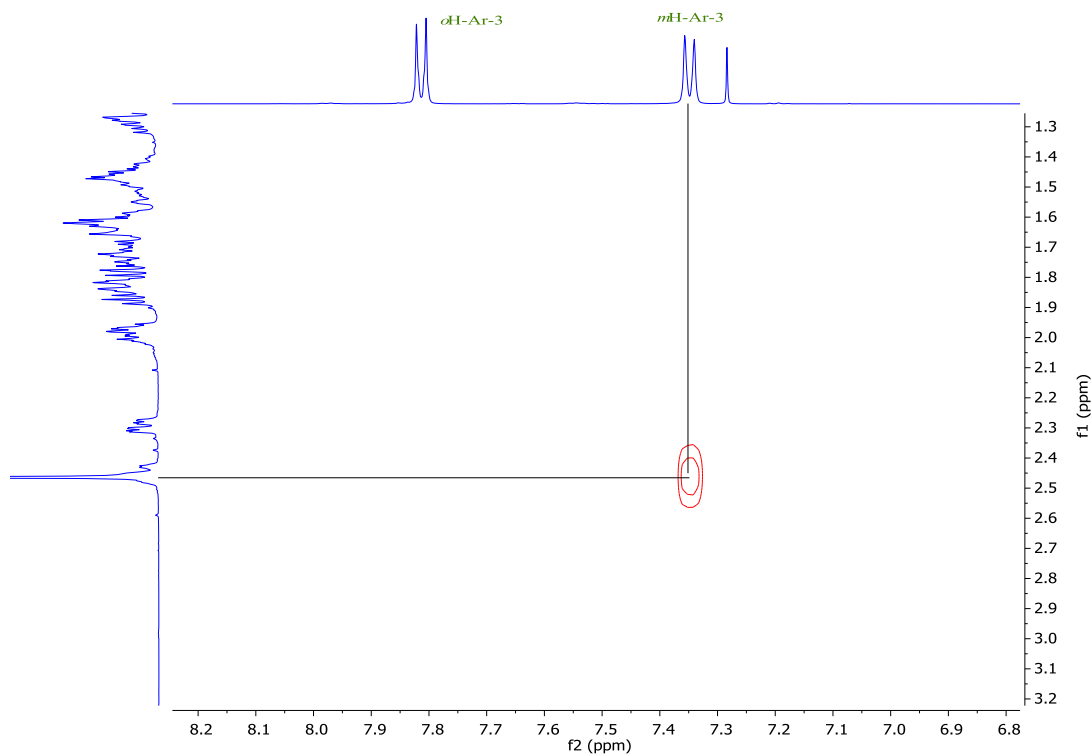


Figura 52. Espectro RMN COSY del tosilato de diosgenina (284).

Finalmente, en el espectro de ^{13}C podemos distinguir solo algunos cambios significativos, como la aparición de las señales en la región de los aromáticos, las cuales fueron asignadas con el experimento de HSQC previamente estudiado. Un efecto particularmente destacable es la señal correspondiente a C-3, misma que normalmente aparece a frecuencias menores que el CDCl_3 pero con el cambio de grupo se desplaza hasta 82.5 ppm.

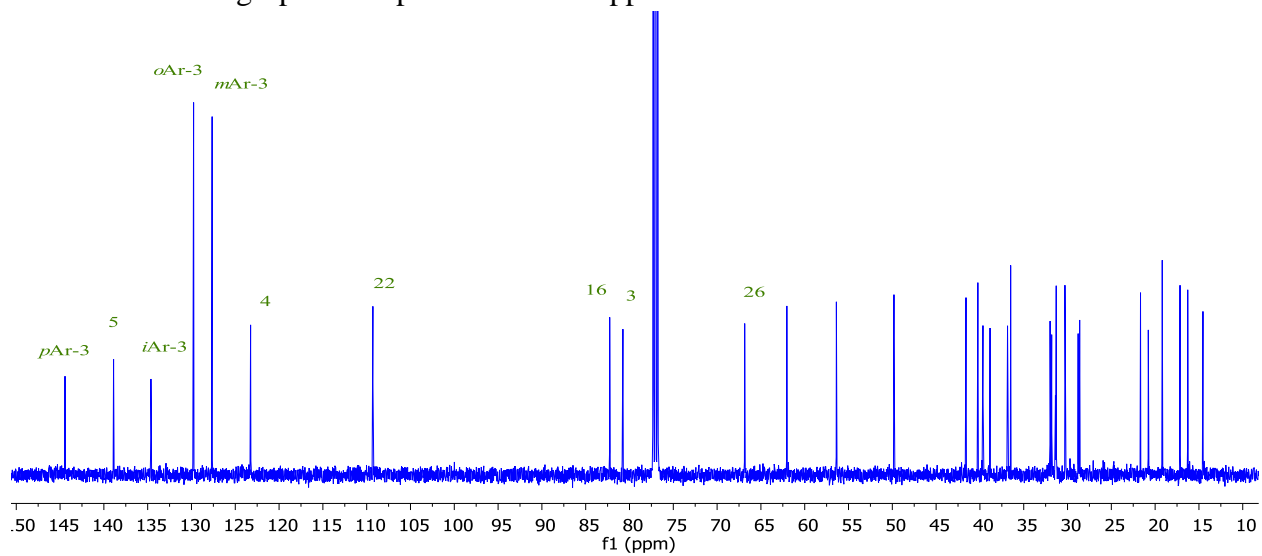


Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C a 125 MHz del tosilato de diosgenina (284).

➤ (25*R*)-3,5-ciclo-5α-espirostan-6β-ol (**278**)

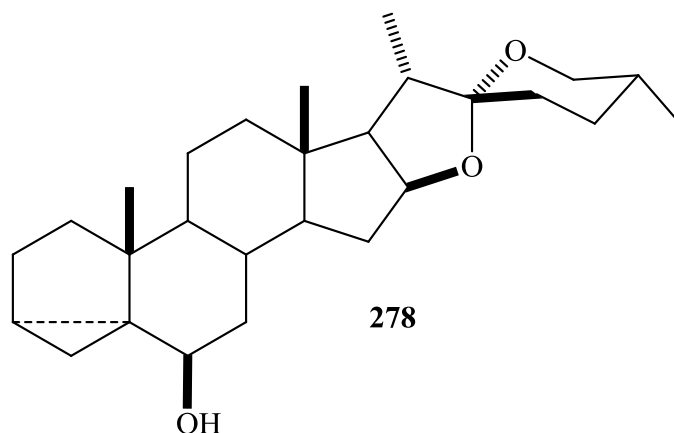
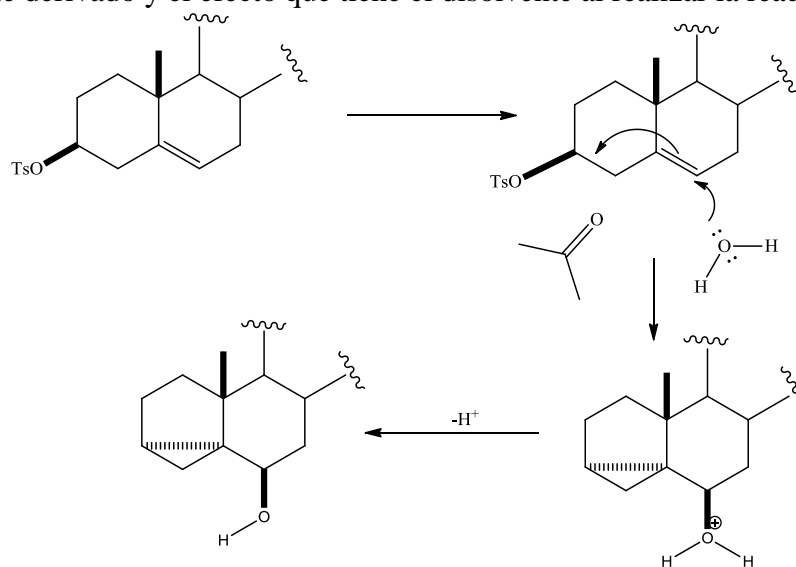


Figura 54. Estructura de **278**.

Con el objetivo de la obtención del *i*-esteroide a partir del derivado tosilado, se procedió a la realización de una reacción de desplazamiento intramolecular en medio acuoso. Si bien cabe la interrogante de que, en condiciones básicas el nucleófilo puede atacar al directamente al carbono unido al grupo tosilo y dar una reacción de tipo S_N2, al utilizar la acetona como disolvente y medio de reacción, se permite la polarización de los enlaces para dar lugar a la reacción intramolecular, como se observa en el mecanismo del esquema 34. Además, el producto de la reacción de sustitución (la α-diosgenina) no es un producto estable debido a las interacciones 1,3 que genera el hidroxilo en posición axial; en cambio el derivado *i*-esteroidal no presenta este tipo de interacciones, aunque se forma un puente entre tres carbonos no muy estable. Al momento de realizar la reacción, se observó la formación de un producto único, el cual al determinar su estructura por RMN se confirmó la presencia del *i*-esteroide, demostrando estar más favorecida la formación de este derivado y el efecto que tiene el disolvente al realizar la reacción.



Esquema 36. Mecanismo de formación del derivado **278**.

En el espectro de RMN de ^1H de este derivado podemos observar un gran número de señales sin modificar en comparación con la diosgenina, un cambio significativo se presenta en la señal en 3.19 ppm que se observa como una señal *t* con $J= 2.9$ Hz, que se asigna al H-6 resultado de la formación del alcohol en este carbono, que se acopla con los dos protones H-7, en los que se minimiza el valor de la constante de acoplamiento por el ángulo diedro que forman, debido a la torsión de los ciclos debido a la formación del biciclo con el puente entre 3 carbonos. En la figura 56 podemos observar la estructura de mínima energía calculada por el método MM2 mostrando cómo el ángulo se minimiza a un valor entre 40° y 50° , motivo por el cual las constantes de acoplamiento son mínimas; por otro lado podemos observar que la señal correspondiente al CH_3 -19, se desplaza a 1.2 ppm debido a que se genera una interacción 1,3 entre este metilo y el grupo hidroxilo insertado en el C-6, así mismo el CH_3 -18 se desplaza ligeramente a mayor frecuencia por la presencia de este grupo hidroxilo. Por otro lado, si observamos la señal correspondiente a H-4e, que previamente se había observado como una señal *tt* o *ddd* ahora se ha modificado su patrón de acoplamiento hasta volverse mucho más compleja, por lo que se define como una señal múltiple, esto se debe a que estos protones pertenecen a un sistema de un ciclopropano, el cual presenta acoplamientos diversos según la posición en la que se encuentre con cada protón cercano además de presentar acoplamiento tipo *w* debido a la distribución espacial de estos protones, como se observa en la estructura tridimensional de la figura 56. Por su parte las señales correspondientes a H-16 y a los protones diasterotópicos en C-26 no se ven afectados debido a la distancia con respecto a la modificación realizada.

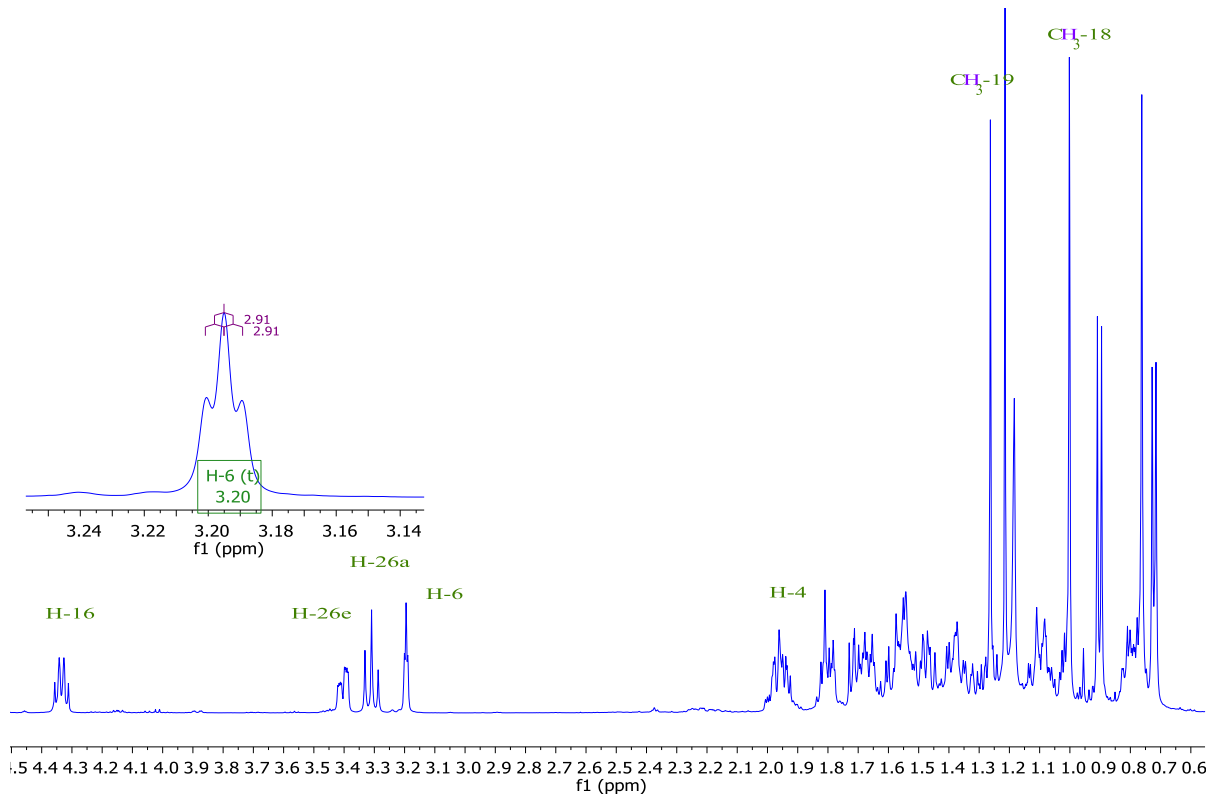


Figura 55. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de 278.

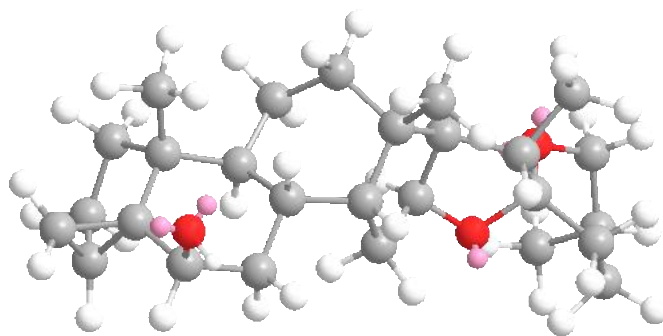


Figura 56. Estructura de mínima energía (método MM2) de 278.

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C , podemos observar la señal en 109.5 ppm que corresponde al C-22 del espiroacetal, en 81.5 ppm observamos la señal de C-16 y en 74 ppm aparece una señal que ahora corresponde al C-6 base de oxígeno del nuevo hidroxilo formado. Las señales de los carbonos 3 y 5 se encuentran en frecuencias más bajas debido a su nuevo ambiente químico.



Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del 278.

➤ (25R)-3,5-ciclo-5 α -espirostan-6-ona (285).

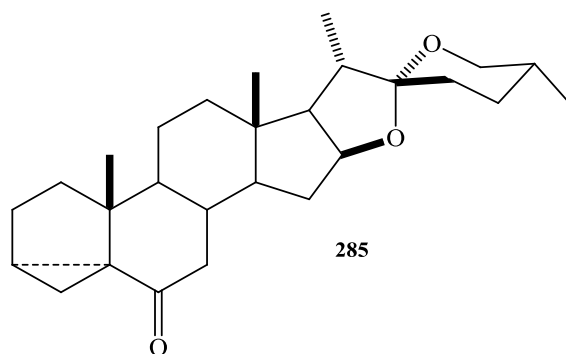


Figura 58. Estructura de 285.

Con la finalidad de obtener el grupo carbonilo en el C-6 característico de la laxogenina (**122**) se procedió a oxidar **278**. Con base al análisis de las condiciones y resultados previos de las reacciones de oxidación, se decidió realizar esta oxidación con reactivo de Jones a baja temperatura, con la finalidad de realizar la oxidación de manera selectiva sin afectar el resto del esteroide, dado que debido a la gran tensión que existe en el ciclopropano del anillo A lo hace susceptible a reacciones secundarias. De los factores que fueron considerados para conducir la reacción deseada, el tiempo resultó ser determinante, por lo que se dejó solo el tiempo necesario, como se observa en la gráfica de la figura 59; a los 30 minutos la reacción concluyó y después de 45 minutos se observa una disminución de en el rendimiento debido a la formación de diversos sub-productos, confirmando la alta reactividad de este derivado.

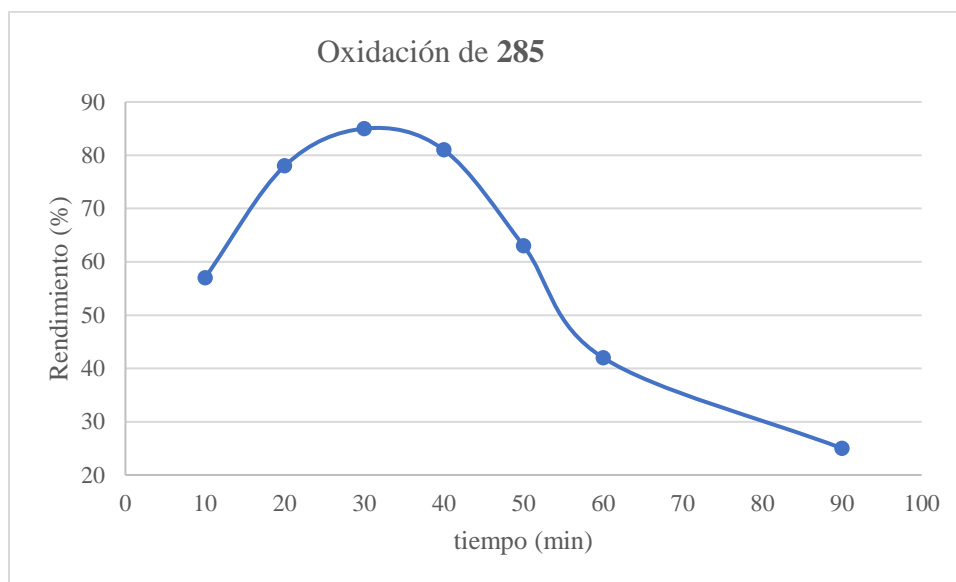


Figura 59. Análisis del tiempo de reacción con la selectividad y rendimiento de la oxidación de (**285**).

En la caracterización podemos observar en el espectro de RMN de ^1H del derivado cetónico, como se aprecian modificaciones drásticas debidas al cambio de hibridación del C-6, ocasionando que, la señal de H-6 que se apreciaba en la materia prima desaparece, y aparece una señal en 2.48 ppm con $J_{gem}= 16.6$ Hz y $J_{7e-8}= 4.5$ Hz correspondiente al H-7e que se desplaza a frecuencia alta debido a la cercanía con el grupo carbonilo formado, a partir de esta señal es posible, mediante el experimento COSY, correlacionar en con el protón geminal, que parece en 2.13 ppm, a continuación nos permite encontrar la señal del H-8 que aparece alrededor de 1.9 ppm traslapado con otras señales; de manera análoga en este experimento se buscaron dos señales que acoplaran entre sí, pero con ningún otro carbono, y una ubicada en mayor frecuencia que la otra, asignando como H-4a en 2.01 ppm y H-4b en 1.30 ppm, una se encuentra a mayor frecuencia debido a que en su estructura tridimensional, una queda en el cono de protección típico de un grupo carbonilo y otra queda fuera del mismo, lo que provoca este efecto tan marcado.

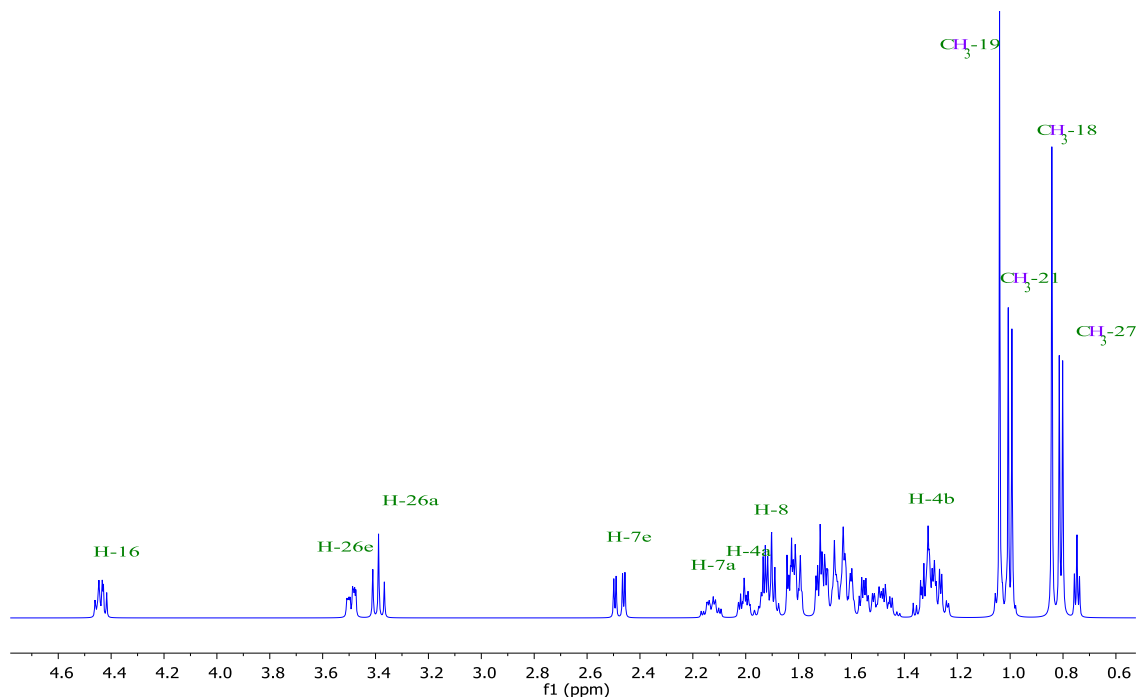


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de (285).

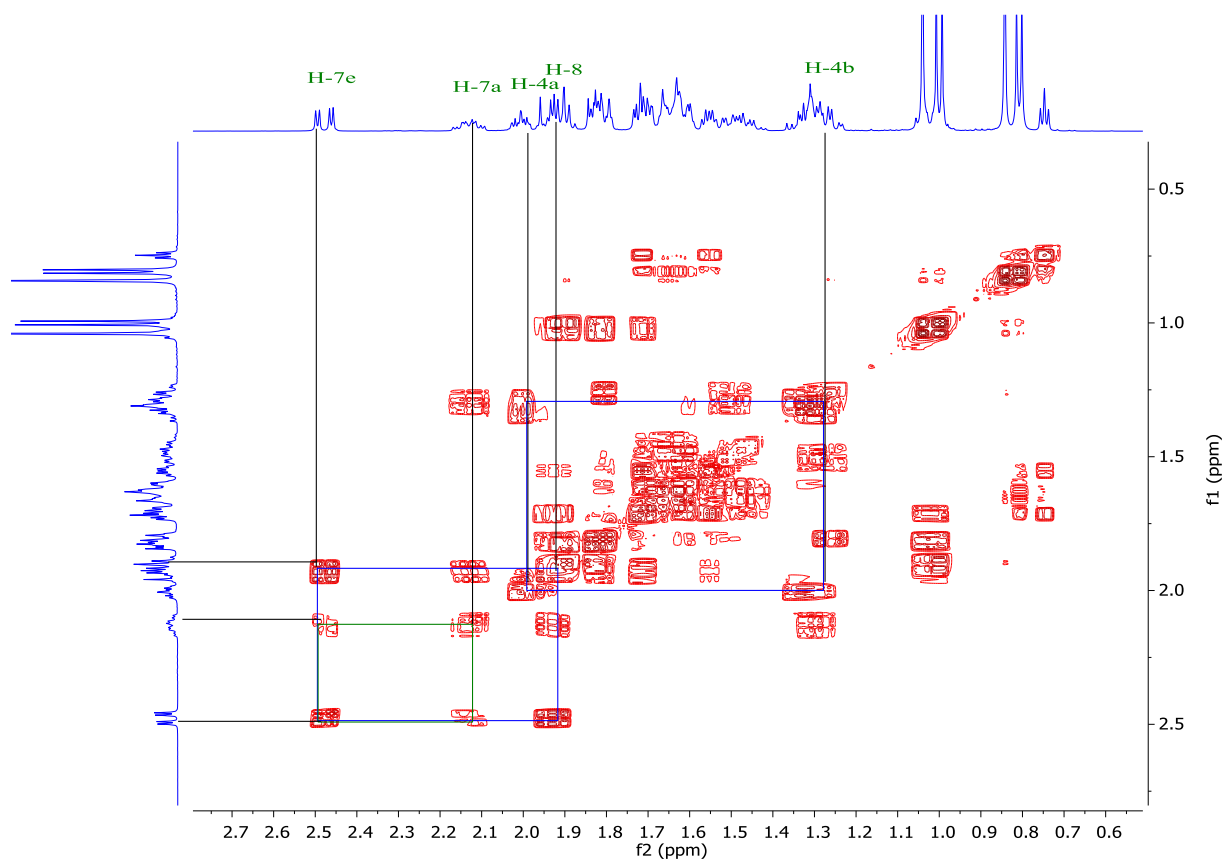


Figura 61. Espectro RMN COSY de 285.

En el espectro de RMN de ^{13}C podemos observar una nueva señal en 209 ppm característica de una cetona, por lo que corresponde al C-6, en consecuencia, se observa la desaparición de la señal correspondiente al carbono base de oxígeno en la materia prima, conservándose las señales de los C-16 y C-26 base de oxígeno en 80.3 y 66.8 ppm respectivamente, y en 109 ppm podemos corroborar que el espirioacetal se ha mantenido después de la reacción confirmando la estructura de este compuesto.

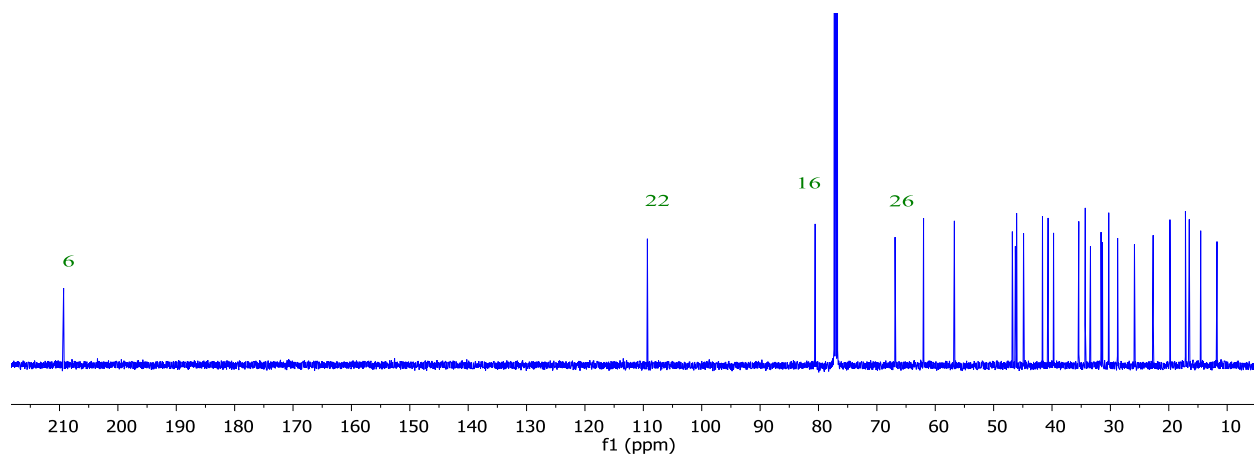
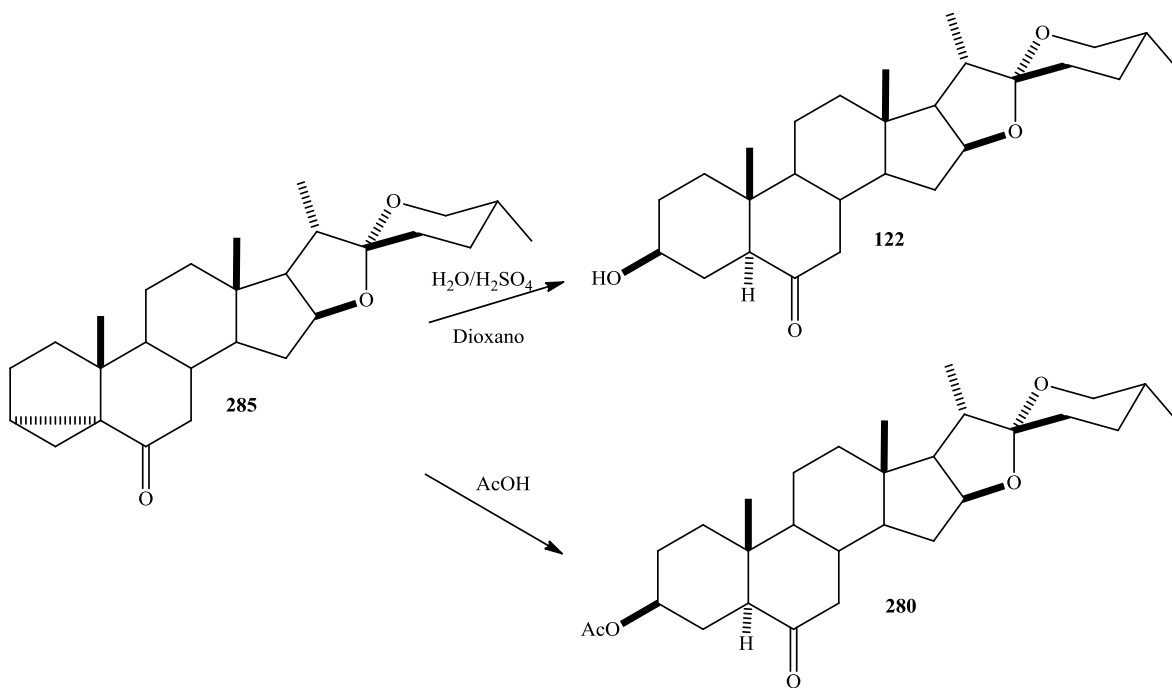


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de **285**.

➤ Apertura del *i*-esteroide **285**.



Esquema 37. Apertura del *i*-esteroide **285** en medio ácido.

Con la finalidad de abrir el ciclopropano característico del *i*-esteroide, se decidió realizar la apertura en medio ácido para agregar un nucleófilo específico en el C-3 de la estructura. Para lograr este objetivo, se estudiaron dos reacciones una con ácido acético para la obtención de acetato de laxogenina y otra con agua en medio ácido para la obtención directa de laxogenina. En la primer reacción se estudió y determinó el tiempo necesario para alcanzar la máxima conversión posible, como se observa en la figura 63a, observando que al tiempo de 6 h se ha logrado una conversión cuantitativa del derivado *i*-esteroidal al acetato de laxogenina; mientras que en la reacción con agua en medio ácido a las dos horas se ha consumido la materia prima (ver figura 63b) pero la selectividad es mucho menor debido a la formación de otros subproductos sin interés en este estudio. Si bien esta reacción es más rápida la disminución del rendimiento del producto mayoritario pone en conflicto seleccionar cuál es la metodología óptima, ya que la realizada con ácido acético aun requiere una etapa posterior de hidrólisis básica para la obtención de la laxogenina, pero analizando el rendimiento neto, como se observa en la tabla 5, aun así es conveniente realizar la reacción en dos etapas.

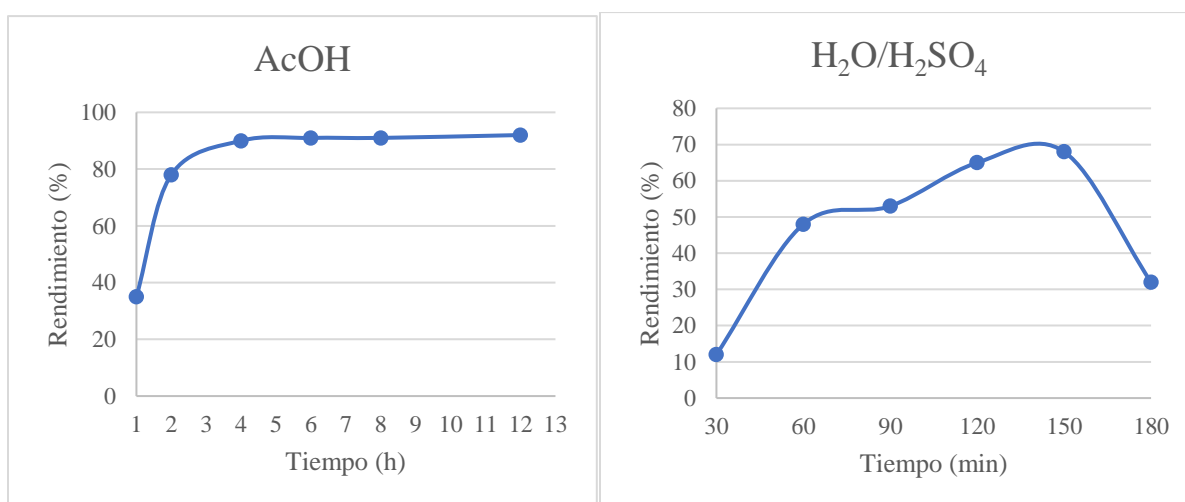
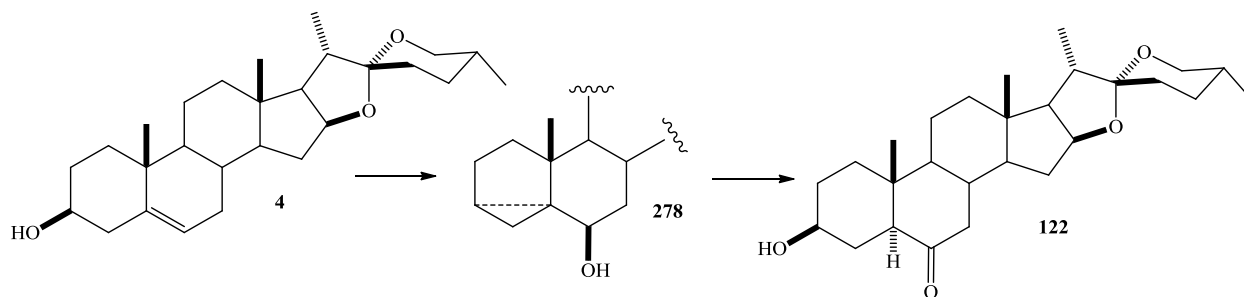


Figura 63. Apertura de 285, izquierda: ácido acético; derecha: agua en H₂SO₄.

Tabla 5. Comparación de metodologías de obtención de laxogenina (122) a partir de 285.

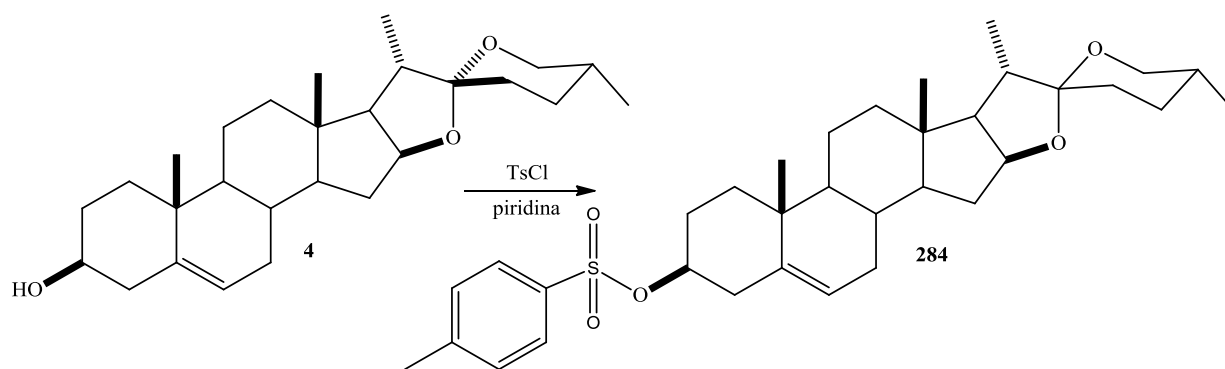
Reacción/Reactivo	AcOH	H ₂ O/H ₂ SO ₄
Apertura	90 %	65 %
Hidrólisis	95 %	-
Rendimiento neto	85.5 %	65 %

➤ *Diseño del proceso semicontinuo de la obtención de laxogenina. Ruta B*



Esquema 38. Obtención de laxogenina por ruta B.

Para esta ruta de síntesis, se siguió la misma metodología de análisis que se utilizó para el diseño del proceso semi-continuo para la ruta A. Se procedió a realizar el diseño para la ruta B con las modificaciones pertinentes de acuerdo con el tipo de reacción, como se detalla a continuación.



Esquema 39. Tosilación de diosgenina.

Esta reacción como se describió previamente fue optimizada el tiempo de reacción y la cantidad necesaria de TsCl, con la finalidad de combinar con la etapa posterior para la formación del *i*-esteroide en el anillo A, se decidió minimizar la cantidad de disolvente necesario (piridina), sin afectar el rendimiento de la reacción. En la figura 64 podemos observar como por cada mmol de esteroide solo son necesarios 2 mL de piridina para llevar a término la reacción; además, se observó una disminución en el tiempo necesario de reacción para alcanzar la conversión máxima, por lo que se volvió a estudiar el tiempo de reacción con el nuevo volumen de disolvente utilizado, obteniendo un nuevo tiempo óptimo de 2 h, efecto que se explica debido a la saturación de los reactivos en el disolvente, aumentado la disponibilidad de los mismos para iniciar la reacción, disminuyendo así el tiempo necesario.

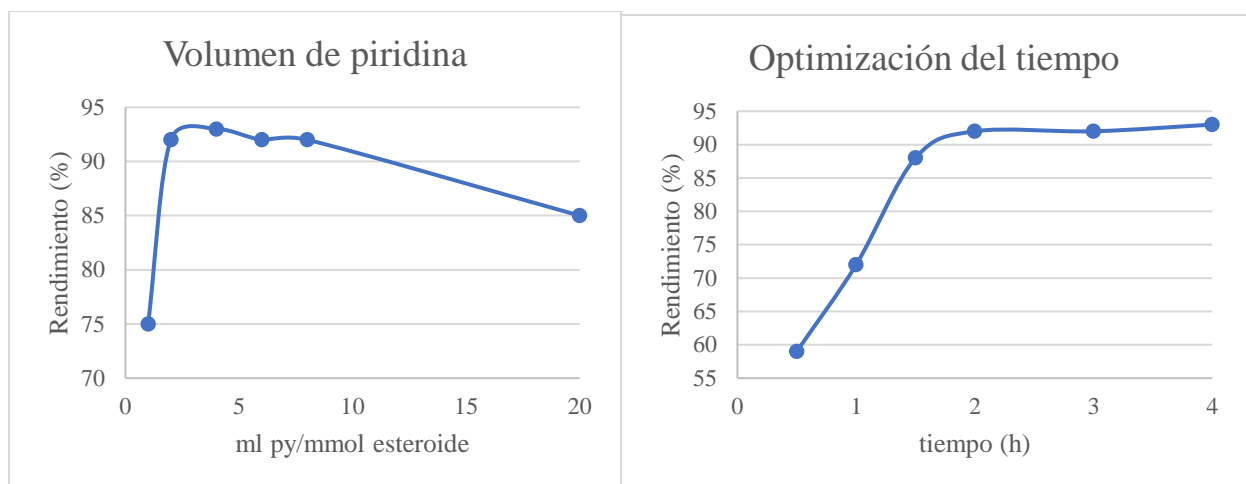
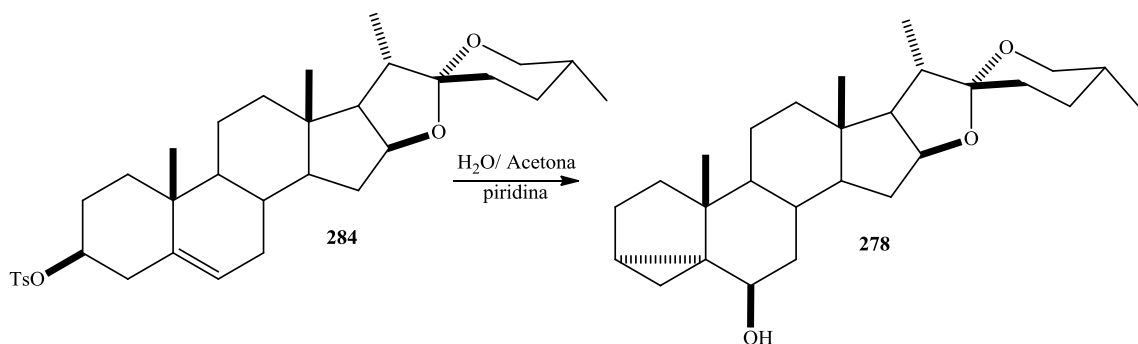


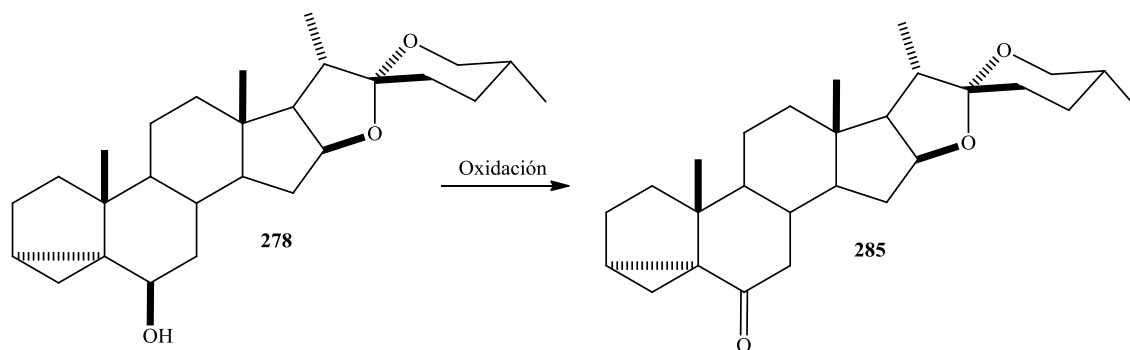
Figura 64. Optimización de la tosilación de diosgenina: a) volumen de piridina mínimo, b) tiempo óptimo.



Con la finalidad de dar continuidad al proceso desde la etapa anterior se estudió la posibilidad de mantener a la piridina en el medio de reacción; en la tabla 6, podemos observar las cantidades de AcOK estudiadas con la finalidad de analizar la compatibilidad de las bases en el medio de reacción, aunque cabe destacar que si analizamos por separado su fuerza como base, son muy parecidas, por lo que se explica que aun en ausencia del AcOK se da la formación del derivado *i*-esteroideo, por lo que al aumentar el tiempo de reacción en 1 h, solo en presencia de piridina como base, la reacción alcanza una alta tasa de conversión, permitiendo entonces generar un sistema en el cual inmediatamente después de la formación del tosionato de diosgenina, se adiciona la mezcla acetona/agua (80/20) y coloca a reflujo para lograr la conversión al derivado *i*-esteroideo.

Tabla 6. Análisis del efecto de la base para la obtención del derivado *i*-esteroideo 278.

Base	AcOK/ piridina	AcOK/ piridina	AcOK/ piridina	NH ₄ OH/ piridina	KOH/ piridina	B/ piridina
Relación n/v	3:2	1:2	0.5:2	1:2	1:2	0:1
Rendimiento	85	84	85	82	67	85



Esquema 41. Formación del *i*-esteroide 285.

Para la etapa de oxidación, aprovechando que está presente una mezcla de acetona-agua en el medio de reacción, se decidió optar por una oxidación directa en el crudo de reacción; sin embargo, se observaron bajos rendimientos con las oxidaciones con reactivo de Jones, como se observa en la tabla 7. Esto se debe a que esta reacción se realiza en medio ácido, pero en esta ocasión disminuye la acidez por la piridina remanente en la mezcla de reacción, por lo que se optó por una oxidación tipo Collins en medio básico, adicionando únicamente el CrO_3 directo a la reacción, pero debido al tipo de reacción y sus condiciones, se observó que a bajas temperaturas la conversión, si bien era selectiva, tenía el inconveniente de ser muy lenta, por lo que se probó modificar la temperatura y se observó que a $40\text{ }^\circ\text{C}$ la reacción se completa en 30 minutos.

Tabla 7. Estudio de oxidantes para la formación del *i*-esteroide 285.

Oxidante	Jones	Jones	KMnO_4	Collins	Collins
Tiempo	30 min	1 h	1 h	1 h	2 h
Rendimiento (%)	45 %	62 %	48 %	72 %	78 %

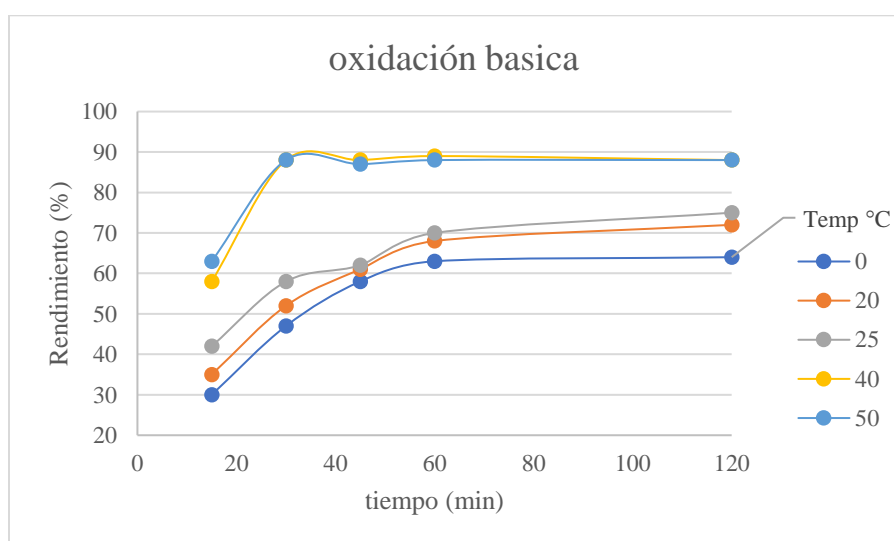
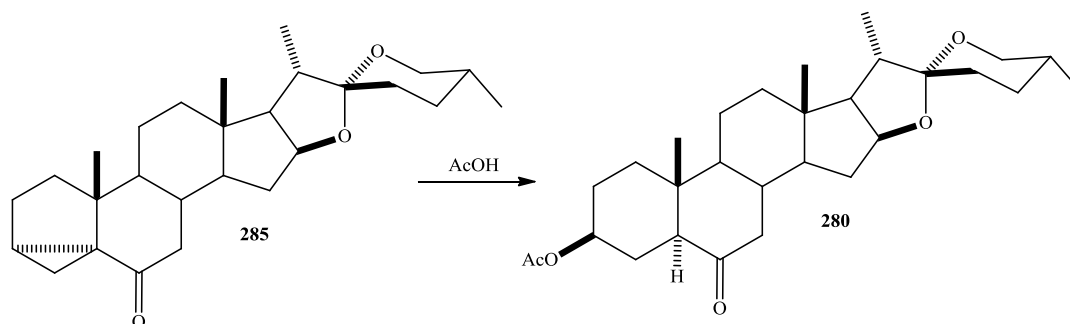


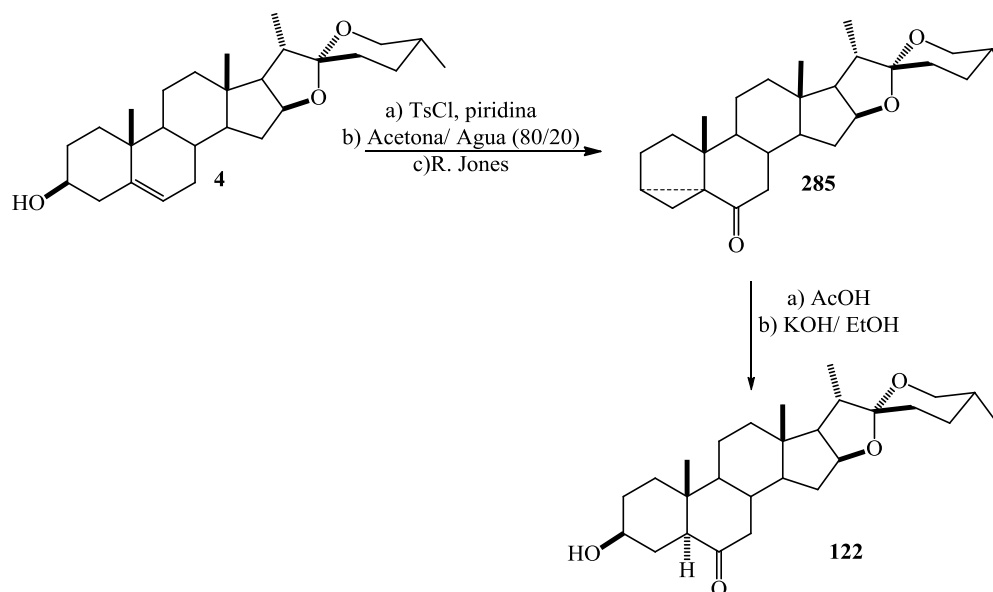
Figura 65. Análisis de la temperatura y tiempo para la oxidación básica del *i*-esteroide 278.

Una vez obtenido el derivado **285**, se procedió a eliminar los disolventes orgánicos por destilación a presión reducida, y el oxidante por filtración con el sistema descrito previamente, aunque solo con gel de sílice debido al alto contenido de humedad que presenta el crudo de reacción, por lo que fue necesario una extracción orgánica para la obtención del crudo selectivamente, dividiendo el proceso continuo en esta etapa.



Esquema 42. Apertura en medio ácido de **285**.

Previamente se había analizado la optimización de esta reacción, concluyendo que la apertura para obtener el acetato de laxogenina en dos etapas es la mejor opción, aunque involucra una segunda etapa de hidrólisis el rendimiento es considerablemente mayor. Y con la finalidad de unir al proceso anterior, inmediatamente después de la etapa anterior se eliminó el disolvente orgánico utilizado para la adición del ácido acético y se colocó a reflujo para llevar a cabo la apertura del *i*-esteroide. A continuación se realizó la hidrólisis con una solución alcohólica de KOH al 10 %, como previamente se estudió para la obtención de la laxogenina, observando una mejoría del 62% al 72% de rendimiento y disminuyendo el tiempo de 78 h hasta 14 h, permitiendo mejorar considerablemente las condiciones para la obtención de laxogenina por esta ruta, diseñando un proceso que se resumen en el esquema 41 y detalla en el diagrama de bloques de la figura 66.



Esquema 43. Obtención de laxogenina por ruta B: proceso semi-continuo.

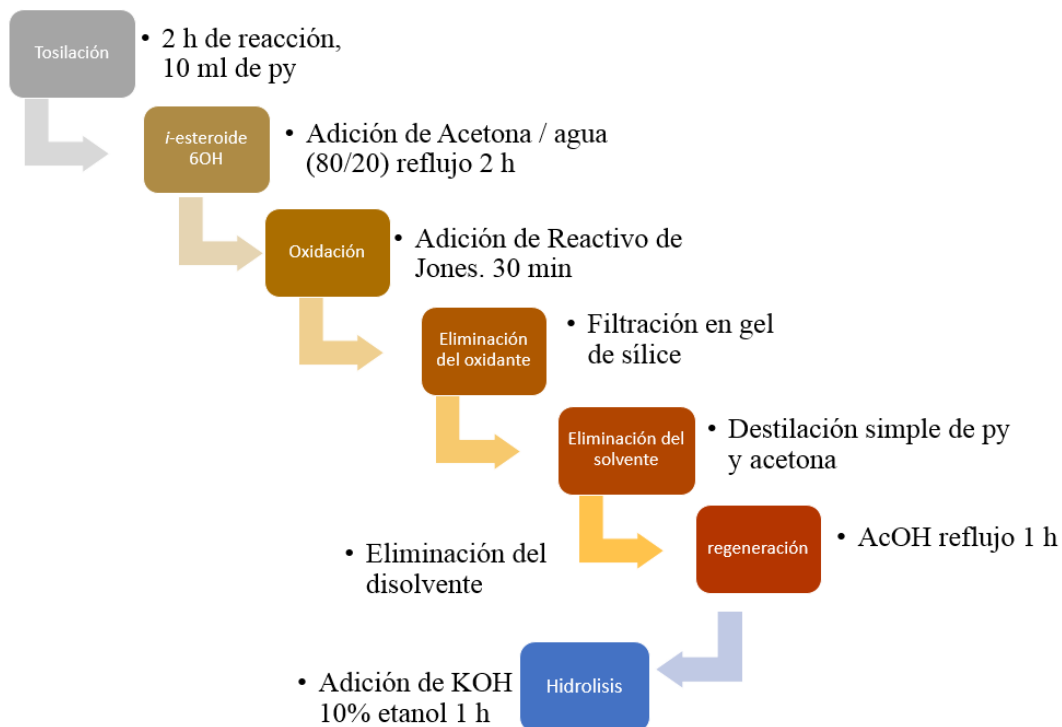
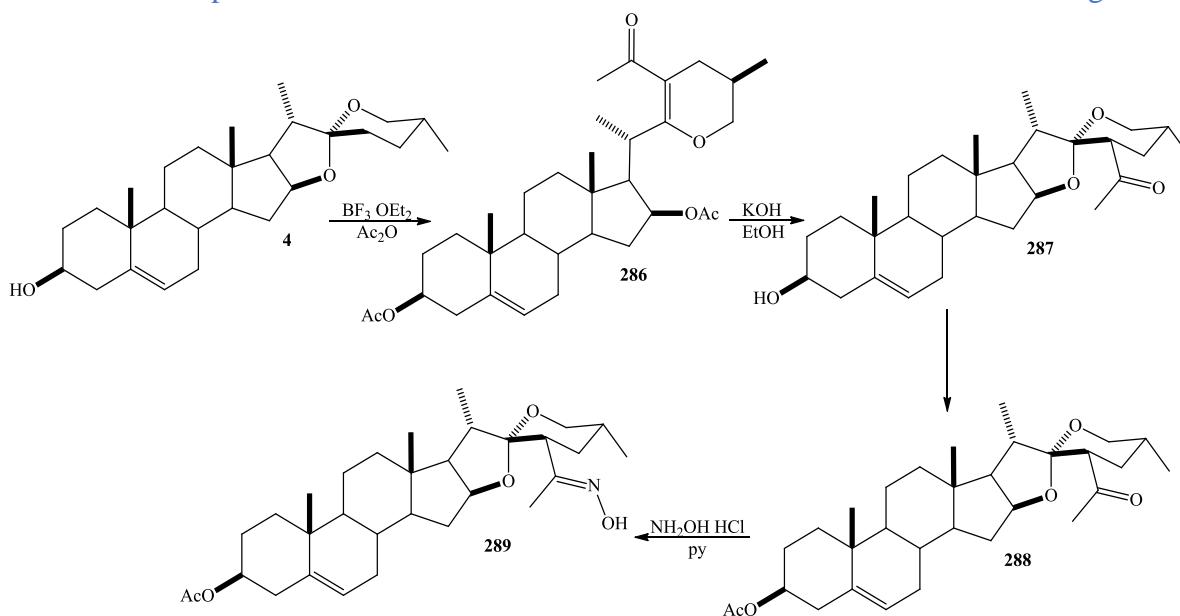


Figura 66. Diagrama de bloques del proceso de obtención de laxogenina por ruta B.

4.1.3 Optimización de la obtención de la oxima del acetato de 23-acetil diosgenina.



Esquema 44. Obtención de la oxima del acetato de 23-acetil diosgenina (289).

La producción en mayor cantidad de cualquier compuesto es de gran interés para la investigación, en especial si el compuesto presenta una actividad biológica relevante, como lo es el caso particular de la oxima del acetato de 23-acetildiosgenina (289), compuesto que ha mostrado un interesante efecto citotóxico contra líneas de cáncer cervicouterino en las líneas celulares CasKi y Hela,

debido a sus bajos valores de IC_{50} , así como se observó que a estas dosis, células sanas como los linfocitos, no se vieron afectadas [57], lo cual promete para este compuesto excelentes probabilidades como agente anticancerígeno selectivo, para lo cual se necesita continuar con los estudios *in vivo*, con la limitante de que se necesita mayor cantidad de compuesto si comparamos con el estudio *in vitro*. Entonces se decidió aplicar las metodologías de diseño de procesos semi-continuos para aumentar la producción de este derivado al nivel de multigramos, aplicando dicha metodología se diseñó el diagrama de bloques que se observa en la figura 67, para la ruta de reacción que se muestra en el esquema 42.

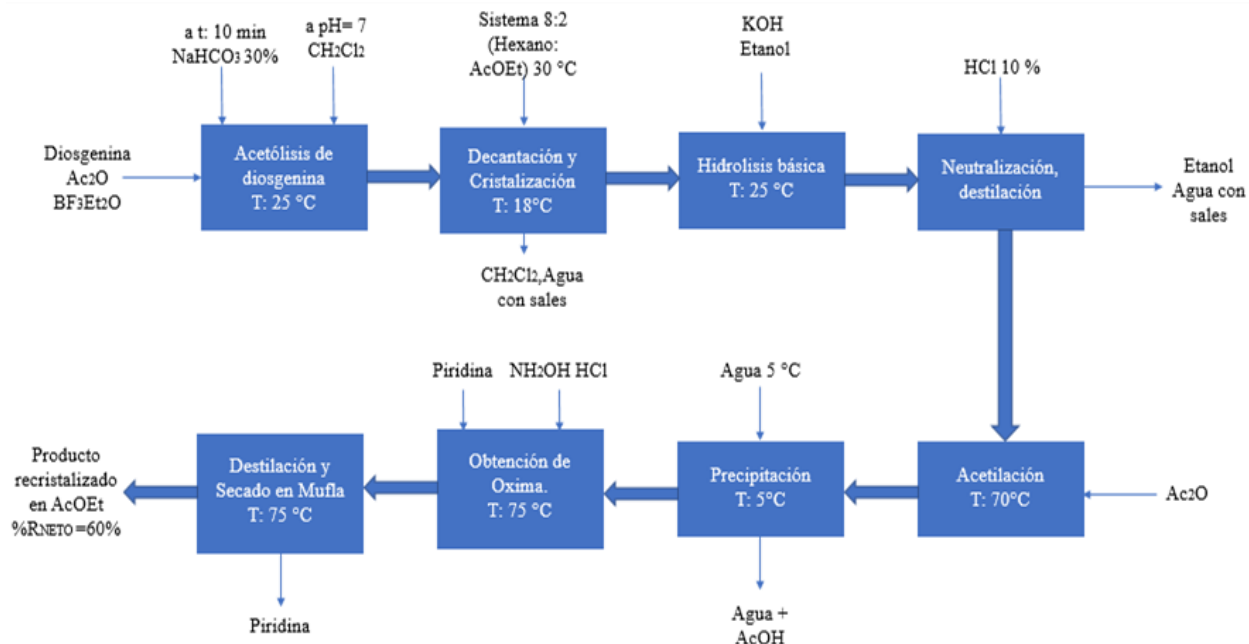


Figura 67. Diagrama de bloques para la obtención de la oxima del acetato de 23-acetil diosgenina (289)

Con la finalidad de seguir la reacción en cada uno de los pasos de la misma, se fue monitoreando la misma por CCF así como por IR, en la figura 68 podemos observar la ruta de reacción paso a paso por IR, mostrando como a partir de la diosgenina al momento de realizar el epoxicolesteno **286**, desaparece la banda después de los 3000 cm^{-1} y aparecen varias bandas en la región de 1600 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , estas debidas a los acetatos agregados a la estructura y a la formación de la cetona α,β -insaturada en C-23; posteriormente al realizar la hidrólisis se observa como desaparecen varias de estas últimas señales dejando solo una correspondiente al grupo acetilo en C-23, así mismo aparece la banda correspondiente al hidroxilo, posteriormente al realizar la acetilación del hidroxilo en 3, se observa en el nuevo espectro como simplemente desaparece la banda del hidroxilo y se forma una nueva banda correspondiente al carbonilo del acetato, así como una banda de ester en 1250 cm^{-1} . Finalmente, al momento de la formación de la oxima, no se observa un cambio aparente en las bandas existentes, solo la formación de una nueva banda en 3200 cm^{-1} que corresponde al grupo hidroxilo de la oxima, lo que corrobora la obtención del producto; cabe destacar que estos derivados ya se han caracterizado inequívocamente, previamente como se observa en la literatura del grupo de investigación [57].

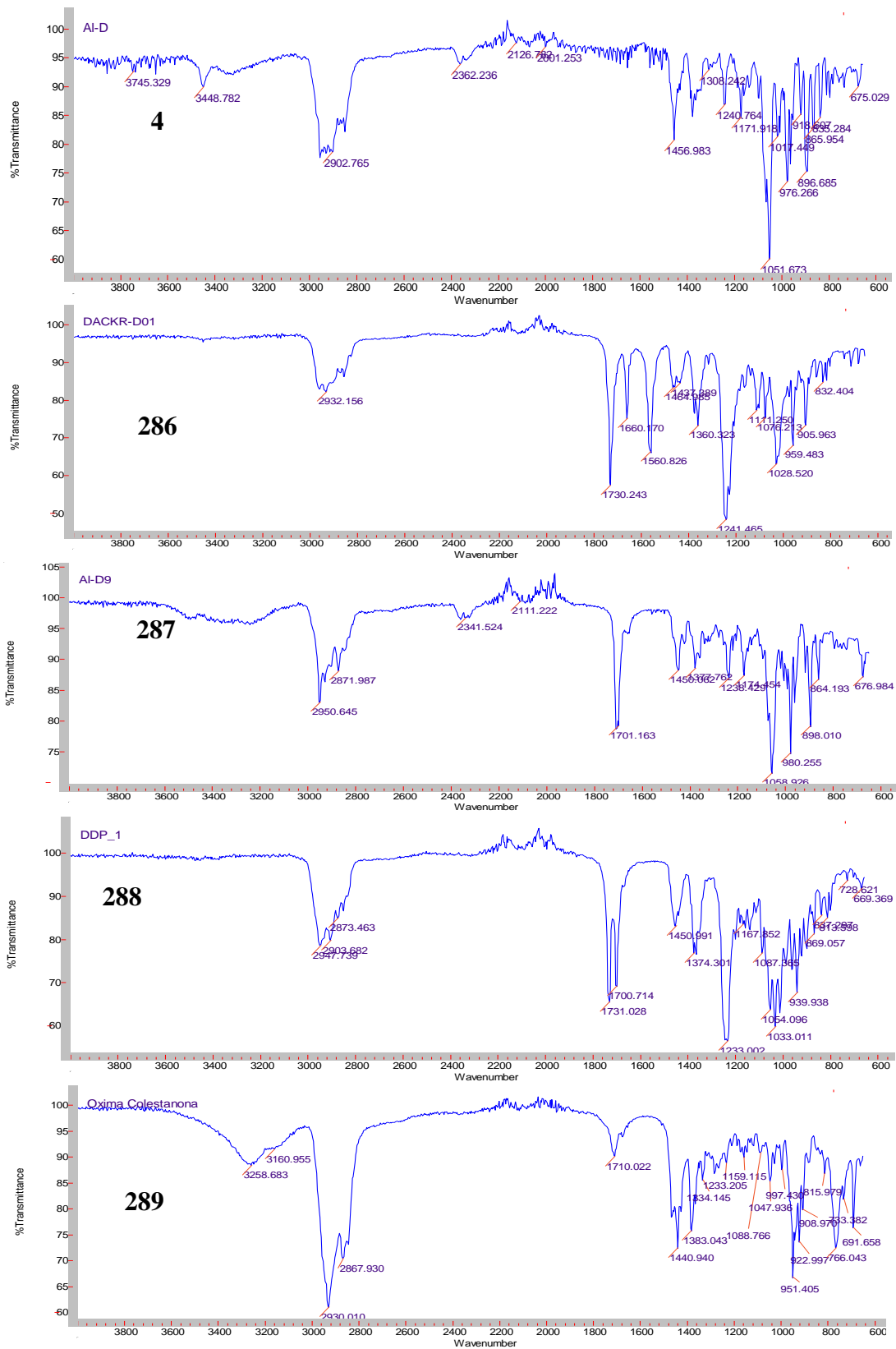


Figura 68. Seguimiento de reacción por IR de la obtención del derivado 289.

Dentro de los productos de las etapas de reacción de obtención de este derivado, se observaron dos intermediarios interesantes. Primero en la etapa de cristalización por cambio de disolvente se observó la formación de cristales muy característicos, como se ve en la figura 69. Cabe destacar que los cristales de este compuesto ya se encontraban reportados, pero con la diferencia de que cristalizó con una molécula de benceno como disolvente, en este caso se observó una cristalización atípica con 0.8 moléculas de hexano por molécula esteroidal, lo cual es de gran interés desde el punto de vista cristalográfico.

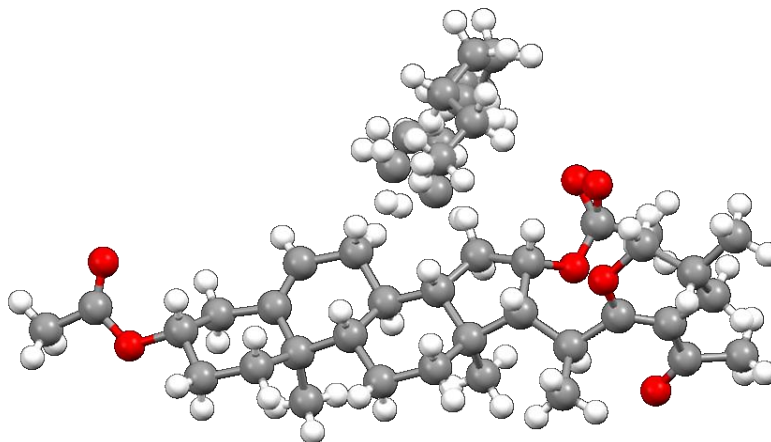


Figura 69. Diagrama Ortep del derivado epoxicolesténico 286.

Por otra parte, en la neutralización del derivado 23-acetilado se observó la formación de un segundo grupo de cristales lo cuales correspondían al sub-producto de esta reacción, que al momento de analizarlos resultaron ser el derivado epoxicolesténico hidrolizado el acetato en 3, como se observa en la figura 70, lo que dio pauta a la recuperación de este subproducto, ya que al someterlo a hidrólisis básica conduce a la formación del derivado 23-acetilado.

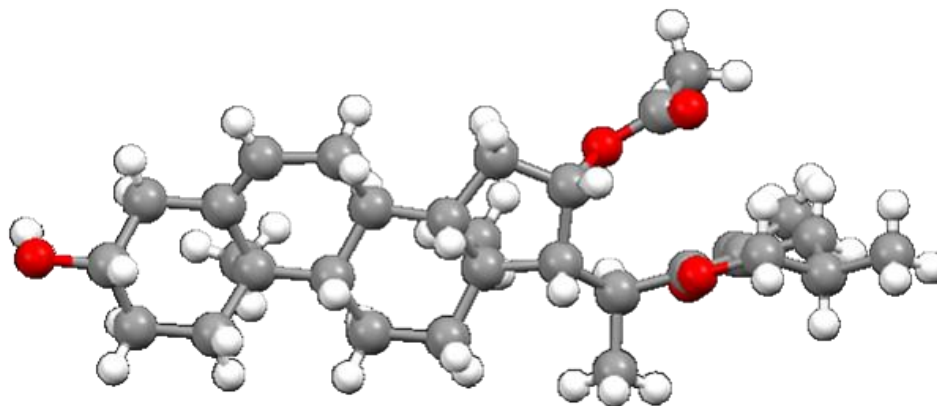
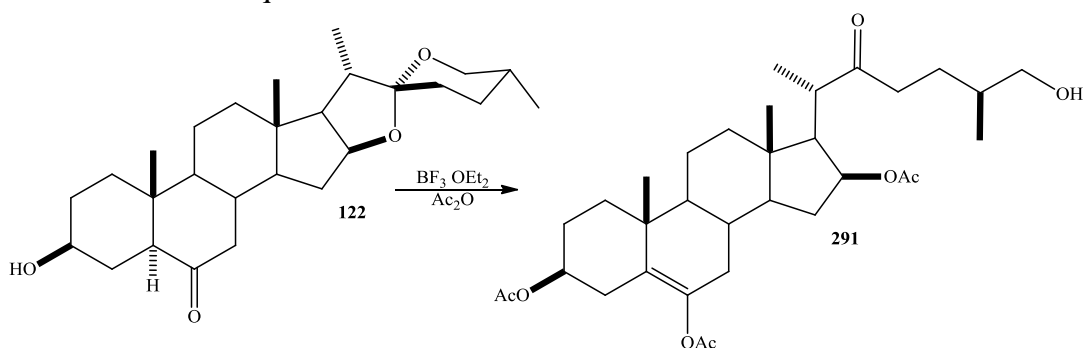


Figura 70. Diagrama Ortep del derivado epoxicolesténico 290.

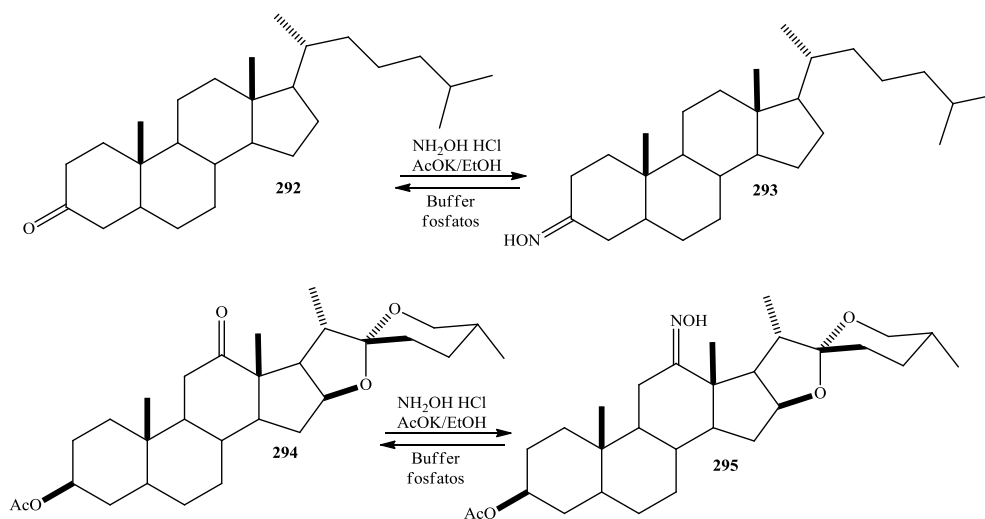
4.2 Empleo de las oximas como grupo protector.

Una limitante muy importante al momento de llevar a cabo la síntesis de nuevas estructuras es la formación de sub-productos que, si bien pueden resultar interesantes y ayudar a explicar el mecanismo de la reacción, muchas veces dificultan tanto la purificación o inclusive impiden la formación del producto deseado. En el grupo de trabajo se ha observado un fenómeno particular, al momento de realizar aperturas del espiroacetal con la finalidad de obtener derivados 6,22 dioxocolestánicos, debido al medio ácido de la reacción, el grupo carbonilo sufre la tautomerización a su forma enólica, y en presencia de anhídrido acético en el medio de la reacción, da lugar a un enol acetilado, impidiendo la conservación o regeneración del grupo cetónico, como se puede observar en el esquema 43.



Esquema 45. Derivado enol acetilado esteroidales.

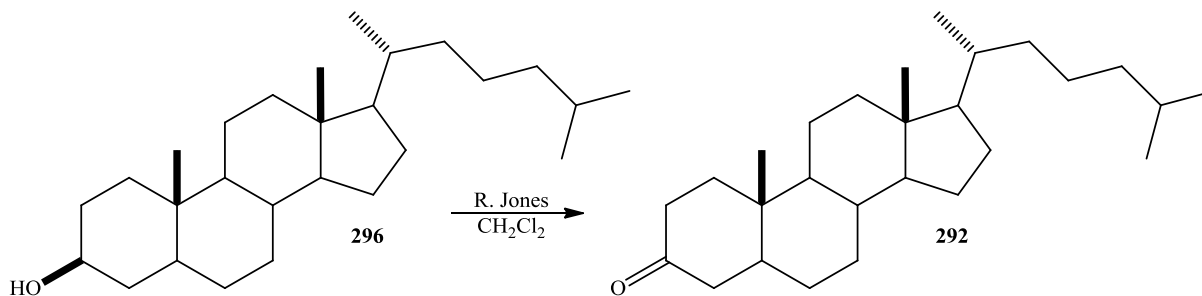
Con la finalidad de evitar este problema, se ha estudiado el uso de grupos protectores; cabe destacar que normalmente el grupo protector por excelencia del grupo carbonilo es la formación de acetales, pero debido al tipo de reacción que se está estudiando donde se manejan condiciones ácidas, no es una opción, por lo que se optó por una reacción de condensación con NH_2OH para formar la oxima correspondiente para posteriormente realizar la obtención de nuevos derivados 22 oxocolestánicos y finalmente estudiar la reversibilidad selectiva de la reacción. Para dicho estudio se seleccionó como modelo la Colestanona y el acetato de hecogenina, como se observa en el esquema 44.



Esquema 46. Uso de oximas como grupo protector.

4.2.1 Estudio con 5 α -colestonona.

Para la preparación de Colestanona (**292**) se partió de colestanol, como se ve en el esquema 45, el cual fue oxidado a temperatura ambiente, debido a la simplicidad de la estructura se obtiene un único producto en un excelente rendimiento. En la figura 71 podemos observar el espectro de RMN de ^1H de ambos compuestos, mostrando la desaparición de la señal correspondiente al H-3 y dos señales alrededor de 2.2 ppm que corresponden a los protones de C-2 y C-4 ahora α al grupo carbonilo.



Esquema 47. Oxidación de colestanol (**296**).

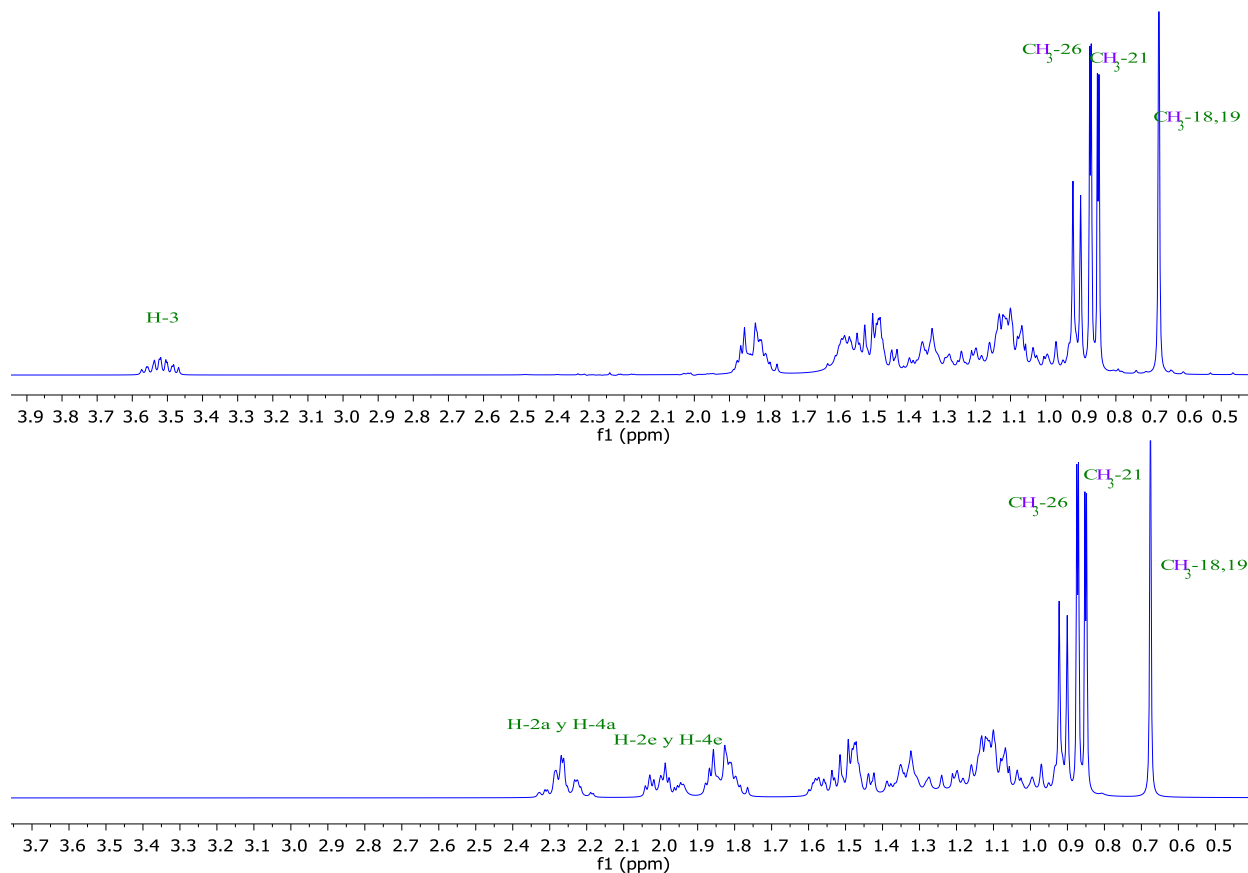


Figura 71. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de colestanol (**296**) y colestanona (**292**).

De manera análoga en el espectro de RMN de ^{13}C se puede observar la desaparición de la señal en 70 ppm correspondiente al carbono base de oxígeno del C-3 para desplazarse y aparecer en 210 ppm característico para el grupo carbonilo de cetona, cabe destacar que este esteroide fue seleccionado debido a la presencia de un solo grupo funcional lo que permite observar directamente el efecto de la formación y reversibilidad de la oxima como grupo protector, sin la influencia de otros grupos funcionales.

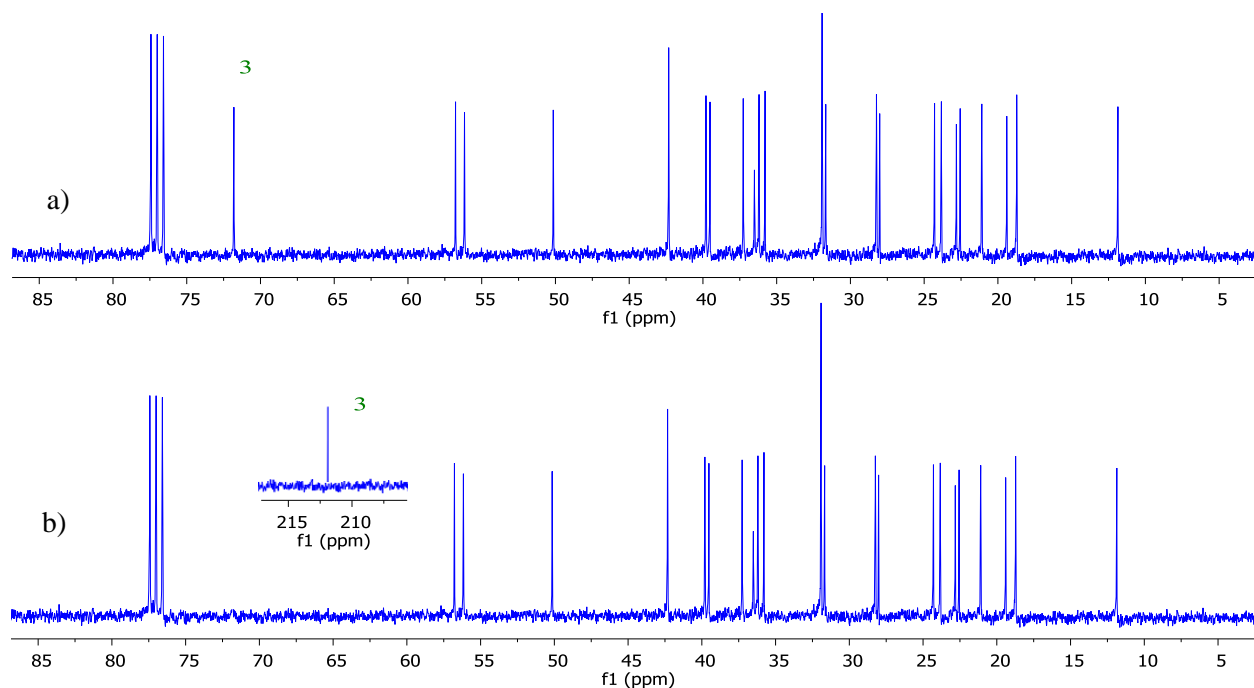


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de: a) colestanol (296), b) colestanona (292).

Para la formación de la oxima de Colestanona se procedió por condensación con NH_2OHHCl en EtOH y AcOK como base, observando una conversión completa a 1 h de reacción, el producto fue caracterizado, aunque en el espectro de ^1H no se observan cambios aparentes, sin embargo, en el espectro de ^{13}C se observa la desaparición de la señal en 210 ppm, para dar lugar a una nueva señal en 154 ppm que corresponde al carbono base de imino formado, como se observa en la figura 73.

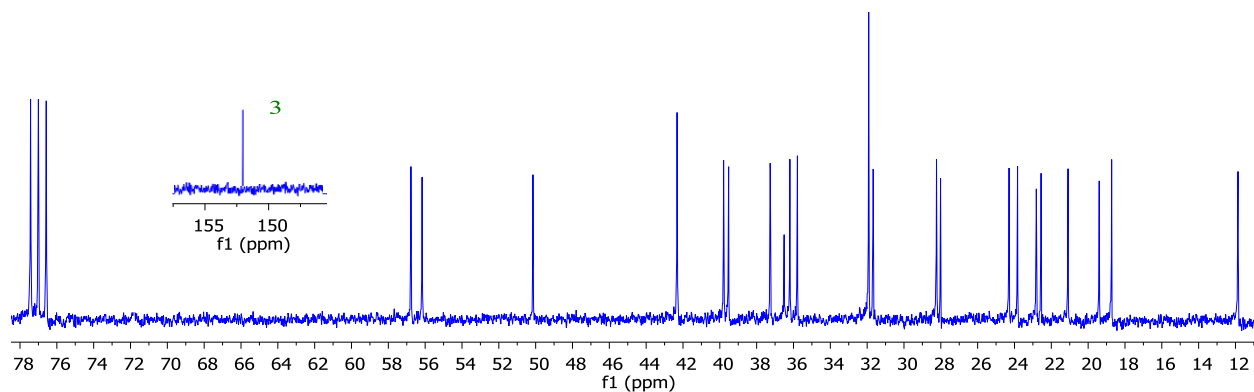


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de la oxima de colestanona (293).

A partir de este producto se estudió la reversibilidad de la reacción, para lo que se prepararon soluciones buffer de fosfatos a pH 3, 5 y 6 con una capacidad 10 M, con la finalidad de mantener constante el pH durante el estudio, así mismo se decidió trabajar a dos niveles de temperatura, ambiente y reflujo. En la figura 74, podemos observar que en este caso a reflujo en 1 h se ha alcanzado la conversión máxima a la colestanona, mientras que a temperatura ambiente se necesitan 6 h para alcanzar esta conversión mostrando como, la reacción tiene un alto grado de conversión, lo que hace idóneo a las oximas como una opción de grupo protector.

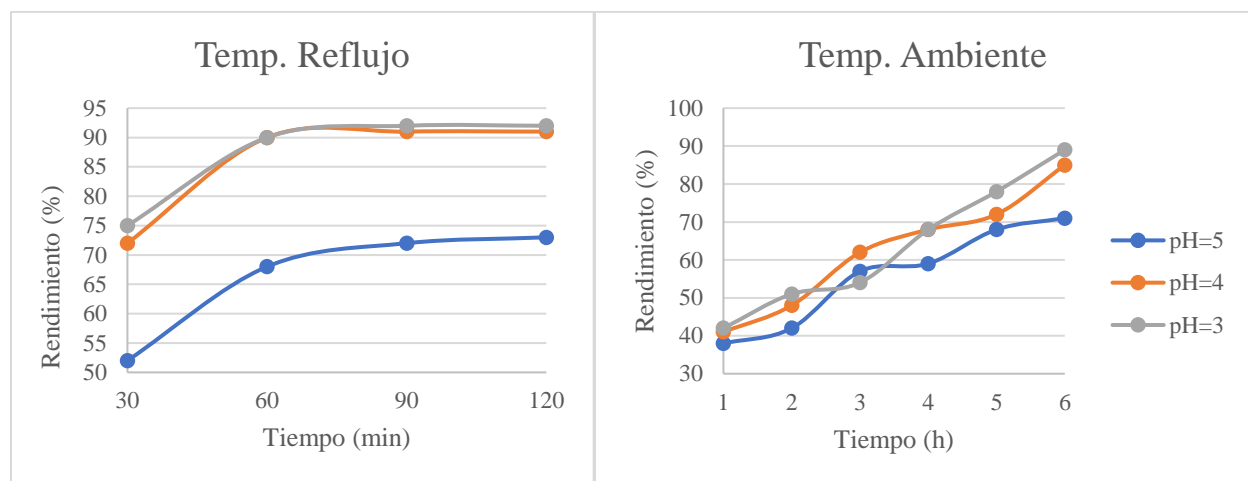


Figura 74. Estudio de reversibilidad de oximas esteroidales en función del pH y la temperatura.

4.2.2 Estudio con acetato de hecogenina.

Cabe destacar que, si bien la oxima de colestanona fue totalmente reversible, cuando existe más de un grupo funcional como lo son los ésteres, vale la pena estudiar si estos soportan la reacción de hidrólisis de la oxima, sin verse modificados. Con la finalidad de estudiar este efecto, se preparó la oxima del acetato de hecogenina, en la figura 85 podemos observar el comparativo entre el espectro de ^1H de la materia prima y la oxima, mostrando algunos cambios muy específicos, en 3.30 ppm aparece una señal *dd* con $J_{11e-9} = 4.9$ Hz, $J_{gem} = 14.9$ Hz, que corresponde al H-11 ecuatorial el cual se ve grandemente afectado debido a que el grupo hidroxilo de la oxima se encuentra sobre él; en cambio la señal del H-11a se mantiene en 2.53 como una señal *dd* ya que queda opuesto a este grupo hidroxilo, de igual manera denota la aparición de una señal en 7.18 ppm, correspondiente al grupo hidroxilo de la oxima formada, el cual no presentó intercambio total con deuterio lo que permitió observarlo por RMN, cabe destacar que el protón hidroxilo de una oxima no es tan ácido como el de un alcohol, lo que dificulta su intercambio. Por otro lado, en 2.05 ppm se confirma que se ha conservado el grupo acetilo durante la formación de este compuesto, aparte de estas señales no se ha presentado un cambio aparente en las otras señales del compuesto con respecto a la materia prima, como lo es el caso de H-3 y H-16 que continúan apareciendo en 4.7 ppm y 4.35 ppm respectivamente.

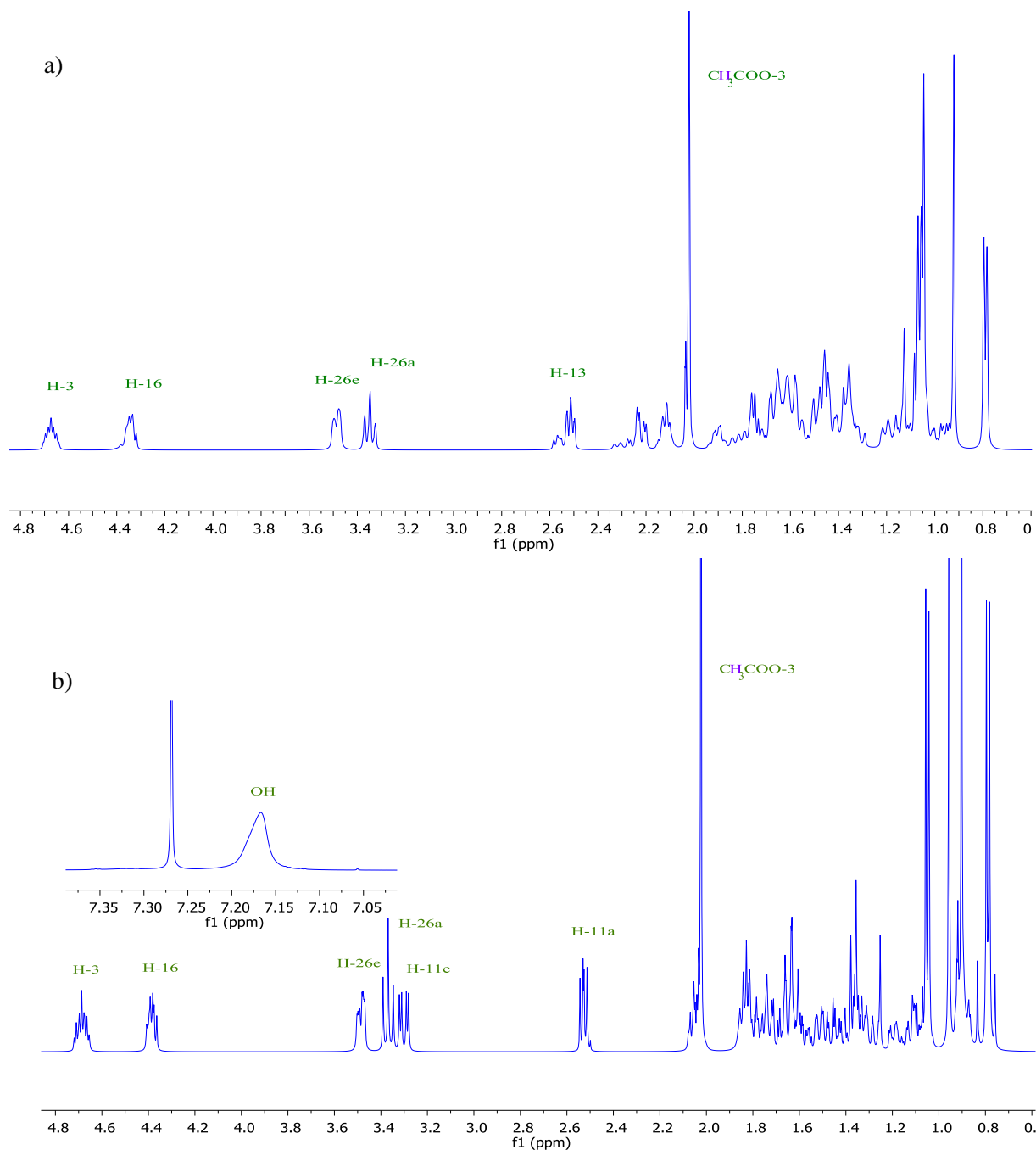


Figura 75. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de a) hecogenina y b) su oxima correspondiente.

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C podemos observar la desaparición de la señal en 210 ppm para dar lugar a una señal en 165 ppm correspondiente a la oxima formada, característico de oximas exocíclicas, lo que confirma la formación del producto, posteriormente el producto obtenido fue cristalizado en CH_2Cl_2 , obteniendo cristales idóneos para la someter a difracción de rayos x, obteniendo la estructura que se observa en la figura 77, corroborando la isomería geométrica *E* del doble enlace de la oxima del esteroide.

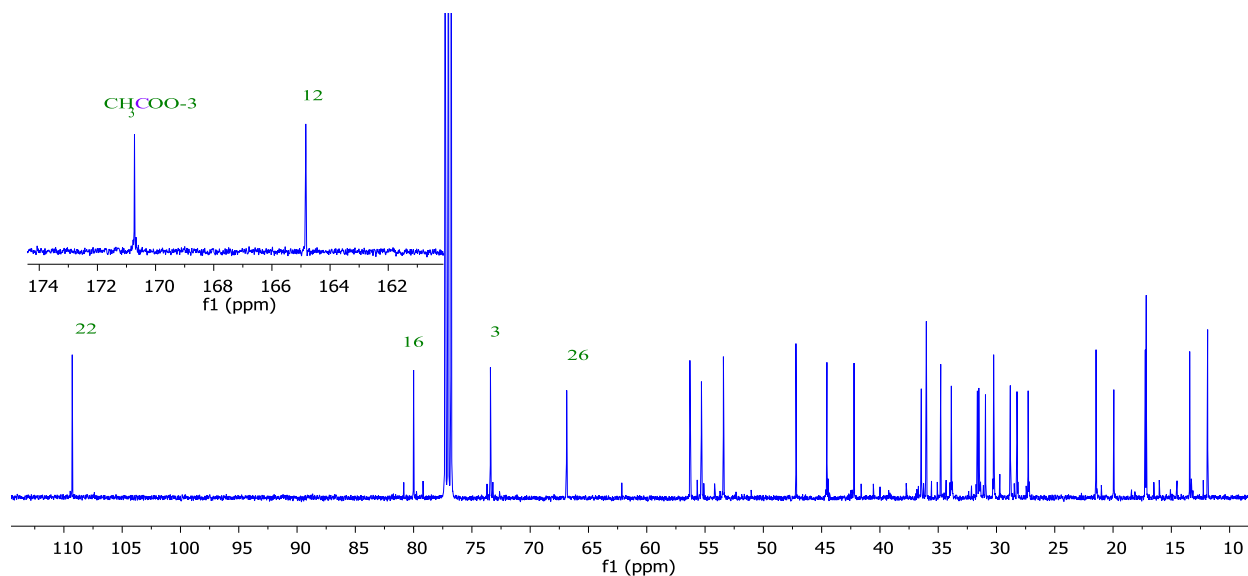


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la oxima del acetato de hecogenina.

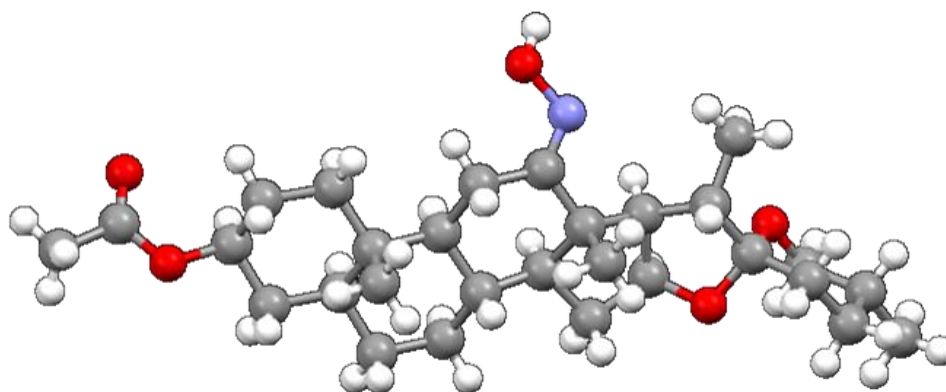


Figura 77. Diagrama ortep de la oxima del acetato de hecogenina (295).

Para el estudio de la reversibilidad de esta reacción, se probaron las condiciones previamente analizadas con la oxima de colestano, como se observa en la figura 78, mostrando que a temperaturas de reflujo promueve a la formación de sub-productos, así como a la hidrólisis del éster en el C-3, mientras que a temperatura ambiente la reacción se vuelve selectiva, sin embargo, aumenta el tiempo de reacción necesario, encontrando que la condición ideal para la recuperación de la cetona, sin afectar al espiroacetal y al acetato en C-3, es a pH = 4 y 5 h de reacción, esto se explica debido a que el medio ácido no solo favorece de hidrólisis del acetato sino también en exceso favorece la formación del enol de la cetona obtenida, por lo que se vuelve de vital interés el control adecuado del medio ácido.

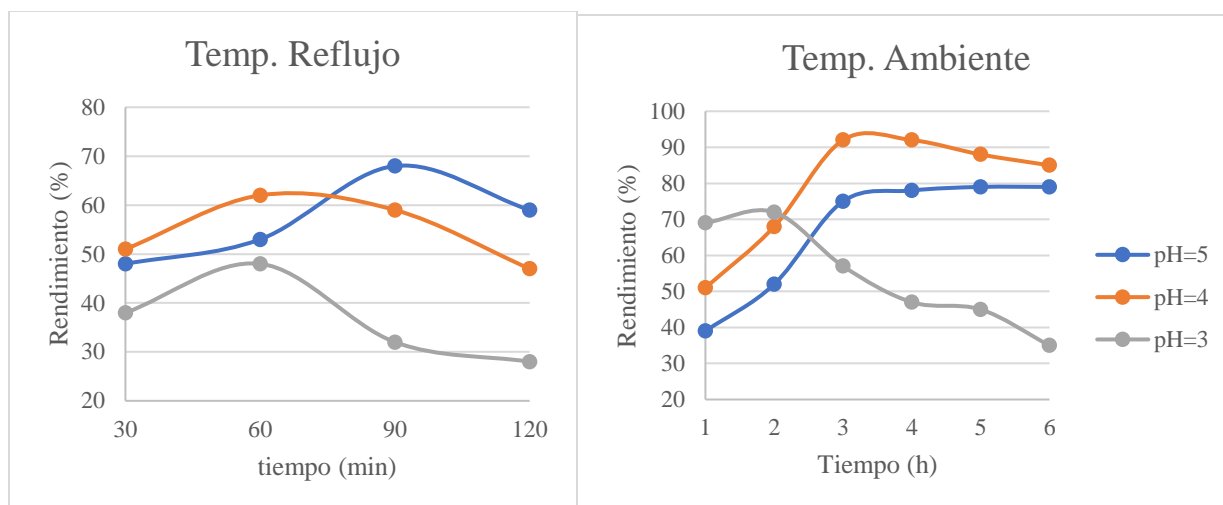


Figura 78. Gráficas del Estudio de reversibilidad de la oxima del acetato de hecogenina.

Al estudiar ambos compuestos permitió diseñar dos metodologías de desprotección de las oximas formadas, como se describe en la figura 79, estudio que se extrapolara a la síntesis de compuestos 22 oxo colestánicos a partir de ceto-esteroides sin involucrar la formación de enoles acetilados.

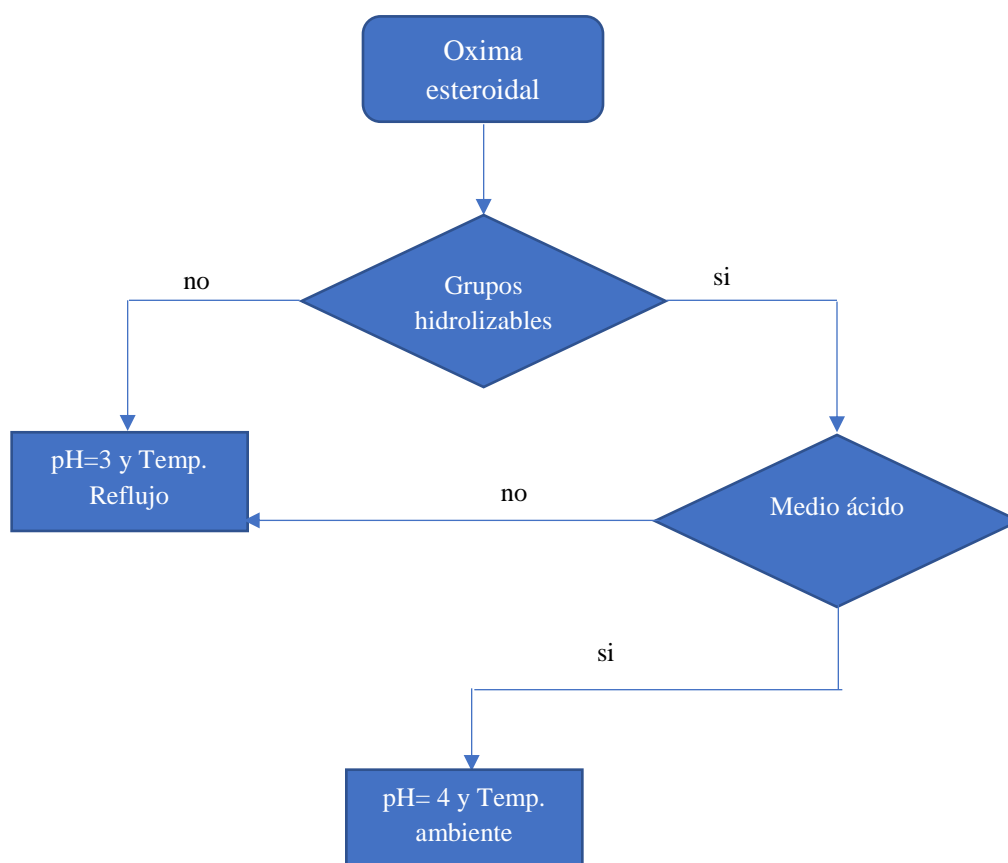
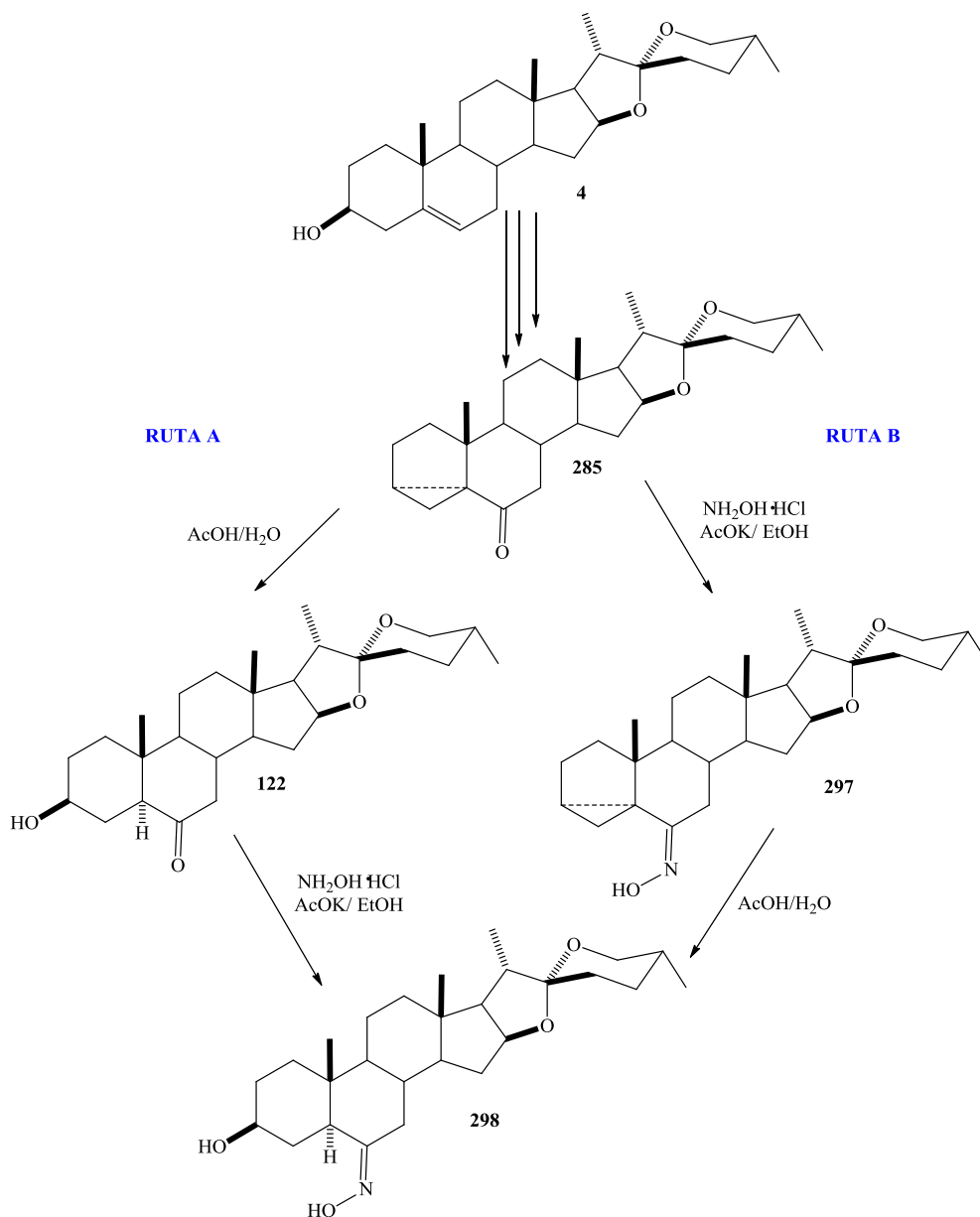


Figura 79. Diagrama de flujo para la desprotección de oximas esteroidales.

4.3 Modificaciones de la laxogenina.

A partir de la laxogenina obtenida en las etapas anteriores del proyecto se decidió modificar la estructura química de estos con la finalidad de obtener nuevos derivados 6,22 dioxo colestánicos, mismo que como se describió en los antecedentes han presentado actividad biológica variada, por lo que para llevar a cabo su evaluación biológica no solo se necesita su obtención sino a su vez la optimización de sus metodologías para aumentar la disponibilidad de estos compuestos, por lo que con el estudio de la oxima como grupo protector se decidió estudiar dos rutas alternas para la obtención de la oxima de laxogenina, como se observa en el esquema 46, analizando la viabilidad de la reacción de apertura del *i*-esteroide previamente descartada, ahora con la influencia del grupo hidroximino como grupo protector.



Esquema 48. Rutas para la obtención de la oxima de laxogenina (298).

4.3.1 Oxima del (25*R*)-3 α ,5-ciclo-espirostan-6-ona (**297**).

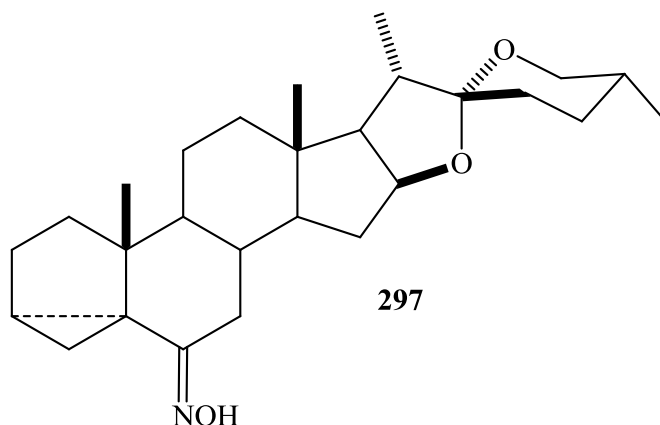


Figura 80. Estructura de **297**.

A partir del derivado *i*-esteroide de laxogenina se llevó a cabo la condensación con NH_2OH , reacción con buen rendimiento y selectividad, en el espectro de RMN de ^1H podemos observar una gran similitud con la materia prima, mostrando una señal en 4.45 ppm correspondiente al H-16 y en 3.5 ppm y en 3.4 ppm podemos observarlas señales correspondientes a los H-26, de manera análoga que en la materia prima en 3.35 ppm parece una señal *dd*, correspondiente al H-7e, que se ha desplazado a mayor frecuencia debido al cambio de grupo funcional, con ayuda del experimento HMBC se logró asignar no solo a señal del H-7a sino se encontró la señal correspondiente al H-8 entre la mezcla de señales a baja frecuencia, en este experimento además permite corroborar como existe una cercanía entre el carbono 22 del espiroacetal y los protones diasterotópicos en 26, así como el metilo de la posición 21 como se observa en la figura 82.

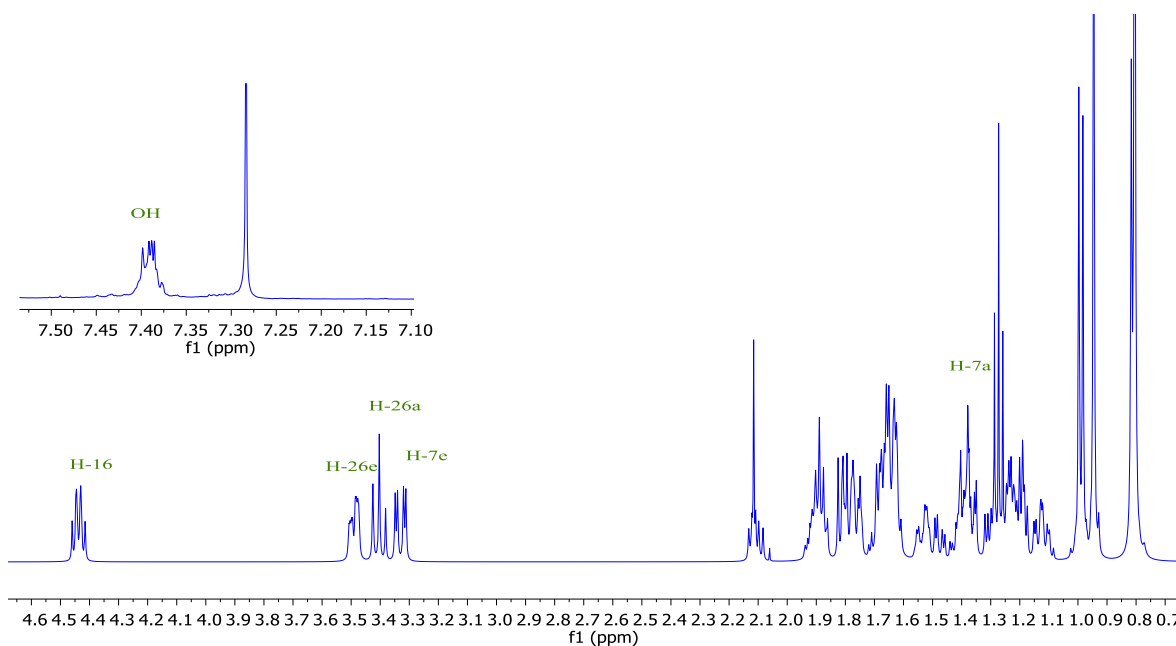


Figura 81. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz de la oxima **297**.

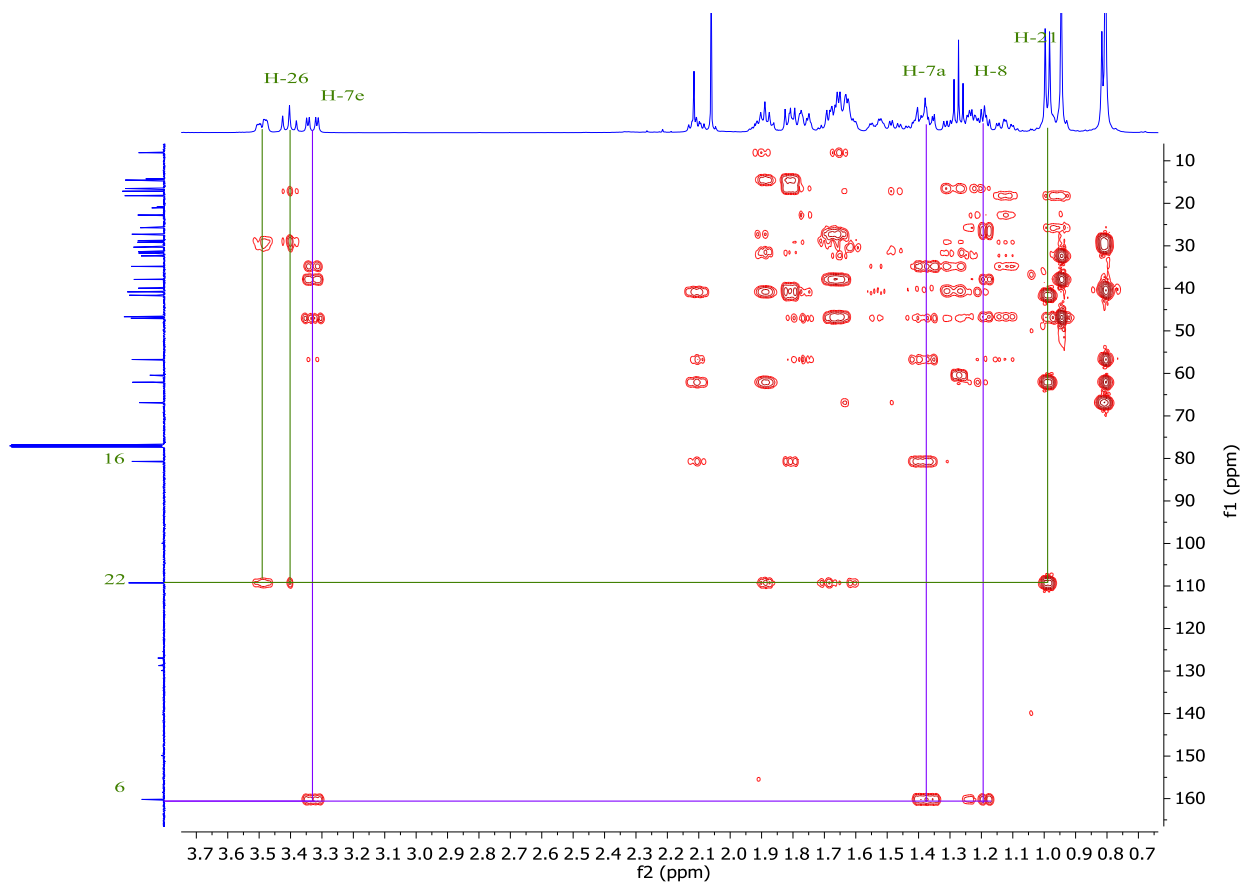


Figura 82. Espectro de RMN HMBC de la oxima 297.

Otra señal característica fue la aparición de una señal múltiple ancha en 7.4 ppm del grupo hidroxilo de la oxima. Por otro lado, en el espectro de RNM de ^{13}C podemos observar inmediatamente la señal correspondiente al carbono de la oxima en 160 ppm, a parte de este carbono el espectro guarda una gran similitud con la materia prima.

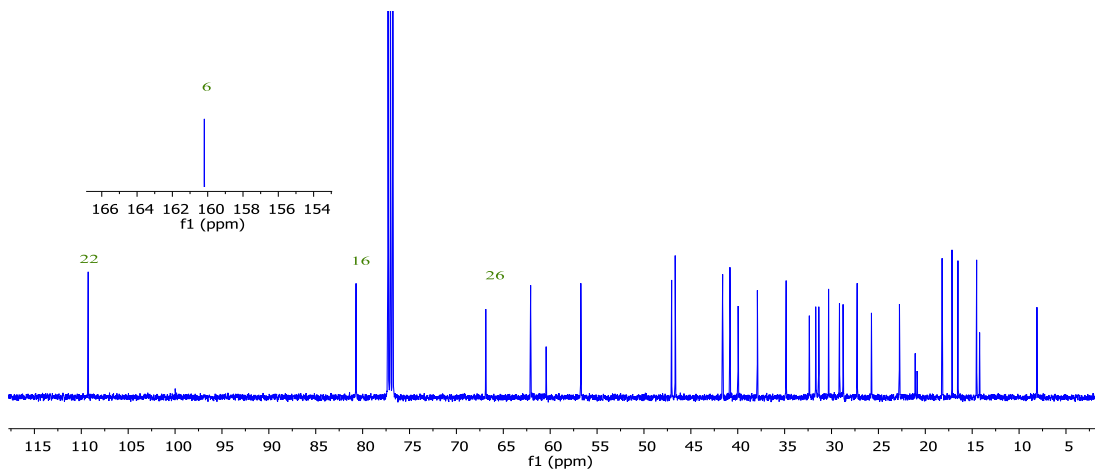


Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C de la oxima 297.

4.3.2 Oxima de laxogenina (298)

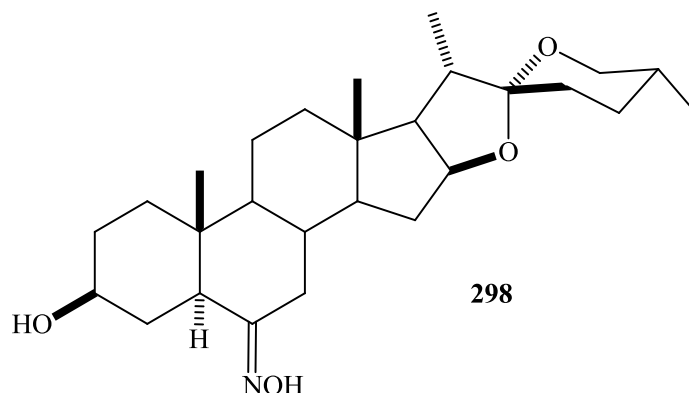


Figura 84. Oxima de laxogenina (298).

La formación de oximas ha mostrado gran interés en el desarrollo experimental, debido a la actividad biológica que se le ha atribuido, por lo que, si bien se puede obtener directamente de la condensación con hidroxilamina de laxogenina, paralelamente se estudió la opción de la formación de la oxima del *i*-esteroide para posterior apertura en medio ácido, reacción que con el *i*-esteroide cetónico dio bajo rendimiento, en la tabla 8, como al proteger este grupo permite un aumento del rendimiento neto considerable, dando así otra opción para la obtención de este derivado.

Tabla 8. Estudio de obtención de oxima de laxogenina a partir de 285.

Ruta	A	B
Rxn 1	65 %	90 %
Rxn 2	85 %	80 %
Rendimiento neto	55.2 %	72 %

En el espectro de RMN de ^1H podemos observar como la señal de H-7e se desplaza ligeramente a mayor frecuencia ocasionando que se traslape con la señal H-26a, y por otro lado se forma la señal correspondiente al H-3 en 3.6 ppm, a parte de este cambio, no se observa mucha diferencia con el derivado **122**, sin embargo, cabe destacar que a diferencia de las oximas previamente estudiadas no se observó la señal del grupo hidroxilo, esto se explica debido a la mayor disponibilidad de este protón para ser intercambiado debido a la posición en donde se encuentra, como se observa en la estructura optimizada de la figura 86, análogamente con el experimento de HSQC se localizó el protón diasterotópico H-7a, como se observa en la figura 87, debido a que ambos acoplan con el mismo carbono, al igual que el protón H-3 permite localizar al C-3.

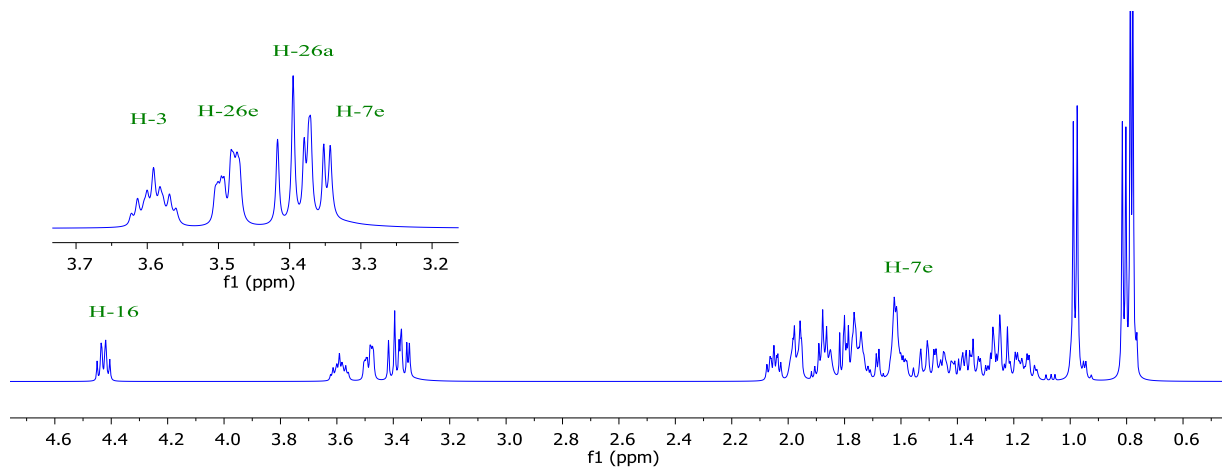


Figura 85. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de la oxima de laxogenina (**298**).

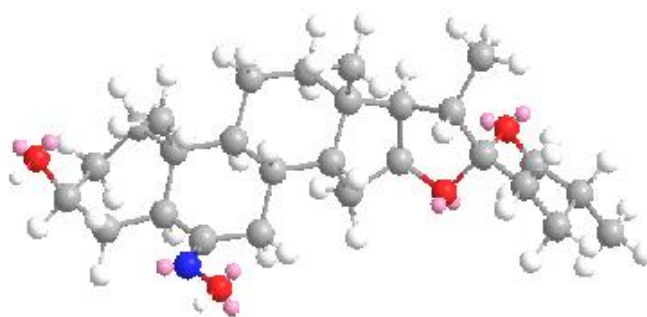


Figura 86. Estructura optimizada de la oxima de laxogenina (**298**) por MM2.

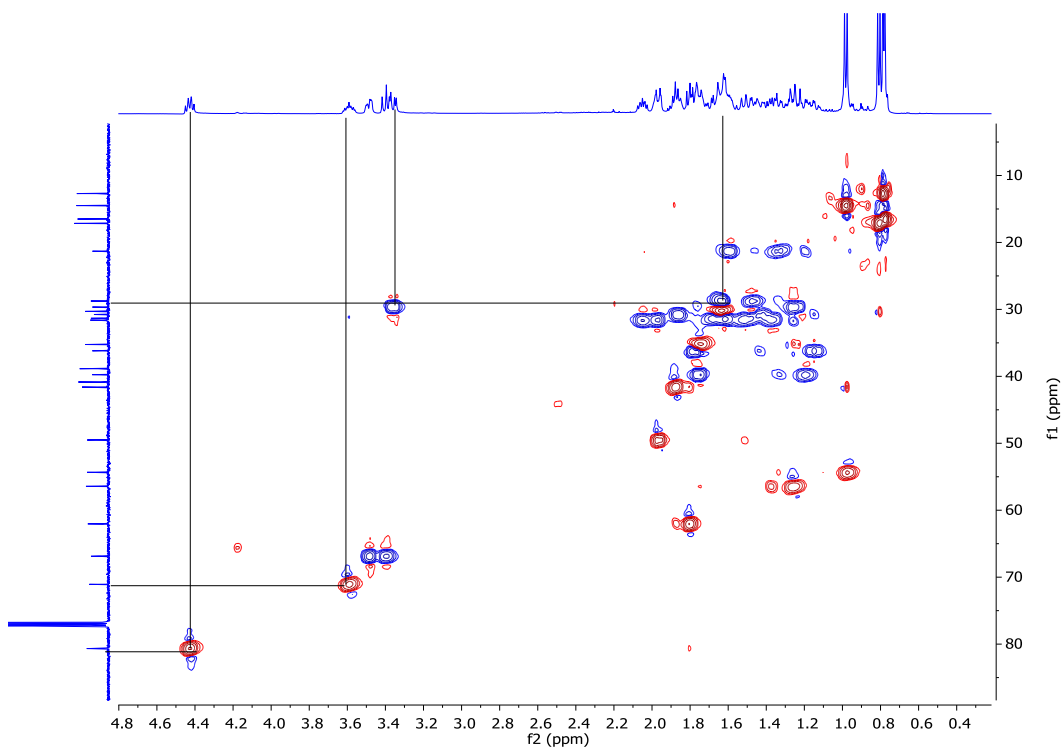


Figura 87. Espectro de RMN HSQC de la oxima de laxogenina (**298**).

En el espectro de RMN de ^{13}C podemos observar la aparición de una señal en 160 ppm correspondiente al C-6 de la oxima formada, en la búsqueda del H-5 se utilizó el experimento de HMBC a partir de la señal de C-6 podemos observar cómo se acopla con los protones diastereotópicos en C-7 y con otra señal en 1.9 ppm que corresponde al H-5, análogamente con el C-22 se puede asignar el H-23 ya que se conocen los H-26 como podemos observar en la figura 89.

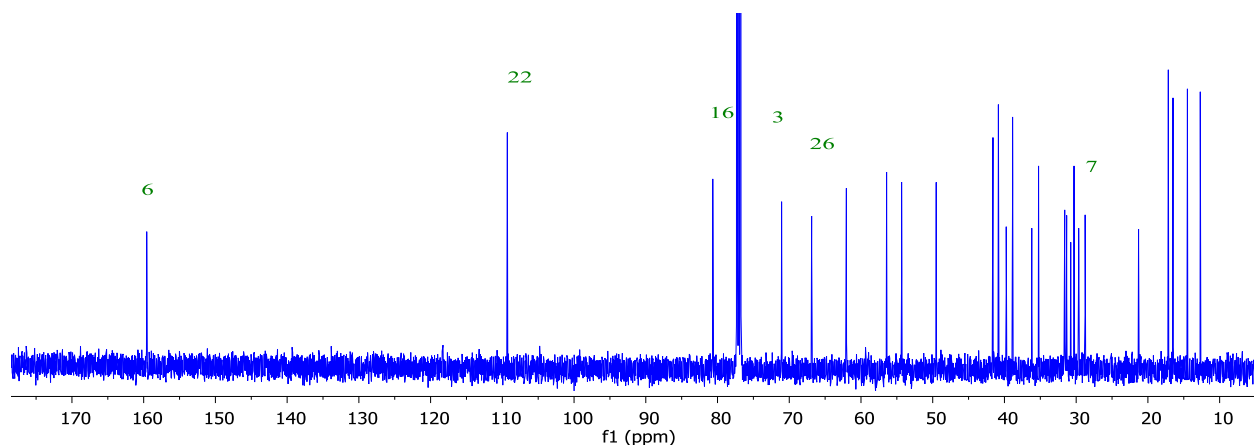


Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de la oxima de laxogenina (298).

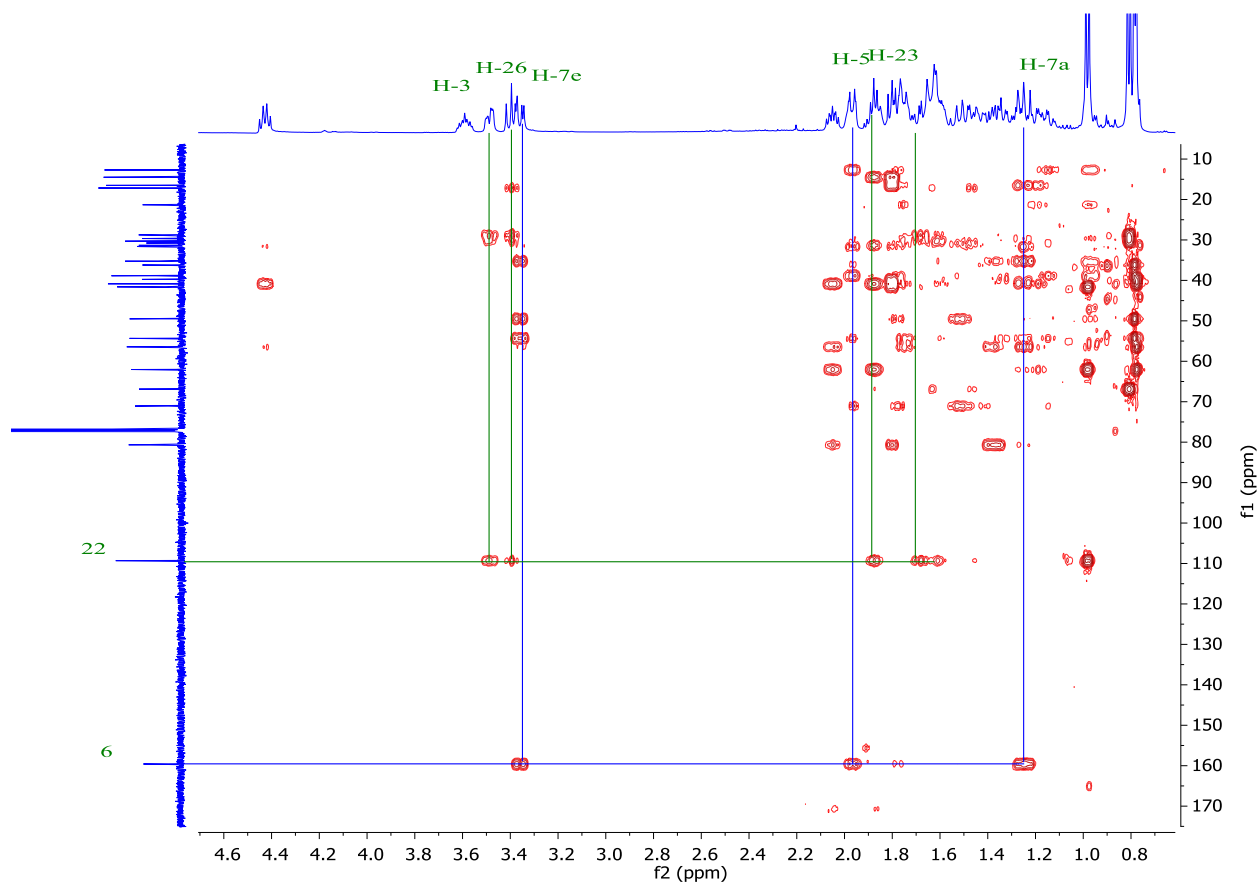


Figura 89. Espectro de RMN HMBC de la oxima de laxogenina (298)

4.3.3 Diacetato de (25R)-26-hidroxi-6-hidroxiimino-22-oxocolest-3 β ,16 β -diilo (299)

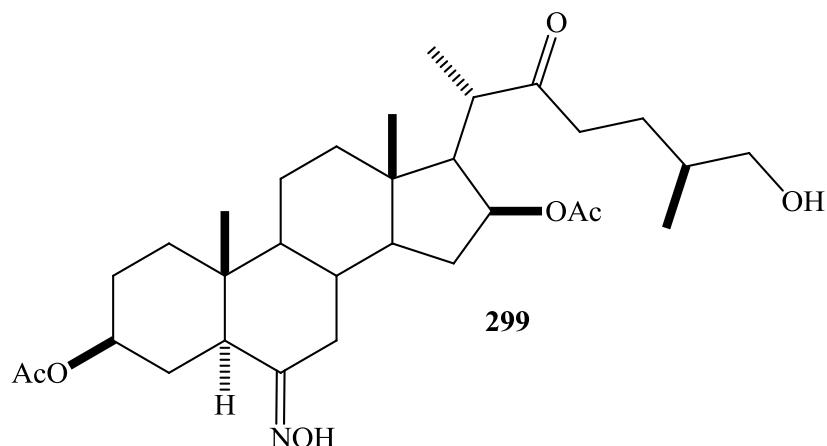
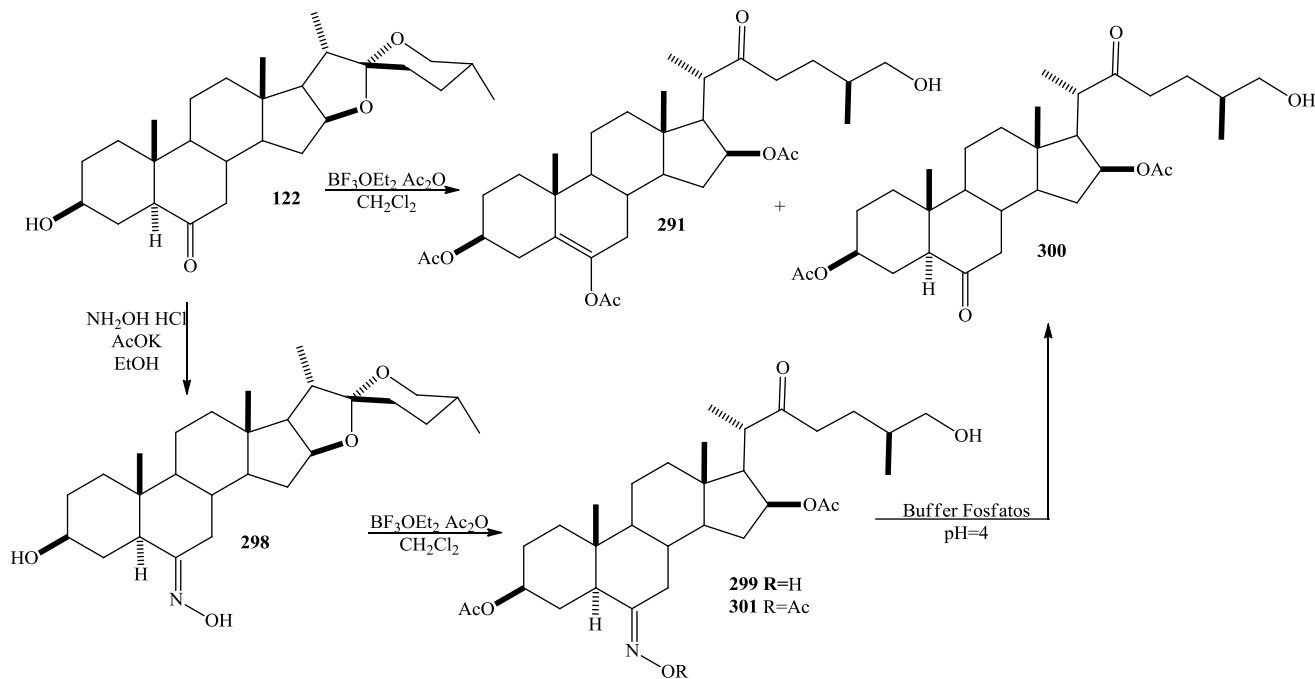


Figura 90. Diacetato de (25R)-26-hidroxi-6-hidroxiimin-22-oxocolest-3 β ,16 β -diilo (299).

Los compuestos 22-oxo-colestánicos han mostrado gran interés por diversos grupos de investigación en esteroides, anudado a esto la laxogenina ha mostrado potencial como promotor de crecimiento vegetal y como anticancerígeno, motivo por el cual los derivados 22-oxo-colestánicos de laxogenina prometen actividades biológicas interesantes, misma que al llevarse a cabo directo de laxogenina da como producto mayoritario un derivado enol acetilado, por lo que se diseñó una ruta que involucrara la formación de la oxima para posterior apertura, dando como producto principal el derivado 22-oxo-colestánico de la oxima de laxogenina, y un segundo derivado con el hidroxilo de la oxima acetilado, destacando que ambos productos se pueden desproteger para la obtención del derivado 22-oxocolestánicos.



Esquema 49. Obtención del derivado 300.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del derivado **299** podemos observar que la señal correspondiente al H-3 se ha desplazado a mayor frecuencia hasta 4.92 ppm, esto debido a la formación del acetato en esta posición, por otro lado vemos que la señal correspondiente al H-16 de igual forma se desplaza ligeramente a mayor frecuencia debido a la apertura del espiroacetal, no obstante el cambio más significativo, que demuestra la apertura del espiroacetal, es la señal correspondiente a los H-26, la cual aparece como una señal d con $J_{26-25} = 6.0$ Hz, la cual se había observado como un par de señales diaterotópicas, sin embargo al abrir el anillo F, este efecto se pierde debido al libre giro que tiene la molécula con la cadena lateral abierta. De igual forma al observar su desplazamiento en 3.18 ppm podemos confirmar que el hidroxilo en 26 no se ha acetilado como se esperaba, en 2.9 ppm aparece una nueva señal múltiple que corresponde al H-20, el cual se corroboró mediante el empleo del experimento COSY al observar su correlación con el metilo 21, como se puede observar en la figura 92, cerca de esta señal en 2.6 ppm podemos encontrar una señal que corresponde al H-23, a menor frecuencia se encuentra un juego de señales traslapadas que se pueden asignar a H-5 y H-7a, descubriendo que H-5 se encuentra ligeramente a mayor frecuencia debido a que en experimento HSQC se observa que no es diaterotópico, a diferencia de H-7 pero debido al traslapamiento es difícil su asignación aislada, finalmente en la región de 2.0 ppm aparecen dos señales que corresponden a los metilos de los acetatos en los C-3 y C-16, para discernir que señal corresponde a cada una, con el experimento COSY podemos observar como correlacionan cada uno con H-3 y H-16 respectivamente.

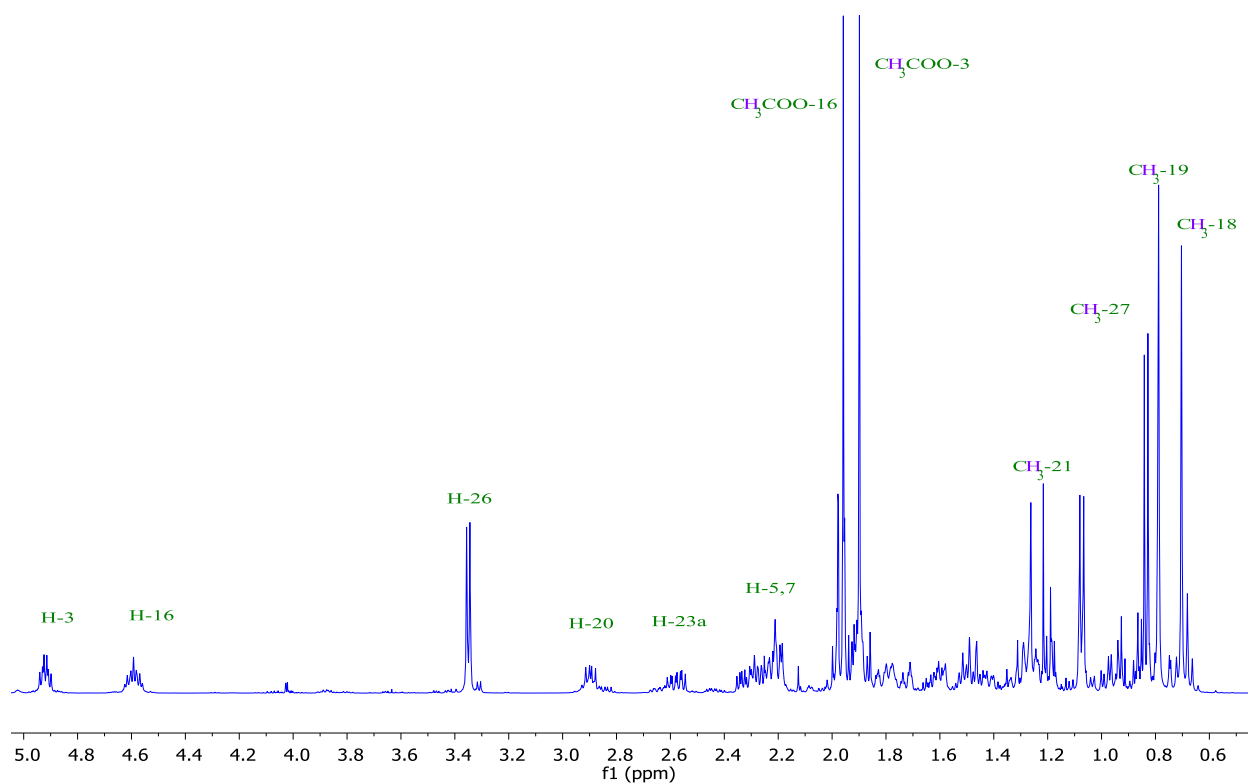


Figura 91. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de **299**.

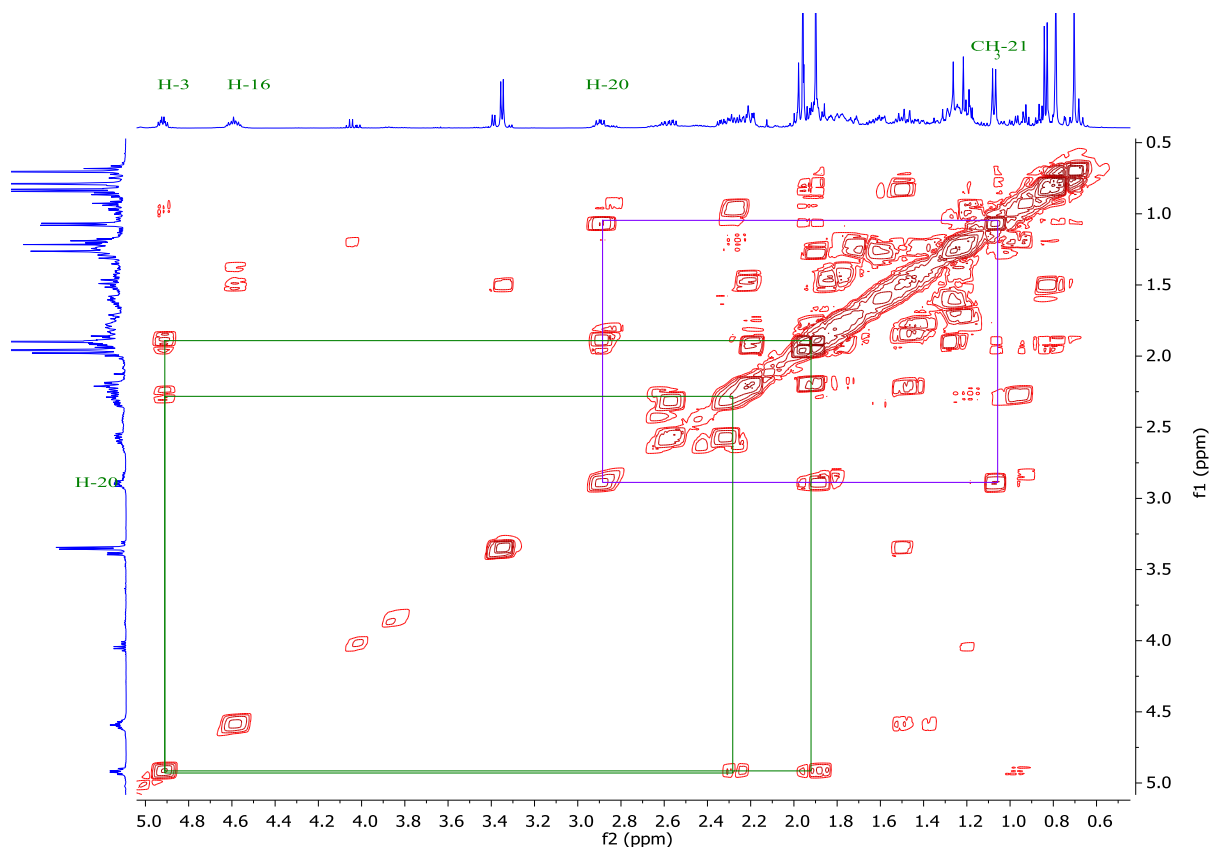


Figura 92. Espectro RMN COSY de **299**.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^{13}C , podemos observar que el espectro cambia notablemente, en primera desaparece la señal en 108 ppm característica del espiroacetal, así como la señal correspondiente a C-16 se desplaza a menor frecuencia hasta 75 ppm, efecto típico en la apertura del anillo E, paralelamente podemos observar la aparición de dos señales de éster en 170 ppm y 171 ppm correspondientes a los acetatos en 16 y 3, por otra parte la señal de C-3 se desplaza ligeramente a mayor frecuencia debido a la formación del acetato, mientras que C-26 no se ve afectado, comprobando la presencia del hidroxilo en este carbono.

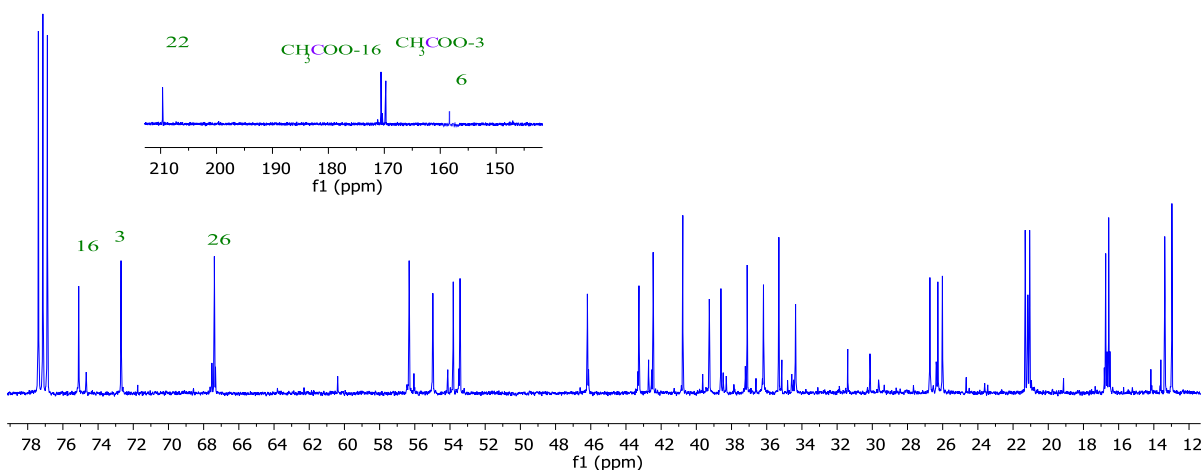


Figura 93. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de **299**.

Durante el desarrollo de la reacción, se observó la formación de un subproducto, el cual después de ser aislado y caracterizado, se confirmó que se trata del derivado anterior con un acetilo en el hidroxilo de la oxima, lo se esperaba debido a la presencia de catálisis ácida y Ac₂O en el medio de la reacción, en el espectro de RMN de ¹H de este derivado se puede observar una gran similitud con el derivado sin acetilar, con la única diferencia de la aparición de una nueva señal de metilo de acetato en 1.92 ppm, de igual manera en el espectro de RMN de ¹³C solo se observa una nueva señal en 172 ppm debido al nuevo grupo ester presente en este subproducto.

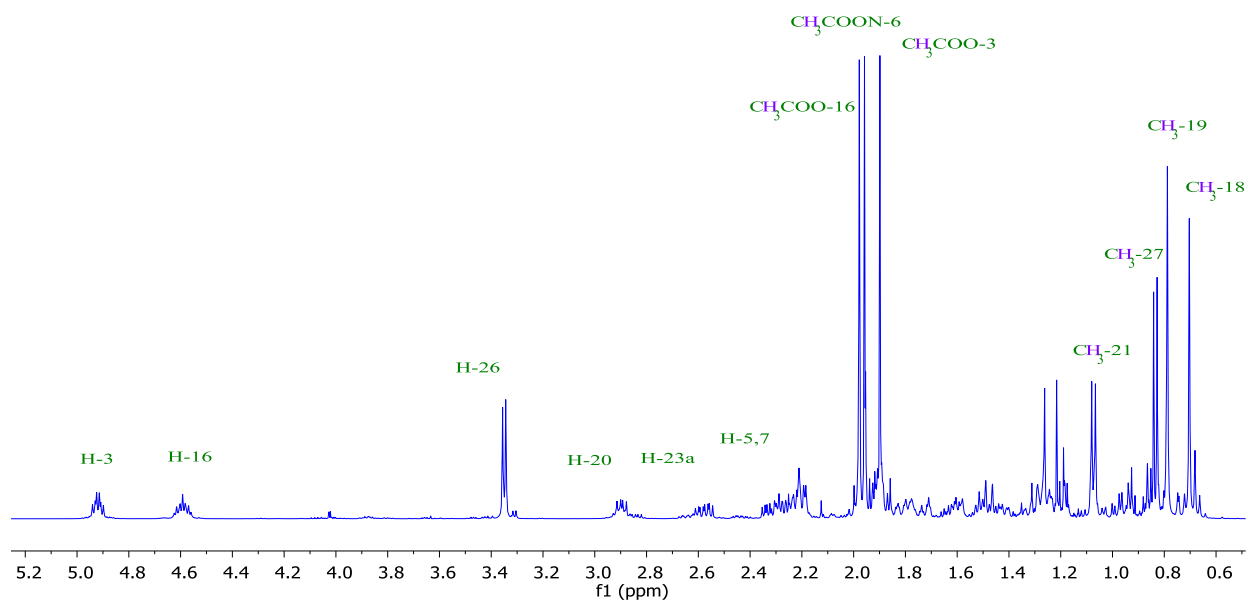


Figura 94. Espectro de RMN de ¹H a 500 MHz de 301.

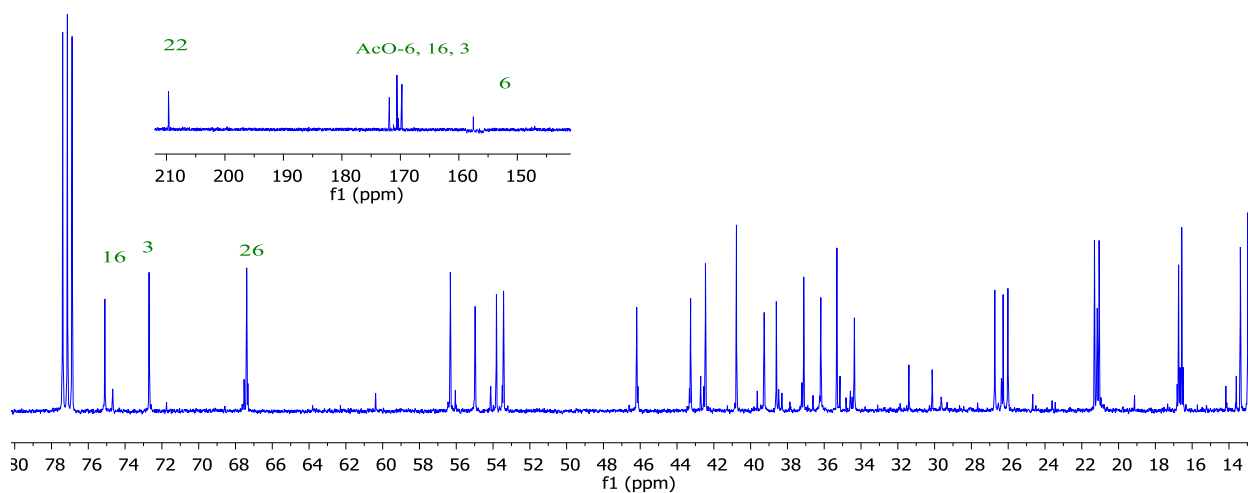


Figura 95. Espectro de RMN de ¹³C a 125 MHz del oxo 26 OH de oxima de laxogenina.

4.3.4 Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-6,22-dioxocolest-3 β ,16 β -diilo (**300**)

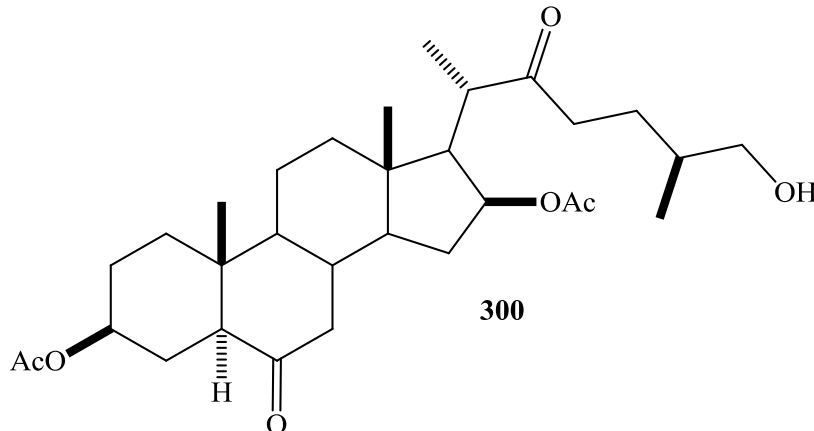


Figura 96. Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-6,22-dioxocolest-3 β ,16 β -diilo (**300**).

La obtención de este derivado es eje central en el desarrollo del presente trabajo experimental, debido a la actividad biológica como promotores de crecimiento vegetal, así como su latente potencial como anticancerígeno. Si bien la metodología convencional indicaría realizar una apertura directa sobre la laxogenina (**122**), al realizar esta reacción se observó la formación de dos productos mayoritarios, el derivado **300** y su forma enol-acetilada (**291**), en proporciones muy similares, lo que no disminuye considerablemente el rendimiento de la reacción, si bien se exploró la hidrólisis de este derivado enólico, al momento de llevar a cabo esta reacción se hidrolizaba los acetilos en 3 y 16 regresando el producto a la materia prima, por lo que con la finalidad de emplear la metodología de uso de oximas como grupo protector que se diseñó, se observó que debido a la presencia de grupos hidrolizables, la mejor opción de reversibilidad era a pH=4 a temperatura ambiente, obteniendo una conversión del 86 %, lo cual aumenta la disponibilidad de este producto para sus estudios biológicos. Cabe destacar que al momento que se estudió la factibilidad de obtener el derivado **300** a partir del derivado **301**, observando de igual forma una alta conversión, por lo que se decidió trabajar con la mezcla de los derivados **299** y **301**, para obtener el producto esperado, obteniendo una conversión neta del 85 %.

Por otro lado, para la caracterización del derivado **300**, en el espectro de RMN de ^1H podemos observar que proactivamente el espectro no presenta cambios con respecto a la materia prima **299**, solo con ligeros cambios en las señales de H-5 y H-7 que se desplazan ligeramente a mejor frecuencia debido al cambio de grupo funcional, al igual que se observa un desplazamiento en el acetato previamente asignado al C-3, por lo que para corroborar si la asignación aun es correcta, al observar el espectro HMBC, podemos notar como uno de estos metilos correlaciona a 2 enlaces con los carbonos de éster, confirmando la estructura.

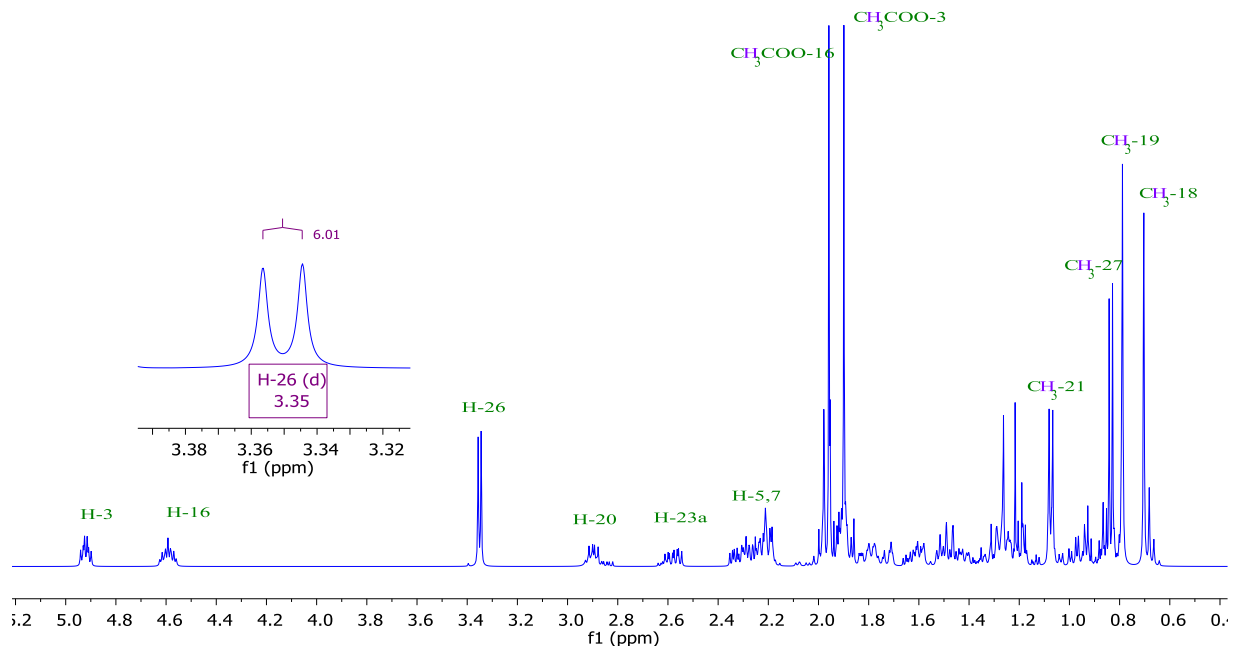


Figura 97. Espectro RMN de ^1H a 500 MHz de **300**.

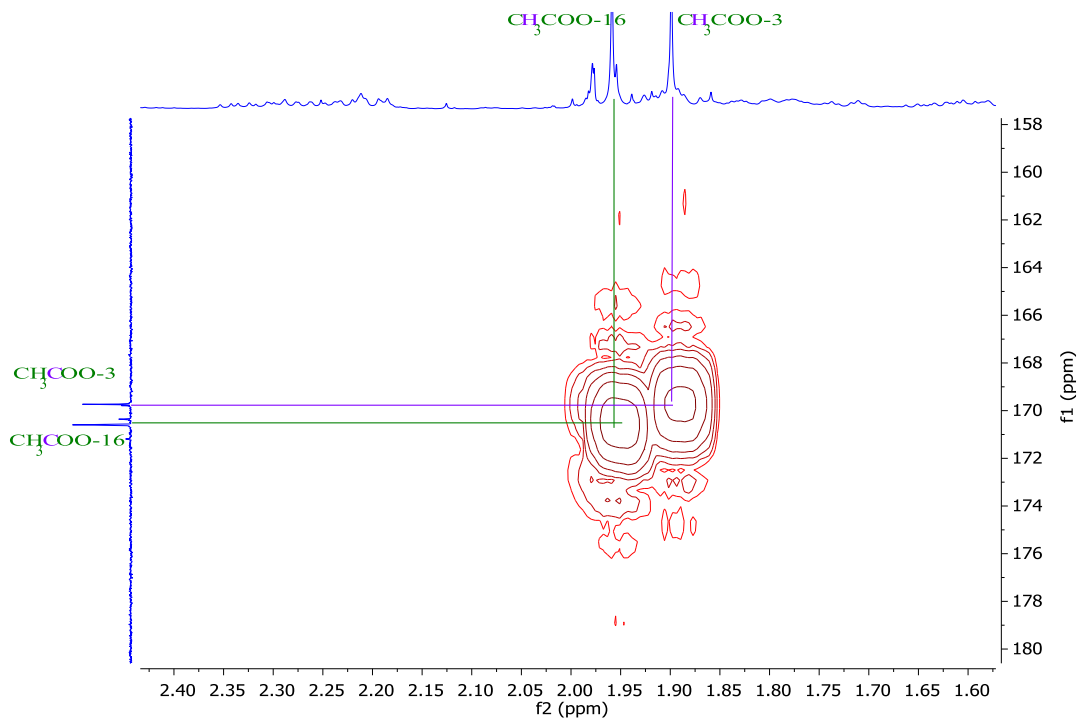


Figura 98. Espectro RMN HMBC de **300**.

Con la ayuda del espectro de RMN de ^{13}C donde se observa un cambio significativo, debido a la desaparición de la señal en 160 ppm correspondiente al carbono de oxima, y la reaparición de la señal en 214 ppm característica de la cetona en C-6, como se observó en la laxogenina previamente, aunque de igual manera el resto de espectro conserva una gran similitud con el derivado **299**.

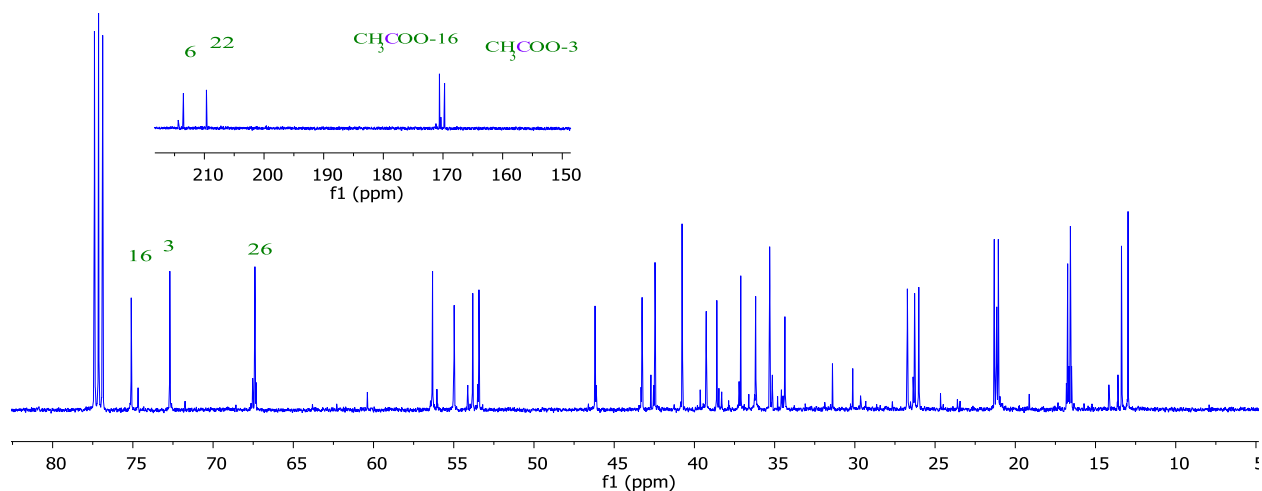


Figura 99. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de **300**.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^1H del derivado enol-acetilado (**291**), podemos observar como aparece una señal en 2.05 ppm correspondiente a un nuevo grupo acetilo en la molécula, así mismo podemos observar como la región donde se había observado a H-5 se ha visto modificada con la inserción de una nueva señal, la cual se debe ahora a los H-4, los cuales ahora son base de vinilo, pero a menor frecuencia que los H-7, debido al cambio de ambiente químico que presenta la molécula en esta región.

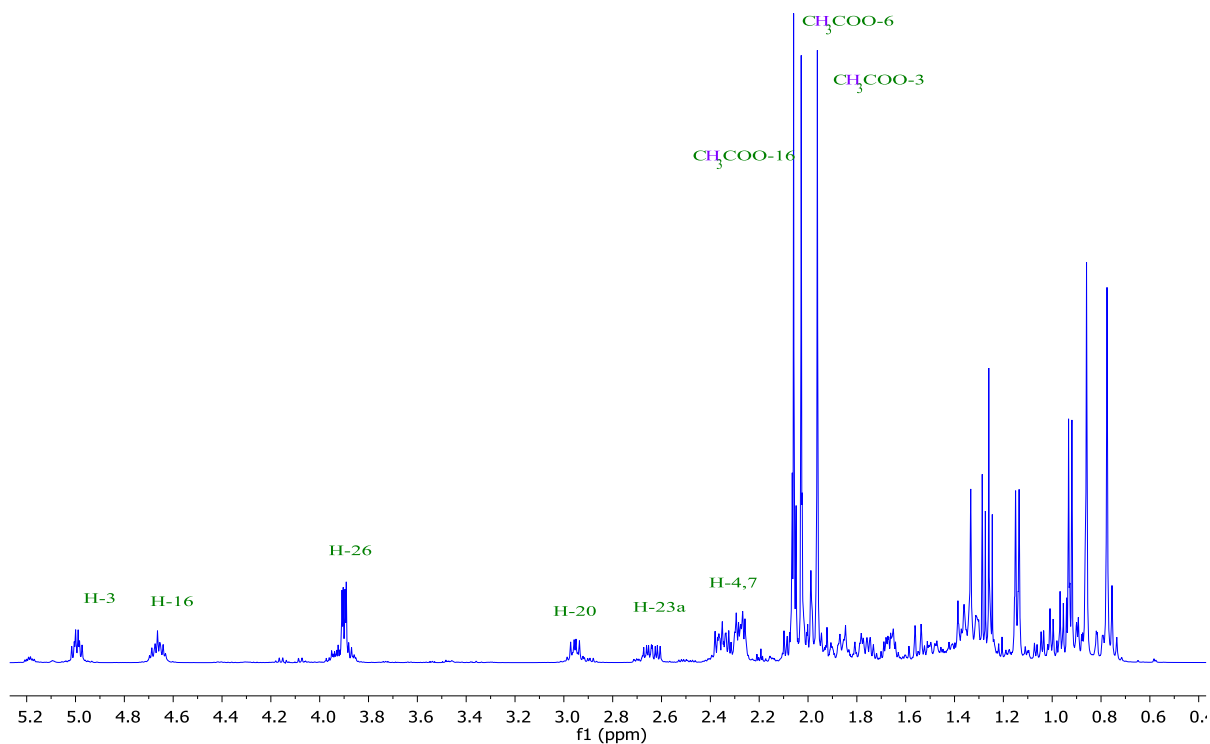


Figura 100. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de **291**.

Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{13}C podemos observar la presencia de tres señales en la región de los ésteres, confirmando la formación del enol acetilado, así mismo en 154 ppm podemos observar la aparición de una señal que corresponde al C-6 carbono vinílico base de oxígeno y en 124 ppm la señal correspondiente a C-5, confirmando la formación del doble enlace, así mismo en 209 ppm podemos encontrar la señal correspondiente al C-22 pero a mayor frecuencia no se observa la señal del C-6 de cetona, lo que indica que todo el producto se encuentra enolizado.

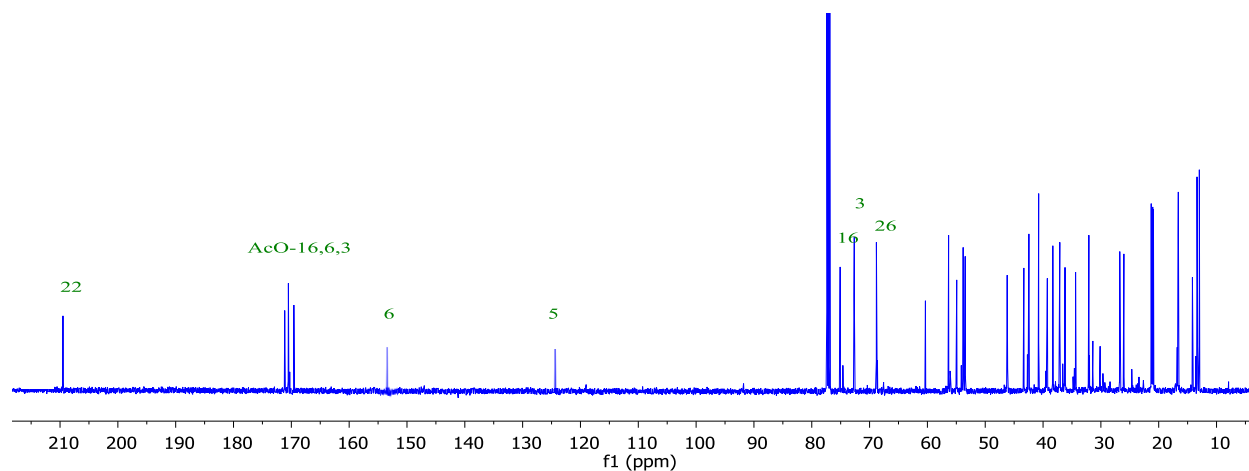


Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de **291**.

4.4 Evaluación biológica de 122, 285, 297-300 como anticancerígenos.

El cáncer es uno de los principales motivos de decesos tanto a nivel mundial como en el país, sobre todo en las mujeres, por lo que con la finalidad de evaluar compuestos obtenidos en el desarrollo experimental como posibles nuevos agentes anticancerígenos, se procedió a trabajar con dos líneas celulares de cáncer de mama, la MCF-7, línea celular definida como cáncer de mama tipo estándar, siendo el más común encontrado como padecimiento a nivel mundial y, por otro lado se trabajó con la línea MDA-MD-231, definido como cáncer triple negativo, cáncer con la característica de ser el más nocivo y de difícil tratamiento, ya que no existe terapia efectiva en la actualidad contra este tipo de cáncer, siendo una oportunidad latente para la búsqueda de nuevos agentes contra este tipo de cáncer.

Para el estudio se seleccionaron 6 compuestos esteroidales obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, los cuales fueron seleccionados con la finalidad de estudiar la importancia del grupo hidroximino como potenciador del efecto citotóxico en un esteroide, en la figura 102 podemos observar las estructuras seleccionadas, de los que se puede destacar que se analiza la presencia del *i*-esteroide en el anillo A tanto en su forma cetónica como la oxima correspondiente, así como la forma libre de la laxogenina, y finalmente estudiar la importancia de la cadena lateral abierta al momento de observar un efecto citotóxico.

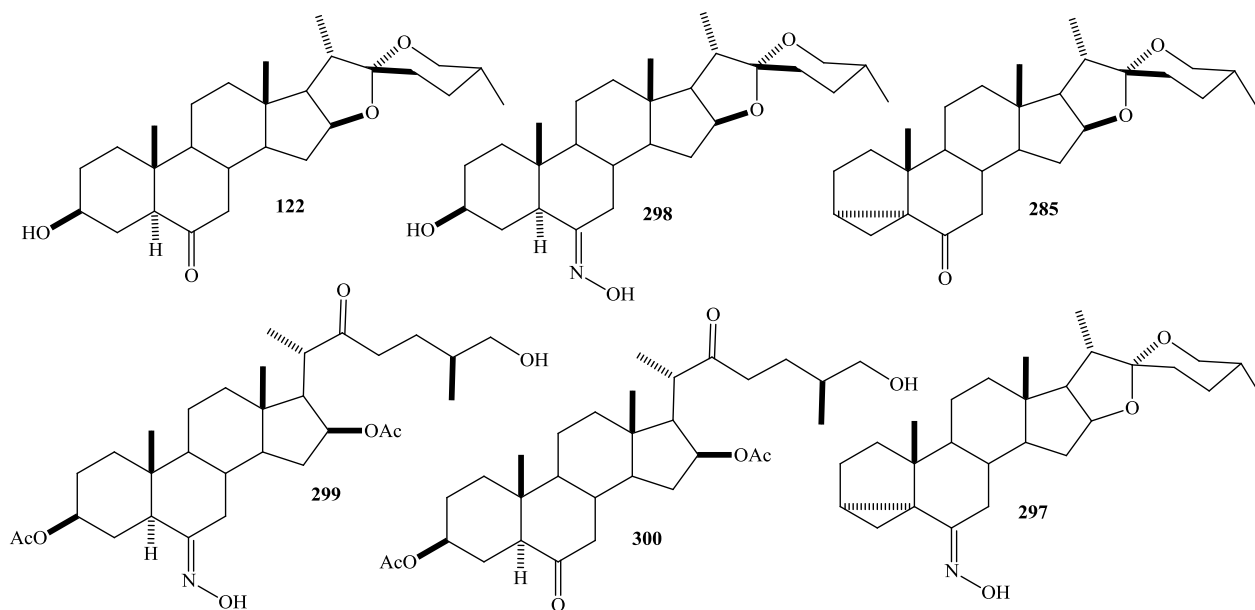


Figura 102. Estructuras seleccionadas para el estudio citotóxico en cáncer de mama.

4.4.1 Empleando cepas de cáncer de mama línea MCF-7

En la figura 103 podemos observar el efecto de la concentración con la proliferación celular de esta línea de cáncer de mama, observando en primera instancia que los compuestos cetónicos con el espiroacetal no muestran una actividad relevante a concentraciones menores a los 80 μ M, en cambio las oximas correspondientes muestran un IC_{50} del orden de 80 μ M, no fue destacable su

actividad en esta línea celular; por otra parte los derivados 22-oxocolestánicos muestran un valor de IC₅₀ en el orden de 10 µM, siendo más bajo el de la oxima, por lo que se puede corroborar que la presencia de las oximas en la estructura esteroidal, para esta línea celular potencia la actividad como anticancerígeno.



Figura 103. Estudio del IC₅₀ de los derivados esteroidales seleccionados.

Aunque al analizar el número de células en los compuestos con el espiroacetal se observó que aun después de cumplir un ciclo celular durante el experimento no se observaba un cambio aparente en el número de los mismos, por lo que se decidió estudiar estos compuestos a una concentración estándar de 40 µM pero ahora a diversos tiempos, observando que el número de células se mantenía constante, indicado esto que los compuestos cetónicos son citostáticos, es decir, no matan células

pero si evitan su proliferación, el cual es el primer paso para que un compuesto se considere citotóxico, por lo que se decidió estudiar a concentraciones más altas como se observa en la figura 104 y para el caso del *i*-esteroide cetónico se observa un IC₅₀ en el orden de 400 μM, que si bien para fines prácticos no es una dosis aceptable, demuestra el potencial latente de este tipo de compuestos.

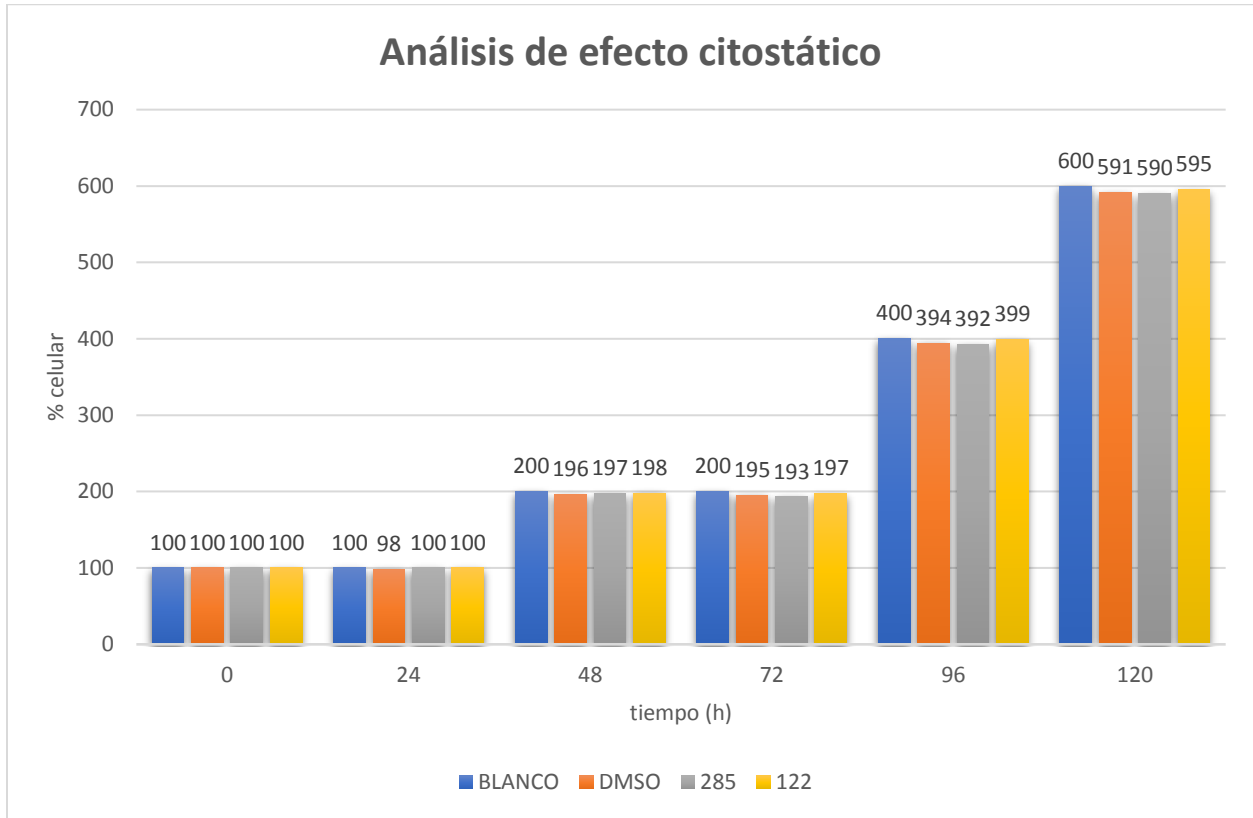


Figura 104. Estudio de proliferación celular en función del tiempo.

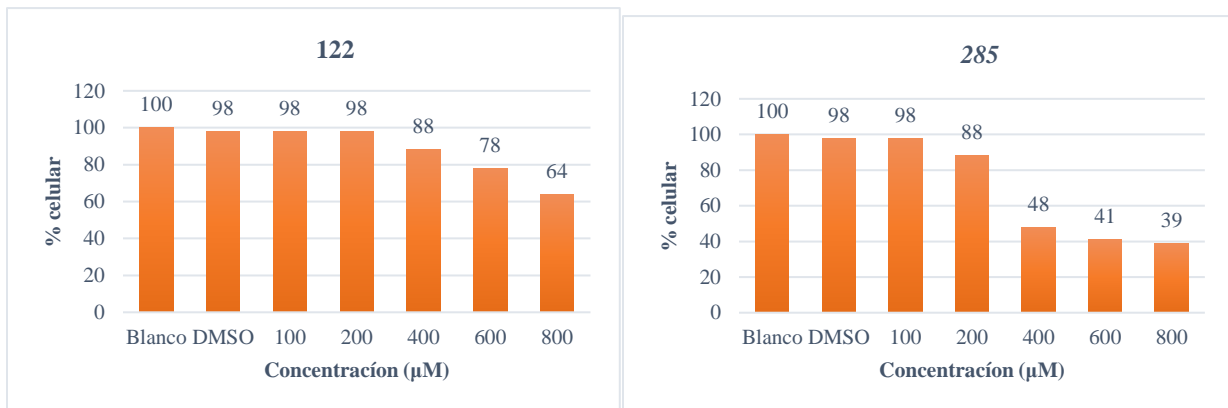


Figura 105. Estudio citotóxico de derivados espirostánicos cetónicos a concentraciones altas.

4.4.2 Efecto en células cancerosas de mama MDA-MB-231.

Por su parte el estudio realizado en la línea celular MDA-MB-231, mostró resultados completamente diferentes a los de su línea alterna, como se observa en la figura 106 los derivados cetónicos espiroestánicos muestran un valor de IC₅₀ del orden de 1 μM siendo potenciales agentes anticancerígenos para su continuo estudio, debido a la baja dosis requerida para la obtención del efecto citotóxico, además cabe destacar que estos compuestos no fueron activos a estas dosis en la otra línea celular, por lo que se puede especificar que son selectivas aun entre los diversos tipos de cáncer de mama, permitiendo entonces hablar de posibles terapias específicas para el tipo de cáncer presentado.

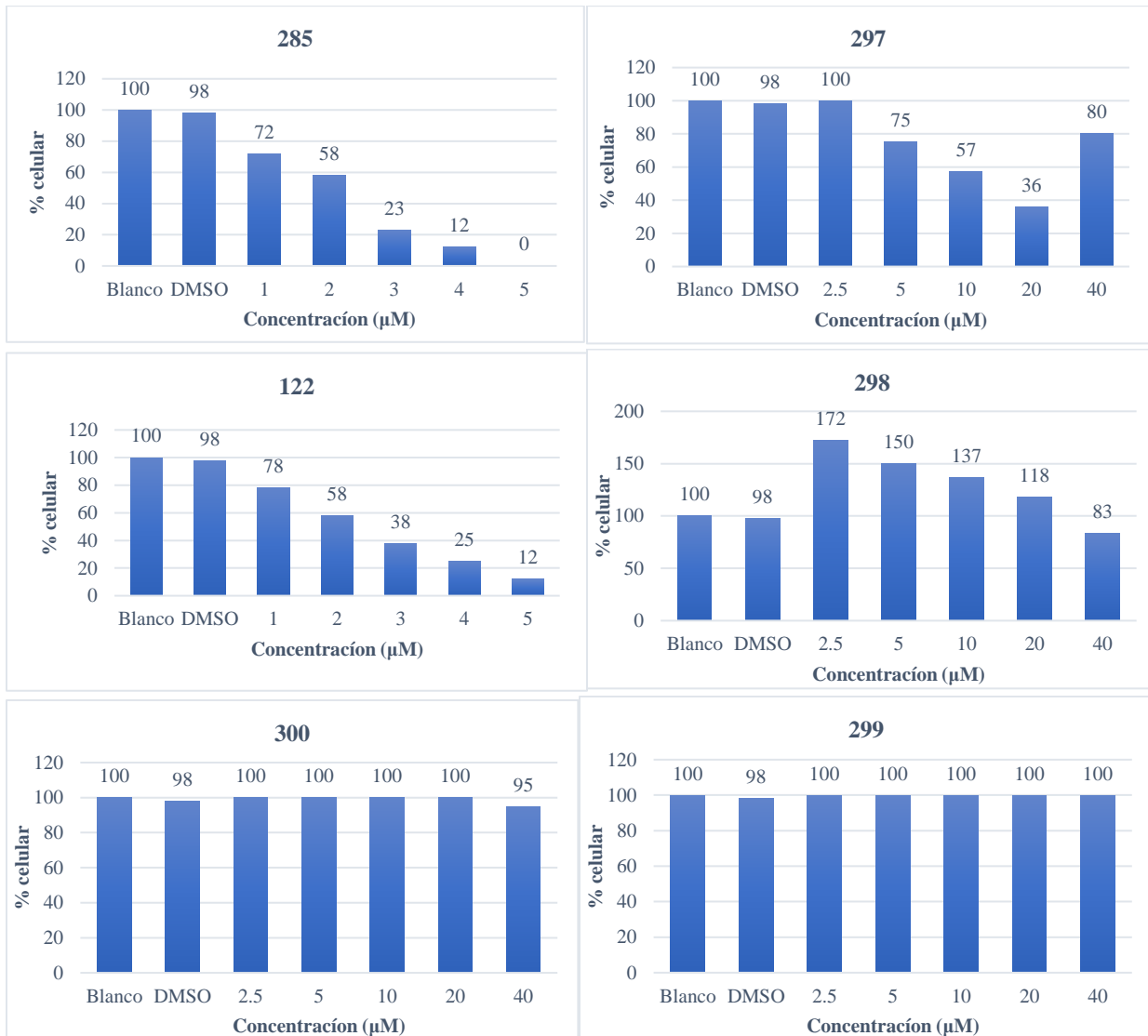


Figura 106. Estudio del IC₅₀ de los derivados esteroideos seleccionados.

Por su parte se observa que las oximas de los derivados cetónicos espirostánicos tiene un valor de IC₅₀ en el orden de 15 µM una dosis mayor que sus formas cetónicas, generando la hipótesis que los receptores de muerte que activan cada grupo son diferentes, además se observó que a dosis altas estos derivados aumentan la proliferación celular de este tipo de cáncer, lo que es indicativo que las células metabolizan ahora estos esteroides en vez de las hormonas normalmente biodisponibles, por lo que un estudio a mayores concentraciones como el que se observa en la figura 107, nos permitió comprobar esto, mostrando que, a mayores dosis de este compuesto aumenta la proliferación de este tipo de células, lo que es indicativo de que líneas celulares hormona-dependientes podrían ser suplementadas con este tipo de compuestos y así aumentar su producción; por otro lado en esta línea celular los derivados 22-oxocolestánicos no demostraron actividad aparente ni como citostáticos, porque la población aumento exponencialmente como normalmente sucede en una línea celular.

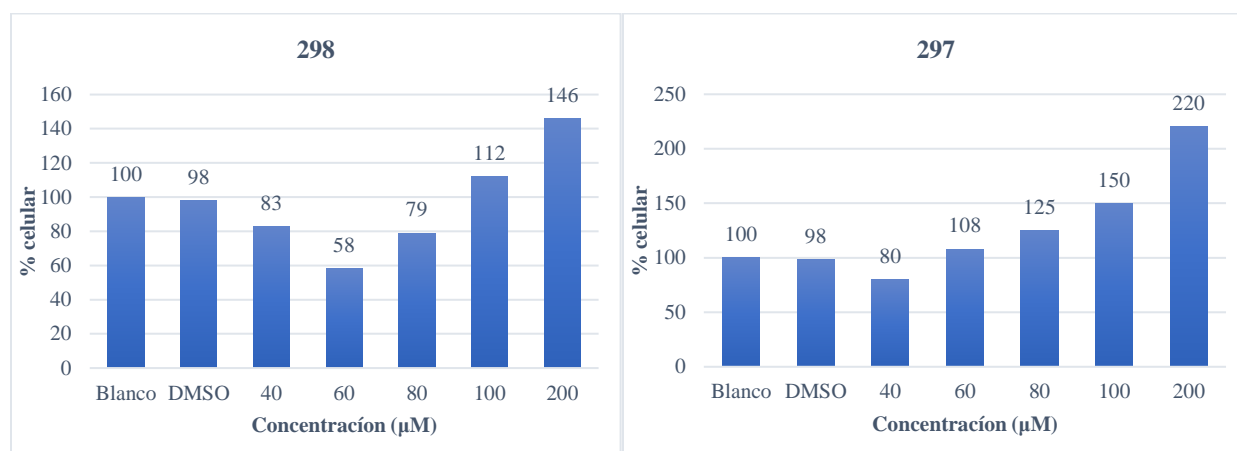


Figura 107. Estudio a dosis altas de las oximas esteroidales como promotores de la proliferación celular.

4.5 Evaluación biológica de 291 y 300 como promotores de crecimiento vegetal.

La mejora en la producción de alimentos de primera necesidad es una de las ramas de investigación más explotada, además de la médica, como se observó en los antecedentes, los esteroides han demostrado gran importancia como fuente de nuevos promotores de crecimiento vegetal, si bien en un inicio se trabajaba con esteroides obtenidos directamente de fuentes naturales, como la brasinolida, en la actualidad se buscan análogos sintéticos a estos, que permitan una mayor disponibilidad y los mismos o mejores efectos que los brasinoesteroides ya conocidos, por lo que se decidió trabajar con algunos derivados 22-oxocolestánicos mediante el ensayo de inclinación de lámina de arroz, utilizando como control positivo homobrasinólida (brasinoesteroide comercial), utilizando dos variedades de arroz Morelos el A08 y el A06, arroz mexicano previamente estandarizado para su empleo en esta técnica, observando que el Morelos A06 es un cultivo menos sensible, obteniendo ángulos entre 26 ° a 79 °, como se observa en la figura 108, en cambio con el Morelos A08 se encontraron ángulos en el orden de 180 °, como se observa en la figura 109.

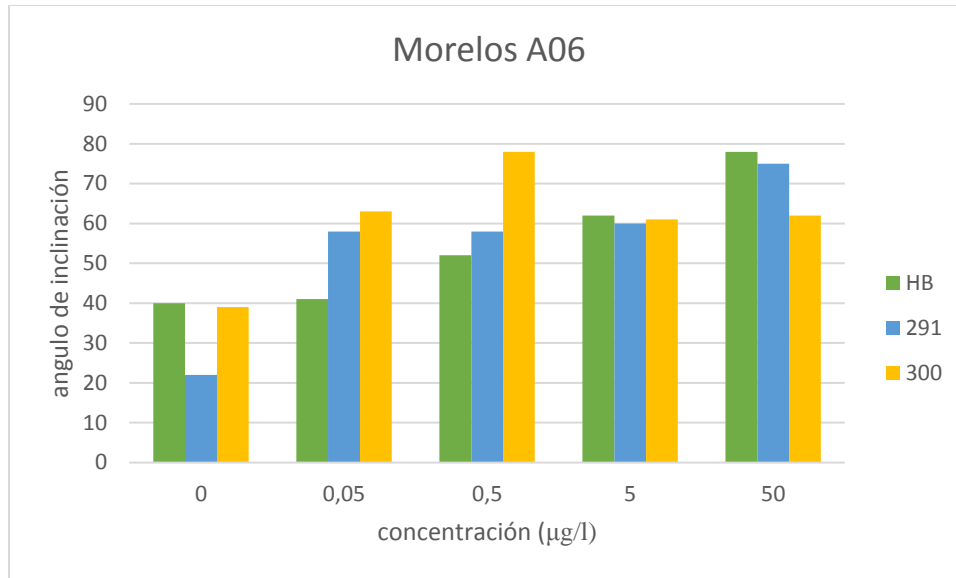


Figura 108. Ensayo de inclinación de lámina de arroz con variedad Morelos A06

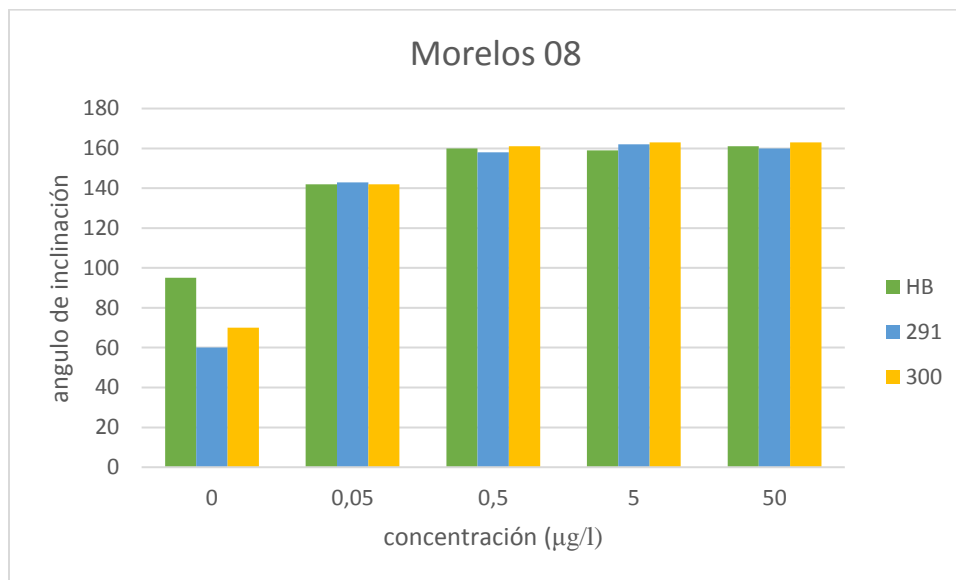


Figura 109. Ensayo de inclinación de lámina de arroz con variedad Morelos A08

En el caso del Morelos A06 podemos observar como el compuesto enólico muestra un valor de 70° a una concentración de 50 µg/L mayor que el blanco pero aun no mejor que la HB que presenta un valor de 79 ° a esta concentración, en cambio el derivado 22-oxocolestanico de laxogenina a una concentración de 0.5 µg/L se observa un valor de 76 ° mucho mayor que la HB a esta concentración, la cual muestra un valor de 49°, indicando que este nuevo derivado es mejor promotor de crecimiento vegetal que la HB a esta concentración, además de que esta concentración es más baja que la normal de aplicación en el caso de la HB, además de que este compuestos es de más fácil acceso que la HB.

Por otro lado para el Morelos A08, el cual demostró ser un cultivo mucho más sensible, de nuevo el compuesto 22 oxocolestánico de laxogenina a una concentración de 5 µg/L mostro un valor de 171 ° siete unidades más que la HB; por otro lado el derivado enólico a una concentración de 50 µg/L mostro un valor de 176 ° seis grados más que la HB, pero cabe destacar que esta concentración ya se considera alta para su aplicación, debido a que la relación costo beneficio se vería comprometida al aumentar tanto la dosis de los nuevos promotores de crecimiento vegetal, por lo que el derivado 22 oxocolestánico de laxogenina, es el idóneo para continuar con un estudio a nivel invernadero, así como con otras especies de interés agronómico.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Equipos, técnicas y materias primas utilizadas.

5.1.1 Equipos y técnicas de identificación.

➤ Punto de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Melt Temp, mediante rampas de temperatura de 10 °C/min y 1°C/min por la técnica de capilar abierto y no fueron corregidos.

➤ Rotación óptica

La desviación óptica fue medida en un polarímetro compacto modular MCP100 con celda de 10 cm de longitud y una longitud de emisión de 589 nm (emisión del Na) a temperatura constante de 25 °C, en solución de cloroformo o metanol según su solubilidad y se presenta como rotación óptica específica.

➤ Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 500 MHz se obtuvieron en el equipo Bruker para la obtención de experimentos de 1D (1H, 13C y DEPT) y 2D (COSY, HMBC, HSQC, NOESY), utilizando cloroformo deuterado conteniendo tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz).

➤ Espectroscopia de infrarrojo

Para la obtención de los espectros de IR se utilizó un equipo Agilent Cary 630 FTIR, con interfases ATR con punta de diamante para sólidos y DIAL PATH para líquidos, la ubicación de las bandas de transmitancia se expresa en número de onda ν (cm^{-1}).

➤ Espectrometría de masas

Para la obtención de los datos de masa molecular exacta y espectros de masas se utilizó un equipo Jeol, expresando los espectros en % abundancia relativa vs relación masa carga, para los resultados de masas de alta resolución se expresa con exactitud de 4 cifras decimales.

5.1.2 Técnicas de purificación

➤ Cromatografía en capa fina

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 F₂₅₄ de Macherey-Nagel, Alemania y como fase móvil sistemas de elución de hexano/ acetato de etilo. Para su revelado se empleó luz

ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara de UV) y por tratamiento con ácido sulfúrico al 50% con posterior calcinación de las placas.

➤ Cromatografía en columna

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 hexano/acetato de etilo con polaridad creciente.

5.1.3 Materias primas

➤ Diosgenina

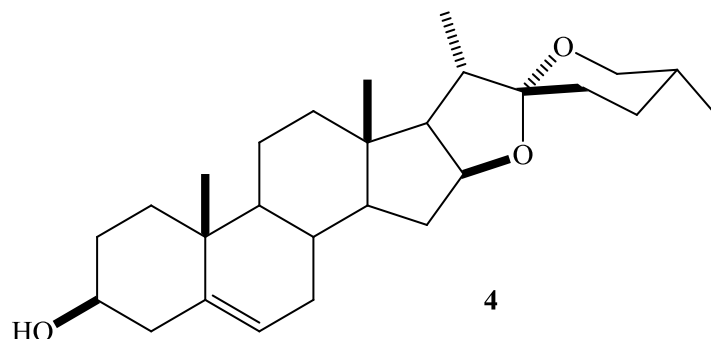


Figura 110. Estructura de 4.

La diosgenina (4) figura 110 se caracterizó por método físicos y espectroscópicos, los datos fueron comparados con los reportados en la literatura. [55]

Caracterización.

Fórmula molecular: $C_{27}H_{42}O_3$, P.M.: 414.62, Polvo amorfo, p.f. 199-200 °C, $\alpha_D = -129^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1.0$), IR: 3650 cm^{-1} O-H, 2869 cm^{-1} CH_3 , 1374 cm^{-1} C-O, $[M+H] = 415.6258$, calcu: 414.6206

RMN 1H

δ : 5.35 (1H, dt, $J_{6-7} = 5.4$, $J_{6-4} = J_{6-8} = 2.0$ Hz, H-6), 4.41 (1H, ddd, $J_{16-15a} = 7.6$ Hz, $J_{16-15e} = 6.4$ Hz, $J_{16-17} = 8.7$, H-16), 3.52 (1H, ma, H-3), 3.48 (1H, m, , H-26e), 3.37 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8$ Hz, H-26a), 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).

RMN ^{13}C

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).

➤ Acetato de hecogenina (**294**)

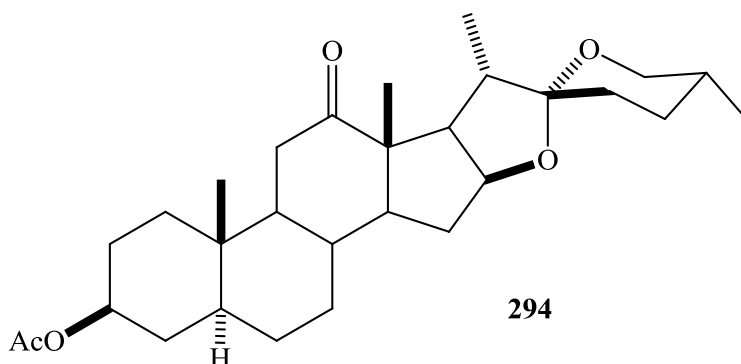


Figura 111. Estructura de **294**.

El acetato de hecogenina (**294**) figura 111 se caracterizó por método físicos y espectroscópicos, los datos fueron comprados con los reportados en la literatura. [55]

Caracterización.

Fórmula molecular: $C_{29}H_{44}O_5$, P.M.: 472.66, Polvo amorfo, p.f. 205-207 °C, $\alpha_D = -13.4^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1.0$), IR: 2957 (CH), 1727 (AcO), 1223 (C-O), $[M+H] = 473.3167$, calc: 472.3189

RMN 1H

δ : 4.67 (1H, ma, H-3), 4.35 (1H, m, H-16), 3.46 (1H, ddd, $J_{gem} = 10.8$, $J_{26e-25a} = 4.4$, $J_{26e-24e} = 2.4$ Hz, H-26e), 3.35 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8$ Hz, H-26a), 2.51 (1H, m, H-11), 2.01 (3H, s, CH_3COO-3), 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).

RMN ^{13}C

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 210.9 (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), 170.9 (CH_3COO-3)

➤ 5 α -colestanol (**296**)

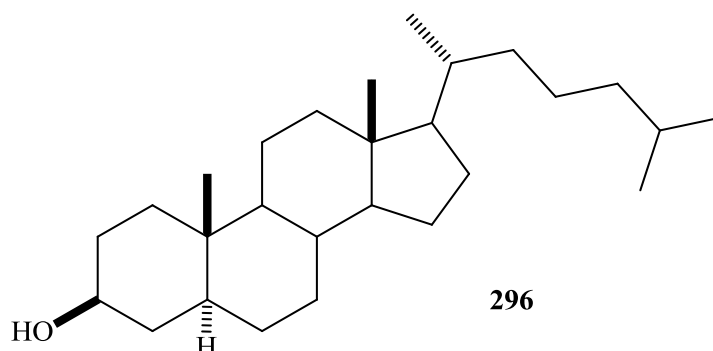


Figura 112. Estructura de **296**.

El colestanol (**296**) figura 112 se caracterizó por métodos físicos y espectroscópicos, los datos fueron comparados con los reportados en la literatura. [55]

Caracterización.

Fórmula molecular: C₂₇H₄₈O₈, P.M.: 388.67, Polvo amorfo, p.f. 172-173 °C, $\alpha_D = -38^\circ$ (CHCl₃, $c = 1.0$), IR: 3478 (O-H), 2975 (CH) cm⁻¹

RMN ¹H

δ (300 MHz): 3.51 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, s, CH₃-18), 0.70 (6H, d, $J_{25-27} = 7.2$ Hz CH₃-27).

RMN ¹³C

δ (75 MHz): 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), 31.5 (C-16), 35.8 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 15.8 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 19.4 (C-26).

5.2 Optimización de la obtención de laxogenina.

5.2.1 Acetato de diosgenina (**21**)

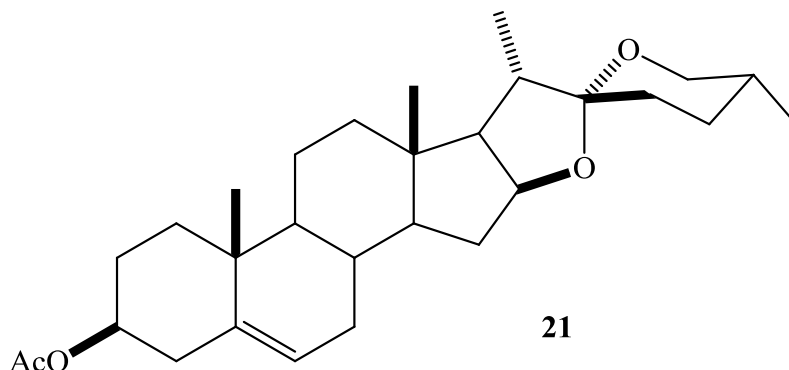


Figura 113. Estructura de **21**.

A una solución de 2.0 g (4.82 mmol) de diosgenina (**4**) en 10 mL de anhídrido acético (106 mmol) 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 NaHCO₃ (2x25 mL) y posteriormente con agua destilada (2x25 mL). Se obtuvo 1.87 g (85%) de un sólido blanco correspondiente a **21**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₉H₄₄O₄, P.M= 456.66, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 85%.
[α]_D= -122° (CHCl₃, c =1.0) IR: 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm⁻¹, [M+H]= 457.3238, calc: 456.3240

RMN ¹H

δ(500Hz): 5.37 (1H, d, *J*₆₋₇= 5.2 Hz, H-6), 4.60 (1H, m, H-3), 4.41 (1H, m, H-16), 3.47 (1H, ddd, *J*_{gem}=10.95 Hz, *J*_{26e-25a}= 4.48 Hz *J*_{26e-24e}= 2.06 Hz, H-26e), 3.37 (1H, dd, *J*_{gem}= *J*_{26a-25a}=10.8Hz, H-26a), 2.03 (3H, s, CH₃COO-3), 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).

RMN ¹³C

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 (CH₃C=O-3), 21.4 (CH₃COO-3).

5.2.2 Acetato de (25R)-5 β ,6 β -epoxi-5 β -espirostan-3 β -ilo (**279**)

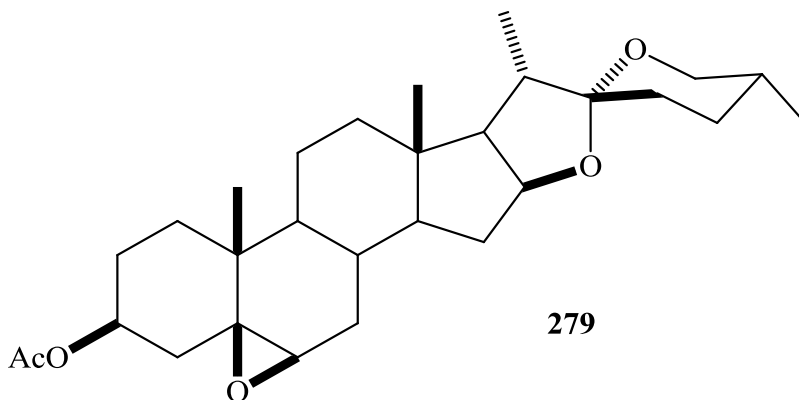


Figura 114. Estructura de **279**.

A una solución de 500 mg (1.1 mmol) de **21** en 20 mL de CH₂Cl₂ fue añadida una mezcla de 2.0 g (12.65 mmol) de KMnO₄, 1.0 g (2.5 mmol) de Fe₂(SO₄)₃, 0.2 mL de H₂O y 5 mL de CH₂Cl₂, 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 CH₂Cl₂ para terminar de eluir, el crudo filtrado es lavado con agua (2x25 mL), secado con Na₂SO₄ y evaporado para obtener 425 mg (85%) de un polvo blanco correspondiente al compuesto **279**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₉H₄₄O₅, P.M= 472.66, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 85%. [α]_D= -111.3° (CHCl₃, *c* =1.0) IR: 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 473.3178 calc: 472.3189.

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.76 (1H, m, H-3), 4.32 (1H, m, H-16), 3.49 (1H, dd, *J*_{26e-26a}=10.9 Hz, *J*_{26e-25} = 5.6 Hz, H-26_e), 3.35 (1H, dd, *J*_{26a-26e} = 10.9 Hz, *J*_{26a-25} = 6.5 Hz, H-26_a), 3.09 (1H, m, H-6), 2.04 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.08 (3H, d, *J*₂₁₋₂₀ = 7.1 Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, d, *J*₂₇₋₂₅ = 6.8 Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

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 (CH₃C=O-3), 21.4 (CH₃COO-3)

5.2.3 Acetato de (25R)-5-bromo-6β-hidroxi-5α-espirostan-3β-ilo (**283**)

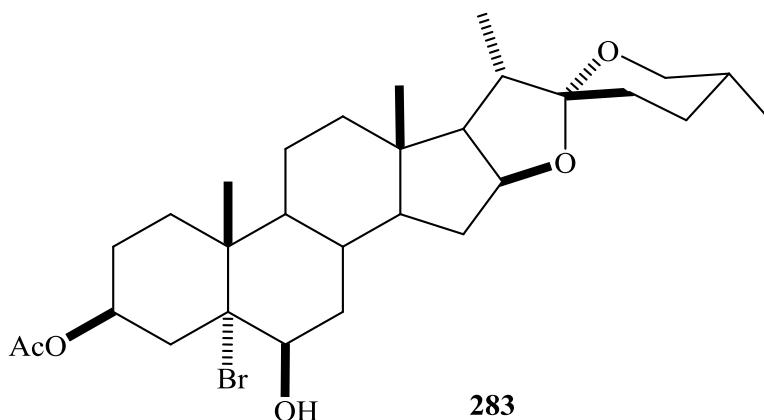


Figura 115. Estructura de **283**.

A una solución de 482 mg (1.02 mmol) de **270**, en 20 mL de CH₂Cl₂, se le añadieron 5 mL de HBr al 47 % y se agito vigorosamente por 15 min. El crudo de reacción fue neutralizado con una solución saturada de NaHCO₃ (3x30 mL); posteriormente fue lavado con agua (2x25 mL), secado con Na₂SO₄ y evaporado para obtener 508 mg (90%) de un polvo ligeramente verdoso correspondiente al compuesto **283**, el cual fue purificado por cromatografía en columna tipo “flash”, obteniendo un polvo ligeramente amarillo.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₉H₄₄O₅Br, P.M= 553.57, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 90%. [α]_D= -122° (CHCl₃, c =1.0) IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 553.2468 Calc.: 552.2450

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.76 (1H, m, H-3), 4.42 (1H, m, H-16), 4.2 (1H, m, H-4), 3.58 (1H, dd, $J_{26e-26a}=10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 5.6$ Hz, H-26_e), 3.48 (1H, dd, $J_{26a-26e} = 10.9$ Hz, $J_{26a-25} = 6.5$ Hz, H-26_a), 3.18 (1H, m, H-6), 2.42 (1H, m, H-7), 2.04 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.08 (3H, d, $J_{21-20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 42.5 (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 (CH₃COO-3), 21.4 (CH₃COO-3)

5.2.4 Acetato de (25R)-5-bromo-6-oxo-5 α -espirostan-3 β -ilo (**281**)

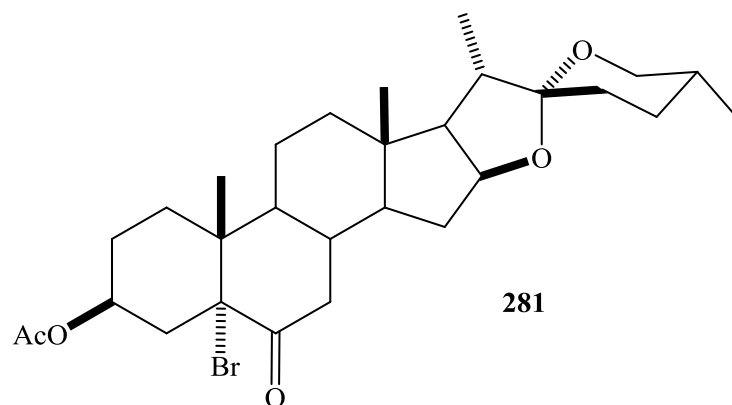


Figura 116. Estructura de **281**.

A una solución de 512 mg (0.92 mmol) de **283** en 20 mL de CH₂Cl₂ se enfrió a 0 °C y fue añadido 3 mL de reactivo de Jones, se mantuvo 30 min en agitación constante a temperatura ambiente, el crudo fue filtrado por una capa de gel de sílice para retirar el exceso de oxidante, se agregó 30 mL de CH₂Cl₂ para terminar de eluir, posteriormente es lavado con agua (2x25 mL), secado con Na₂SO₄ y evaporado para obtener 434 mg (85%) de un polvo verde correspondiente al compuesto **281**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₉H₄₃O₅Br, P.M= 551.55, punto de fusión: 230-233 °C, rendimiento 85%. [α]_D= -98.5° (CHCl₃, c =1.0) IR: 2947 (CH), 1690 (CO), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 551.2295, [M+2+H] 553.2278: Calc.: 550.2294

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.76 (1H, m, H-3), 4.42 (1H, m, H-16), 4.2 (1H, m, H-4), 3.59 (1H, dd, $J_{26e-26a}=10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 5.6$ Hz, H-26_e), 3.48 (1H, dd, $J_{26a-26e} = 10.9$ Hz, $J_{26a-25} = 6.5$ Hz, H-26_a), 2.4 (1H, m, H-7), 2.04 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.08 (3H, d, $J_{21-20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 42.5 (C-5), 212.5 (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 (CH₃C=O-3), 21.4 (CH₃COO-3)

5.2.5 Acetato de laxogenina (**280**)

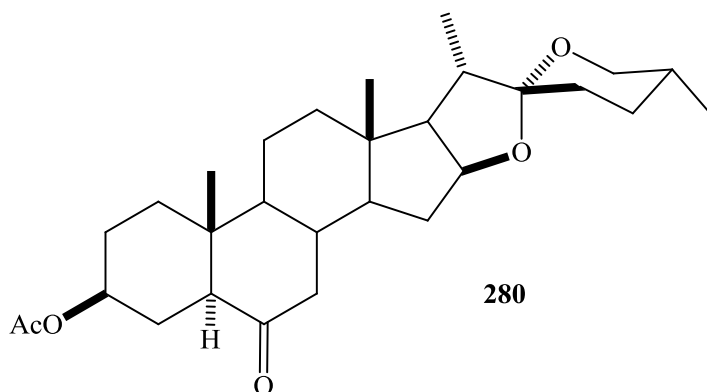


Figura 117. Estructura de **280**.

A una solución de 490 mg (0.89 mmol) de **281** en 20 mL de AcOH se fue añadido 0.3 g de Zn en malla, se mantuvo 45 min en agitación constante a reflujo, el crudo fue filtrado para retirar el metal, se neutralizó con una solución saturada de NaHCO₃ (3x15 mL), se extrajo con 30 mL de CH₂Cl₂, posteriormente es lavado con agua (2x25 mL), secado con Na₂SO₄ y evaporado el disolvente para obtener 386 mg (92%) de un polvo blanco correspondiente al compuesto **280**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₉H₄₄O₅, P.M= 472.66, punto de fusión: 223-224 °C, rendimiento 92%. [α]_D= -129° (CHCl₃, c =1.0) IR: 3456 (CH) 2947 (CH), 1690 (CO), 1243 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 472.3178, Calc.: 472.3189

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.66 (1H, m, H-3), 4.41 (1H, m, H-16), 3.47 (1H, dd, $J_{26e-26a}=10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 5.6$ Hz, H-26_e), 3.3 (1H, dd, $J_{26a-26e} = 10.9$ Hz, $J_{26a-25} = 6.5$ Hz, H-26_a), 2.35 (1H, m, H-7e), 2.26 (1H, dd, $J_{5-4a} = 12.6$ Hz, $J_{5-4e} = 3.1$ Hz) H-5), 2.04 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.08 (3H, d, $J_{21-20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 42.5 (C-5), 210.3 (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), 170.6 (CH₃COO-3), 21.4 (CH₃COO-3)

5.2.6 Tosilato de diosgenina (**284**).

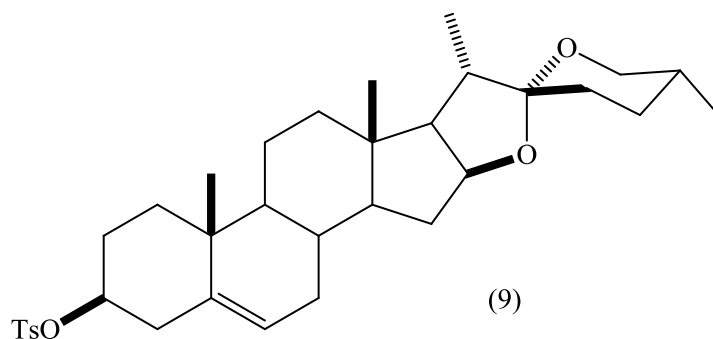


Figura 118. Estructura de **284**.

A una solución de 2.0 g (4.82 mmol) de **4** en 20 mL de piridina seca se fue añadido 1.0 g (18.5 mmol) de TsCl, se mantuvo 4 h en agitación constante a temperatura ambiente, la piridina fue evaporada a presión reducida, el crudo se extrajo con éter etílico (2x15 mL) y lavó con agua (2x25 mL), posteriormente se secó con Na₂SO₄ y evaporó el disolvente para obtener 2.52 g (92%) de un polvo blanco correspondiente al compuesto **284**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₃₄H₄₈O₅S, P.M= 472.66, punto de fusión: 174-175 °C, rendimiento 92%. [α]_D= -93.5° (CHCl₃, c =1.0) IR: 2947 (CH), 1558 (Ar), 1243 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: Observado: 473.3207. Calc.: 472.3189

RMN ¹H

δ (500 MHz): 7.81 (2H, *d*, *J*_{*m-o*}=8.32 Hz, *mH*-Ar-3), 7.35 (2H, *d*, *J*_{*o,m*}=8.32 Hz, *mH*-Ar-3), 5.31 (1H, *m*, H-6), 4.41 (1H, *m*, H-16), 4.32 (1H, *tt*, *J*_{3-2e}= *J*_{3-4e}=4.74 Hz, *J*_{3-2a} = *J*_{3-4a} = 11.5 Hz, H-3), 3.49 (1H, *dd*, *J*_{26e-26a}=10.9 Hz, *J*_{26e-25} = 5.6 Hz, H-26_e), 3.38 (1H, *dd*, *J*_{26a-26e} = 10.9 Hz, *J*_{26a-25} = 6.5 Hz, H-26_a), 2.49 (3H, *s*, *p*CH₃Ar-3), 2.43(1H, *m*, H-4a), 2.29 (1H, *ddd*, *J*_{gem} = 13.76 Hz, *J*_{4e-3} = 4.74 Hz, *J*_{4e-2e} = 2.1 Hz, H-4e), 1.08 (3H, *d*, *J*₂₁₋₂₀ = 7.1 Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, *d*, *J*₂₇₋₂₅ = 6.8 Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, *s*, CH₃-18), 0.82 (3H, *s*, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 144.1 (*p*Ar-3), 134.6 (*i*Ar-3), 129.8 (*o*Ar-3),127.6 (*m*Ar-3), 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 80.7 (C-3), 42.2 (C-4), 138.8 (C-5), 123.3 (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), 82.0 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.14 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 21.4 (CH₃COO-3)

5.2.7 (25R)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6 β -ol (**278**)

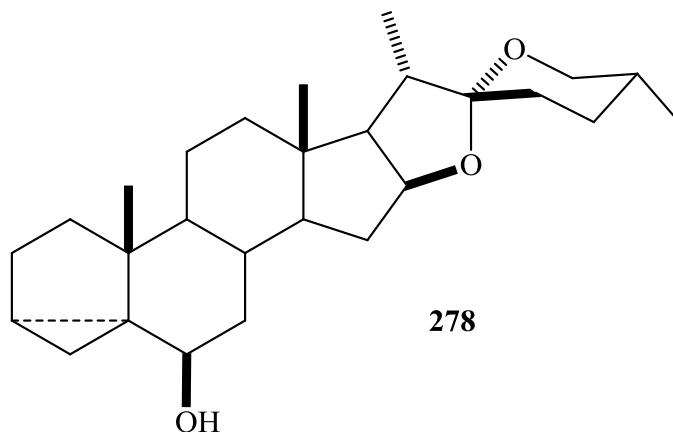


Figura 119. Estructura de **278**.

A una solución de 2.2 g (3.87 mmol) de **284** en 30 mL de solución de H₂O/Acetona (20/80) fue añadido 1.0 g (12.5 mmol) de AcOK, se mantuvo 5 h en agitación constante a reflujo, la acetona fue evaporada a presión reducida, el crudo se extrajo con acetato de etilo (2x15 mL) y lavó con agua (2x25 mL), posteriormente fue secado con Na₂SO₄ y retirado el disolvente para obtener 1.43 mg (89%) de un polvo blanco correspondiente al compuesto **278**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₇H₄₂O₂, P.M= 414.62, punto de fusión: 166-167°C, rendimiento 89%. $[\alpha]_D^{25} = -85^\circ$ (CHCl₃, $c = 1.0$) IR: 3473 (OH), 2947 (CH), 1444 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 415.3128, Calc.: 414.3134

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.33 (1H, m, H-16), 3.41 (1H, dd, $J_{26e-26a} = 10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 5.6$ Hz, H-26e), 3.32 (1H, dd, $J_{26a-26e} = 10.9$ Hz, $J_{26a-25} = 6.5$ Hz, H-26a), 3.20 (1H, t, $J_{6-7} = 2.91$ Hz, H-6), 1.95 (1H, m, H-4e) (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.08 (3H, d, $J_{21-20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19), 0.73 (1H, dd, $J_{4a,4e} = J_{4a,3} = 4.8$, H-4a)

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 45.8 (C-3), 42.2 (C-4), 42.5 (C-5), 74.0 (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), 81.5 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.5 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

5.2.8 (25R)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6-ona (285)

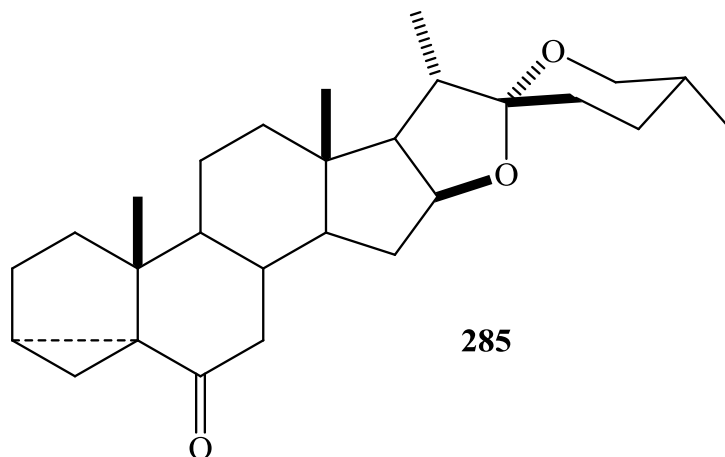


Figura 120. (25R)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6 β -ol (285).

A una solución de 1.8 g (4.34 mmol) de **278** en 30 mL de CH₂Cl₂ fue añadido 5 mL de reactivo de reactivo de Jones, la reacción se mantuvo 30 minutos en agitación constante a temperatura de 0 °C, el crudo fue filtrado por una capa de gel de sílice para retirar el oxidante y se añadió 30 ml de CH₂Cl₂ para terminar de eluir, posteriormente se lavó con agua (2x25 mL), secó con Na₂SO₄ y evaporó el disolvente para obtener 1.52 g (85%) de un polvo blanco correspondiente al compuesto **285**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₇H₄₀O₃, P.M= 412.30, punto de fusión: 183-184 °C, rendimiento 85%. [α]_D= -49.5° (CHCl₃, c =1.0) IR: 2947 (CH), 1674 (CO), 1064 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 413.2968, Calc.: 412.2977

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.41 (1H, m, H-16), 3.47 (1H, ddd, $J_{26ec,24} = 2.0$ Hz, $J_{26ec,25} = 4.4$ Hz, $J_{gem} = 10.8$ Hz, H-26e), 3.36 (1H, dd, $J_{26a,25} = J_{gem} = 10.8$ Hz, H-26ax), 2.46 (1H, dd, $J_{7ec,7ax} = 16.4$ Hz, $J_{7ec,8} = 4.4$ Hz, H-7e), 2.11 (1H, m, H-8), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.98 (3H, d, $J_{21,20} = 6.8$ Hz, CH₃-21), 0.83 (3H, s, CH₃-18), 0.79 (3H, d, $J_{27,25} = 6.4$ Hz, CH₃-27), 0.73 (1H, dd, $J_{4a,4e} = J_{4a,3} = 4.8$, H-4a).

RMN ¹³C

33.5 (C-1), 25.9 (C-2), 35.5 (C-3), 11.8 (C-4), 46.8 (C-5), 208.9 (C-6), 44.9 (C-7), 34.3 (C-8), 46.1 (C-9), 40.7 (C-10), 22.7 (C-11), 39.8 (C-12), 46.3 (C-13), 56.7 (C-14), 31.6 (C-15), 80.5 (C-16), 62.0 (C-17), 16.6 (C-18), 19.9 (C-19), 41.7 (C-20), 14.6 (C-21), 109.2 (C-22), 31.4 (C-23), 28.8 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.2 (C-27).

5.2.9 Laxogenina (**122**).

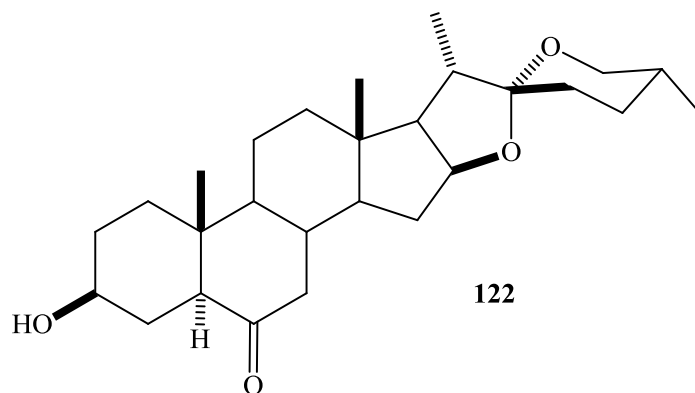


Figura 121. Estructura de **122**

➤ Método A

En un matraz balón de 250 mL con 30 ml de una solución de KOH al 10 % en etanol se añadió 500 mg (1.06 mmol) del acetato de Laxogenina y se dejó en agitación constante a temperatura de 45 °C durante una hora, posteriormente se neutralizó en exceso de KOH con una solución de HCl 1.0 N y se procedió a retirar el etanol por destilación a presión reducida; el sólido obtenido se disolvió en 30 mL de CH₂Cl₂ y lavó con agua destilada (2x20 mL), se secó con Na₂SO₄ y concentró para obtener 387 mg (92%) de un polvo blanco correspondiente a la laxogenina.

➤ Método B

Una solución de 1.5 g (3.64 mmol) del *i*-esteroide cetónico (**285**) en 30 mL de dioxano se añadió 1 mL de Agua destilada y 0.2 mL de H₂SO₄ concentrado se dejó en agitación constante a reflujo por 30 minutos. Posteriormente se neutralizó el ácido con 10 mL de una solución saturada de NaHCO₃, se procedió a retirar el dioxano por destilación simple, el sólido obtenido fue filtrado al vacío y lavado con agua destilada (2x50 mL). El sólido fue purificado en columna cromatografica con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil un sistema 5:5 (hexano: acetato de etilo), para obtener 1.46 g (65%) de un polvo blanco correspondiente a la laxogenina (**122**).

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₇H₄₂O₄, P.M= 430.62, punto de fusión: 210-211 °C, [α]_D= -86° (CHCl₃, *c*=1.0) IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1690 (CO) cm⁻¹. [M+H]: 431.3087, Calc.: 430.3083

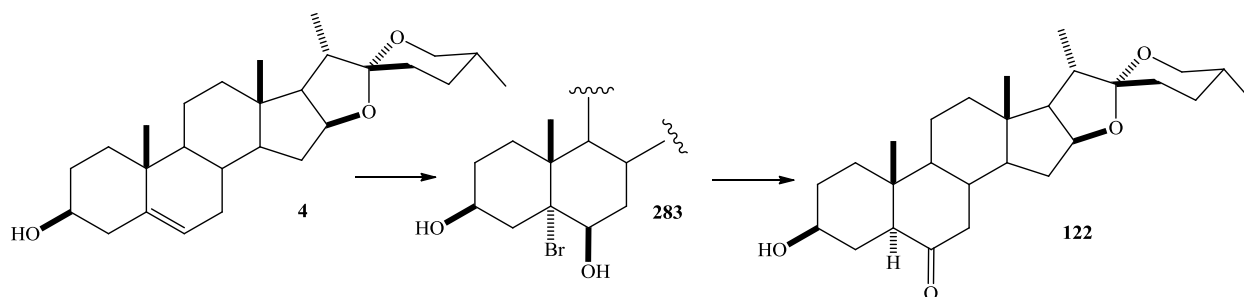
RMN ¹H

δ (500 MHz):4.41 (1H, m, H-16), 3.57 (1H, m, H-3), 3.47 (1H, dd, $J_{26e-26a}=10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 5.6$ Hz, H-26_e), 3.36 (1H, dd, $J_{26a-26e} = 10.9$ Hz, $J_{26a-25} = 6.5$ Hz, H-26_a), 2.35 (1H, dd, $J_{gem} = 8.54$ Hz, $J_{7a-8} = 2.27$ Hz, H-7e), 2.2 (1H, m, H-5), 1.98 (1H, d, $J_{gem} = 8.54$ Hz, H-7a), 1.08 (3H, d, $J_{21-20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 45.8 (C-3), 42.2 (C-4), 42.5 (C-5), 210.5 (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), 21.4 (CH₃COO-3)

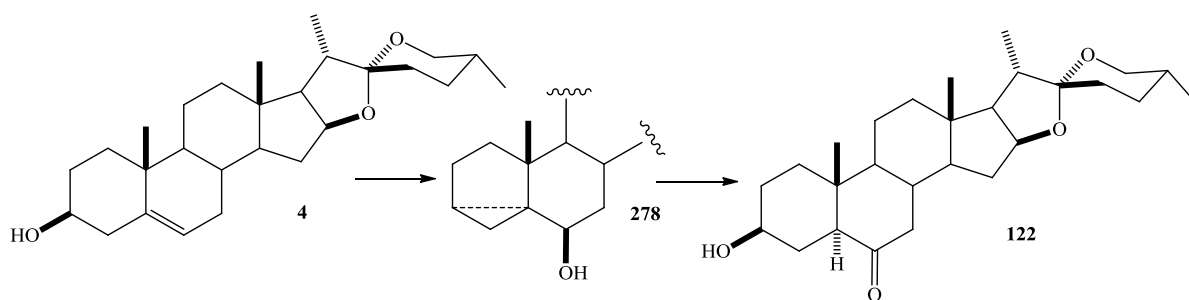
5.2.10 Proceso semi-continuo Ruta A.



Esquema 50. Obtención de **122** mediante epoxidación estereoselectiva.

En un matraz balón de 500 mL con 5.0 g (12.06 mmol) de diosgenina se agregaron en 25 mL de Ac₂O y colocaron a reflujo durante 1h; posteriormente a 45 °C la solución fue agregada en agua fría, obteniendo un sólido blando, el cual se filtró a vacío, y fue re-disuelto en 50 mL de CH₂Cl₂ y añadió 10 g de mezcla oxidante de KMnO₄ y Fe₂(SO₄)₃ (2g/3g) como suspensión en 30 mL de CH₂Cl₂, 1 mL de agua y 0.5 mL de *t*-BuOH, se dejó en agitación durante 1 h, posteriormente se filtró el crudo de reacción por una mezcla de gel de sílice con Na₂SO₄ para retirar el oxidante y el agua, se continuo extrayendo con 50 mL de CH₂Cl₂, en la parte inferior del embudo se colocó un matraz con 10 mL de HBr (47 %) con agitación constante durante 1 h, posteriormente a la mezcla de reacción se le añadió una solución de 3 g de CrO₃ en 10 mL de agua, dejando la reacción durante 45 minutos. Posteriormente el crudo de reacción se filtró con una capa de gel de sílice para retirar el oxidante, el crudo obtenido se lavó con una solución de saturada de NaHCO₃ (2x30 mL) y con agua destilada (2x15 mL), se secó con Na₂SO₄ y concentro a presión reducida, se añadieron 50 mL de AcOH al crudo obtenido y 1 g de Zn en virutas, se colocó la reacción a reflujo durante 2 h, pasado este tiempo se añadió 50 mL de una solución de KOH al 10 % y dejó en agitación durante 15 minutos, al crudo obtenido se extrajo con CH₂Cl₂ y secó con Na₂SO₄, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil sistema 5:5 (hexano: acetato de etilo) para obtener 3.22 g (62 %) de un polvo blanco correspondiente a la laxonigenina.

5.2.11 Proceso semi-continuo Ruta B.



Esquema 51. Obtención de **122** via un *i*-esteroide.

5.0 g (12.06 mmol) de diosgenina fueron disueltos en 15 ml de piridina y se añadió 3.0 g (15.8 mmol) de TsCl, se dejó en agitación constante durante 4 h, posteriormente se redujo a 2/3 partes del solvente y añadió 100 mL de una solución de acetona/ H₂O (80/20) y colocó a reflujo durante 2 h, posteriormente a la mezcla de reacción se le añadió 5 mL de reactivo de Jones disueltos en 50 mL de CH₂Cl₂ y dejó en agitación constante durante 15 min, posteriormente se neutralizó el exceso de oxidante con isopropanol hasta tener una tonalidad verde, se filtró el precipitado y se evaporó el solvente orgánico de la mezcla de reacción, se filtró obteniendo un precipitado amarillo el cual se disolvió en 50 mL de AcOH, se colocó la reacción a reflujo durante 4 h, posteriormente se añadió 50 ml de una solución de KOH al 10 % y dejó en agitación durante 15 min, al crudo obtenido se extrajo con CH₂Cl₂ y seco con Na₂SO₄, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil sistema 5:5 (hexano: acetato de etilo) para obtener 3.74 g (72 %) de un polvo blanco correspondiente a la laxogenina.

5.3 Empleo de las oximas como grupo protector.

5.3.1 5 α -colestanona (**292**)

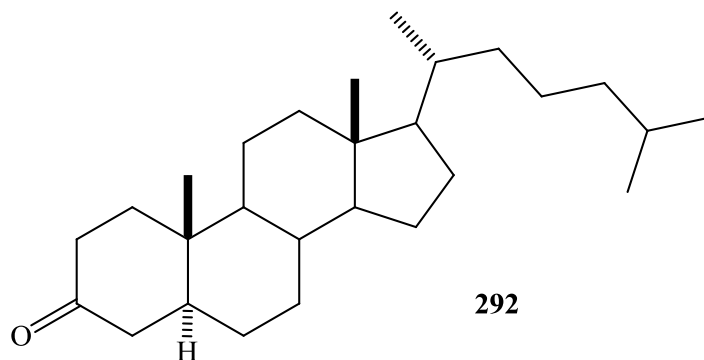


Figura 122. Estructura de **292**.

Una solución de 2.0 g (5.15 mmol) de colestanol en 30 mL de CH₂Cl₂ se enfrió a 0 °C y añadió gota a gota 2 mL de Reactivo de Jones sin dejar que la temperatura sobrepasara los 10 °C, se dejó en agitación durante 30 min, posteriormente se filtró por una capa de gel de sílice para retirar el oxidante, el crudo se lavó con agua destilada (2x 30 mL) y secó con Na₂SO₄ para obtener un 1.79 g (90 %) de un sólido blanco que corresponde a la colestanona (**292**).

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₇H₄₆O, P.M= 386.65, punto de fusión: 172-173 °C, [α]_D= -23° (CHCl₃, c =1.0) IR: 2957 (CH), 1602 (CO), cm⁻¹.

RMN ¹H

δ (300 MHz): 2.26 (2H, m, H-2a y H-4a), 2.01 (2H, m, H-2e y H-4e), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, J_{21-20} = 7.2 Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, s, CH₃- 18), 0.70 (6H, d, J_{25-27} = 7.2 Hz CH₃- 27).

RMN ¹³C

δ (75 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 212.2 (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), 31.5 (C-16), 35.8 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 15.8 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 19.4 (C-26).

5.3.2 Oxima de 5 α -colestonona (**293**)

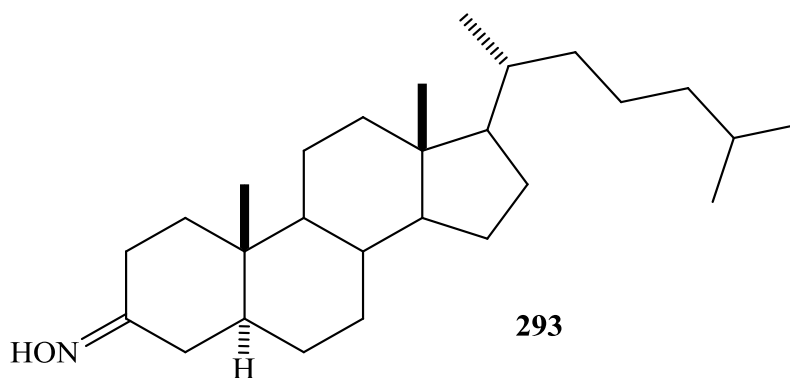


Figura 123. Estructura de **293**.

Se disolvieron 500 mg (1.29 mmol) de **292** en 20 ml de etanol, posteriormente se añadió 200 mg (2.4 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 180 mg de AcOK , la mezcla de reacción se colocó a reflujo durante 2 h, posteriormente se retiró el etanol por destilación a presión reducida el sólido obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 y lavó con agua destilada (2x25 mL), se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida, obteniendo 493 mg (95 %) de un sólido blanco que corresponde a la oxima de 5 α -colestonona (**293**).

Caracterización.

Fórmula condensada: $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{ON}$, P.M= 401.67, punto de fusión: 175-176 °C, $[\alpha]_D = -26^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.0$) IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1560 (CN), 1243 (C-O) cm^{-1} .

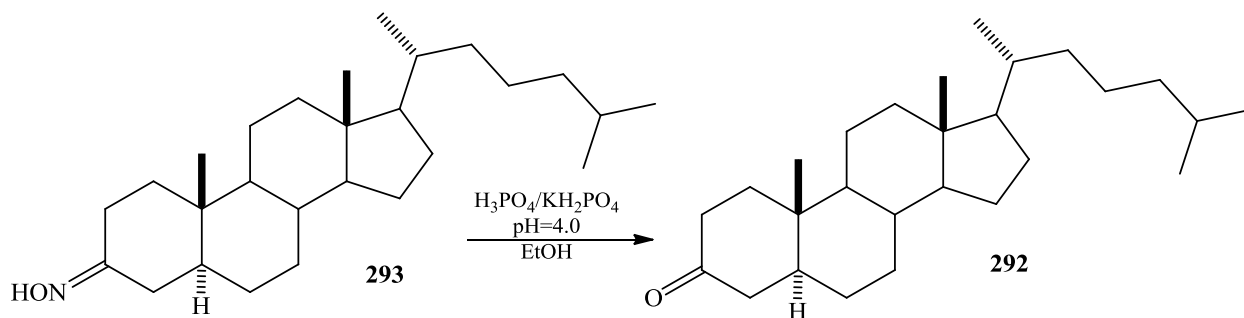
RMN ^1H

δ (300 MHz): 2.26 (2H, m, H-2a y H-4a), 2.01 (2H, m, H-2e y H-4e), 1.02 (3H, s, CH_3 -19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH_3 -21), 0.79 (3H, s, CH_3 - 18), 0.70 (6H, d, $J_{25-27} = 7.2$ Hz CH_3 - 27).

RMN ^{13}C

δ (75 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 152.5 (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), 31.5 (C-16), 35.8 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 15.8 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 19.4 (C-26).

5.3.3 Hidrólisis de la oxima de 5 α -colestonona.



Esquema 52. hidrólisis de oxima **293**.

Se disolvieron 480 mg (1.2 mmol) de la oxima de colestonona (**292**) en 20 ml de etanol, posteriormente se añadió una solución buffer a pH=4 y colocó la mezcla a reflujo durante 1 h, posteriormente se retiró el etanol por destilación a presión reducida el sólido obtenido se filtró a presión reducida y lavó con 50 mL de agua destilada obteniendo 416 mg (90 %) de un sólido blanco que corresponde a la colestonona (**292**).

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₇H₄₆O, P.M= 386.65, punto de fusión: 172-173 °C, [α]_D= -23° (CHCl₃, c=1.0) IR: 2957 (CH), 1602 (CO), cm⁻¹.

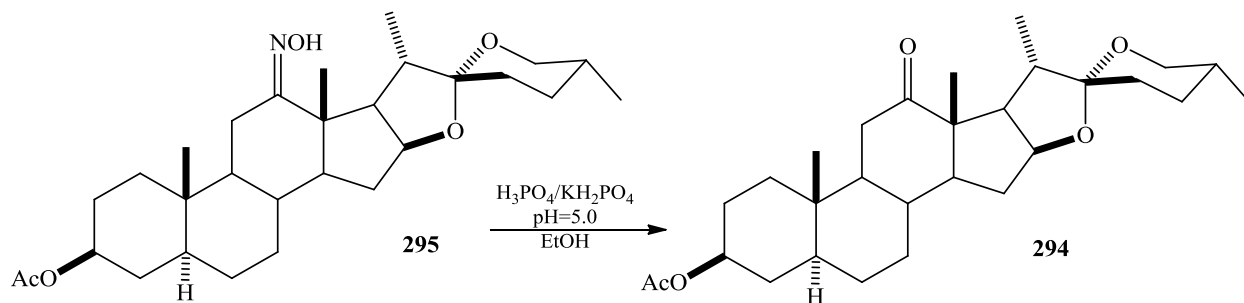
RMN ¹H

δ (300 MHz): 2.26 (2H, m, H-2a y H-4a), 2.01 (2H, m, H-2e y H-4e), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, J_{21-20} = 7.2 Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, s, CH₃- 18), 0.70 (6H, d, J_{25-27} = 7.2 Hz CH₃- 27).

RMN ¹³C

δ (75 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 212.2 (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), 31.5 (C-16), 35.8 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 15.8 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 19.4 (C-26).

5.3.5 Hidrólisis de la oxima de acetato de hecogenina.



Esquema 53. hidrólisis de la oxima **295**.

Se disolvieron 460 mg (0.94 mmol) de la oxima **295** en 20 ml de etanol, posteriormente se añadió una solución buffer a pH=4 y colocó la mezcla se dejó en agitación constante durante 3 h, posteriormente se retiró el etanol por destilación a presión reducida el sólido obtenido se filtró a presión reducida y lavó con 50 mL de agua destilada obteniendo 423 mg (92 %) de un sólido blanco que corresponde al acetato de hecogenina (**294**).

Caracterización.

Formula molecular: C₂₉H₄₄O₅, P.M.: 472.66, Polvo amorfo, p.f. 205-207 °C, $\alpha_D = -13.4^\circ$ (CHCl₃, c=1.0), IR: 2957 (CH), 1727 (AcO), 1223 (C-O), [M+H]=473.3167, calc: 472.3189

RMN ¹H

δ : 4.67 (1H, ma, H-3), 4.35 (1H, m, H-16), 3.46 (1H, ddd, $J_{gem}=10.8$, $J_{26e-25a}=4.4$ $J_{26e-24e}=2.4$ Hz, H-26e), 3.35 (1H, dd, $J_{gem}=J_{26a-25a}=10.8$ Hz, H-26a), 2.51 (1H, m, H-11), 2.01 (3H, s, CH₃COO-3), 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).

RMN ¹³C

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 210.9 (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), 170.9 (CH₃COO-3)

5.3.6 Metodología General del uso de oximas como grupo protector en esteroides.

➤ Método A. Compuestos sin grupos hidrolizables.

A una solución de 2 mmol de la oxima del esteroide en 20 ml de etanol, se añade 25 ml de una solución buffer a pH=4 y se coloca a reflujo durante 1 h, posteriormente se retira el etanol por destilación generando la precipitación del esteroide cetónico, el cual es filtrado al vacío y lavado con 100 ml de agua destilada, obteniendo el esteroide cetónico con una pureza alrededor del 95 %.

➤ Metodo B. Compuestos con grupos hidrolizables.

A una solución de 2 mmol de la oxima del esteroide en 20 ml de etanol, se añade 25 ml de una solución buffer a pH=5 y se coloca en agitación constante a temperatura ambiente durante 3 h, posteriormente se retira el etanol por destilación generando la precipitación del esteroide cetónico, el cual es filtrado al vacío y lavado con 100 ml de agua destilada obteniendo el esteroide cetónico con una pureza alrededor del 90 %.

5.4 Modificaciones de la laxogenina.

5.4.1 Oxima de la (25*R*)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6-ona (**297**).

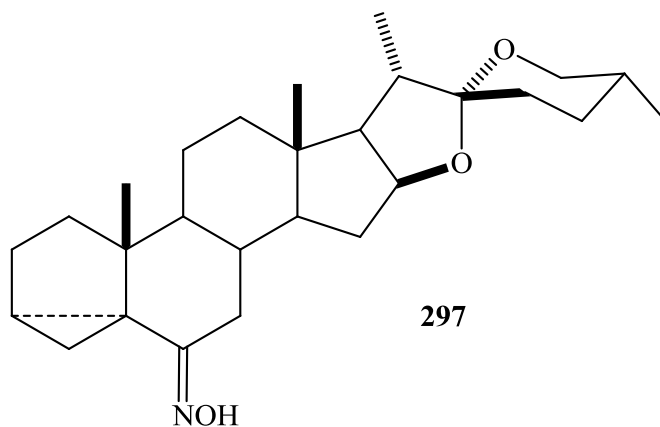


Figura 125. Estructura de **297**.

Se disolvieron 500 mg (1.2 mmol) del *i*-esteroide **285** en 20 ml de etanol, posteriormente se añadió 200 mg (2.4 mmol) de NH₂OH·HCl y 180 mg de AcOK, la mezcla de reacción se colocó a reflujo durante 2 h, posteriormente se retiró el etanol por destilación a presión reducida el sólido obtenido lavó con agua destilada (2x25 mL), obteniendo 477 g (92 %) de un sólido blanco que corresponde a la oxima **297**.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₇H₄₁O₃N, P.M= 427.62, punto de fusión: 179-180 °C, [α]_D= -58° (CHCl₃, *c* =1.0) IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1690 (CO), 1243 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: Observado: 427.3086. Calc.: 428.3058

RMN ¹H

δ (500 MHz): 7.4(1H, m, OH), 4.41 (1H, m, H-16), 3.47 (1H, ddd, $J_{26ec,24} = 2.0$ Hz, $J_{26ec,25} = 4.4$ Hz, $J_{gem} = 10.8$ Hz, H-26e), 3.36 (1H, dd, $J_{26a,25} = J_{gem} = 10.8$ Hz, H-26ax), 2.46 (1H, dd, $J_{7ec,7ax} = 16.4$ Hz, $J_{7ec,8} = 4.4$ Hz, H-7e), 2.11 (1H, m, H-8), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.98 (3H, d, $J_{21,20} = 6.8$ Hz, CH₃-21), 0.83 (3H, s, CH₃-18), 0.79 (3H, d, $J_{27,25} = 6.4$ Hz, CH₃-27), 0.73 (1H, dd, $J_{4a,4e} = J_{4a,3} = 4.8$, H-4a).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 33.5 (C-1), 25.9 (C-2), 35.5 (C-3), 11.8 (C-4), 46.8 (C-5), 160.1 (C-6), 44.9 (C-7), 34.3 (C-8), 46.1 (C-9), 40.7 (C-10), 22.7 (C-11), 39.8 (C-12), 46.3 (C-13), 56.7 (C-14), 31.6 (C-15), 80.5 (C-16), 62.0 (C-17), 16.6 (C-18), 19.9 (C-19), 41.7 (C-20), 14.6 (C-21), 109.2 (C-22), 31.4 (C-23), 28.8 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.2 (C-27).

5.4.2 Oxima de laxogenina (298)

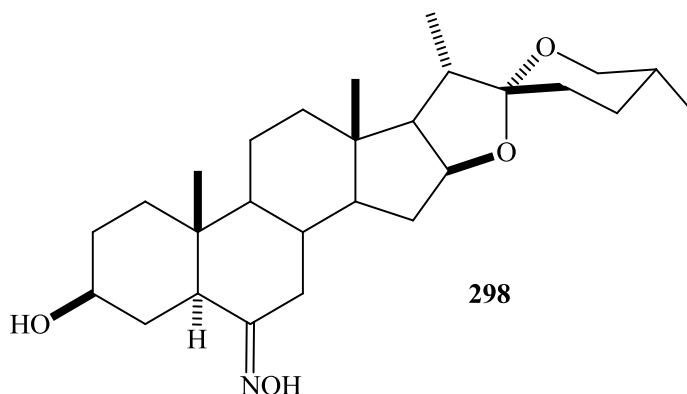


Figura 126. oxima de laxogenina (298).

➤ Método A.

Se disolvieron 500 mg (1.2 mmol) de laxogenina (122) en 20 ml de etanol, posteriormente se añadió 200 mg (2.4 mmol) de NH₂OH·HCl y 180 mg de AcOK, la mezcla de reacción se colocó a reflujo durante 2 h, posteriormente se retiró el etanol por destilación a presión reducida, el sólido obtenido se lavó con agua destilada (2x25 mL), obteniendo 497 g (93 %) de un sólido blanco que corresponde a la oxima de laxogenina (298).

➤ Método B.

Una solución de 500 g (3.6 mmol) de la oxima 297 en 30 mL de dioxano se añadió 1 mL de Agua destilada y 0.2 ml de H₂SO₄ concentrado se dejó en agitación constante a reflujo por 30 min, posteriormente se neutralizó el ácido con 10 mL de una solución saturada de NaHCO₃, se procedió a retirar el dioxano por destilación simple, el sólido obtenido fue filtrado al vacío y lavado con agua destilada (2x50 mL), el sólido fue purificado en columna cromatografica con gel de sílice

con Na₂SO₄ y concentro a presión reducida, el crudo fue purificado por columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice y fase móvil sistema 4:6 (hexano: acetato de etilo) obteniendo 918 mg (75 %) de un polvo blanco que corresponde al derivado **299** y 198 mg (15%) correspondientes al derivado **301**.

Caracterización de **299**.

Fórmula condensada: C₃₁H₄₉O₇N, P.M= 547.72, rendimiento 75 %, punto de fusión: 159-160 °C, [α]_D= -122° (CHCl₃, c =1.0) IR: 3567 (OH), 2938 (CH), 1728,1735,1638 (CO), 1253 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 548.3515. Calc.: 547.3509

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.92 (1H, m, H-3), 4.58 (1H, m, H-16), 3.18 (2H, d, J₂₆₋₂₅ = 6.0, H-26), 2.94 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, m, H-23a), 2.21 (1H, m, H-5, H-7a), 1.96 (3H, s, CH₃CO₂-16), 1.9 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.13 (3H, d, J_{21,20} = 7.1 Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, s, CH₃-18), 0.90 (3H, d, J_{27,25} = 6.7, CH₃-27), 0.85 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 59.8 (C-5), 159.5 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 213.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25), 67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 169.9 (CH₃COO-3), 170.5 (CH₃COO-16), 21.4 (CH₃COO-3), 21.1 (CH₃COO-16).

Caracterización de **301**.

Fórmula condensada: C₃₃H₅₅O₈N, P.M= 589.75, rendimiento 15 %, punto de fusión: 152-153 °C, [α]_D= -123° (CHCl₃, c =1.0) IR: 2938 (CH), 1728,1735,1727, 1716, 1638 (CO), 1283 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 589.3618. Calc.: 589.3615

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.92 (1H, m, H-3), 4.58 (1H, m, H-16), 3.18 (2H, d, J₂₆₋₂₅ = 6.0, H-26), 2.94 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, m, H-23a), 2.21 (1H, m, H-5, H-7a), 1.96 (3H, s, CH₃CO₂-16), 1.92 (3H, s, CH₃CO₂N-6), 1.9 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.13 (3H, d, J_{21,20} = 7.1 Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, s, CH₃-18), 0.90 (3H, d, J_{27,25} = 6.7, CH₃-27), 0.85 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 59.8 (C-5), 159.5 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 213.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25), 67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 172 (CH₃COON-6), 169.9 (CH₃COO-3), 170.5 (CH₃COO-16), 21.4 (CH₃COO-3), 21.1 (CH₃COO-16).

5.4.4 Diacetato de (25R)-26-hidroxi-6,22-dioxo-5 α -colest-3 β ,16 β -diilo (**300**)

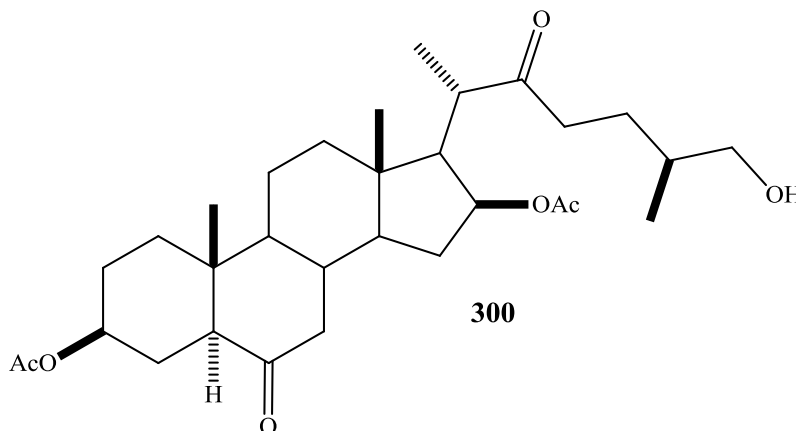


Figura 128. Diacetato de (25R)-26-hidroxi-6,22-dioxocolest-3 β ,16 β -diilo (**300**).

➤ Método A.

Se disolvieron 1.0 g (2.32 mmol) de laxogenina (**122**) en 10 ml de CH₂Cl₂ y se enfrió a 0 °C, paralelamente se preparó una solución de 2.5 ml de Ac₂O y 3 mL de Et₂OBF₃, posteriormente esta solución se le añadió a la solución esteroidea y se mantuvo en agitación durante 15 min, después se vertió sobre agua con hielo y extrajo con CH₂Cl₂ (2x25 mL) y el crudo se lavó con una solución de saturada de NaHCO₃ (2x20 mL) y agua destilada (2x25 mL), se secó con Na₂SO₄ y concentro a presión reducida, el crudo fue purificado por columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice y fase móvil sistema 4:6 (hexano: acetato de etilo) obteniendo 519 mg (42 %) de un polvo blanco que corresponde al derivado **300**, y 600 mg (45 %) derivado **291**.

➤ Método B.

Se disolvieron 830 mg (1.2 mmol) de la oxima **299** en 20 ml de etanol, posteriormente se añadió una solución buffer a pH=4 y coloco la mezcla se dejó en agitación constante durante 3 h, posteriormente se retiró el etanol por destilación a presión reducida el sólido obtenido se filtró a presión reducida y lavo con 50 mL de agua destilada obteniendo 790 mg (89 %) de un sólido blanco que corresponde al derivado **300**.

Caracterización de **300**.

Fórmula condensada: C₃₁H₄₈O₇, P.M= 532.71, punto de fusión: 160-161 °C, [α]_D= -119° (CHCl₃, c =1.0) IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1715, 1709, 1681 (CO), 1253 (C-O) cm⁻¹. [M+H]: 533.3398 Calc.: 532.3400

RMN ¹H

δ (500 MHz): 4.94 (1H, m, H-3), 4.59 (1H, m, H-16), 3.35 (2H, d, J_{26-25} = 6.0, H-26), 2.98 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, m, H-23a), 2.21 (1H, m, H-5, H-7a), 1.96 (3H, s, CH₃CO₂-16), 1.9 (3H, s,

CH₃CO₂-3), 1.13 (3H, d, $J_{21,20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, s, CH₃-18), 0.90 (3H, d, $J_{27,25} = 6.7$, CH₃-27), 0.85 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 59.8 (C-5), 214.1 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 210.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25), 67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 169.9 (CH₃COO-3), 170.5 (CH₃COO-16), 21.4 (CH₃COO-3), 21.1 (CH₃COO-16).

Caracterización de 291.

Fórmula condensada: C₃₃H₅₀O₈, P.M= 574.75, punto de fusión: 159-160 °C, $[\alpha]_D = -114^\circ$ (CHCl₃, $c = 1.0$) IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1795, 1752, 1735, 1682 (CO), 1343 (C-O) cm⁻¹. [M+H]:
Observado: 574.3509. Calc.: 574.3506

RMN ¹H

δ (500 MHz): 5.01 (1H, m, H-3), 4.68 (1H, m, H-16), 3.9 (2H, d, $J_{26-25} = 6.0$, H-26), 2.98 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, *m*, H-23a), 2.31 (1H, m, H-4, H-7a), 2.09 (3H, s, CH₃CO₂-16), 2.05 (3H, s, CH₃CO₂-6), 1.93 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.13 (3H, d, $J_{21,20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, s, CH₃-18), 0.90 (3H, d, $J_{27,25} = 6.7$, CH₃-27), 0.85 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C

δ (125 MHz): 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 124.8 (C-5), 154.5 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 213.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25), 67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 172.5 (CH₃COO-6), 169.9 (CH₃COO-3), 170.5 (CH₃COO-16), 21.4 (CH₃COO-3), 21.1 (CH₃COO-16).

5.5 Evaluación biológica de nuevas estructuras esteroideas obtenidas como anticancerígenos.

5.5.1 Cultivo celular

Se cultivo las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, característica del cáncer de mama positivo, generalizado como estándar de este tipo cáncer hormona dependiente, en medio MEM sin rojo fenol suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1 % de insulina (ITS), 1 % L-glutamina y 0.5 % de antibiótico (estreptomina, gentamicina y penicilina), proliferando a 37 °C en una atmosfera de 90 % de humedad y 5 % de CO₂ hasta un 90 % de confluencia, añadiendo medio fresco cada tercer día y cambiando el mismo cada semana.

5.5.2 Evaluación de dosis letal media IC₅₀

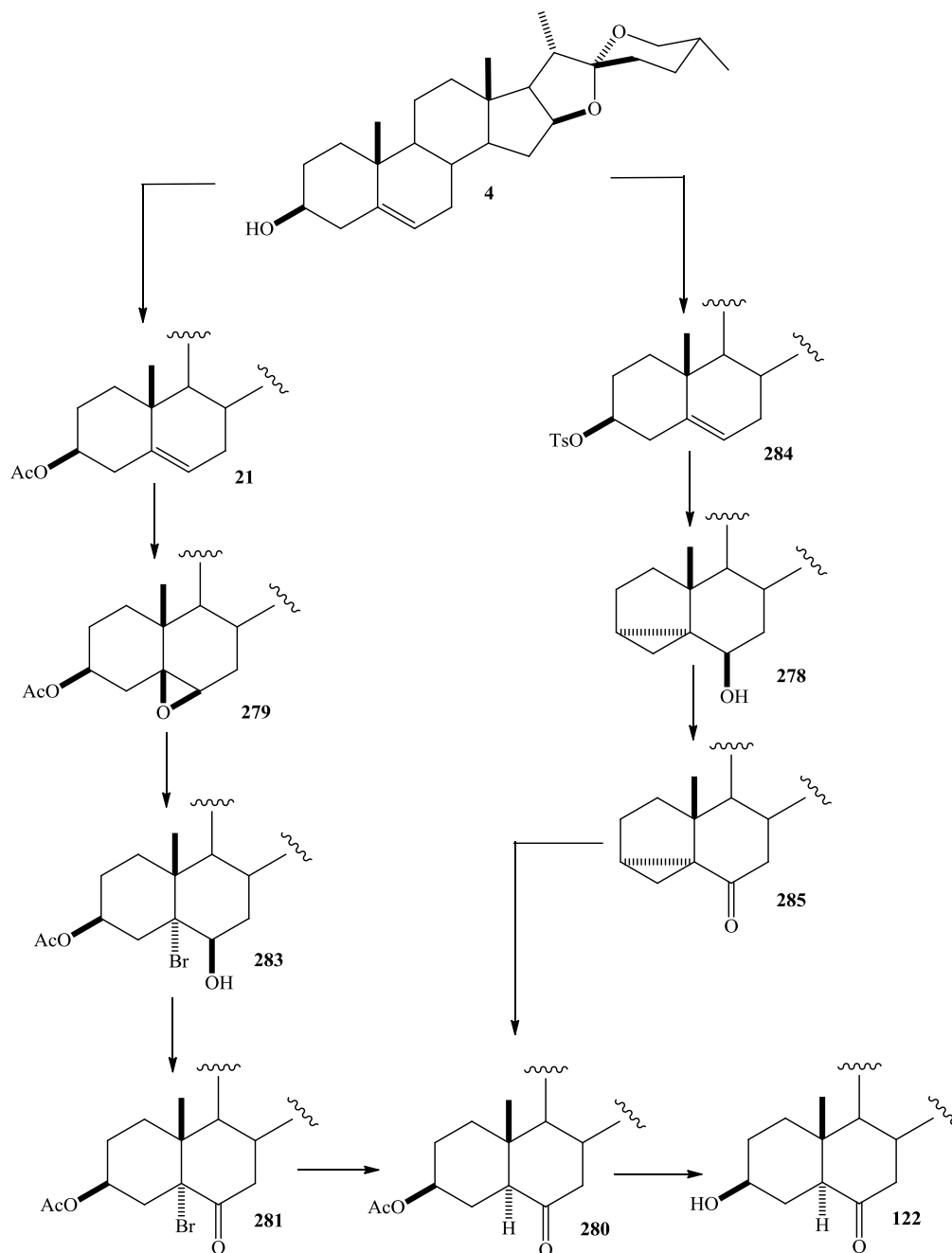
Se utilizo el Kit XTT para la evaluación de viabilidad celular y evaluación de citotoxicidad, procediendo a cultivo en placa de 96 posos a razón de 4000 células por poso durante 24 h, con posterior adición de una solución estéril del esteroide a evaluar en DMSO o en Etanol, según su solubilidad, dejando un tiempo de acción de 24 h, posteriormente se añadió la solución reveladora del kit XTT y dejo en acción por 6 h para preceder a leer la absorbancia mediante el lector de Elisa a 450 nm y 600 nm para medir la relación con respecto al número de células vivas, previamente realizada la curva de calibración, para medir la relación dosis respuesta y calcular la dosis letal media.

5.6 Evaluación Biológica de nuevas estructuras esteroideas obtenidas como promotores de crecimiento vegetal.

Los segmentos de hoja, cada uno formado por la segunda lámina (longitud 1 cm), una unión de lámina y vaina (longitud 1 cm), se cortaron plántulas de arroz de 7 días de edad, cultivadas en agua destilada a 30 ° C en condiciones de oscuridad. Después de flotar los segmentos de hoja en agua destilada durante 24 h, se incubaron en 1 ml de solución de maleato de potasio 2,5 mM que contenía una cantidad finita de una muestra de ensayo durante 48 ha 30 °C en condiciones de oscuridad. Las magnitudes de los ángulos inducidos entre las láminas y las vainas se midieron después del período de incubación. Las hojas no tratadas y una muestra comercial de homobrassinolida se usaron como controles

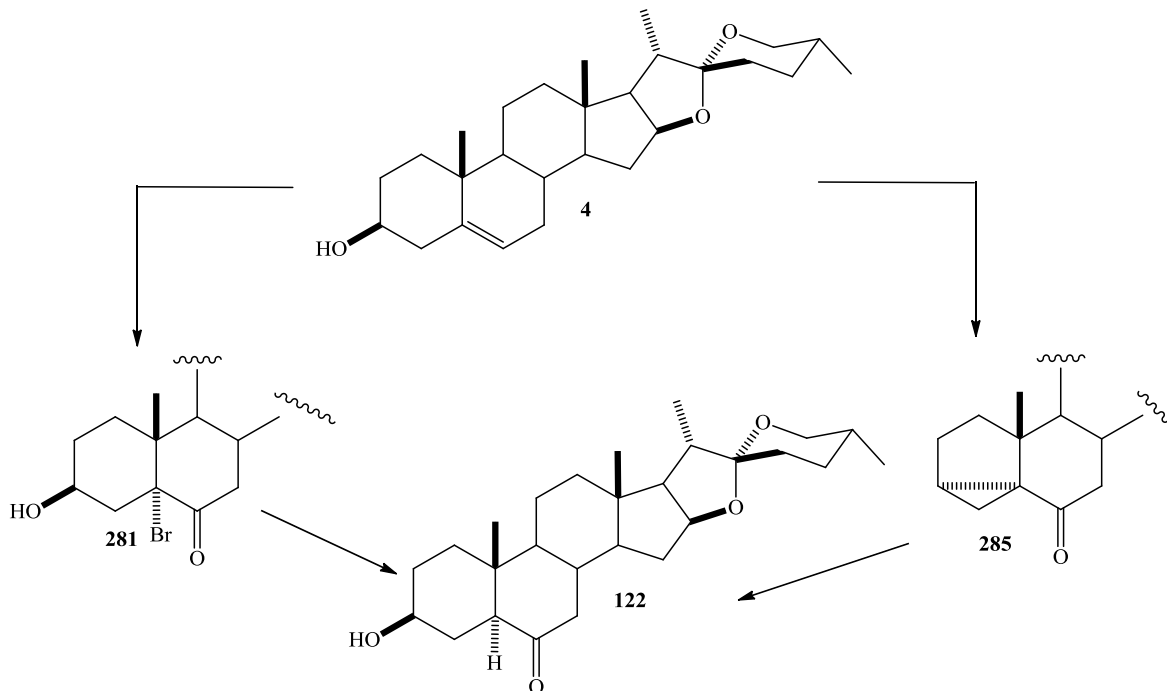
6. CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de laxogenina (**122**) a partir de dos rutas, una mediante una epoxidación estereoselectiva y otra mediante la formación de un derivado *i*-esteroideo como intermediario, ambas metodologías con la finalidad de la formación estereoespecífica del H-5 α característico de este derivado esteroideo.



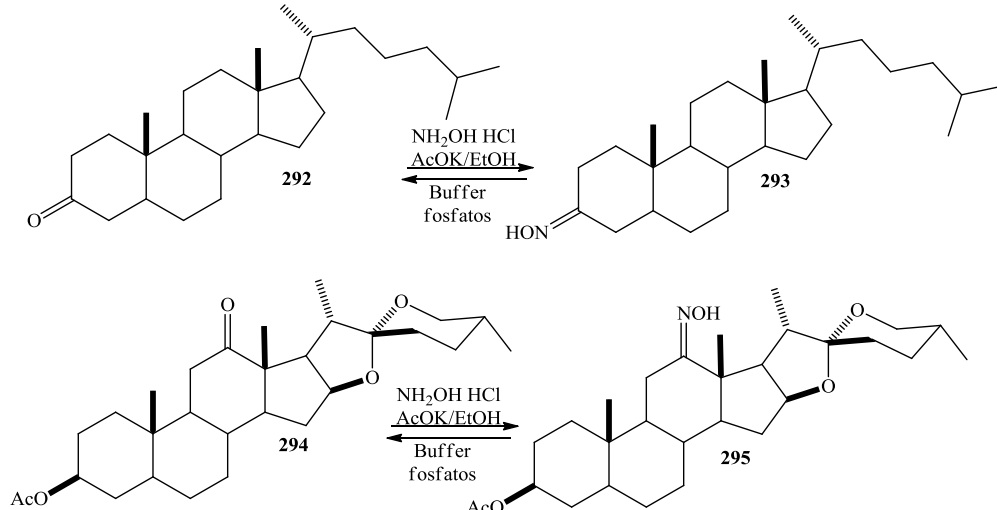
Esquema 54. Rutas de reacción de obtención de laxogenina (**122**).

La optimización de dos rutas de reacción para la obtención de laxogenina (**122**) a partir de diosgenina, en ambos casos mediante el empleo de procesos semi-continuos, los cuales fueron diseñados analizando la compatibilidad de reacciones consecutivas, incrementando así en un 12 % y 10 % respectivamente cada ruta, permitiendo así aumentar la disposición de esta materia prima.



Esquema 55. Rutas de reacción optimizadas para la obtención de laxogenina.

Se diseñó una nueva metodología de protección del grupo carbonilo de ceto-esteroides de enolizaciones con posterior acetilación, mediante la formación de una oxima sobre este grupo carbonilo, la cual durante las reacciones de apertura del espiroacetal estudiadas, no permitía la enolización debido a que antes de esta reacción se encontraba una competencia con la acetilación de este nuevo grupo, mismo que mostro una gran reversibilidad, del orden del 85 %, sin modificaciones estructurales secundarias.



Esquema 56. Uso de oximas como grupo protector.

Nuevos derivados cetónicos e hidroximínicos esteroidales fueron sintetizados y debidamente caracterizados por técnicas espectroscópicas, optimizando cada una de las reacciones de obtención de estos derivados con la finalidad de aumentar la disponibilidad de los mismos para su evaluación biológica.

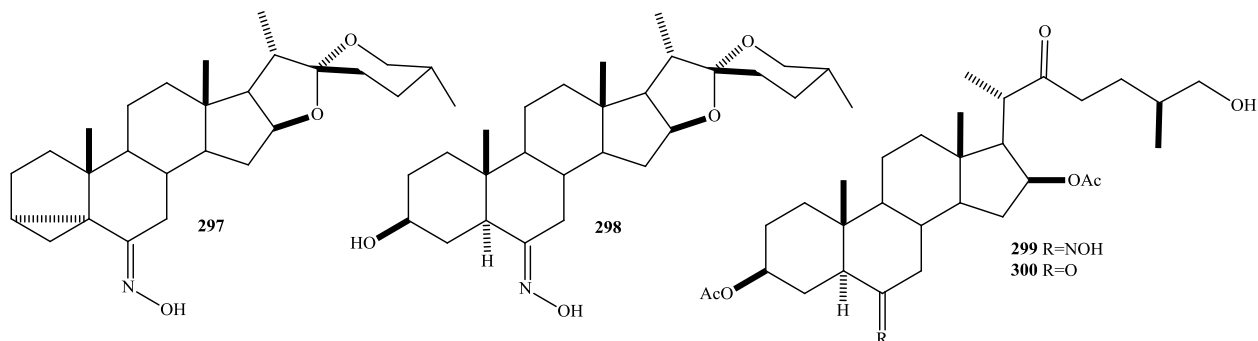


Figura 129. Nuevas estructuras cetónicas e hidroximínicas esteroidales sintetizadas.

Los derivados esteroidales evaluados contra líneas celulares de cáncer de mama, mostraron como la presencia del espiroacetal contra la línea MDA-MB-231 (triple negativo) genera un efecto citotóxico, mientras que la cadena lateral abierta genera un efecto citoestático, en cambio en la línea celular MCF-7 (cáncer maligno típico) todos los compuestos resultaron citotóxicos, pero en específico los derivados colestánicos mostraron concentraciones DL_{50} mucho menores que las espirostanicas, por otra parte en esta línea celular se observó como la presencia del grupo hidroximino aumenta el efecto citotóxico, mientras que en la línea celular triple negativo este efecto no fue de gran impacto.

Tabla 9. Valores de IC_{50} de los esteroides en las líneas celulares de cáncer estudiadas

Compuesto	IC_{50} (μM)	
	MCF-7	MDA-MB-231
285	392	2.3
297	78.5	9.3
122	>800	1.9
298	78.0	9.3
299	11.8	-
300	9.3	-

Por otra parte, el estudio de los nuevos derivados como promotores de crecimiento vegetal mostró como la presencia de la cadena lateral colestánica es de vital importancia para la expresión de esta actividad biológica, observando en el ensayo de lámina de arroz como el derivado colestánico de la laxogenina tiene un efecto mucho mayor como promotor de crecimiento vegetal en comparación con su derivado enolizado, mostrando como el grupo carbonilo juega un papel importante al momento de promover el crecimiento vegetal.

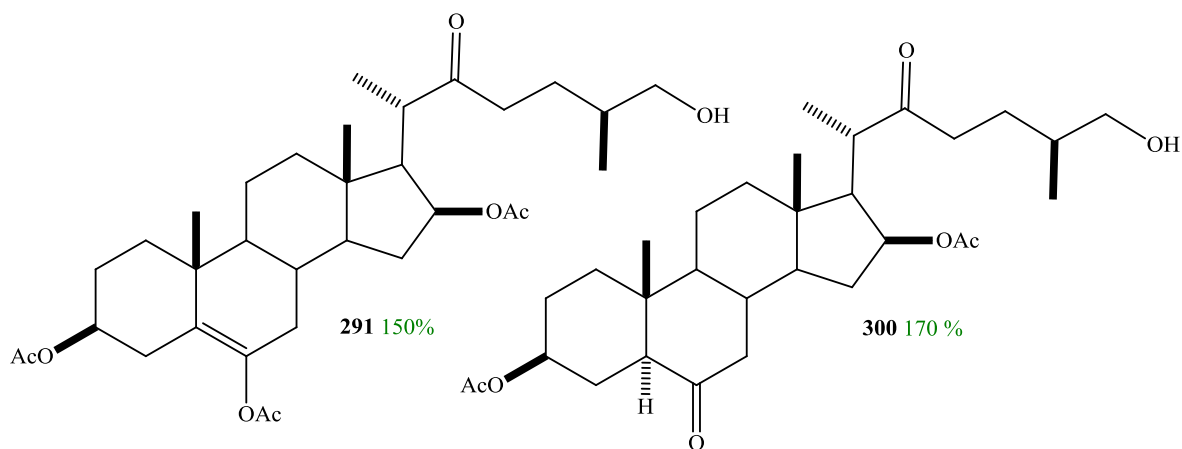


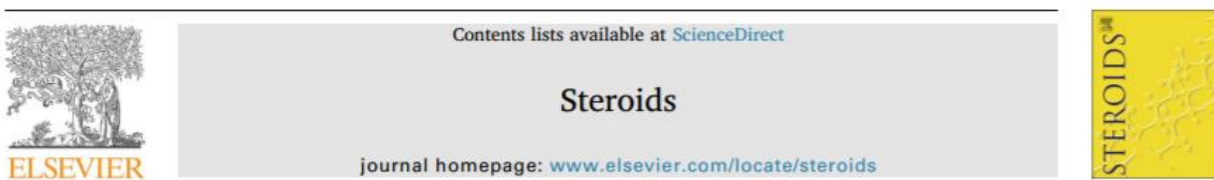
Figura 130. Efecto como promotor de crecimiento vegetal de los derivados colestánicos de laxogenina (100 %, HB).

Cabe destacar que en los resultados biológicos, se puede observar que compuestos que tienen actividad citotóxica también presentan actividad como promotor de crecimiento vegetal, propiedades consideradas antagónicas, pero es importante explicar que estos procesos biológicos son completamente independientes dado que son en seres vivos de índole muy diferente, por lo que estudios de mecanismo de acción de ambas actividades biológicas se vuelve de gran interés, para lo cual se necesita contar con suficiente materia esteroideal para dichos estudios, donde la optimización y diseño de procesos semi-continuos se vuelve de gran importancia.

7. ANEXOS

Dentro del desarrollo de la presente tesis se elaboró material para publicación en revistas internacionales y generación de patentes tanto en compuestos con actividad citotóxica relevante como en procesos de obtención de derivados de interés biológico, de los cuales se muestran a continuación la portada de los mismos.

- Zefenino-Diaz, R.; Hilario-Martinez, J.C.; Rodriguez-Acosta, M.; **Carrasco-Carballo, A.**; Hernández-Linares, M.G.; Sandoval-Ramirez, J.; Fernandez-Herrera M.A.; *Mimicking Natural Phytohormones: 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as Plant Growth Promoters. Steroids 2017, in press.*



Mimicking natural phytohormones. 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as plant growth promoters

Reyna Zeferino-Diaz^{a,b}, J. Ciciolil Hilario-Martinez^{a,b}, Maricela Rodriguez-Acosta^{c,*}, Alan Carrasco-Carballo^{b,d}, Maria Guadalupe Hernandez-Linares^d, Jesus Sandoval-Ramirez^b, Maria A. Fernandez-Herrera^{a,c,*}

^a Departamento de Física Aplicada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Merida, km 6 Antigua Carretera a Progreso, Apdo. Postal 73, Cordemex, 97310 Merida, Yuc., Mexico

^b Facultad de Ciencias Químicas, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Pue., Mexico

^c Herbario y Jardín Botánico, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Pue., Mexico

^d Instituto de Ciencias, Laboratorio de Investigación. Herbario y Jardín Botánico, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Pue., Mexico

^e Conacyt Research Fellow: Departamento de Física Aplicada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad Merida, km 6 Antigua carretera a Progreso. Apdo. Postal 73, Cordemex, 97310 Merida, Yuc., Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

26-Hydroxycholestan-22-one derivatives
Plant growth promoting activity
Rice lamina inclination test
Mimic phytohormones

ABSTRACT

26-Hydroxycholestan-22-one derivatives with oxygenated functions in the rings A and/or B were successfully synthesized from diosgenin. After the modifications of rings A and B, the spiroketal side chain was selectively opened through a Lewis acid mediated acetolysis to afford the cholestane derivatives. These compounds incorporate pharmacophores, which mimic the activity of natural phytohormones and show high growth promoting activity in Mexican rice cultivars using the rice lamina inclination test.

- **Alan Carrasco-Carballo**, Gabriel Guerrero-Luna, Maria Guadalupe Hernández-Linares, Sylvain Bernès. *Crystal structure of (3 β ,5 α ,25R*)-12-(Hydroxyimino) spirostan-3-yl acetate. *IUCrData*, 2017, 2, x170491.



IUCrData

ISSN 2414-3146

(3 β ,5 α ,25R)-12-(Hydroxyimino)spirostan-3-yl acetate

Alan Carrasco-Carballo,^a Gabriel Guerrero-Luna,^a María-Guadalupe Hernández Linares^a and Sylvain Bernès^{b*}

^aLaboratorio de Investigación del Jardín Botánico, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. 113 Complejo de Ciencias CU, San Manuel, 72570 Puebla, Pue., Mexico, and ^bInstituto de Física, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio y 18 Sur, 72570 Puebla, Pue., Mexico. *Correspondence e-mail: sylvain_bernes@hotmail.com

Received 22 March 2017

Accepted 29 March 2017

Edited by K. Fejfarova, Institute of Biotechnology CAS, Czech Republic

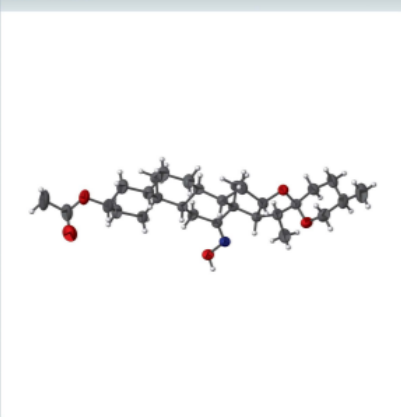
Keywords: crystal structure; oxime steroid; spirostan; hecogenin; hydrogen bonding.

CCDC reference: 1540985

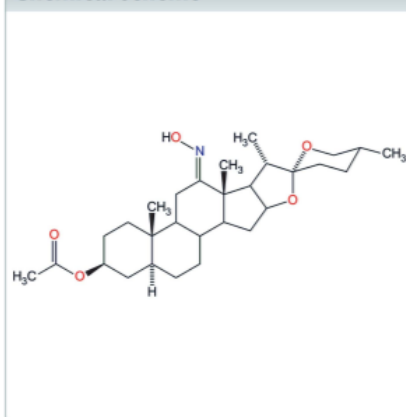
Structural data: full structural data are available from iucrdata.iucr.org

The title steroid, C₂₉H₄₅NO₅, obtained by condensation of hecogenin acetate [systematic name: (3 β ,5 α ,25R)-12-oxospirostan-3-yl acetate] with NH₂OH, has the oxime group substituting the C-12 site on the C ring of the steroid nucleus. The introduction of this functional group allows the formation of chain motifs, using the oxime OH group as a donor and the O atom of the E ring as an acceptor. The C(8) chains formed by this intermolecular hydrogen bond are oriented parallel to the short cell axis *a*. The structural features of this compound are very close to those of C₂₉H₄₃NO₅, the derivative with a C14=C15 double bond in the D ring, which crystallizes in the same space group and with similar unit-cell parameters.

3D view



Chemical scheme



- Sanchez-Sanchez, L.; Hernández-Linares, M.G.; Escobar, M-L-; Lopez-Muñoz, H.; Zenteno, E.; Fernández-Herrera, M.A.; Guerrero-Luna, G.; Carrasco-Carballo, A.; Sandoval-Ramirez, J. *Antiproliferative Cytotoxic and Apoptotic Activity of steroidal oximes in Cervicouterine Cell Lines. **Molecules** 2016, 21(11), 1533.*



Article

Antiproliferative, Cytotoxic, and Apoptotic Activity of Steroidal Oximes in Cervicouterine Cell Lines

Luis Sánchez-Sánchez ¹, María Guadalupe Hernández-Linares ^{2,*}, María L. Escobar ³, Hugo López-Muñoz ¹, Edgar Zenteno ^{4,5}, María A. Fernández-Herrera ⁶, Gabriel Guerrero-Luna ^{2,7}, Alan Carrasco-Carballo ^{2,7} and Jesús Sandoval-Ramírez ⁷

¹ Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 09230 Ciudad de México, Mexico; luisss@unam.mx (L.S.-S.); hugogris@hotmail.com (H.L.-M.)

² Laboratorio de Investigación, Jardín Botánico Universitario, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., Mexico; gabriel.guerrero@alumno.buap.mx (G.G.-L.); alan.carballo@alumno.buap.mx (A.C.-C.)

³ Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico; escobarluisa@ciencias.unam.mx

⁴ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico; ezenteno@unam.mx

⁵ Centro de Investigación UNAM-UABJO, 68120 Oaxaca, Oax., Mexico

⁶ Departamento de Física Aplicada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados—Unidad Mérida, km 6 Antigua Carretera a Progreso, Cordemex, 97310 Mérida, Yuc., Mexico; mfernandez@cinvestav.mx

⁷ Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., Mexico; jesus.sandoval@correo.buap.mx

* Correspondence: guadalupe.mghl@correo.buap.mx; Tel./Fax: +52-222-295-500 (ext. 7039)

Academic Editor: Margaret Brimble

Received: 17 September 2016; Accepted: 7 November 2016; Published: 14 November 2016

Abstract: Steroidal sapogenins have shown antiproliferative effects against several tumor cell lines; and their effects on human cancer cells are currently under study. Changes in the functionality on the steroidal structure make it possible to modify the biological activity of compounds. Herein, we report the synthesis and in vitro antitumor activity of two steroidal oxime compounds on cervical cancer cells. These derivatives were synthesized from the steroidal sapogenin diosgenin in good yields. The in vitro assays show that the steroidal oximes show significant antiproliferative activity compared to the one observed for diosgenin. Cell proliferation, cell death, and the cytotoxic effects were determined in both cervical cancer cells and human lymphocytes. The cancer cells showed apoptotic morphology and an increased presence of active caspase-3, providing the notion of a death pathway in the cell. Significantly, the steroidal oximes did not exert a cytotoxic effect on lymphocytes.

Keywords: steroidal oximes; 23-acetyldiosgenin; (25R)-spirost-4-en-3,6-dione; apoptosis; antiproliferative activity

- Maria Guadalupe Hernández-Linares, **Alan Carrasco-Carballo**, Gabriel Guerrero-Luna, Sylvain Bernès, Gerardo Aguirre Hernández. *Crystal structure of (25R)-23-Acetyl-3 β ,16 β -diacetoxy-22,26-epoxy-cholestan-5,22-diene n-hexane 0.8-solvate*. *IUCrData*, 2016, 1, x160622.



ISSN 2414-3146

IUCrData

(25R)-3 β ,16 β -Diacetoxy-23-acetyl-22,26-epoxy-cholesta-5,22-diene n-hexane 0.8-solvate

María-Guadalupe Hernández Linares,^a Alan Carrasco-Carballo,^a Gabriel Guerrero-Luna,^a Sylvain Bernès^{b*} and Gerardo Aguirre Hernández^c

^aLaboratorio de Investigación del Jardín Botánico, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. 113 Complejo de Ciencias CU, San Manuel, 72570 Puebla, Pue., Mexico, ^bInstituto de Física, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio y 18 Sur, 72570 Puebla, Pue., Mexico, and ^cCentro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana, Apdo. Postal 1166, 22500 Tijuana, B.C., Mexico. *Correspondence e-mail: sylvain_bernes@hotmail.com

Received 31 January 2016

Accepted 13 April 2016

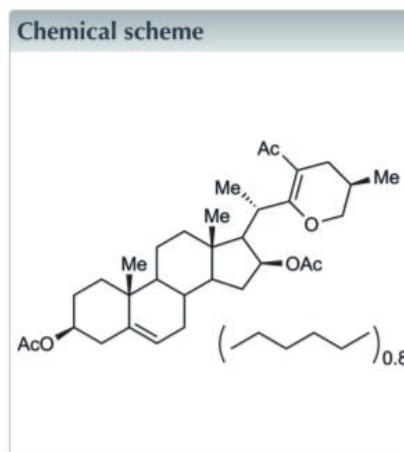
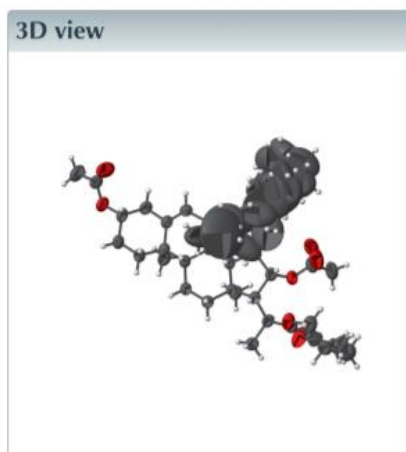
Edited by P. Bombicz, Hungarian Academy of Sciences, Hungary

Keywords: crystal structure; steroid; diosgenin; solvate.

CCDC reference: 1473880

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

In the title solvate, C₃₃H₄₈O₆·0.8C₆H₁₄, the steroid presents a conformation almost identical to that of its previously characterized benzene monosolvate [Sandoval-Ramírez *et al.* (1999). *Tetrahedron Lett.* **40**, 5143–5146]. The n-hexane solvent of crystallization is agglomerated in channels parallel to [100] in the crystal. The solvent molecule is disordered over two sites in the asymmetric unit, with occupancies of 0.46 and 0.34. A minor disorder for the carbonyl O atom of the acetyl substituent at position 16 in the steroid was also introduced, with two sites having occupancies of 0.7 and 0.3.



- Maria Guadalupe Hernandez Linaes, **Alan Carrasco Carballo**, Gabriel Guerrero Luna, Jesús Sandoval Ramírez, Maricela Rodríguez Acosta; María Antonieta Fernández Herrera, *“Escalamiento a Nivel Multigramos para la Obtencion de la Oxima de 23-Acetildiogenina”*. No. de solicitud de registro: **MX/a/2017/005582**.



REPORTE DE INVENCION

INFORMACIÓN GENERAL DEL INVENTO	
Título: Escalamiento a nivel multigramos para la obtención del Acetato de la Oxima de 23-acetildiogenina.	Palabras clave (máximo 5): Escalamiento, multigramos, oximas esteroidales, anticancerígenos.
Inventor(es): María Guadalupe Hernández-Linares, ^a Alan Carrasco-Carballo, ^a Gabriel Guerrero-Luna, ^a Jesús Sandoval-Ramírez, ^e Maricela Rodríguez-Acosta, ^c María A. Fernández-Herrera. ^d	

- Maria Guadalupe Hernandez Linaes, Luis Sánchez-Sánchez, Gabriel Guerrero-Luna **Alan Carrasco Carballo**, María L. Escobar-Sánchez, Hugo López-Muños, María A. Fernández-Herrera, Jesús Sandoval Ramírez, *“Emplero de la oxima del acetato de 23(S)-acetildiogenina como agente anticancerígeno en cáncer cérvicouterino”*. No. de solicitud de registro: **MX/a/2016/013944**.



REPORTE DE INVENCION

INFORMACIÓN GENERAL DEL INVENTO	
Título: Empleo de la oxima del acetato de la 23(S)-acetildiogenina como agente anticancerígeno en cáncer cérvicouterino.	Palabras clave (máximo 5): Anticancerígeno selectivo, apoptosis, cáncer cervicouterino
Inventor(es): María Guadalupe Hernández-Linares, ^a Luis Sánchez-Sánchez, ^b Gabriel Guerrero-Luna, ^a Alan Carrasco-Carballo, ^a María L. Escobar-Sánchez, ^c Hugo López-Muñoz, ^b María A. Fernández-Herrera, ^d Jesús Sandoval-Ramírez. ^e	

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Koller, D. L. Does the Constitution Apply to the Actions of the United States Anti-Doping Agency?, St. Louis : University of Baltimore School of Law, **2005**.
- [2] Freeman, E., Bloom, D. A., & McGuire, E. J. *Journal of Urology*, **2001**, 2(165), 371-373.
- [3] Oesper, R. E. *J. Chem. Educ.*, **1949**, 2(26), 91-93.
- [4] Segaloff, A. *Advances in Chemistry*, **1964**, 45(17), 204-220.
- [5] Fieser, L. F. y Fiser, M. *Steroids*, Reihold Publishig Corporation, **1959**.
- [6] D. H. R. Barton, «The Stereochemistry of Cyclohexane Derivatives,» *J. Chem. Soc.*, 1027-1040, **1953**.
- [7] Panico, R., Poewll, W. y Richer, J. C., *A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds*, Oxford: Blackwell Scientific Publications, **1993**.
- [8] Klyne, W., *Química de los esteoides*, Barcelona: Compañia Editorial Continental, **1970**.
- [9] Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products*, Chichester: John Wiley & Sons, **1997**.
- [10] Marker, E., R., Tsukamono, T., Turner, D., L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, 62, 2525, 1940.
- [11] Khripach, V. A. Zhabinskii, V. N. de Groot, A. E. *Brassinosteroids, A New Class of Plant Hormones*, San Diego: Academi Press, **1999**.
- [12] Zavarin, I., V., Chetkova, V., Levina, S., I., Chernonurova, E. *Russ Chem Rev*, **2011**, 80, 661-682.
- [13] Reyer, A. I., Genert, W. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74(17), 4336-4339.
- [14] Fieser, L. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75(18), 4377-4385.
- [15] Everett S. Wallis, E. Fernholz, F. T. Gephart. *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, 59(1), 137-140.
- [16] Dodson, R. M., Riegel, B. *J. Org. Chem.*, **1948** 13(3), 424-437.
- [17] W. J. Wechter, H. C. Murray, *J. Org. Chem.*, **1963**, 28(3), 755-760.
- [18] Zaldo, C., A., Tacoronte, J., E., Manchado F., C., de la Paz L., H., Cabrera, M., T. *CENIC Ciencias Químicas*, **2002**, 33(1), 19-24.

- [19] Iglesias-Arteaga, M. A., Xochihua-Moreno, L. S., Viñas-Bravo, O, Smith, S. M., Reyes, S. M., Sandoval-Ramírez, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16(3), 381-385.
- [20] Sandoval-Ramírez, J. Meza-Reyes, S. del Río, R. E., Hernandez-Linares, G. Rincon, R. S., Farfán, N., Santillan, R. L. *Steroids*, **2003**, 68, 199-204.
- [21] Meza-Reyes, S. Sandoval-Ramírez, J. Montiel-Smith, S. Hernández-Linares, G. Viñas-Bravo, O. Martínez-Pascual, R. Fernández-Herrera, M. A. Vega-Báez, J. L. Merino-Montiel, P. Santillán, R. L. Farfan, N. Susana. R y Rosa. E, *Arkivoc*, **2005**, 6, 307-320.
- [22] Hilario-Martinez, J.C., Zeferino-Diaz, R.; Muñoz-Hernández, Miguel A. Hernández-Linares, M., G., Cabellos, J. L., Merino, G., Sandoval-Ramirez, J., Jin, Z., Fernandez-Herrera, M.A, *Org. Lett.*, **2016**, 18(8), 1772-1775.
- [23] Cui, J. Huang, L. Fan, L. Zhou, A. *Steroids*, **2008**, 73, 252-258.
- [24] Lone, I. H. Kkan, K. Z. Fozdar, B. I. Hussain, F. *Steroids*, **2013**, 78.
- [25] Abmed, S., Boruad, R. C. *Tetrahedron Lett*, **1996**, 37(45), 8231-8232.
- [26] Milijković, D., Penov-Gasi, K., Djurendić, E., Sakać, M. *Tetrahedron Letter*, **1997**, 38(26), 4683-4684.
- [27] Penov-Gasi, K., Milijković, D., Medić-Mijacević, L., Djurendić, E., Petrović, J., Pejanocić, V., Lazar, S. *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 9759-9760.
- [28] Kubo, S., Mimaki, Y., Terao, M., Sashida, Y., Nikaido, T., Ohmoto, T. *Phytochemistry*, **1992**, 31(11), 3969-3973.
- [29] Deng, S., Yo, B., Lou, Y., & Hui, Y. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 202-208
- [30] Morzycki, J. W., Wojtkielewicz, A. *Phytochemistry Rev.* **2005**, 4, 259-277.
- [31] Fernández-Herrera, M.A., Sandoval-ramírez, J. López-Muñoz, H., Sánchez-Sánchez, L., *Arkivoc*, **2009**, xiii, 170-184.
- [32] Zhang, J., Pomomareva, L. V., Nandurkar, N. S., Yuan, T., Fang, L., Zhan, C.-G., Thorson, J. S. *Medical Chemistry Letters*, **2015**, 1, A-F.
- [33] Muranaka, K. *J. Chem. Educ.*, **2001**, 78(10), 1390-1393.
- [34] Leese, M. P., Hejaz, H. A., Mahon, M. F., Simon P. Newman, A. P., Reed, M. J., & Potter, B. V. *J. of Med. Chem.*, **2005**, 45(16), 5243-5256.

- [35] Leese, M. p., Jourdan, F. L., Gaukroger, K., Mahon, M. F., Newman, S. P., Foster, P. A., *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1295-1308.
- [36] Robinson, A. J., DeLucca, I., Drummond, S., Boswell, G. A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 4801-4804.
- [37] Dharam, Jindal, P., Chattopadhaya, R., Guleria, S., Gupta, R. *Eur J. Med. Chem.* **2003**, 38, 1025-1034.
- [38] Krstić, N. M., Bjelaković, M. S., Žižak, Ž., Pavlović, M. D., Juranić, Z. G., & Pavlović, V. D.. *Steroids*, **2007**, 72, 406-414.
- [39] Cui, J., Fan, L., Huang, Y., Xin, Y., Zhou, A. *Steroids*, **2009**, 74, 989-995.
- [40] Cui, J. -G., Fan, L., Huang, L.-L., Liu, H.-L., Zhou, A.-M. *Steroids*, **2009**, 74, 62-72.
- [41] Berényi, Á., Minorics, R., Iványi, Z., Ocsovszki, I., Ducza, E., Thole, H., Zupkó, I. *Steroids*, **2013**, 78, 96-78.
- [42] Chunfang Gan, K. C., Su, S., Lin, Q., Jia, L., Fan, L., Huang, Y. *Steroids*, **2014**, 87, 99-107.
- [43] Michael D. Grove, G. F., William K, R., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen, J. D., Steffens, G. L., Cook, J. C. *Nature*, **1979**, 281, 216-217..
- [44] Sakurai, A., T. Yokota, S. C. *Brassinosteroids steroidal plant hormones*. Tokyo: Springer, **1999**.
- [45] Brosa. C., *Steroids*, **1994**. 59, 463-467.
- [46] Brosa, C., Soca, L., Terricabras, E., Ferrer, J. C., Alsina, A. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 12337-12348.
- [47] Jürgen Schimidt, B. S., Yokota, T., Nakayama, M., Takatsuto, S., Voigt, B., Adam, G. *Phytochemistry*, **1995**, 38(5), 1095-1097.
- [48] Voigt, B., Schimidt, J., Adam, G. *Tetrahedron*, **1996**, 52(6), 1997-2004.
- [49] Brosa, C., Miró, X. *Tetrahedron*, **1997**, 53(31), 11347-11354.
- [50] Hellrung, B., Voigt, B., Schmidt, J., Adam, G. *Steroids*, **1997**, 62, 415-421.
- [51] D. L. Baron, W. Lou, L. Janzen, R. P. Pharis y T. G. Back, *Phytochemistry*, 4(7), 1849-1858, **1998**.
- [52] Brosa, C., Soca, L., Terricabras, E., Ferrer, J. C., Alsina, A. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 12337-12348.
- [53] Ramírez, J. A., Centurión, O. M., Gros, E. G., Galagovsky, L. R. *Steroids*, **2000**, 65, 329-337.

- [54] Eignerová, B., Slaviková, B., Buděsíňky, M., Dracíňsky, M., Klepetárová, B., St'astná, E., Kotora, M. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 5753-5757.
- [55] Masaki, B., Masayoshi, O., Naoki, K., Yoshihito, O., Shoji, S., Jenf, P., Toru, O. *Biol. Pharm. Bull.*, **2000**, *23*(5), 660-662
- [56] Francis, C. A., Richard, S. J. *Advanced Org. Chem.*. Kluwer Academic, **1997**
- [57] Sánchez-Sánchez, L., Hernández-Linares, M., Escobar, M. L. López-Muñoz; Zenteno, E.; M.A., Fernández-Herrera; Guerrero-Luna, G.; Carrasco-Carballo, A.; Sandoval Ramírez, J. *Molecules*, **2016**, *21*, 1533,