BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE ACETÓLISIS EN SAPOGENINAS ESTEROIDALES.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

Presenta:

JAIR GARCÍA MÉNDEZ

Directores de tesis:

DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ

DRA. MARÍA ANTONIETA FERNÁNDEZ HERRERA

Puebla, Pue. Noviembre de 2014

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y de la Dra. María Antonieta Fernández Herrera. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me otorgó la beca No…. Aspectos relevantes de esta tesis fueron presentados en dos congresos nacionales (I Simposio de RMN del Posgrado en Química, UAM-I, enero 2014; 10ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, mayo 2014).

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. Jesús Sandoval Ramírez y a la Dra. María Antonieta Fernández Herrera, por el apoyo, tiempo y dedicación para la realización y culminación de este trabajo, por compartir sus conocimientos y experiencias.

A mi familia, por todo el apoyo brindado en esta travesía, por la paciencia y comprensión hacia mi profesión y persona.

A los miembros de la comisión revisora:

Dr. José Luis Vega Báez.

Dra. Ma. Laura Orea Flores.

Dra. Maricela Rodríguez Acosta.

Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A todos mis compañeros de escuela y de vida, por los momentos y enseñanzas que pasamos juntos.

A todas aquellas personas que se han visto involucradas en mi evolución profesional y personal.

Mis sinceros agradecimientos.

Contenido

RESUMEN……2

ABREVIATURAS……3

INTRODUCCION……4

ANTECEDENTES……7

OSW-1……7

Colesterol……8

Sapogeninas……9

Diosgenina……9

Hecogenina……9

e*pi*-Esmilagenina……10

OBJETIVOS……13

DISCUSIÓN DE RESULTADOS……14

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3β,16β-diilo (4)……15

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β-diilo (5)……17

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxo-5α-colestano-3β,16β-diilo (6)……19

DESARROLLO EXPERIMENTAL……23

Técnicas y equipos utilizados……23

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3β,16β-diilo (4)……25

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β-diilo (5)……26

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxo-5α-colestano-3β,16β-diilo (6)……27

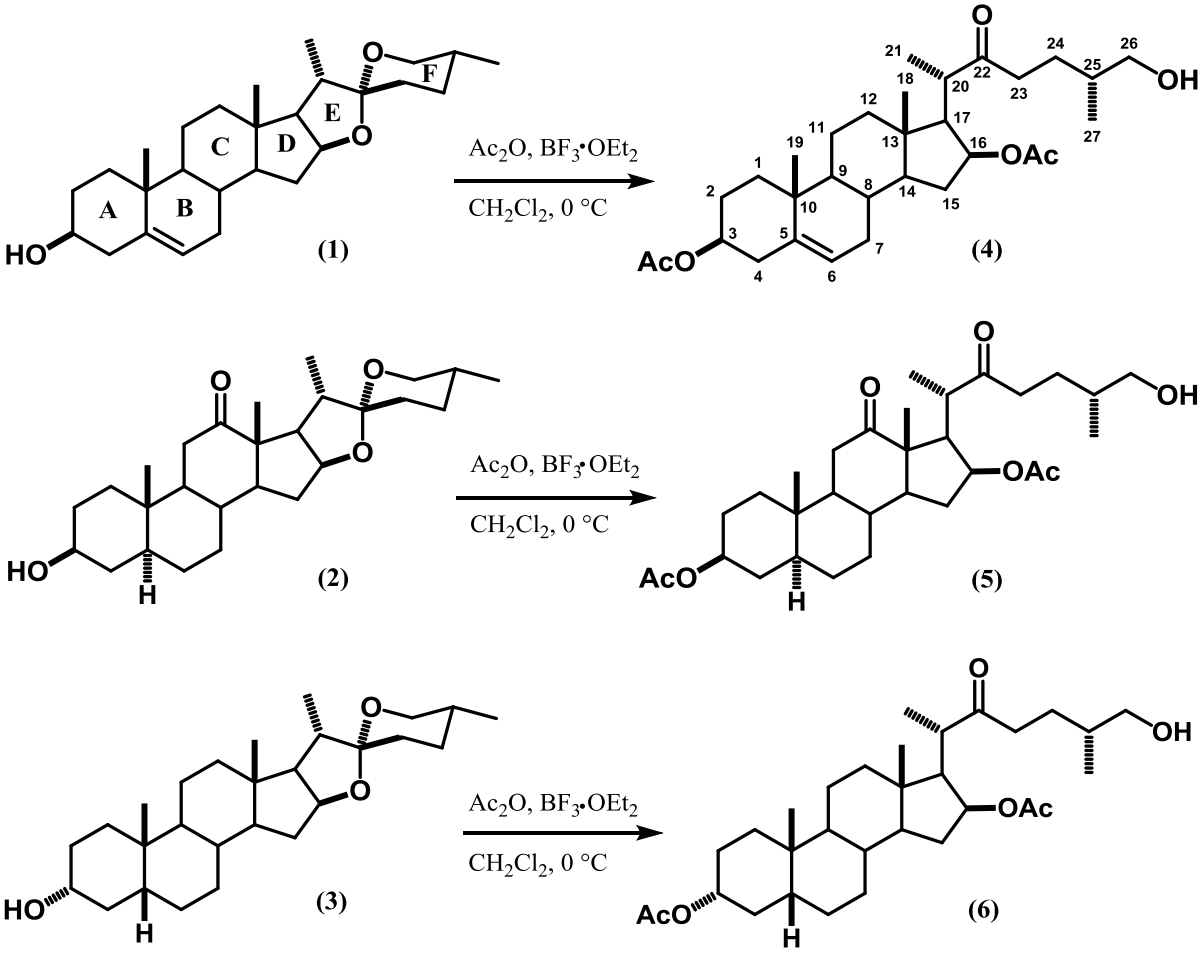
CONCLUSIONES……29

BIBLIOGRAFIA……30

RESUMEN.

En este trabajo de tesis se presenta la transformación de diosgenina (**1**), hecogenina (**2**) y *epi*-esmilgenina (**3**), sapogeninas esteroidales de las series 25*R* y 25*S*, en la formación de los compuestos 26-hidroxi-22-oxocolestánicos **4**, **5** y **6.** Se realizó un estudio de optimización de la apertura de los anillos E y F espirostánicos para mejorar el rendimiento de la obtención de **4**-**6**.

La ruta de reacción para obtener los compuestos 26-hidroxi-22-oxocolestánicos fue la siguiente:



ABREVIATURAS

CCF	Cromatografía en capa fina
p.f.	Punto de fusión
p.e.	Punto de ebullición.
RMN de ^{1}H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
IR	Infrarrojo
Δ	Doble enlace
δ	Desplazamiento químico, en RMN
J	Constante de acoplamiento, en RMN
ppm	Partes por millón
TMS	Tetrametilsilano

INTRODUCCIÓN

Los esteroides son compuestos que contienen el núcleo del ciclopenta[*α*]fenantreno o un esqueleto derivado de éste; pueden tener grupos metilo sobre las posiciones 10 y 13 y una cadena lateral hidrocarbonada sobre el carbono 17 (Figura 1). Incluyen una gran variedad de productos de origen natural, entre los que se encuentran los esteroles, los ácidos biliares, las hormonas sexuales, las hormonas adrenocorticales, los glicósidos cardiotónicos, las sapogeninas y algunos alcaloides entre otros.[1]

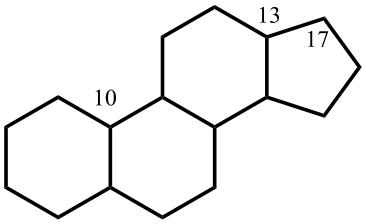


Figura 1. Ciclopenta[*α*]fenantreno

En la naturaleza se encuentran numerosas saponinas, sobre todo en el reino vegetal. Cuando se encuentran en forma de glicósidos (saponinas), disminuyen la tensión superficial del agua y por consiguiente, sus soluciones acuosas forman espuma fácilmente.[2] Las saponinas son compuestos polares que presentan solubilidad en agua y alcoholes. Algunas de ellas forman complejos estables con otros 3β-hidroxiesteroides y con otros compuestos más simples. Algunas de estas saponinas son de tipo triterpénica y otras de tipo esteroidal. Ejemplo de ellas son: (Figura 2)

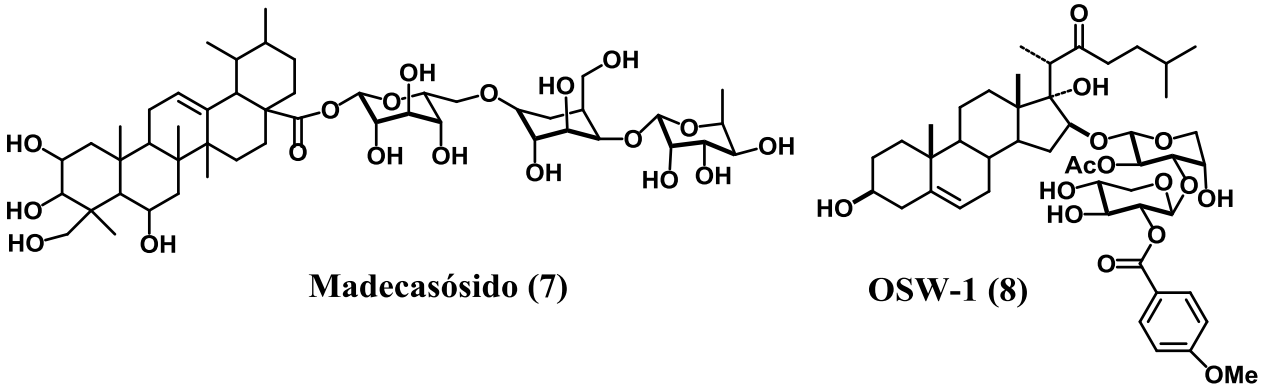
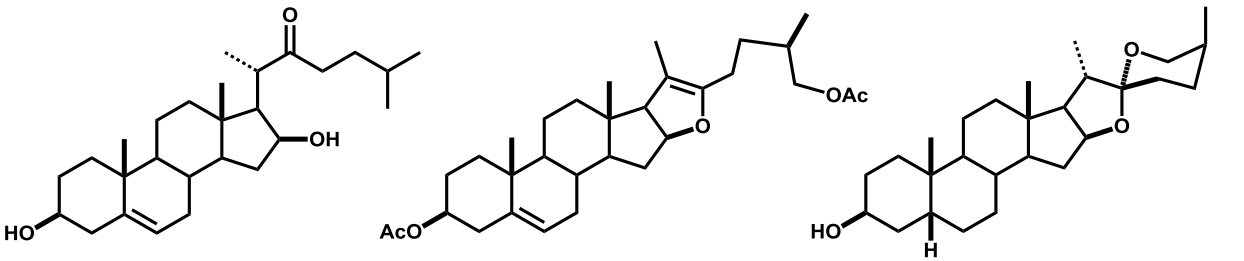


Figura 2. Ejemplos de saponina triterpénica y esteroidal.

Los ácidos y las enzimas hidrolizan a las saponinas para obtener las correspondientes agliconas o sapogeninas. Estructuralmente, las agliconas sapogenínicas pueden ser colestánicas, furostánicas, espirostánicas, por ejemplo:



22-Oxocolesterol (9) **Pseudodiosgenina (10)** **Sarsasapogenina (11)**

Figura 3. Ejemplo de aglicona colestánica, furostánica y espirostánica

Las sapogeninas esteroidales poseen 27 átomos de carbono con una cadena lateral espirocetálica. La mayoría de los espirostanos conocidos pertenecen a la serie 5α, una minoría importante posee configuración 5β y también son comunes algunos compuestos insaturados en 5, como la diosgenina, que es una de las principales materias primas para la síntesis de hormonas sexuales y corticosteroides (Figura 4). Pueden encontrarse grupos hidroxilo en diferentes átomos de carbono siendo los más frecuentes C3, C2, C5, C7 y C12.

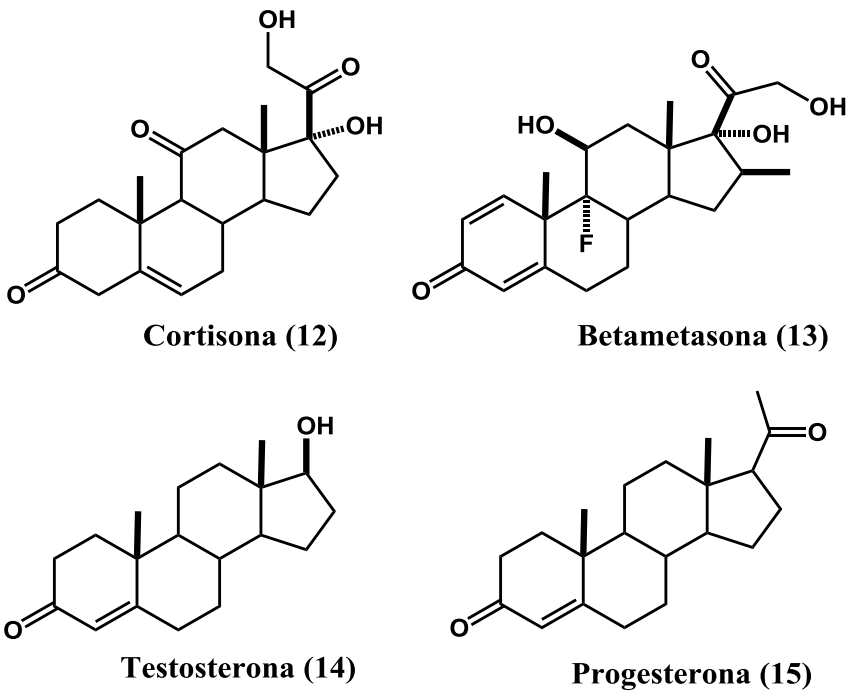


Figura 4. Ejemplos de hormonas sintetizadas a partir de hecogenina y diosgenina

Los investigadores que han aportado mayor información al establecimiento de las estructuras de las sapogeninas fueron Windaus, Jacobs, Tschesche, Kon, Fieser y Marker. Este último propuso la estructura espirocetálica de la cadena lateral (1939) y llevó a cabo investigaciones muy extensas en este campo.[3]

La importancia práctica de estas reacciones reside en el hecho de que en los años 1940 se desarrollaron varios caminos para obtener esqueletos pregnánicos. Dado que muchas sapogeninas son accesibles en cantidades comerciales y que los rendimientos de las degradaciones son buenos, las sapogeninas han constituido una de las principales fuentes de obtención de hormonas de 21 carbonos como la progesterona.

ANTECEDENTES.

En la actualidad, el cáncer se ha convertido en uno de los más grandes problemas de salud a nivel mundial, ya que es difícil de tratar debido a la sucesiva mutación de los oncogenes y de los genes supresores que alteran la regulación del ciclo de la célula.

El cáncer es una enfermedad que consiste en el crecimiento celular descontrolado. En los tejidos normales, las tasas de crecimiento de nuevas células y la muerte de células viejas se mantienen en balance; en el caso del cáncer, este balance se altera y como resultado, puede ocurrir un crecimiento celular descontrolado y por tanto, se pierde la habilidad de la célula para someterse a muerte celular programada, proceso conocido como *apoptosis*. Se han descubierto más de 100 formas distintas de cáncer, de acuerdo con el órgano o tejido en el que se originan.

A partir del descubrimiento de la camptotecina, los taxanos y algunos otros más, se ha desarrollado un progreso significante en el desarrollo de nuevos fármacos y terapias.

OSW-1

Recientemente se ha descubierto que ciertos compuestos esteroidales muestran actividad antiproliferativa contra varias líneas celulares de cáncer, pero su actividad selectiva frente a células malignas no ha sido propiamente establecida. A finales del siglo pasado se reportó que el glicósido natural OSW-1 (Figura 5) componente mayoritario del grupo de las saponinas colestánicas aisladas de los bulbos de *Ornithogalum saundersiae* (Figura 6), mostró una actividad 100 veces mayor que el taxol.

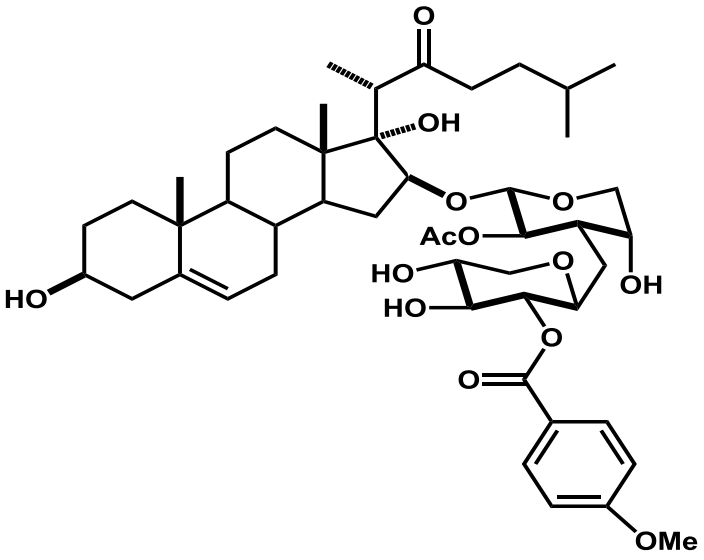


Figura 5. Estructura de OSW-1 (8)

Colesterol

El colesterol[4] (Figura 6), es un ejemplo de esteroide, que posee gran importancia en el humano ya que es un componente esencial en la estructura de la membrana celular; el colesterol sirve como precursor en la biosíntesis de diversos compuestos, tales como: hormonas esteroidales, ácidos biliares y la vitamina D.

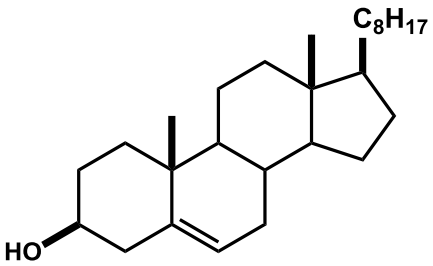


Figura 6. Estructura del Colesterol (16)

A partir del colesterol se han elaborado diversas reacciones químicas y enzimáticas, las cuales son ampliamente utilizadas en la transformación y obtención de esteroides de gran importancia práctica.[5]

Sapogeninas

Las sapogeninas son compuestos naturales muy importantes debido a que mediante estos se pueden sintetizar estructuras esteroidales biológicamente activas. En los 40´s adquirieron gran importancia debido a su transformación en derivados pregnánicos; así, la diosgenina y la sarsasapogenina eran fácilmente transformadas en progesterona;[6] la hecogenina fue transformada en cortisona y betametasona.[7]

Diosgenina

La diosgenina (**1**) es una sapogenina esteroidal que fue aislada por primera vez en 1936 por Takeo Tsukamoto, a partir de *Dioscorea tokoro.*[8] En la década de 1940, Russell Marker encontró en México que la *Dioscorea composita*, conocida como barbasco, contiene de 7 a 9% de diosgenina (Figura 7) y con ella desarrolló un proceso para sintetizar progesterona, proceso que fue conocido como la ¨Degradación de Marker¨.[9]

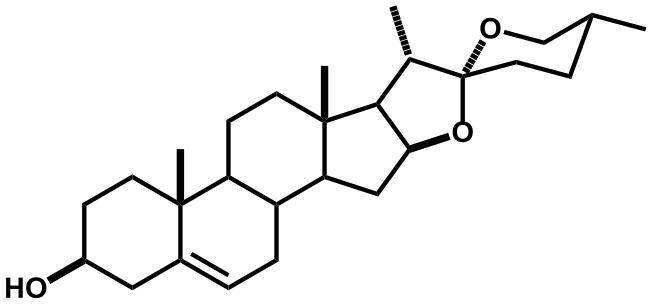


Figura 7. Estructura de la diosgenina (1)

Hecogenina

La hecogenina (**2**) es una sapogenina que se extrae del *Agave sisalana*; su empleo creció fuertemente en la década de 1950 debido a que a partir de ella se sintetizaron corticoesteroides. En el año 2003, se encontró que la hecogenina (Figura 8) inducía apoptosis en el osteosarcoma.[10] La hecogenina también se ha utilizado para sintetizar compuestos diméricos con actividad antineoplástica como las cefalostinas y las ritterazinas.[11]

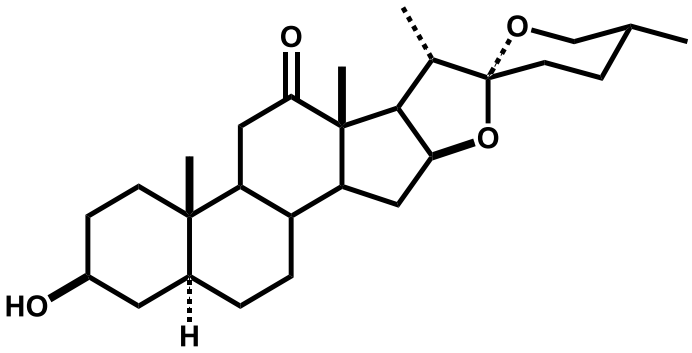


Figura 8. Estructura de la hecogenina (2)

***epi*-Esmilagenina.**

La 3-*epi*-esmilagenina (**3**) (Figura 9) se obtuvo a partir de la reducción de la esmilagenona. Ésta a su vez, se obtiene a partir de la esmilagenina la cual fue aislada por primera vez a partir de la *Yucca gloriosa* Linn, recolectada por Marker en Tenerife, Islas Canarias.[12]

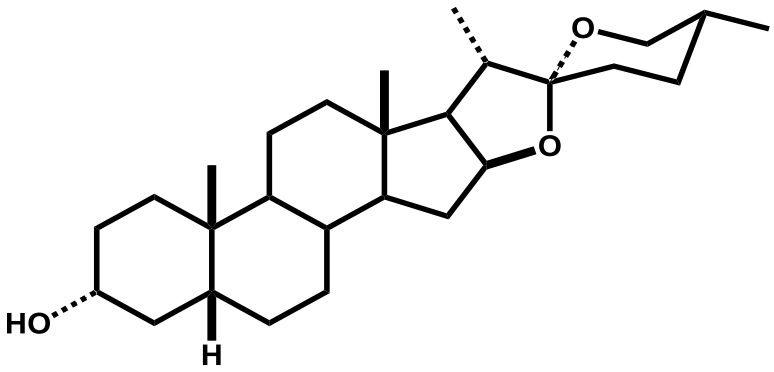
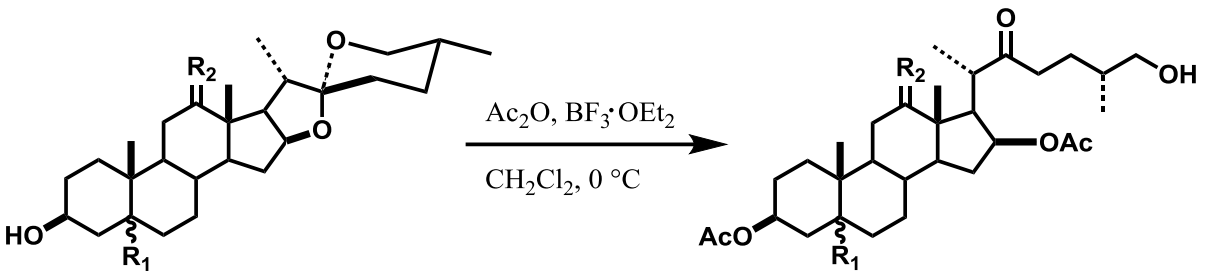


Figura 9. Estructura de la *epi*-esmilagenina (3)

La síntesis de estructuras 26-hidroxi-22-oxocolestánicas es importante ya que éste representa un intermediario sintético en la obtención de pseudosapogeninas o furostanos. También se ha observado que estos compuestos presentan actividad antiproliferativa e inducen apoptosis en diversas líneas celulares. (Esquema 1)

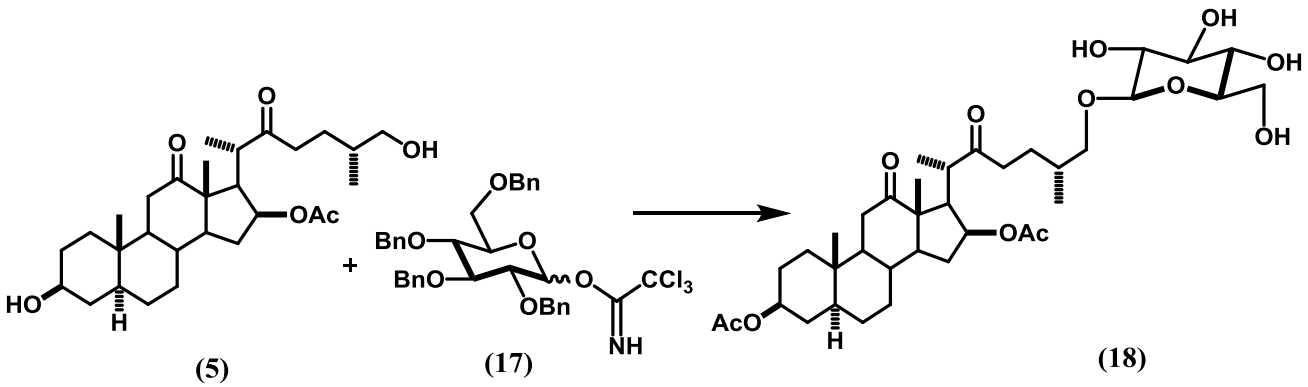


(1) H_3= α, R_1= Δ^5, R_2= H,H
(2) H_3= α, R_1= 5α-H, R_2= O
(3) H_3= β, R_1= 5β-H, R_2= H,H

(4) H_3= α, R_1= Δ^5, R_2= H,H
(5) H_3= α, R_1= 5α-H, R_2= O
(6) H_3= β, R_1= 5β-H, R_2= H,H

Esquema 1. Síntesis de compuestos 26-hidroxi-22-oxocolestanicos.

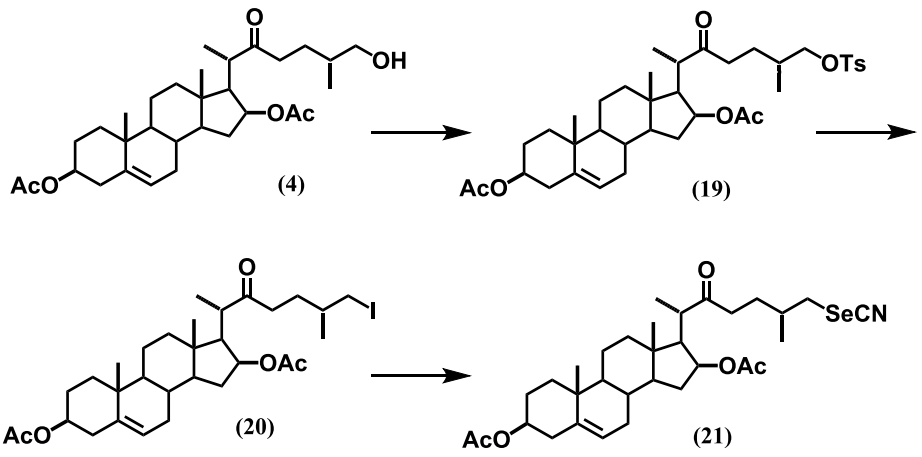
Los compuestos descritos anteriormente son precursores en la obtención de glicósidos esteroidales tal como el β-D-glucopiranósido de (25*R*)-3β,16β-diacetoxi-12,22-dioxo-5α-colestano-26-ilo (**18**). Este compuesto, que fue sintetizado en nuestro grupo de trabajo, presenta actividad contra el cáncer cervicouterino, en líneas celulares tales como: HeLa, CaSki y ViBo, a través del mecanismo de apoptosis.[13] (Esquema 2)



(5) **(17)** **(18)**

Esquema 2. Síntesis de β-D-glucopiranósido de (25*R*)-3β,16β-diacetoxi-12,22-dioxo-5α-colestan-26-ilo (18).

En nuestro laboratorio, a partir de los compuestos 26-hidroxi-22-oxocolestánicos (4), se realizó la síntesis de los compuestos 22-oxo-26-selenocianocolestanos, compuesto que potencializa la apoptosis en células tumorales, tales como en el cáncer cervicouterino. Debido a esta actividad antiproliferativa, también se ve afectada la proliferación de linfocitos en la sangre.[14] (Esquema 3)



Esquema 3. Síntesis del 22-oxo-26-selenocianocolestano (21)

OBJETIVOS

- Reestudiar la síntesis de derivados 26-hidroxi-22-oxocolestánicos a partir de las sapogeninas esteroidales diosgenina, hecogenina y *epi*-esmilagenina, con el fin de incrementar el rendimiento de los nuevos derivados 26-hidroxi-22-oxocolestánicos que servirán para sintetizar nuevos compuestos con potencial actividad anticancerígena.

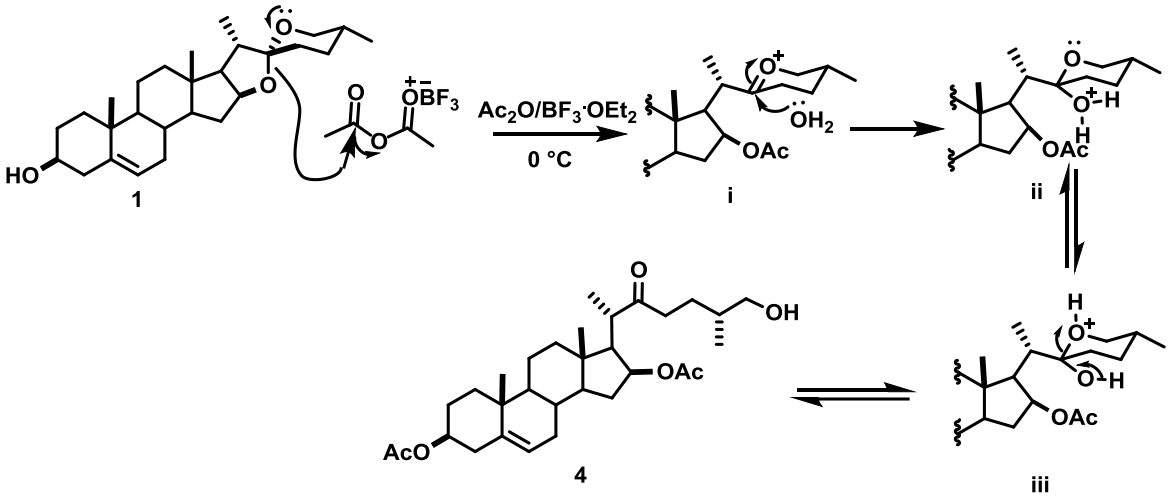
- Caracterizar los productos obtenidos por las distintas técnica físicas (rotación óptica, punto de fusión), espectrofotométricas (IR) y espectrométricas (RMN), que confirmen las estructuras de cada uno de los compuestos obtenidos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se ha realizado el estudio de la reacción de acetólisis en sapogeninas esteroidales, obteniendo los compuestos esteroidales 26-hidroxi-22-oxocolestánicos, los cuales han mostrado tener una amplia versatilidad en síntesis orgánica y actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer cervicouterino tal como el HeLa o CaSKi. [15]

Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó un nuevo método cuantitativo para realizar la apertura regioselectiva del anillo E de sapogeninas esteroidales para obtener protosapogeninas triacetiladas (e.g. triacetato de 22-oxocolestan-3β,16β,26-triilo).[16] Dichos compuestos se obtuvieron mediante la apertura regioselectiva de los anillos E y F de los compuestos **1**, **2** y **3**, bajo la acción del eterato de trifluoruro de boro, en presencia de anhídrido acético, a 0 °C. Bajo estas condiciones de reacción, uno de los carbonilos del Ac_2O es activado por el ácido de Lewis y el otro grupo carbonilo es atacado por el par electrónico del enlace entre el C-22 y el átomo de oxígeno del anillo tetrahidrofuránico; este ataque es promovido a la vez por la participación del par electrónico del átomo de oxígeno del anillo tetrahidropiránico. (Esquema 4)

De esta manera se forma el intermediario (**i**), que puede denominarse como ión oxacarbenio, oxocarbenio o bien, simplemente como ión oxonio. Posteriormente se efectúa la hidrolisis de este intermediario por ataque sobre el C-26 o sobre C-22, con lo cual el átomo de oxigeno tetrahidropiránico recupera su par electrónico.



Esquema 4. Mecanismo de reacción para la apertura de los anillos E y F.

En este mismo esquema, se esboza el ataque sobre el carbono 22 generando así el alcohol protonado en C-22 (intermediario **ii**, ión que se puede considerar como un ión oxonio). La desprotonación de este último, seguido por una protonación del átomo de oxígeno tetrahidropiránico conduce al intermediario hemiacetálico **iii**.

La apertura del anillo F de **iii** se obtiene mediante la participación de un par electrónico del átomo de oxígeno del alcohol intermediario y mediante la desprotonación de está conduce finalmente al compuesto 22-oxo-26-hidroxilado (4).

Los productos obtenidos **4, 5** y **6** son análogos 17-deoxi-26-hidroxilados de la cadena lateral de la aglicona del OSW-1.

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3β,16β-diilo (4)

En el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **4** (Figura 10) se puede observar la señal del protón vinílico **H-6**, como una señal doble, ancha, en 5.34 ppm con una constante de acoplamiento $J_{6\text{-}7}$= 4.8 Hz, lo cual es la señal típica en esteroides con un Δ^5. El **H-16** presenta una señal múltiple en 4.95 ppm y el **H-3** una señal igualmente múltiple en 4.57 ppm. La señal de los protones de **H-26** caen en 3.40 ppm como una señal doble con

una constante de acoplamiento $J_{26,25}$= 6 Hz. En 2.93 ppm se observa una señal múltiple, perteneciente al protón **H-20**. Por otra parte, en 2.62 y 2.38 ppm se aprecian los protones **H-23a** y **H-23b**, protones en posición alfa al grupo cetónico.

Los protones de los metilos pertenecientes a grupos acetatos de **C-3** y **C-16** están presentes, como señales simples, en 2.01 y 1.94 ppm, respectivamente; por otra parte, los metilos **C-19** y **C-18** corresponden a las señales simples en 0.99 y 0.84 ppm, el metilo de **C-21** se observa como una señal múltiple a 1.12 ppm y el metilo de **C-27** corresponde a la señal doble en 0.89 ppm ($J_{27\text{-}25}$=6.8 Hz).

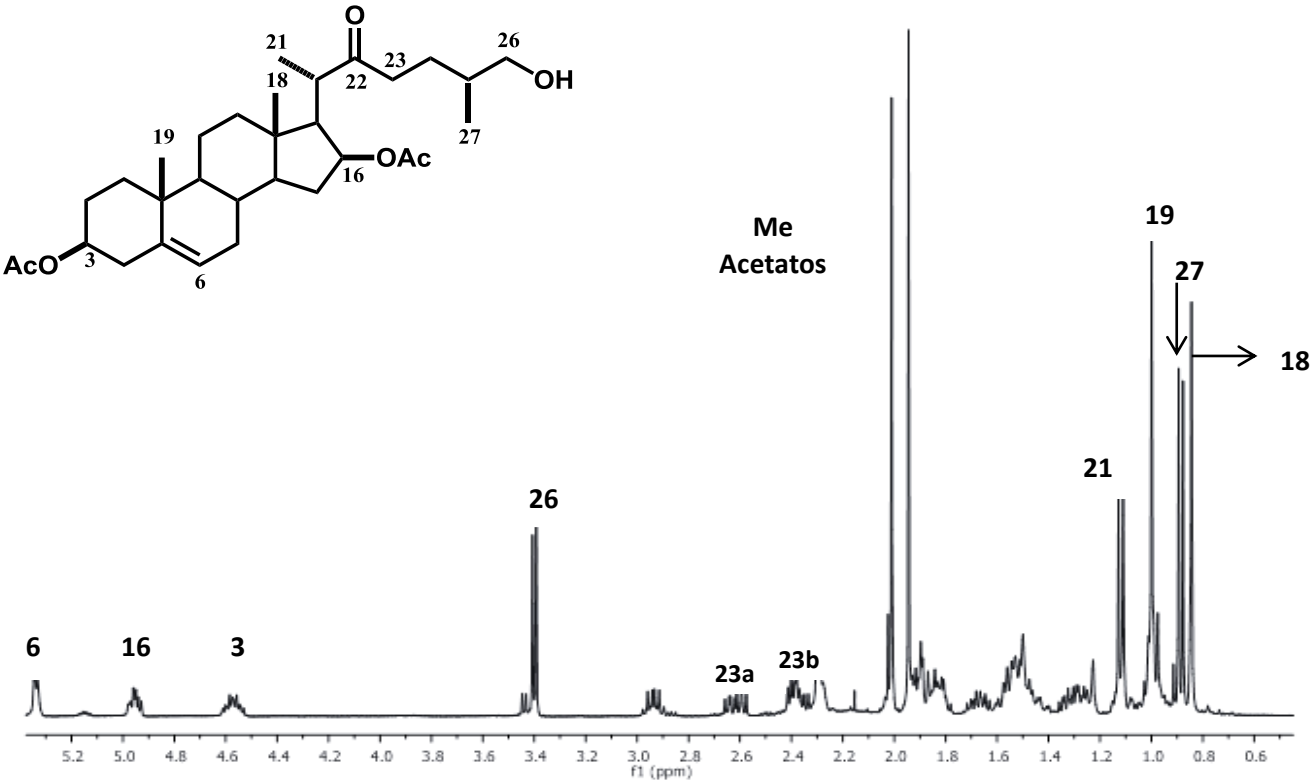


Figura 10: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz en $CDCl_3$) del compuesto 4

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **4** (Figura 11) se aprecia la señal de **C-22** que pertenece a un carbonilo de cetona en 213.49 ppm, mientras que la señal de los carbonilos de grupos acetatos pertenecientes a **C-3** y **C-16** se distinguen en 170.51 y 169.59 ppm. Los **C-5** y **C-6** correspondientes a Δ^5 se aprecian a 139.35 y 121.93 ppm; las señales para **C-16** y **C-3** se distinguen en 75.64 y 73.75 ppm. En 67.45 ppm se observa la señal de **C-26.** A frecuencias más altas aparecen las señales de los metilos

restantes: para **C-27** en 16.61 ppm, **C-21** en 16.60 ppm, **C-19** y **C-18** en 19.60 y 13.34 respectivamente.

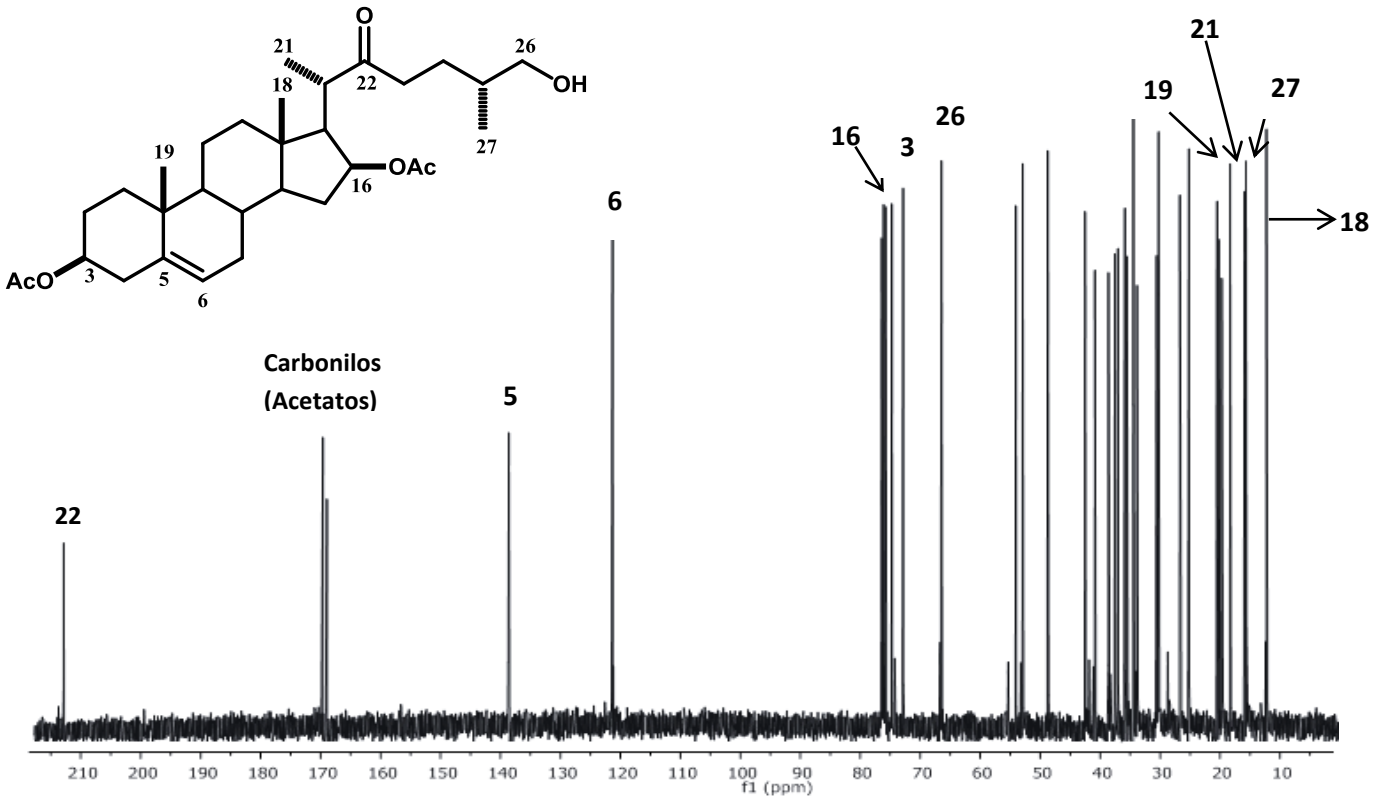


Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz en $CDCl_3$) del compuesto 4.

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β-diilo (5)

Se muestran a continuación los espectros de ^{1}H y ^{13}C para el compuesto **5**; en RMN de ^{1}H (Figura 12) observamos hacia 4.91 y 4.59 ppm las señales para los protones de **H-16** y **H-3** como señales múltiples, posteriormente se muestra la señal de los protones de **H-26** como una señal doble en 3.34 ppm, con una $J_{26,25}$=5.7 Hz, posteriormente se observa una señal múltiple para **H-20** en 2.73 ppm; los protones pertenecientes a **H-23a** y **H-23b** aparecen en 2.48 y 2.44 ppm, respectivamente, ambas como señales múltiples. Los metilos pertenecientes a grupos acetatos en **C-3** y **C-16** se observan como señales simples en 1.94 y 1.89 ppm. Los protones pertenecientes a los metilos **C-21** y **C-27** se observan como señales dobles a 1.02 y 0.84 ppm, con una $J_{21,\ 20}$= 6 Hz

y $J_{27,\ 25}$= 4.2 Hz, respectivamente. Los metilos **H-19** y **H-18** se aprecian en frecuencias más altas como señales simples en 1.11 y 0.82 ppm.

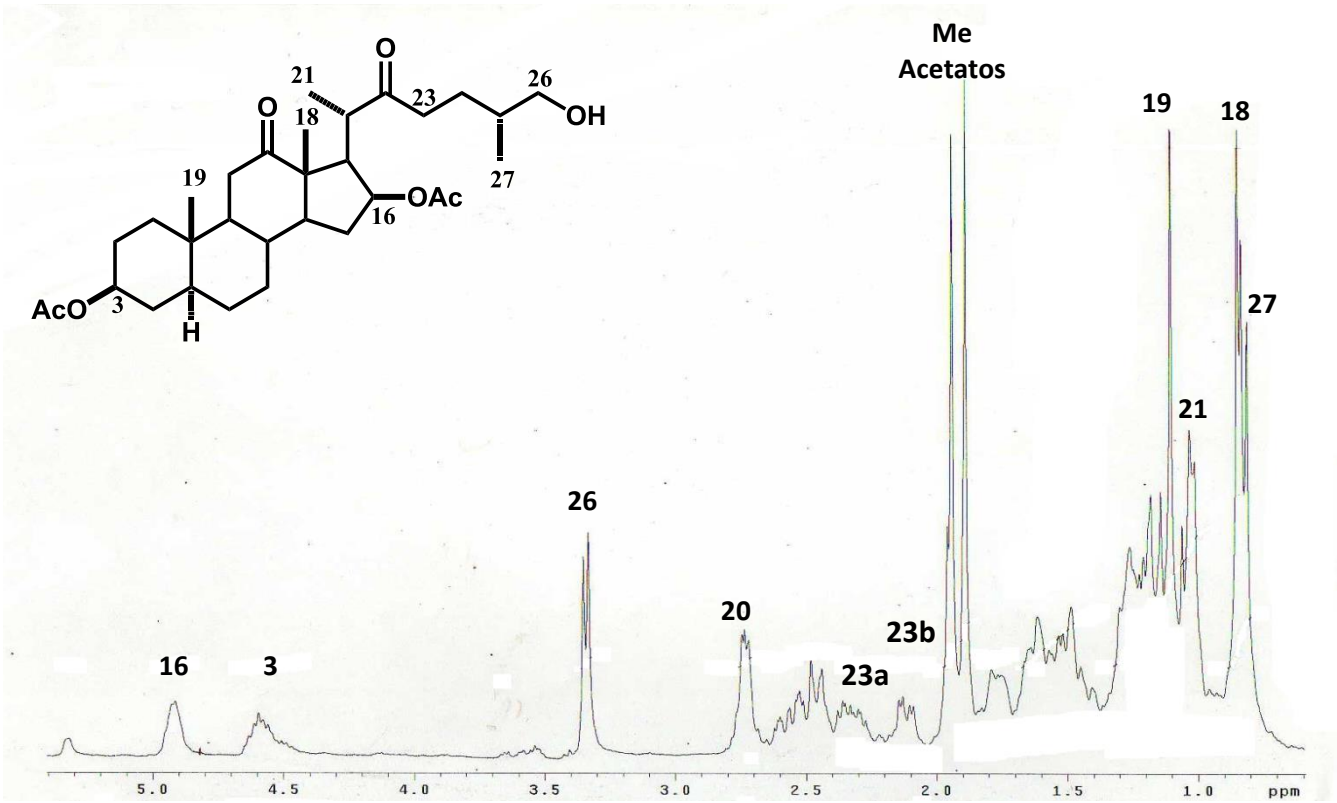


Figura 12: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz en $CDCl_3$) del compuesto 5.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 13) del compuesto **5** se aprecia la señal de los carbonilos de cetona de **C-22** y **C-12** en 213.52 y 212.87 ppm, respectivamente. Las señales de los carbonilos pertenecientes a **C-3** y **C-16** se observan en 170.46 y 169.57 ppm, los carbonos **C-16** y **C-3** aparecen a 74.20 y 72.99 ppm, respectivamente. La señal de **C-26**, se observa en 67.26 ppm y a 43.65 ppm se aprecia la señal para **C-20**. Los carbonos de metilo ubicados en las posiciones **C-21, C-27, C-18** y **C-19,** se observan hacia campos altos en 16.89, 16.40, 12.64 y 11.66, respectivamente.

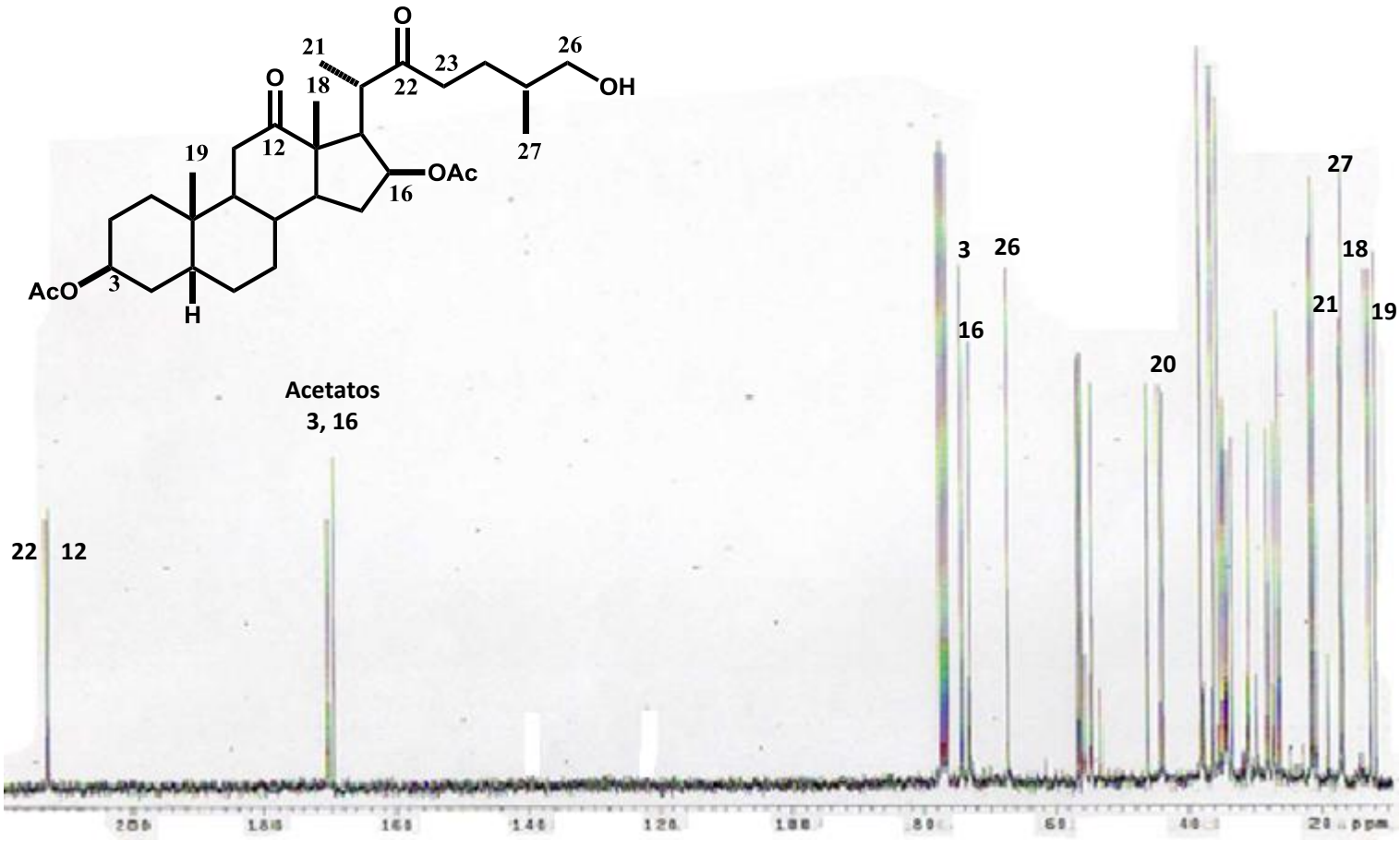


Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz en $CDCl_3$) del compuesto 5.

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxo-5α-colestano-3β,16β-diilo (6)

Se presenta a continuación el espectro de RMN ^{1}H (Figura 14) para el compuesto **6**. En 4.95 y 4.69 ppm se muestran las señales para **H-16** y **H-3**, como señales múltiples, posteriormente en 3.41 se observa una señal doble, la cual pertenece a los protones de **H-26** con una $J_{26,25}$ = 3 Hz, a 2.92 se observa la señal para **H-20** como una señal múltiple, los protones diasterotópicos de la posición 23 aparecen en 2.62 y 2.37 ppm, para **H-23a** y **H-23b**, respectivamente como señales múltiples. Los protones pertenecientes a los metilos de los grupos acetatos en **C-3** y **C-26** se aprecian a 2.01 y 1.94 ppm, como señales simples, para **H-21** y **H-27**, se observan señales dobles a 1.09 y 0.90 ppm, con $J_{21,20}$= 7.8 Hz y $J_{27,25}$= 1.8 Hz, los metilos en **H-19** y **H-18** se observan en 0.91 y 0.82, como señales simples.

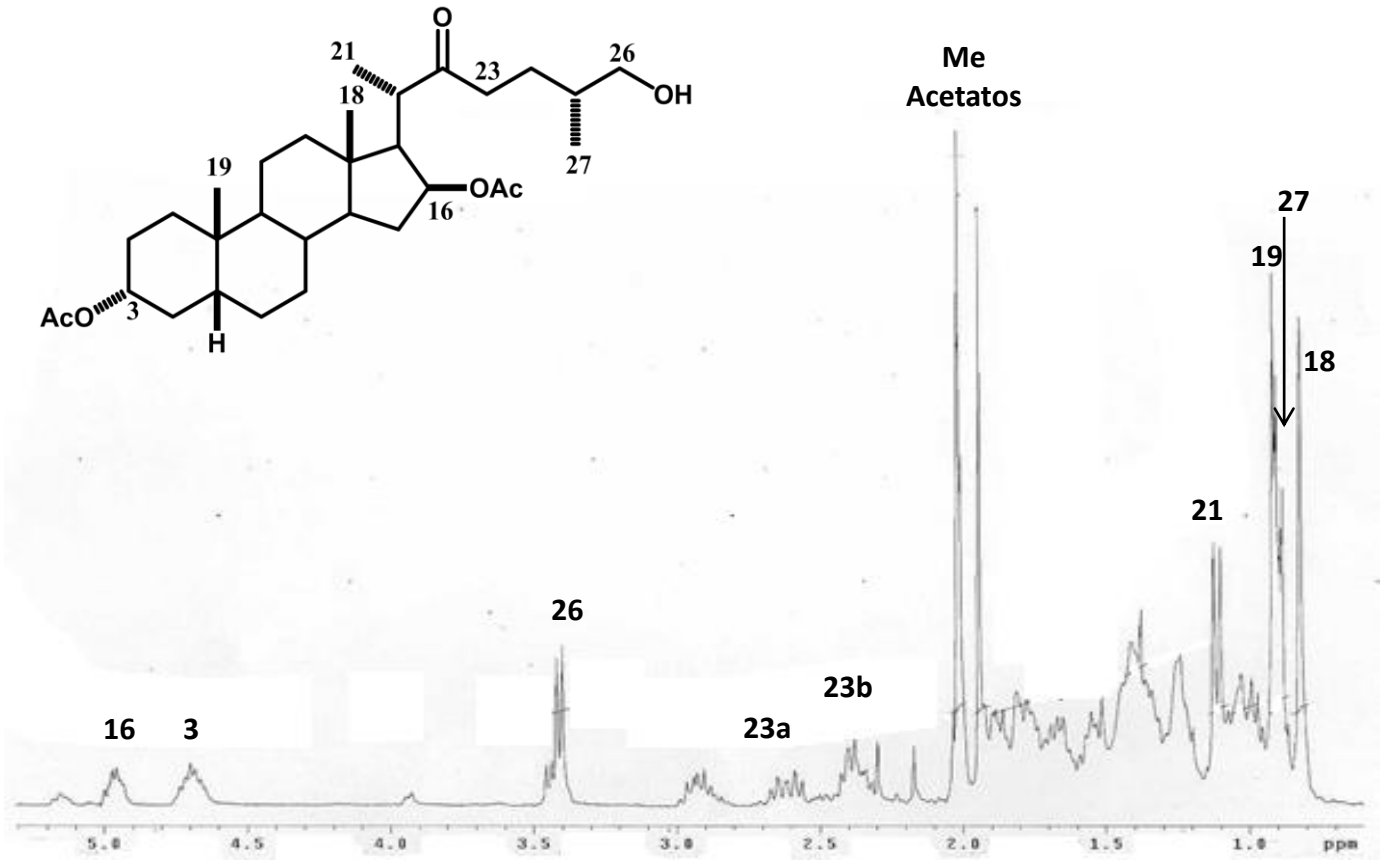


Figura 14: Espectro de ^{1}H (400 MHz en $CDCl_3$) del compuesto 6.

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **6** (Figura 15) se aprecia la señal de **C-22** perteneciente a un carbonilo de cetona en 213.64 ppm; los carbonilos de los grupos acetato en las posiciones **C-3** y **C-16**, se aprecian en 170.66 y 169.80 ppm, respectivamente. A 74.17 y 67.48 ppm aparecen las señales para **C-3** y **C-16.** La señal perteneciente a **C-26** se puede apreciar en 55.27 ppm, así mismo **C-20** se observa en 43.47 ppm. Los carbonos pertenecientes a los metilos en las posiciones **C-21, C-19, C-27, C-18**, se muestran en 20.53, 16.76, 16.58 y 13.38 ppm, respectivamente.

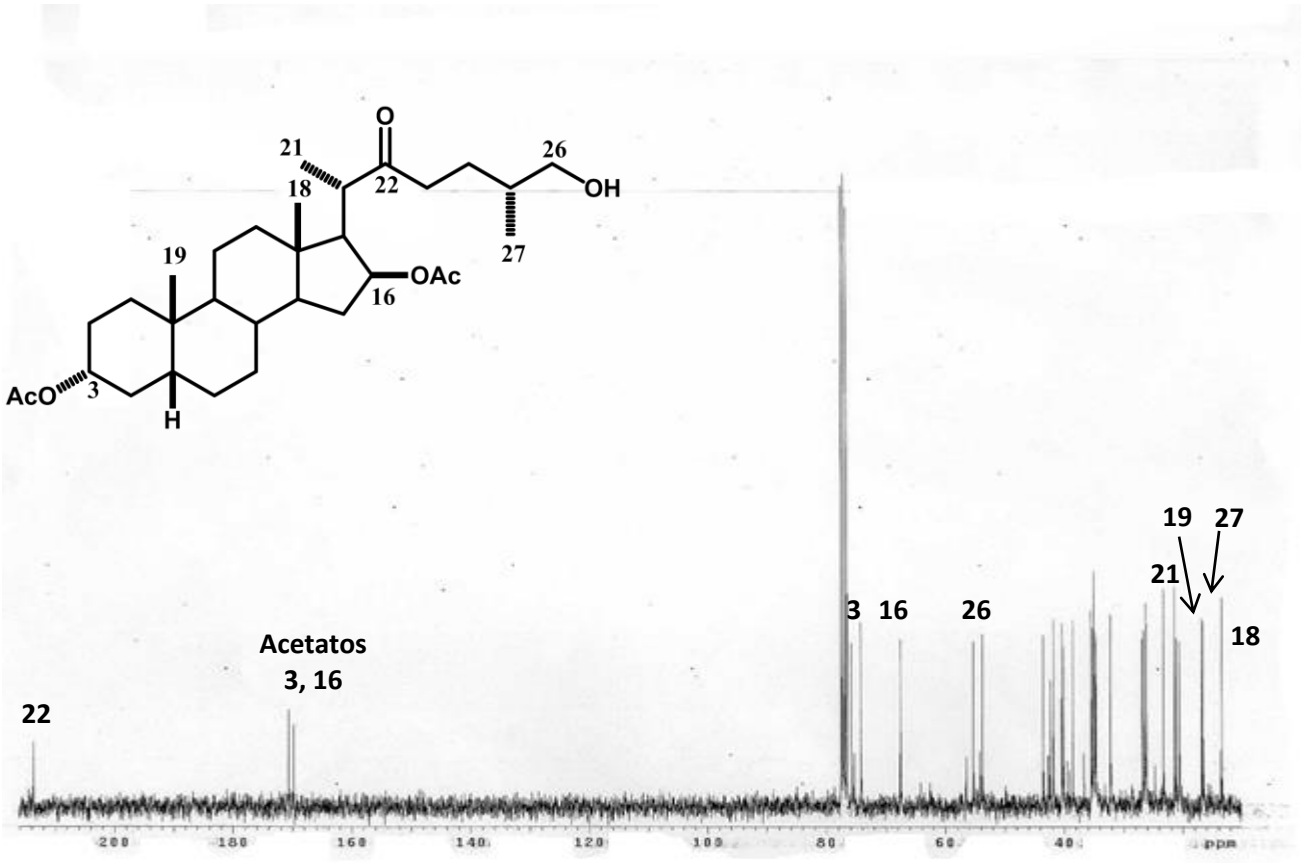


Figura 15: Espectro de ^{13}C (400 MHz en $CDCl_3$) del compuesto 6.

En la siguiente tabla se presenta el resumen de las condiciones de reacción empleadas para la obtención de los compuestos 26-hidroxi-22-oxocolestanicos **4**, **5** y **6.** (Tabla 1) Así mismo se muestran los resultados obtenidos con diferentes condiciones de reacción para cada compuesto, mediante las cuales se pretenden optimizar los rendimientos en la obtención de estos.

Reacción	Condiciones	Rendimientos		
		4	5	6
1	Ac_2O= 10 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=10 eq Disolvente: CH_2Cl_2	19.27%	35.06%	35.67%
2	Ac_2O= 15 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=15 eq Disolvente: CH_2Cl_2	15.55%	55.32%	24.42%
3	Ac_2O= 15 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$= Exceso Disolvente: CH_2Cl_2	20.78%	18.09%	25.27%
4	Ac_2O= Exceso $BF_3{\cdot}OEt_2$= Exceso Disolvente: CH_2Cl_2	20.00%	54.08%	11.83%
5	Ac_2O= 10 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=10 eq AcOH= 1 eq Disolvente: CH_2Cl_2	29.94%	49.30%	13.69%
6	Ac_2O= 10 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=10 eq AcOH= 5 eq Disolvente: CH_2Cl_2	35.05%	33.26%	36.60%
7	Ac_2O= 15 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=15 eq AcOH= 10 eq Disolvente: CH_2Cl_2	37.51%	48.40%	32.45%
8	Ac_2O= 15 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=15 eq AcOH= 15 eq Disolvente: CH_2Cl_2	37.87%	68.00%	44.46%
9	Ac_2O= 15 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=15 eq Disolvente: CH_2Cl_2 (anhidro)	20.06%	28.13%	23.62%
10	Ac_2O= 15 eq. $BF_3{\cdot}OEt_2$=15 eq Disolvente: MeOH	21.97%	31.07%	25.83%

Tabla 1. Condiciones de reacción y rendimientos para los compuestos **4**, **5** y **6**.

A pesar de que la hecogenina presenta en su estructura un carbonilo en **C-12** y que puede reaccionar en esta posición bajo las condiciones presentadas anteriormente, formando un nuevo anillo y obteniendo así compuestos **22-23-dioxocolestanicos**,[17] se obtuvo un mejor rendimiento en comparación con la diosgenina y *epi*-esmilagenina, las cuales no presentan algún sustituyente en dicha posición. Por lo que posteriormente se pretende estudiar el efecto de este carbonilo en el mecanismo de la reacción de acetólisis.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Técnicas y equipos utilizados.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{1}H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz se adquirieron en un equipo VARIAN-MERCURY multinuclear. Se utilizó cloroformo deuterado ($CDCl_3$) como disolvente, de acuerdo a la solubilidad del compuesto y TMS o residuos de disolvente como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz.

Espectroscopia Infrarroja.

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro Agilen Cary 630 FTIR; los datos se expresan en número de onda *v* (cm^{-1}). Se empleó el accesorio ATR con punta de diamante.

Cromatografía.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor que contienen indicador de fluorescencia, empleando una solución “reveladora de carbohidratos”, preparada a partir de ácido molíbdico (H_2MoO_4), sulfato de cerio ($CeSO_4$) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) y posteriormente una calcinación a una temperatura aproximada de 110 °C. Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas de vidrio, las cuales fueron empacadas con gel de sílice grado 60 (230-400 mallas) de acuerdo a la técnica de cromatografía tipo *flash*, utilizando como eluyentes acetato de etilo – hexano.

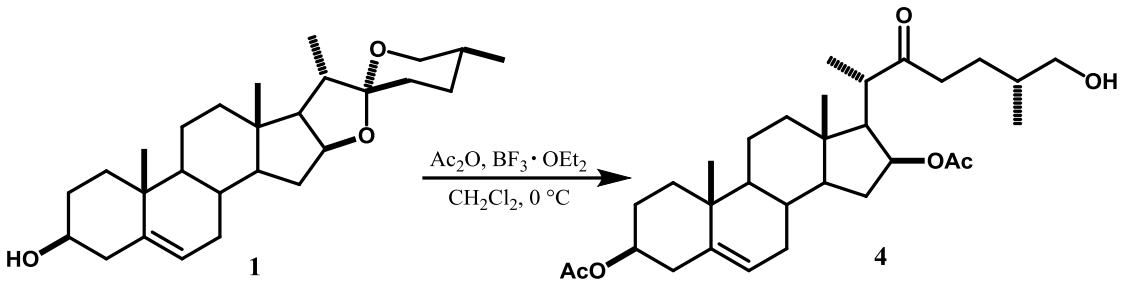
La cromatografía en Columna también se llevó a cabo en el equipo *Combiflash* empleando gradientes para una mejor resolución en la separación.

Disolventes y materias primas.

Los reactivos que se utilizaron fueron grado analítico y se utilizaron directamente sin purificar, a excepción de la *epi*-esmilagenina, ya que como reactivo solo se contaba con la esmilagenona, la cual se purificó dado que esta contaba con una pequeña impureza.

Posteriormente se realizó la reducción de esmilagenona a *epi*-esmilagenina y su respectiva purificación.

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3β,16β-diilo (4)



Se agregó el anhídrido acético a un matraz de fondo redondo, posteriormente se agrega el $BF_3 \cdot OEt_2$, gota a gota, una vez preparada esta mezcla se coloca a 0 °C con agitación por un par de minutos. Transcurrido este tiempo se agregó a la mezcla el compuesto **1** (100 mg, 0.241 mmol) y el disolvente, la reacción fue monitoreada por CCF y se dio por terminada a los 30 minutos. Posteriormente al crudo de reacción se le realizo el consecuente tratamiento agua-hielo en agitación por 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se efectúan lavados con soluciones saturadas de $NaHCO_3$, NaCl y finalmente se realiza el último lavado con agua destilada, se agrega Na_2SO_4 anhidro, para eliminar rastros de agua, después se filtra la solución para eliminar el Na_2SO_4 hidratado. Posteriormente, el crudo de reacción se concentró a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de hexano/AcOEt 70:30. Se obtuvo el compuesto **4** como sólido blanco.

RMN ^{1}H: (400 MHz, $CDCl_3$, δ): 5.34 (1H, d, $J_{6,7}$ = 4.8 Hz, H-6), 4.95 (1H, m, H-16), 4.57 (1H, m, H-3), 3.40 (2H, d, $J_{26,25}$ = 6 Hz, CH_2-26), 2.93 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, m, H-23a), 2.38 (1H, m, H-23), 2.01 (3H, s, *CH_3CO_2-3*), 1.94 (3H, s, *CH_3CO_2-16*), 1.12 (3H, m, CH_3-21), 0.99 (3H, s, CH_3-19), 0.89 (3H, d, $J_{27,25}$ =6.8 Hz, CH_3-27), 0.84 (3H, s, CH_3-18).

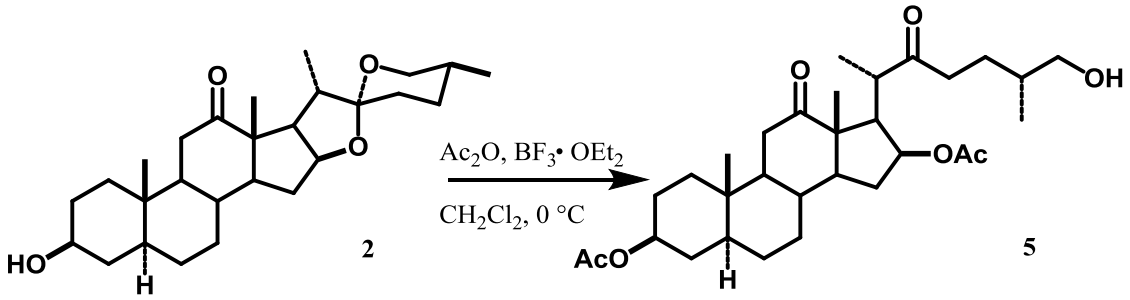
RMN ^{13}C: (100 MHz, $CDCl_3$ δ): 73.75 (C-3), 139.35 (C-5), 121.93 (C-6), 7 54.64 (C-17), 13.34 (C-18), 19.60 (C-19), 43.47 (C-20), 16.60 (C-21), 213.49 (C-22), 67.45 (C-26), 16.61 (C-27), 170.51 ($CH_3CH_2O_2$ -3), 169.59 ($CH_3CH_2O_2$ -16).

$[\alpha]_D$= -0.8° (*C*= 1, $CHCl_3$).

IR (Figura 16)= 3456.22 (OH), 2931.58 (CH, alifáticos), 1719 (C=O, cetona y acetatos).

P.f = 204-209 °C.

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β-diilo (5)



Se agregó el anhídrido acético a un matraz de fondo redondo, posteriormente se agrega el $BF_3 \cdot OEt_2$, gota a gota, una vez preparada esta mezcla se coloca a 0 °C con agitación por un par de minutos. Transcurrido este tiempo se agregó a la mezcla el compuesto **2** (100 mg, 0.211 mmol) y el disolvente, la reacción fue monitoreada por CCF y se dio por terminada a los 25 minutos. Posteriormente al crudo de reacción se le realizo el consecuente tratamiento agua-hielo en agitación por 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se efectúan lavados con soluciones saturadas de $NaHCO_3$, NaCl y finalmente se realiza el último lavado con agua destilada, se agrega Na_2SO_4 anhidro, para eliminar rastros de agua, después se filtra la solución para eliminar el Na_2SO_4 hidratado. Posteriormente, se concentró el crudo de reacción a presión reducida, el producto obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de hexano/AcOEt 60:40. Se obtuvo el compuesto **5** como sólido blanco.

RMN ^{1}H: (400 MHz, $CDCl_3$, δ): 4.91 (1H, m, H-16), 4.59 (1H, m, H-3), 3.34 (2H, d, $J_{26,25}$= 5.7 Hz, CH_2-26), 2.73 (1H, m, H-20), 2.48 (1H, m, H-23a), 2.44 (1H, m, H-23), 1.94 (3H, s, *CH_3CO_2-3*), 1.89 (3H, s, *CH_3CO_2-16*), 1.11 (3H, s, CH_3-18), 1.02 (3H, d, $J_{21,20}$= 6 Hz, CH_3-21), 0.846 (3H, d, $J_{27,25}$= 4.2 Hz, CH_3-27) 0.82 (3H,s, CH_3-19).

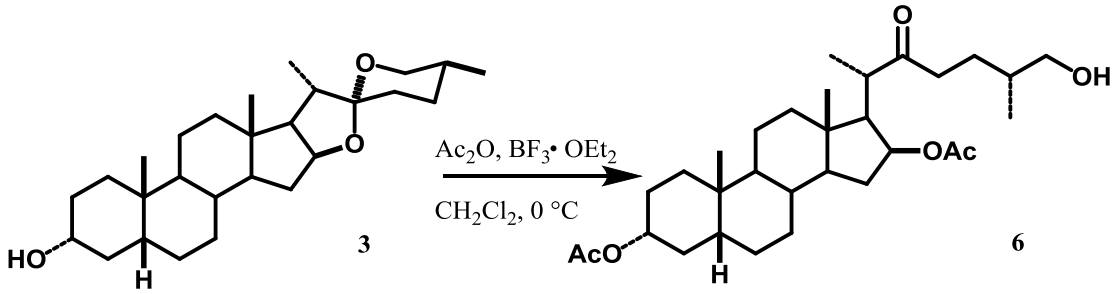
RMN ^{13}C: (100 MHz, $CDCl_3$ δ): 72.99 (C-3), 44.19 (C-5), 212.87 (C-12), 74.20 (C-16), 12.64 (C-18), 11.66 (C-19), 43.65 (C-20), 16.89 (C-21), 213.25 (C-22), 67.26 (C-26), 16.40 (C-27), 170.46 ($CH_3CH_2O_2$ -3), 169.57 ($CH_3CH_2O_2$ -16).

$[\alpha]_D$= +74.5° (*C*= 1, $CHCl_3$).

IR (Figura 17)= 3422.76 (OH), 2984.97 (CH, alifáticos), 1731.60 (C=O, cetona y acetatos).

P.f = 120-125 °C.

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxo-5β-colestano-3α,16β-diilo (6)



Se agregó el anhídrido acético a un matraz de fondo redondo, posteriormente se agrega el $BF_3 \cdot OEt_2$, gota a gota, una vez preparada esta mezcla se colocó a 0 °C con agitación por un par de minutos. Transcurrido este tiempo se agregó a la mezcla el compuesto ***3*** (100 mg, 0.248 mmol) y el disolvente, la reacción fue monitoreada por CCF y se dio por terminada a los 40 minutos. Posteriormente al crudo de reacción se le realizo el consecuente tratamiento agua-hielo en agitación por 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se efectúan lavados con soluciones saturadas de $NaHCO_3$, NaCl y finalmente se realiza el último lavado con agua destilada, se agrega Na_2SO_4 anhidro, para eliminar rastros de agua, después se filtra la solución para eliminar el Na_2SO_4 hidratado. Posteriormente, se concentró el crudo de reacción a presión reducida, la mezcla obtenida se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de hexano/AcOEt 80:20. Se obtuvo el compuesto **6** como sólido incoloro.

RMN ^{1}H: (400 MHz, $CDCl_3$, δ): 4.95 (1H, m, H-16), 4.69 (1H, m, H-3), 3.41 (2H, d, $J_{26,25}$ = 3 Hz, CH_2-26), 2.92 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, m, H-23a), 2.37 (1H, m, H-23), 2.01 (3H, s, *CH_3CO_2-3*), 1.94 (3H, s, *CH_3CO_2-16*), 1.09 (3H, d, $J_{21,20}$= 7.8 Hz, CH_3-21), 0.91 (3H,s, CH_3-19), 0.90 (3H, d, $J_{27,25}$=1.8 Hz), 0.82 (3H, s, CH_3-18).

RMN ^{13}C: (100 MHz, $CDCl_3$ δ): 74.17 (C-3), 67.48 (C-16), 13.38 (C-18), 20.53 (C-19), 43.47 (C-20), 16.76 (C-21), 213.64 (C-22), 55.27 (C-26), 16.58 (C-27), 170.66 ($CH_3CH_2O_2$ -3), 169.80 ($CH_3CH_2O_2$ -16).

$[\alpha]_D$= +59.7° (*C*= 1, $CHCl_3$).

IR (Figura 18)= 3461.71 (OH), 2935.19 (CH, alifáticos), 1723.11 (C=O, cetona y acetatos).

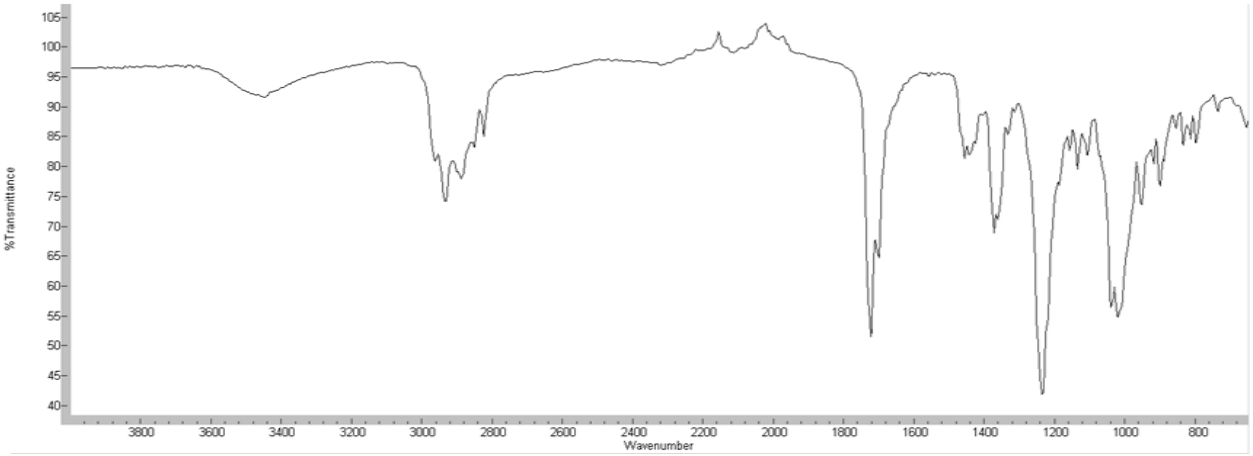


Figura 16. Espectro de IR para el compuesto *4*.

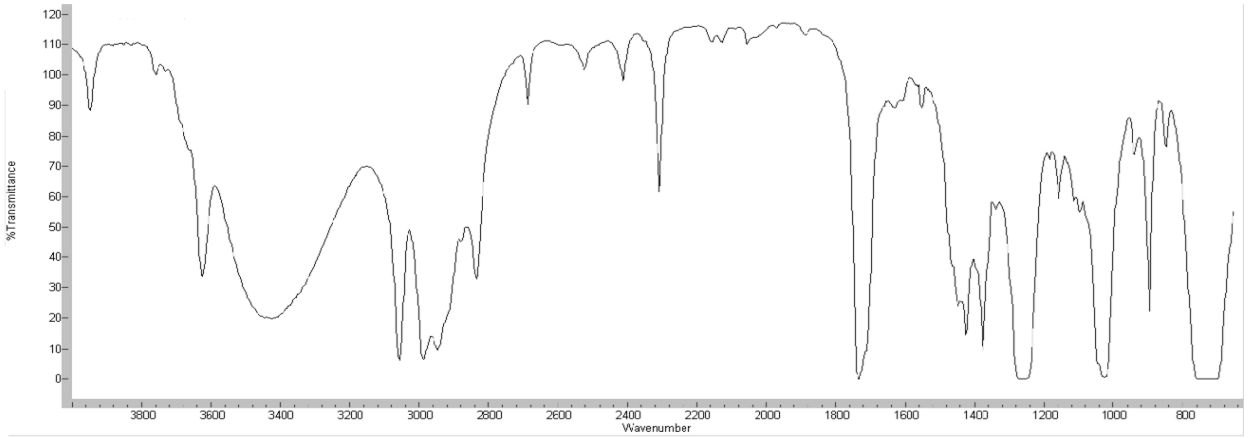


Figura 17. Espectro de IR para el compuesto *5.*

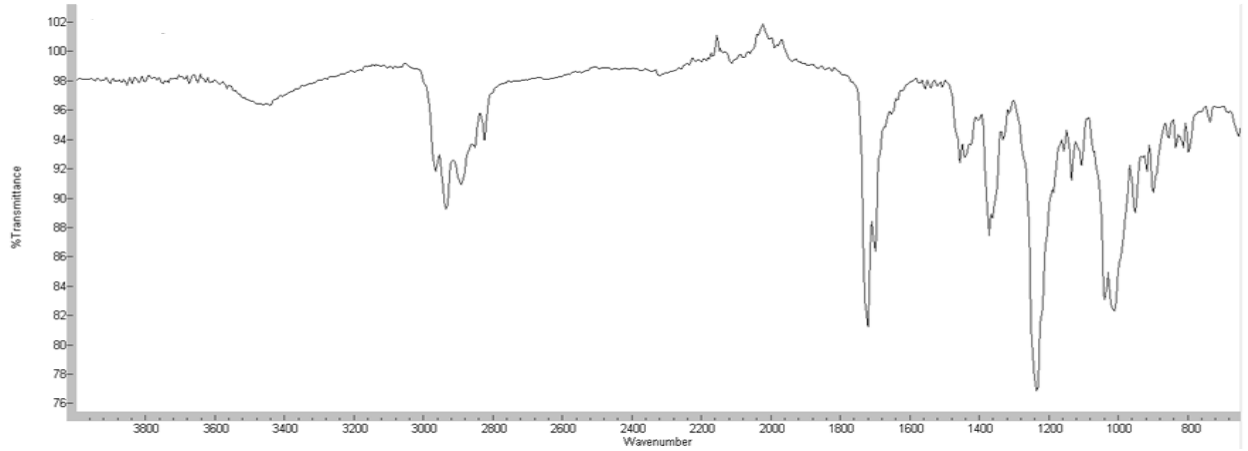


Figura 18. Espectro de IR para el compuesto *6.*

CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados de la Tabla 1, se puede observar que la formación de los productos (4), (5) y (6) se lleva a cabo de manera más óptima en medio ácido, como se puede observar en el experimento 8, para el cual se reportaron los mejores rendimientos.

Reacción	Condiciones	4	5	6
8	Ac_2O= 15 eq. $BF_3 \cdot OEt_2$=15 eq AcOH= 15 eq Disolvente: CH_2Cl_2	37.87%	68.00%	44.46%

- Se obtuvieron cualitativamente los compuestos objetivo:

  - Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3β,16β-diilo
  - Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β-diilo
  - Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxo-5β-colestano-3α,16β-diilo

- Los productos obtenidos se caracterizaron mediante distintas técnicas físicas (rotación óptica y punto de fusión) y espectroscópicas (RMN e infrarrojo), corroborando así las estructuras de los compuestos objetivo.

BIBLOGRAFIA:

1. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*; 2nd Ed. John Wiley & Sons: Chichester. **2002**, pp 237-239.Hostettmann, K.; Marston, A. *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products*; Cambridge University Press: New York. **1995**.
2. Hostettmann, K.; Marston, A. *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products*; Cambridge University Press: New York. **1995**.
3. Marker, R. E.; Lopez, J. *J. Am. Chem. Soc*; **1947**, *163,* 2383-2385
4. Morzycki, J. W. *Steroids*; **2014**, *83*, 62-79.
5. Schroepfer, J. G. *Oxysterols: Modulator of cholesterol metabolism and other processes;* **2000**, *80*, 361-554.
6. Moss, G.P. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1783-1822
7. Marker, R. E.; Wagner, R. B.; Ulshafer, P. R.: Wittbecker, E. L.; Goldsmith, D. P. J.; Ruof, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 1199.
8. Tsukamoto, T.; Ueno, Y.; Otha, Z. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1936**, 56, 931-940.
9. (a) Marker, R. E.; Rohrmann, E. *J. am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 3592-3593. (b) Marker, R. E.; Krueger J. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 3349- 3350. (c) Marker R. E.; Tsukamoto, T.; Turner, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2525- 2532. (d) Marker. R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 3350- 3352.
10. Djerassi, C.; Ringold, H. J.; Rosenkranz, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1951,** 73, 5513-5514.
11. Marker, R. E; Tsukamoto, T.; Turner, D.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2525-2532.
12. Lee, S.; Jamieson, D.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **2009**, 11, 5- 8.
13. Fernández-Herrera, M. A.; Sankar, M.; López-Muñoz, H.; Hernández-Vázquez, J. M.V.; Pérez-Cervantes, E.; Escobar-Sánchez, M. L.; Sánchez- Sánchez, L.; Regla, I.; Pinto, B. M.; Sandoval-Ramírez, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 4827-4837.

14. Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, Sánchez- Sánchez, L.; López-Muñoz, H.; Escobar-Sánchez, M. L. *Eur.J. Med. Chem.* **2014**, 74, 451-460.

15. Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, 53, 125

16. Fernández-Herrera, M. A.; López-Muñoz, H.; Hernández- Vázquez, J. M. V.; López-Dávila, M.; Escobar-Sánchez, M. L.; Sánchez-Sánchez, L.; Pinto, B. M.; Sandoval-Ramírez. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2474-2484.

17. Gómez-Calvario, V.; Arenas-Gonzales, A.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith S. Vega-Báez, J. L.; Sandoval-Ramírez, J.; Hernández-Linares, G. *Steroids*. **2013**, *78*, 902-908.