

Tesis de Posgrado

Síntesis de esteroides simple y doblemente marcados con carbono-13 en cadena lateral

Caballero, Gerardo Manuel

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Caballero, Gerardo Manuel. (1992). Síntesis de esteroides simple y doblemente marcados con carbono-13 en cadena lateral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2547_Caballero.pdf

Cita tipo Chicago:

Caballero, Gerardo Manuel. "Síntesis de esteroides simple y doblemente marcados con carbono-13 en cadena lateral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2547_Caballero.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"SINTESIS DE ESTEROIDES SIMPLE Y DOBLEMENTE
MARCADOS CON CARBONO-13 EN CADENA LATERAL"

Director de Tesis
Dr. Eduardo G. Gros

Lugar de trabajo
Departamento de Química Orgánica

Gerardo Manuel Caballero

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

*Tesis.
2547
q. 2.*

-1992-

*A Tato y a Chiqui,
a Patty, Marcela,
Pablo y Federico*

Mi sincero agradecimiento al Dr. Eduardo G. Gros, mentor de esta tesis, quién con su ejemplar dedicación al trabajo, rigor científico y sagacidad hizo posible mi crecimiento tanto en el campo de la investigación científica como en el plano personal.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por las becas de iniciación y perfeccionamiento usufructuadas.

Al UMYMFOR (CONICET-FCEyN) por las determinaciones instrumentales

Sr. Jorge Aznárez: espectros de masa y CGL-EM.

Sr. Gustavo Arabehty y Dres. Darío Doller y Gerardo Burton: espectros de RMN.

Lic. María M. de Moglia y María Rivero: CGL.

Lic. Marta Marcote y María Rivero: microanálisis; y a los Dres. Eduardo Gros, Alicia Seldes y Gerardo Burton por la organización del trabajo en común.

A la Lic. Cristina Tettamanzi por los espectros NOE diferencia efectuados.

Al Dr. Darío Doller por los espectros NOESY realizados.

Al Dr. Juan B. Rodríguez por sus enseñanzas en la operación de equipos de CLAR y por las muestras de los compuestos 121, 130 y 131 facilitadas.

Al Lic. Eduardo Sproviero, a los Dres. Carlos Stortz y Gerardo Burton y especialmente al Lic. Walter Samaniego por las enseñanzas recibidas en el manejo de distintos programas de computación.

Al Sr. Gustavo Arabehty y al Dr. Gerardo Burton por sus enseñanzas en el manejo de los espectrómetros de RMN Varian XL-100 y Bruker ACE-200.

Al Sr. Jorge Aznárez por sus enseñanzas en la operación de los espectrómetros de masa Varian-MAT CH7-A y Trio-2/2000 VG Massslab.

A los Dres. Gerardo Burton y Alicia Seldes por facilitarme el uso de las computadoras personales de sus laboratorios.

A la Dra. Alicia Fernández Cirelli y al Lic. Oscar Moradei por facilitarme la utilización del cromatógrafo CLAR Knauer 64.

Al Dr. Alberto Cerezo por permitirme el empleo del equipo de liofilización de su laboratorio.

A la Dra. Rosa M. de Lederkremer por permitirme la utilización del contador de centelleo RackBeta 1214, y del equipo de

ultrasonido y los baños termostatzados de su laboratorio.

A los Dres. Gustavo Dartayet, Rosa Erra Balsells y Darío Doller por sus consejos en las etapas iniciales de mi trabajo.

A los Dres. Oscar Varela, Arturo Vitale y Gerardo Burton por sus desinteresados y sugerentes comentarios.

Al Dr. Rafael Labriola (Biofarma) por las muestras de testosterona suministradas.

A la Dra. Juana Tandecarz y particularmente a la Srta. Gabriela Rosetti (Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Dr. Luis F. Leloir) por su amplia colaboración durante la realización de los cultivos de tejido de *Scilla maritima*.

Al Dr. I. Mizrahi (INTA, Castelar) por las semillas de *Digitalis purpurea* facilitadas.

A las Dras. Marta Maier y Mónica De Luca por sus espontáneos comentarios sobre el trabajo con la planta *D. purpurea*.

Al Sr. Berna por su desinteresada y gentil colaboración en el cuidado de los ejemplares de *S. maritima* y *D. purpurea* existentes en el vivero de Ciudad Universitaria.

A Federico Caballero por su ayuda en la recolección de los ejemplares de *D. purpurea* de las lagunas de Yala.

Al personal de biblioteca de la Facultad.

A María del Carmen Ares, Gabriela Friedman, Rosa Ricarte, Rosa Cintas, Virginio Pereira y Don Eduardo López por su diaria y amable colaboración.

MAS AGRADECIMIENTOS

A mis amigos del Departamento de Química Orgánica, Jorge Aznárez, Juan Bautista Rodríguez, Walter Samaniego, Darío Doller, Osvaldo Teme Centurión, Rosa Erra, Alberto Ghini, Marcelo Cases, Alejandro Nin, Oscar Moradei, Daniel Cicero, Edith Monteagudo, Arturo Vitale, Gustavo Revelli, Sergio Giacobello, Sandra Linares, Marisa Ramírez, María Laura Uhrig, Rosalía Agusti, Carola Gallo y Carlos Lima.

A mis compañeros y vecinos de laboratorio Alicia Baldesari, Miriana Biondic, Sergio Bonesi, Andrea Bruttomeso, Fanny Console, Lydia Galagovsky, Luis Iglesias, Daniel Murgida, Alejandra Ponce, Amelia Salinas y Patricia Zunszain.

A los ex y actuales integrantes de la primera división de KEKULE, Walter Samaniego, Gabriel Lombardi, Claudio Siebel y Alejandro Chiocconi (arqueros); Alberto Ghini, Juan Bautista Rodríguez, Diego Federico y Juan Vuolo (defensores); Osvaldo Teme Centurión, Norberto García Espinosa, Oscar Moradei (volantes); Marcelo Cases, Juan José Callá y Carlos Stortz (delanteros) por brindarme el honor de ser el máximo goleador de su gloriosa historia, y por la próxima conquista del campeonato Exactas '92.

A mis amigos de toda la vida, Pablo Raspa, Patricia Valdez y Kelo Vázquez.

A mis amigos de Buenos Aires, Guillermo Bruno, Cristina Pose, Isabel Pose, Orlando Arreguez, Pablo Visconti, Carlos Velo de Ipola, Antonio Parajo y Carina Belinco.

A Gabriel Cuadra por su amistad y su ayuda durante mi vida en Córdoba.

A Gabriela Almeida Huerta por su cariño y comprensión.

A mis tíos Michila Caballero Fascio y Julio Luxardo por su generosidad, hospitalidad y cariño.

A mi tía Evita Bravo Fascio por su afecto, su interés en mis actividades y sus anécdotas turísticas.

A mi tía Choli Berra por las largas charlas compartidas, sus oportunos consejos y su cariño.

And at last but not least, a la "ex Sociedad de los Martes": mis tíos Choli Berra, María Cristina Berra, Rolán Berra y Héctor Pettinicchio, mi tía abuela Bertita Vidarte, y mis primos Federico Pettinicchio y Rodolfo Pettinicchio por todos los momentos compartidos desde que llegué a Buenos Aires.

INDICE

Introducción.....	1
Objetivos	30
Capítulo I. Síntesis de [20,21- ¹³ C ₂]-progesterona, [20,21- ¹³ C ₂]-pregnenolona y [21- ¹³ C]-colesterol.....	34
Capítulo II. Estudios tendientes a la preparación del material biológico adecuado para los estudios biosintéticos...	112
Capítulo III. Desprotección de tioacetales y acetales promovida por sulfato de cobre (II) adsorbido sobre sílica gel.....	115
Capítulo IV. Propiedades espectroscópicas de RMN ¹³ C de ciertos androstanos y efecto de diversos sustituyentes en C-17 del anillo esteroideal.....	153
Parte experimental.....	176
Resumen.....	235
Referencias bibliográficas.....	238

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Å	Angström
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
cc	cantidades catalíticas
ccd	cromatografía en capa delgada
CGL	cromatografía gas líquido
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
Et	etilo
EtOH	etanol
Et ₂ O	éter etílico
g	gramo
h	hora
HMPA	hexametilfosforamida
Hz	hertz
Im	imidazol
i-PrOH	isopropanol
IR	infrarrojo
lit.	literatura
mCi	milicurie
Me	metilo
MeCN	acetonitrilo
MeI	iodometano
MeLi	metililitio
MeOH	metanol
mg	miligramo
min.	minuto
ml	mililitro
Ms	mesilo
m/z	relación masa/carga
n-BuLi	n-Butililitio

nm	nanometro
NOE	efecto nuclear de Overhauser
PCC	clorocromato de piridonio
PDC	dicromato de piridonio
Ph	fenilo
Ph ₃ P	trifenilfosfina
ppm	partes por millón
PPTS	p-toluensulfonato de piridonio
Py	piridina
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear protónica
Σ	t-butildimetilsililo
ss	solución saturada
TBAF	fluoruro de tetra-n-butil-amonio
TEA	triethylamina
THF	tetrahidrofurano
TsOH	ácido p-toluensulfónico

INTRODUCCION

Los glicósidos esteroidales que inyectados en la corriente sanguínea o administrados oralmente tienen la propiedad de ejercer una acción específica y potente sobre el músculo cardíaco del hombre o de animales se denominan principios cardioactivos o cardiotónicos. Una cantidad muy pequeña implica una estimulación beneficiosa del corazón enfermo pero una dosis excesiva puede causar la muerte. Estos glicósidos están presentes en pequeñas cantidades en las semillas, hojas, tallos, raíces o corteza de plantas de una amplia distribución geográfica en familias diversas tales como *Apocynaceae*, *Crassulaceae*, *Scrophulaceae*, *Liliaceae*, *Moraceae*, *Ranunculaceae*, y *Asclepiadaceae*. Muchas especies crecen en regiones tropicales y han sido empleadas por los nativos de Africa y Sudamérica para la preparación de venenos empleados en cacerías y en luchas tribales [Domínguez, 1973].

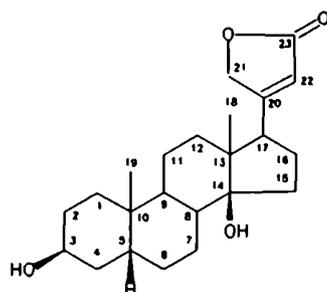
La cebolla de mar (*Scilla maritima*) que crece en forma silvestre en el sur de Europa y en el norte de Africa fue usada en medicina (como expectorante, estimulante cardíaco o diurético) desde los tiempos de los griegos primitivos. Esta planta fue mencionada en el Papiro de Ebers (1500 A.C.) y por el historiador Theophrastus (300 A.C.). Los médicos de la Europa occidental de la Edad Media ya la conocían gracias a los conocimientos difundidos por los árabes [Sharp, 1910] y fue nombrada en la *Materia Medica* (1304-1306) [Gentry, 1987]. Una antiquísima medicina china usada para los mismos propósitos que los preparados de *Scilla* se preparaba con secreciones de la piel de sapos. El llamado veneno de sapo, una secreción producida por las glándulas dérmicas modificadas que están presentes en la mayor parte de la piel del sapo pero concentradas especialmente en la región del cuello (las glándulas parótidas o parotoides), no contiene glicósidos sino geninas esteroidales estructuralmente relacionadas con las agliconas cardíacas. Usualmente se presentan como conjugados de suberilarginina (bufotoxinas) [Wieland, 1922].

Por otra parte, plantas de la familia *Digitalis*, particularmente la *Digitalis purpurea*, fueron usadas para preparar venenos empleados en ejecuciones durante la época medieval. Las drogas hechas a partir de hojas secas de esta planta encontraron un rápido uso en medicina, principalmente para

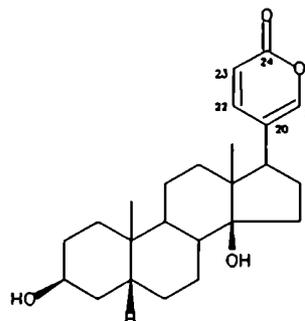
aplicaciones externas promotoras de la cicatrización de heridas. El uso de digitalis, una preparación hecha por extracción de semillas secas y hojas de esta planta, en la terapia del corazón fue introducida en 1785 por el médico escocés William Withering con un suceso espectacular [Fieser, 1959].

GENERALIDADES SOBRE LOS GLICOSIDOS CARDIOTONICOS.

Los esteroides cardioactivos se clasifican en dos grupos. Los cardenólidos que provienen de plantas y los bufadienólidos que son productos de síntesis de organismos vegetales y animales; presentándose como glicósidos los de origen vegetal y como geninas o bufotoxinas los de origen animal [Fieser, 1959]. Los cardenólidos constituyen el grupo predominante en la naturaleza y son esteroides de 23 átomos de carbono que poseen un anillo lactónico de cinco miembros α - β -insaturado (anillo butenólido) unido en β al C-17 vía la posición C-20. El rasgo estructural saliente de los bufadienólidos es la presencia de un anillo lactónico de seis miembros con dos dobles enlaces (α -pirona).



Digitoxigenina (I)
(Cardenolido)



Bufalina (II)
(Bufadienolido)

Estos dos tipos de esteroides están caracterizados por una unión *cis* entre los anillos C y D y la presencia de un grupo hidroxilo en 14β . La configuración en C-3, C-5 (anillos A/B *trans* o *cis*) y C-17 son rasgos de diferenciación como también lo son los patrones de oxigenación (usualmente hidroxilos o carbonilos)

encontrados en las posiciones C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-8, C-11, C-12, C-15, C-16 y C-19. Algunos compuestos tienen un doble enlace olefínico adicional y otros tienen un grupo epoxi en el esqueleto esteroideal. Los cardenólidos y bufadienólidos existen en el reino vegetal usualmente como glicósidos, unidos vía el hidroxilo de C-3 (C-2 y C-5 son otras posiciones de glicosidación) a una o más unidades de un carbohidrato. Los azúcares obtenidos de cardenólidos comprenden azúcares normales (aldohexosas, pentosas, 6-desoxihexosas), 2,6-didesoxihexosas (frecuentemente como o-metiléteres u o-acetatos) y un grupo especial de derivados carbocíclicos (desoxi-hexulosas o desoxi-pentulosas; la unión doble entre la aglicona y la desoxi-hexulosa (unión acetálica y hemiacetálica en las posiciones de la aglicona 3β y 2α respectivamente) distingue a estos glicósidos cardíacos de los cardenólidos normales [Shimada, 1981; Cheung, 1980]). Glucosa, ramnosa y tevetosa son los carbohidratos conocidos provenientes de los glicósidos bufadienólidos [Robien, 1987].

Se ha establecido que los glicósidos deben su actividad cardiotónica a las agliconas. Los carbohidratos son inactivos en forma pura, pero cuando se combinan con las agliconas aumentan la toxicidad y la potencia del principio activo. Se considera que afectan ciertas propiedades físicas, como la solubilidad en agua y la difusión a través de membranas semipermeables. La persistencia de la acción cardíaca de estos principios está también determinada por los carbohidratos ya que actúan como grupos protectores del hidroxilo de C-3 evitando su epimerización a productos 3α -hidroxi, los que han demostrado ser inactivos [Maier, 1985]. Los glicósidos cardíacos son también importantes herramientas en el estudio de la ATPasa dependiente de sodio y potasio, enzima mediadora en la bomba celular de sodio y que por ende ejerce un rol crucial en una variedad de procesos fisiológicos vitales. Esta ATPasa es inhibida específicamente por glicósidos cardíacos y está considerada como el receptor putativo de estas drogas [Hoffman, 1983]. En estudios de inhibición de la ATPasa dependiente de sodio y potasio de cerdo se encontró que la adición de un hidrato de carbono a la genina incrementaba la actividad relativa en un factor constante dependiente de la

naturaleza del carbohidrato [Rohrer, 1984].

Con respecto a la función que cumplen los glicósidos cardiotónicos en los vegetales, aún no se ha llegado a una conclusión concreta. Se supone que pueden tener tanto funciones regulatorias como ecológicas, ayudándolas a sobrevivir en presencia de hongos, insectos y animales superiores [Fraenkel, 1959]. Apoya esta afirmación el hecho de que muy pocos insectos pueden vivir en plantas que contienen glicósidos cardíacos [Duffey, 1972]. Más aún, estos insectos todavía pueden ser comidos por pájaros, lagartos o ratones [Duffey, 1970]. Por otra parte se encontró que la actividad citotóxica informada para muchos glicósidos cardíacos iguala la inhibición del transporte mediado por ATPasas, pero no es fácil comprender como las plantas pueden contener tales sustancias sin ser afectadas por ellas [Heftmann, 1975]; a menos que, como en el caso de plantas productoras de alcaloides tóxicos, estos productos sean almacenados en receptáculos aislados del vegetal, tales como vacuolas o paredes celulares, de los que serían liberados en caso de necesidad fisiológica del organismo [Mothes, 1985]. Se observó también que estos compuestos pueden actuar como hormonas vegetales, ya que extractos acuosos de *Digitalis purpurea* estimulaban la formación de raíces adventicias en cortes de tomate [Geuns, 1978].

CARACTERISTICAS DE LA PLANTA *Scilla maritima*.

La cebolla de mar, *Scilla maritima* o *Urginea maritima* (L.), planta de la familia de las Liliáceas, crece en forma silvestre en terrenos rocosos y secos de las costas del mar Mediterráneo. Es una geofita con un gran bulbo, condicionada por una larga evolución a adaptarse al tipo de clima del Mediterráneo. La planta crece durante el invierno y la primavera, cuando está frío y húmedo, y desarrolla hojas carnosas acintadas de, aproximadamente, 50 a 70 cm de longitud. El crecimiento se detiene completamente con los primeros días calurosos del verano. Las hojas se secan y caen y el bulbo entra en un obligado período de latencia sin verse afectado por los meses cálidos y secos del verano. Hacia mediados de esta estación surge una vara de hasta

1,5 m de altura con una espiga de flores blancas. Las primeras flores comienzan a aparecer en el sexto año de vida de la planta [Galagovsky, 1983; Gentry, 1987].

Además de los usos medicinales ya nombrados, los extractos de bulbo de *Scilla* vienen siendo usados en el control de roedores desde el siglo XIII [Chitty, 1954]. Si bien esta planta existe en dos variedades, la roja y la blanca, sólo la primera presenta toxicidad para las ratas [Winton, 1927]. Los preparados de la variedad roja son eméticos para humanos, perros, gatos y palomas. Sin embargo, las ratas y los ratones no pueden vomitar y mueren unas pocas horas después de haber ingerido dosis letales de scillirósido o de preparados de *Scilla* formulados [Verbiscar, 1986].

El bulbo y otras partes de la planta (variedad roja) contienen scillirósido (III) como bufadienólido glicosídico mayoritario. Este compuesto afecta el sistema cardiovascular y el sistema nervioso central de animales causando convulsiones y la muerte. Estudios toxicológicos realizados con ratas, a las que se les administraron diversos bufadienólidos, han establecido que el grupo 6-acetoxilo presente en el scillirósido y en su aglicona la scillirosidina (IV) contribuye sustancialmente a la toxicidad y que ambos compuestos, administrados por vía oral, presentan valores de DL_{50} similares [Verbiscar, 1986]. Sin embargo, la toxicidad del scillirósido administrado a gatos en forma intravenosa es de 0,20 mmol/kg mientras que la de la scillirosidina es de 0,12 mmol/kg [Stoll, 1950]. Esto constituye una clara indicación de que la aglicona es el metabolito tóxico activo. A pesar de que el scillirósido pueda tener actividad cardiovascular *per se*, es poco probable que pase la barrera sanguínea cerebral, mientras que los órganos animales pueden degradar el scillirósido a scillirosidina si el primero es adsorbido intacto del tracto gastrointestinal luego de una administración oral [Stoll, 1951 a].

Los extractos de *Scilla* son los más seguros de los raticidas debido a sus efectos eméticos sobre humanos y animales domésticos. Han recobrado importancia a causa de la progresiva resistencia desarrollada por las ratas a los venenos

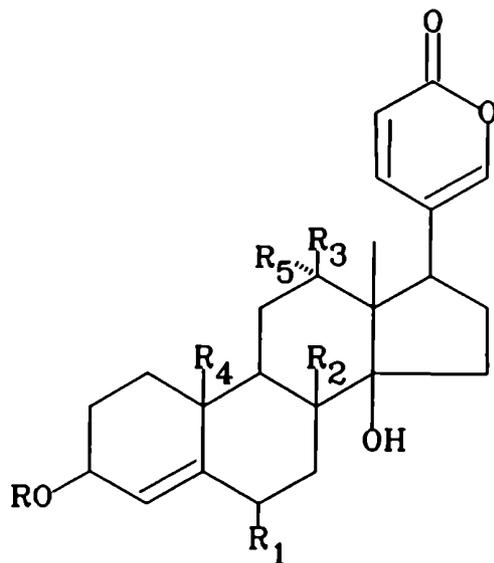
anticoagulantes de uso generalizado. La efectividad de esta planta como raticida ha sido notablemente mejorada mediante la identificación de clones altamente tóxicos (de contenido de scillirósido en bulbos $> 0,1\%$ de peso seco) y su posterior propagación vegetativa (o clonal) [Gentry, 1987]. Este trabajo trajo como consecuencia la recuperación de la importancia económica de esta planta constituyéndose en un nuevo tipo de cultivo apto para zonas semidesérticas como el sudoeste norteamericano. Este renovado interés en la *S. maritima* impulsó estudios sobre métodos de propagación alternativos a los ya conocidos métodos clonal o vegetativo y al método de semillas; habiéndose establecido una técnica para la propagación *in vitro* de esta especie [El Gragri, 1987] similar a aquellas establecidas para otras especies productoras de bulbos.

El scillirósido está presente en todas las partes celulares de la planta incluyendo hojas, pedúnculo floral, bulbo y raíces. Las hojas y el pedúnculo floral frescos presentan bajos niveles de scillirósido y menores aún cuando están secos. En cambio el contenido de scillirósido del bulbo en todas sus partes y de las raíces es consistentemente alto. Este valor (como % de peso seco) no varía con la edad de la planta, pero sí con las estaciones del año. El contenido de scillirósido en el bulbo aumenta en el verano durante el período de latencia, cuando las hojas se han secado, y alcanza su máximo durante la floración [Verbiscar, 1986]. Sobre este punto existen discrepancias ya que otros autores [Galagovsky, 1983] señalan que durante la floración el contenido de materia activa disminuye a valores mínimos correspondientes a los encontrados durante el período de hojas y, en consecuencia, postulan para los glicósidos bufadienólidos una probable función como hormona de floración.

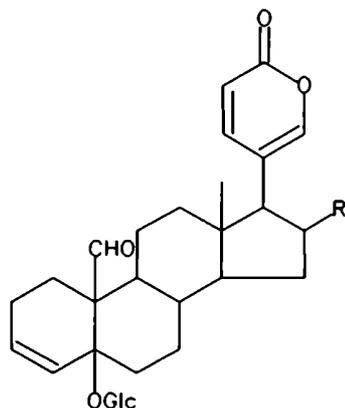
Los primeros estudios químicos sobre esta planta datan de la segunda década de este siglo. En esa época se lograron preparar extractos enriquecidos que recibieron variados nombres como ser "scillitina" [Kopaczewski, 1914], "xantoscillida" y "scillisterol" [Buschmann, 1919]. Estos estudios continuaron durante los años siguientes [Stoll, 1942] y recién a principios de la década del 50 [Stoll, 1951 b] se consiguió obtener

separaciones reproducibles de los glicósidos cardiotónicos mayoritarios mediante cromatografía en columnas de sílica gel. Llegados los años 80 con el advenimiento de la cromatografía líquida de alta resolución fue posible la determinación cuali-cuantitativa de preparados de *Scilla* [Tittel, 1980; Kirchner, 1981].

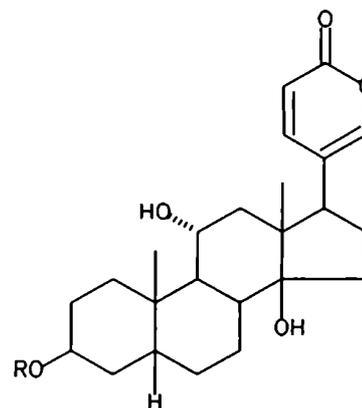
Los bufadienólidos mayoritarios presentes en esta planta son el ya nombrado scillirósido para la variedad roja y la scillaren A (V) para la variedad blanca. Otros bufadienólidos encontrados en ambas variedades son los siguientes: scillirosidina (IV), scillarenina (VI), proscillaridina (VII), scillifeósido (VIII), glucoscillifeósido (IX), β -D-scilla-reninglucósido (X), scillirubrósido (XI), scillifeosidin- β -D-glucósido (XII), 12-epi-scillifeósido (XIII), desacetil-scillirósido (XIV), scilliglaucosidin- α -L-ramnósido (XV), scillirubrosidin- α -L-ramnósido (XVI), scilliglaucósido (XVII), scillicianósido (XVIII) y gammabufotalin- α -L-ramnósido (XIX) [von Wartburg, 1964, 1966 y 1968; Lichti, 1973; Kirchner, 1981].



COMPUESTO	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
III	Glucosil	OAc	OH	H	CH ₃	H
IV	H	OAc	OH	H	CH ₃	H
V	Glucósido-ramnosil	H	H	H	CH ₃	H
VI	H	H	H	H	CH ₃	H
VII	Ramnosil	H	H	H	CH ₃	H
VIII	Ramnosil	H	H	OH	CH ₃	H
IX	Glucósido-ramnosil	H	OH	H	CH ₃	H
X	Glucosil	H	H	H	CH ₃	H
XI	Glucosil	H	OH	H	CH ₃	H
XII	Glucosil	H	H	OH	CH ₃	H
XIII	Ramnosil	H	H	H	CH ₃	OH
XIV	Glucosil	OH	OH	H	CH ₃	H
XV	Ramnosil	H	H	H	CHO	H
XVI	Ramnosil	H	OH	H	CH ₃	H



XVII R= H
XVIII R=OAc



XIX

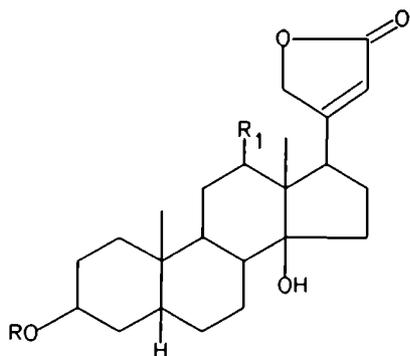
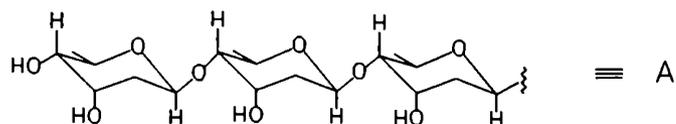
CARACTERISTICAS DE LA PLANTA *Digitalis purpurea*.

La *Digitalis purpurea* es una planta vigorosa, bianual, de un metro de altura promedio, perteneciente a la familia de las Scrophulariáceas. Posee grandes hojas ovales, tallo simple y flores tubulares de color púrpura agrupadas formando espigas terminales.

La planta tiene una gran aplicación en jardinería y por su contenido en glicósidos cardiotónicos se la ha utilizado en medicina desde el siglo XIII. Es originaria de Europa meridional y de Asia occidental. En nuestro país crece espontáneamente en los valles cordilleranos de la Patagonia, desde el lago Nahuel Huapi hasta el lago Argentino y en el parque provincial "Lagunas de Yala", región distante 30 km de San Salvador de Jujuy.

En plantas de un año de desarrollo las mayores concentraciones de cardenólidos se encuentran en las hojas más jóvenes. En el segundo año los cardenólidos se distribuyen en los órganos jóvenes de la planta, es decir flores, frutos y hojas, encontrándose también en las raíces [Evans, 1972]. Sin embargo, la cantidad total y la distribución relativa de los mismos depende de factores ecológicos, grado de desarrollo de la planta, tiempo de cosecha, etc. Movitt informa valores que oscilan entre 5 y 500 mg de digitoxina/kg de hojas secas dependiendo del lugar de origen de la planta [Movitt, 1949].

El principal glicósido de esta planta, así como también de la *Digitalis lanata*, es la digitoxina (XX) estructuralmente formada por la aglicona digitoxigenina (I) y un trisacárido A constituido por tres moléculas de digitoxosa (2,6-didesoxi-D-ribohexosa) unido a través del C-3 de la aglicona. Otros glicósidos encontrados en plantas de este género son la gitoxina (XXI) y la digoxina (XXII) formados por las respectivas agliconas gitoxigenina (XXIII) y digoxigenina (XXIV) unidas al mismo trisacárido A constitutivo de la digitoxina.



COMPUESTO	R	R ₁	R ₂
XX	A	H	H
XXI	A	H	OH
XXII	A	OH	H
XXIII	H	H	OH
XXIV	H	OH	H

BIOSINTESIS DE GENINAS ESTEROIDALES.

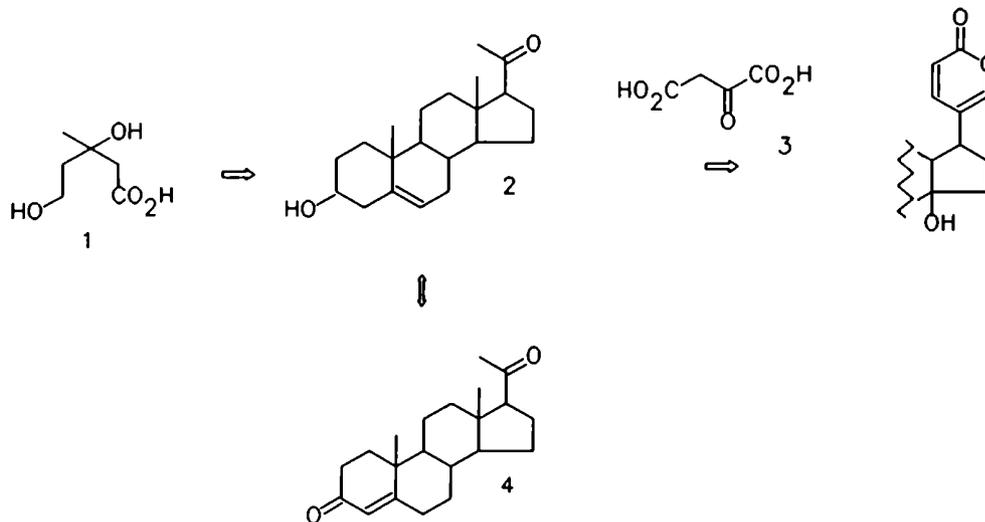
Desde los primeros años de la década del 60 y hasta nuestros días numerosos grupos de investigación se abocaron al estudio de la biogénesis de cardenólidos y bufadienólidos. La biosíntesis de cardenólidos ha sido investigada utilizando principalmente plantas del género *Digitalis*, en particular *D. lanata* y *D. purpurea*; mientras que los estudios biosintéticos de bufadienólidos de origen vegetal se han realizado en plantas *Helleborus atrorubens* y en la variedad roja de la *Scilla maritima*. Por su parte, los estudios acerca de la biosíntesis de bufadienólidos de origen animal se efectuaron en diversas especies de sapos, tales como *Bufo marinus*, *Bufo paracnemis* y *Bufo europeo*.

Dada la existencia de diversos trabajos que recopilaron los conocimientos sobre la biosíntesis de cardenólidos y bufadienólidos hasta el año 1985 [Deluca, 1985; Maier, 1985 y Garraffo, 1985] es menester citar aquí, únicamente, los antecedentes directos que permitieron plantear los objetivos del presente trabajo de tesis.

a) Bufadienólidos de origen vegetal.

A principios de la década del 70 Gros y colaboradores realizaron experiencias con la variedad roja de la *Scilla maritima*, encontrando que tanto el ácido [2-¹⁴C]-mevalónico (1) como la [20-¹⁴C]-3β-hidroxipregn-5-en-20-diona (pregnenolona) (2) se incorporaban al scillirósido (III), estableciendo de esta forma el origen biológico de 21 átomos de carbono del bufadienólido vegetal [Porto, 1970]. Años después, para determinar la procedencia de los átomos de carbono 22, 23 y 24, que completan el anillo lactónico, inocularon ejemplares de la planta nombrada con metabolitos pequeños como acetato y oxalacetato (3) marcados con ¹⁴C en distintas posiciones; demostrando que este último era el donante de los carbonos necesarios para armar el anillo lactónico de 6 miembros [Galagovsky, 1984].

En síntesis, los conocimientos adquiridos hasta el año 1985 sobre la biosíntesis de bufadienólidos en vegetales pueden resumirse en el esquema 1.



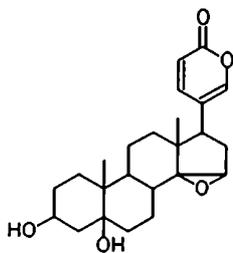
Esquema 1: Camino biosintético de los bufadienólidos de origen vegetal.

En un trabajo no citado en las recopilaciones mencionadas anteriormente se comprobó, mediante la inoculación de [4-¹⁴C]-

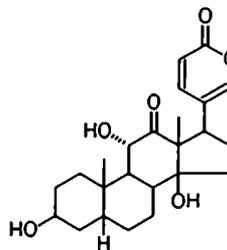
pregn-4-en-3,20-diona (progesterona) (4) en bulbos de *Scilla maritima* y el aislamiento posterior de diversos bufadienólidos marcados, que la progesterona es la sustancia precursora de bufadienólidos que como el scillifeósido (VIII) poseen una doble ligadura 4-5, y también de otros que presentan un doble enlace 3-4 como el scillicianósido (XVIII) [Kopp, 1983]. En este mismo trabajo se encontró también que las hojas de la planta citada son capaces de biosintetizar bufadienólidos. En efecto, la aplicación de [2-¹⁴C]-acetato de sodio a hojas verdes separadas de la planta permitió aislar bufadienólidos radioactivos luego de dos semanas de incubación. En conexión con esto, los autores atribuyeron el hallazgo de marcación en bufadienólidos aislados de hojas y del bulbo, luego de inocular el bulbo de una planta intacta con [2-¹⁴C]-acetato de sodio, al transporte del precursor y la consecuente síntesis en las partes aéreas de la planta. Es poco probable, señalaron, la translocación de bufadienólidos marcados fuera del bulbo hacia las hojas verdes. Los autores presentan también otros resultados, respecto de los probables precursores de diversos bufadienólidos hidroxilados en el anillo esteroidal, que escapan de los objetivos de la presente discusión.

b) Bufadienólidos de origen animal.

A fines de los años 60 y principios de los 70 distintos grupos de investigadores comprobaron mediante inyecciones de, por un lado, [4-¹⁴C]-pregnenolona a sapos *B. marinus* [Chen, 1969] y, por otro, [20-¹⁴C]-pregnenolona a sapos *B. paracnemis* [Porto, 1970] y aislamiento de marinobufagina (XXVI) no radioactiva, que el anillo lactónico de los bufadienólidos de origen animal, a diferencia de lo hallado para sus homónimos vegetales, no tenía su origen en un derivado esteroidal del tipo 20-ceto-pregnano.



Marinobufagina (XXVI)



Arenobufagina (XXVII)

En una experiencia posterior Gros y colaboradores inocularon [20-¹⁴C]-colest-5-en-3β-ol (colesterol) (5) a sapos *B. paracnemis* y, al cabo de 78 y 107 días, aislaron marinobufagina marcada en el carbono 20 según verificaron mediante experiencias degradativas posteriores [Porto, 1971; 1972]. Este resultado, sumado al anterior, forzó la suposición de que, en el caso de los sapos, el colesterol podría ser transformado inicialmente en un intermediario con estructura de ácido biliar, por ruptura de la cadena lateral entre los carbonos 24 y 25, el cual tendría todos los carbonos necesarios para formar el anillo α-pirona sin necesidad de unidades adicionales.

Con el objetivo de verificar esta hipótesis, el grupo de Gros inyectó, en experiencia separadas, [24-¹⁴C]-colesterol y ácido [24-¹⁴C]-3β-hidroxicol-5-énico (6) a sapos *B. paracnemis* encontrando resultados negativos en ambos casos [Garraffo, 1982]. Estos llevaron a descartar la hipótesis del precursor con cadena lateral de ácido biliar y a reconsiderar la posibilidad de que en animales el proceso biosintético transcurriera a través de un intermediario del tipo 20-ceto-pregnano, pero estructuralmente más cercano al producto final que la pregnenolona. Para ello, el mismo grupo de trabajo inoculó [20-¹⁴C]-5β-pregnanolona (7) a sapos *B. paracnemis* obteniendo nuevamente resultados negativos que corroboraban los resultado anteriores en el sentido de que los compuestos del tipo 20-ceto-pregnanos con insaturación 5,6 o aun con sistemas A/B cis no son intermediarios en el proceso biogénico o no pueden acceder al lugar de biosíntesis.

Por otra parte, inocularon sapos *B. arenarum* con [21-¹⁴C]-

5 β -pregnanolona y [21-¹⁴C]-5 β -coleston-3 β -ol (coprostanol) (8) encontrando, nuevamente, la falla del compuesto del tipo 20-ceto-pregnano para actuar como precursor de los bufadienólidos, ya que ni siquiera llegó a la glándula parótida pues se comprobó que el veneno aislado era totalmente inactivo; mientras que el coprostanol resultó incorporado en la arenobufagina (XXVII) luego de un lapso considerable desde la inoculación [Garraffo, 1985].

Estos resultados unidos a otros logrados por el mismo grupo de trabajo con cultivos de tejido de glándula parótida e hígado [Santa Coloma, 1984] pueden racionalizarse como se esquematiza en la figura 1.

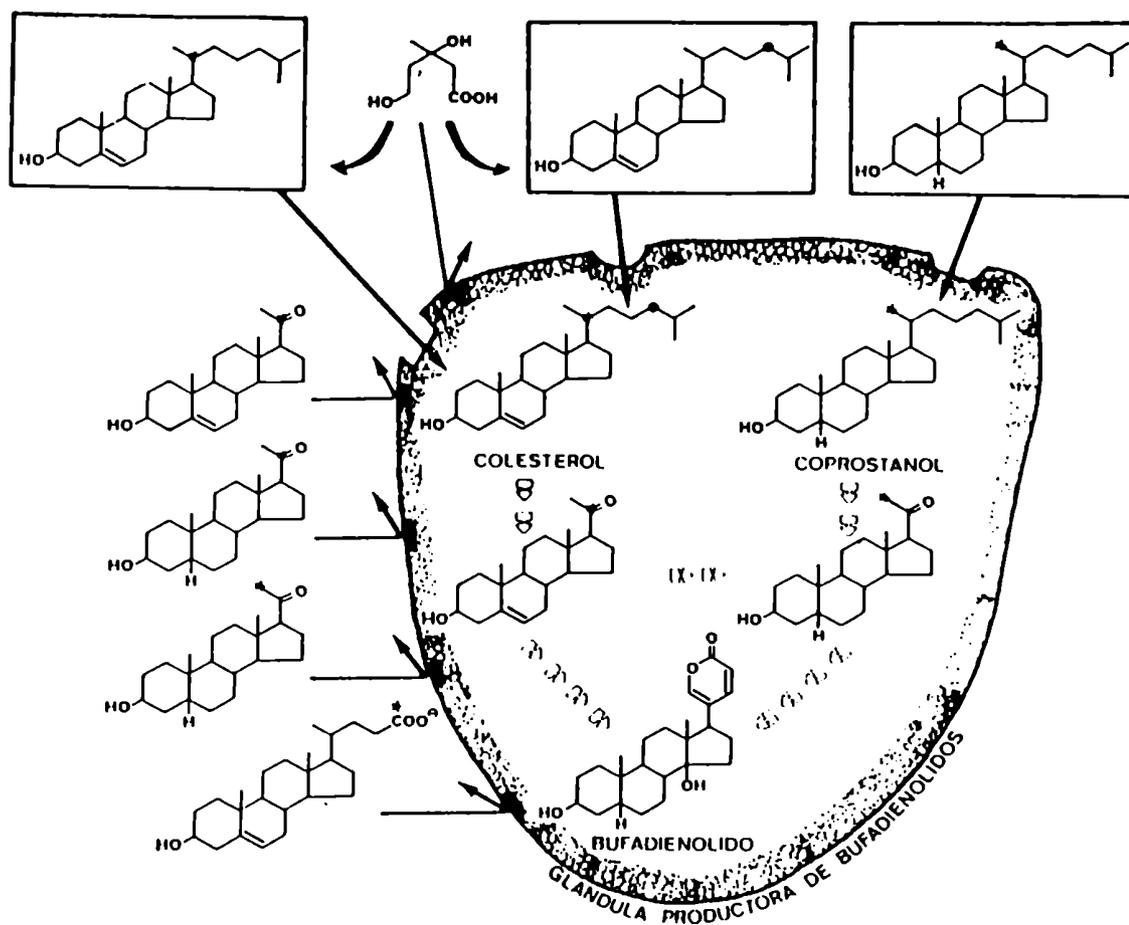
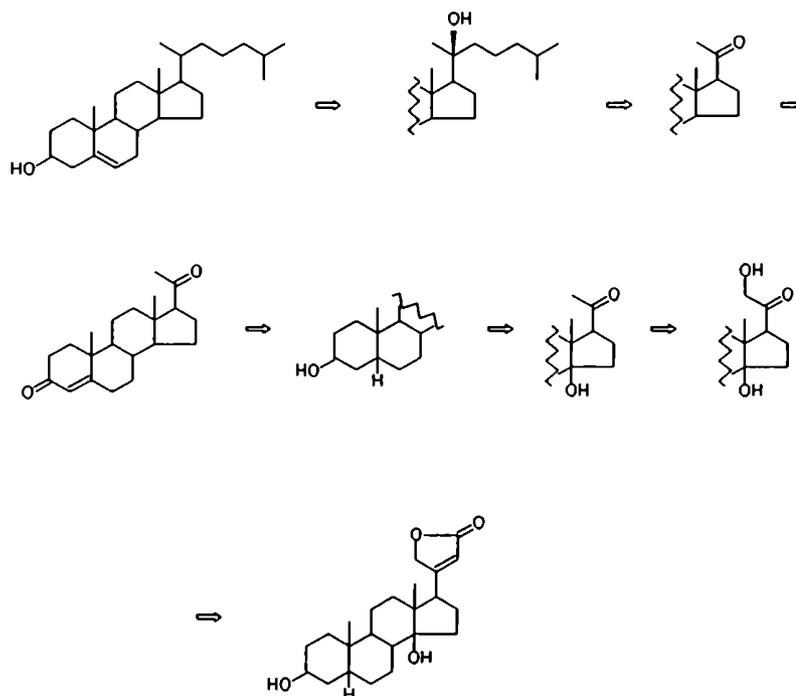


Figura 1: Mecanismo de la biogénesis de bufadienólidos en sapos. Los pasos postulados en el interior de la glándula no han sido aún demostrados.

Se acepta que la glándula *per se* no biosintetiza colesterol sino que lo toma de otras fuentes y que para acceder al sitio de biosíntesis de bufadienólidos existe un requerimiento estructural, formalmente una cadena lateral de tipo colesterol. Este esteroide o un compuesto muy relacionado puede ser transformado en bufadienólidos, ya en el interior de la glándula, por una vía aun no aclarada pero muy probablemente a través de un 20-ceto-pregnano, dados los resultados positivos encontrados con [20- 14 C]-colesterol y negativos con [24- 14 C]-colesterol [Gros, 1986].

c) Cardenólidos.

Los resultados obtenidos hasta los primeros años de la década del 70 en el estudio de la biosíntesis de cardenólidos en plantas del género *Digitalis* pueden resumirse en forma general en la secuencia por etapas que se presenta en el esquema 2.

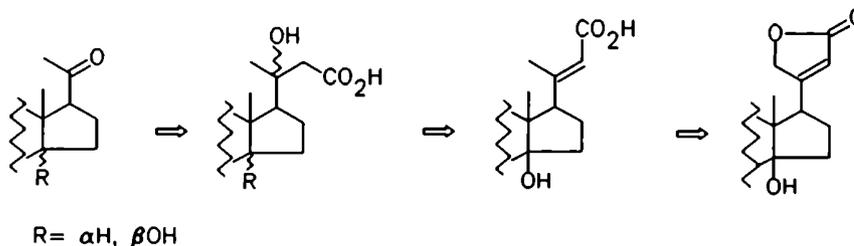


Esquema 2: Posible camino biosintético de cardenólidos en *Digitalis*.

Este camino biosintético, postulado fundamentalmente en base a los trabajos de Caspi y Tschesche [Caspi, 1967; Tschesche, 1971], mantenía oscuros dos puntos importantes en los pasos finales del mismo.

Uno de ellos era el proceso de hidroxilación en la posición 14 β discutido extensamente por otros autores [Deluca, 1985; Maier, 1985] y el otro comprendía a la secuencia de funcionalizaciones sobre el derivado 20-ceto-pregnano, es decir, la hidroxilación de C-21, la condensación con una molécula de acetato (activada como acetil-CoA) y el posterior cierre del anillo lactónico.

Gros y colaboradores especularon con la posibilidad de que la formación del anillo butenólido siguiera un orden inverso al planteado anteriormente, es decir que la condensación con una molécula de acetato e incluso la posterior deshidratación del β -hidroxiácido resultante ocurrieran con anterioridad a la hidroxilación de C-21, según el esquema 3.

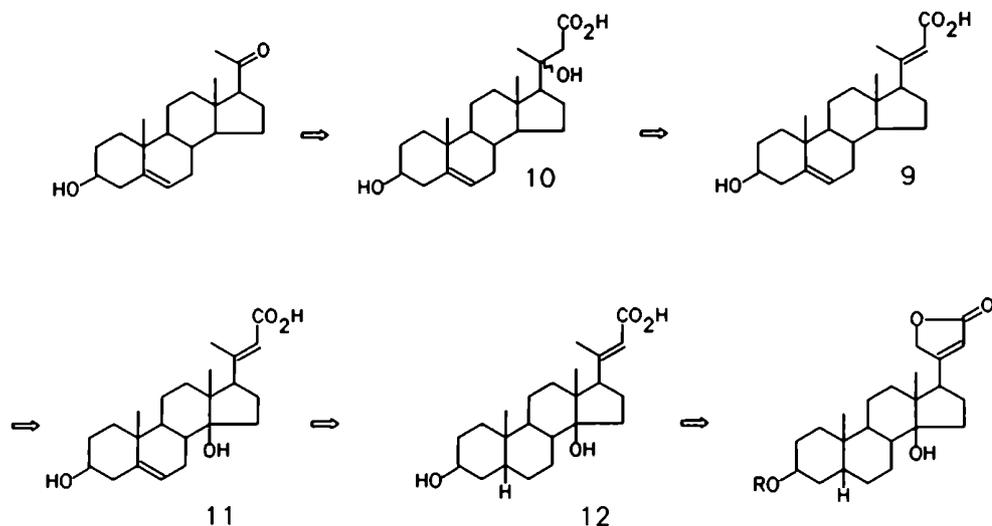


Esquema 3: Camino alternativo para la biosíntesis del anillo butenólido.

Con este fin prepararon una serie de β -hidroxiácidos y de ácidos α - β insaturados del tipo indicado, marcados todos con 14 C en el carbono carboxílico, con diferencias estructurales en los anillos A y B del esqueleto esteroidal tales como 3 β -hidroxi-5-eno, 3-ceto-4-eno y 3 β -hidroxi-5 β ; y los inyectaron en ejemplares intactos de la planta *D. purpurea*.

En base a los diferentes valores de incorporación de todos los precursores inoculados postularon la "ruta de los ácidos norcolánicos", como alternativa a la "ruta de los pregnanos",

para la biosíntesis de cardenólidos en plantas del género *Digitalis* (esquema 4).



Esquema 4: Ruta de los ácidos norcolánicos.

Sustentaron esta secuencia en los valores de incorporación del ácido [23- ^{14}C] 3β-hidroxi-23-norcol-5,20(22)(E)-diénico (9) en los tres glicósidos cardiotónicos, que fueron muy superiores a los encontrados para el ácido [23- ^{14}C] 3β,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico (10). La postulación en este camino de los ácidos 3β,14β-dihidroxi-23-norcol-5,20(22)(E)-diénico (11) y 3β,14β-dihidroxi-23-nor-5β-col-20(22)(E)-énico (12) es, aunque lógica, hipotética ya que no fueron probados directamente [Maier, 1985].

El mismo grupo aportó una prueba adicional en favor de esta ruta cuando administraron una mezcla de ácido [21- ^3H]-3β,20ε-dihidroxi-23-nor-5β-colánico (13) y [21- ^{14}C]-3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (14) a ejemplares intactos de *Digitalis purpurea*, y aislaron digitoxina (XX) doblemente marcada que presentaba una relación $^3\text{H}:^{14}\text{C}$ considerablemente mayor que la relación $^3\text{H}:^{14}\text{C}$ de los sustratos. Este resultado indicó que, en el camino biosintético principal desde un 20-ceto-pregnano a un cardenólido, la introducción de una unidad de acetato en el C-20 debe ocurrir antes de la hidroxilación en C-21 [Deluca, 1989].

EL USO DE ISOTOPOS ESTABLES EN ESTUDIOS BIOSINTETICOS.

El crecimiento explosivo de nuevas técnicas en espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa ha sido seguido por su aplicación, juntamente con el marcado con isótopos estables, en el estudio de las transformaciones bioquímicas. La asignación completa de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C de un producto natural es usualmente un prerequisite para llevar a cabo un experimento de biosíntesis con isótopos estables. Actualmente existe una variedad creciente de nuevas secuencias de pulsos que permiten simplificar la asignación. La elección de la técnica apropiada dependerá del tipo de información que se está buscando, del equipo disponible, del tamaño de la muestra etc. Generalmente, luego de la adquisición del espectro protónico normal y del espectro de ^{13}C desacoplado de ^1H , la secuencia más útil sería: i) determinación del esquema completo de acoplamiento protón-protón por correlación homonuclear de los desplazamientos químicos de ^1H (ej., COSY); ii) determinación del número de átomos de hidrógeno que están unidos a cada carbono por experimentos de transformada de Fourier de ecos de spin (SEFT) o de transferencia de polarización (DEPT: transferencia de polarización reforzada sin distorsión) iii) determinación de los protones que están unidos a un átomo de carbono particular (correlación heteroescalar de desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C); y si se dispone de muestra en cantidades suficientes (un mínimo de 0,5 mmol) iv) determinación del patrón completo de conectividades de carbonos por correlación homonuclear de desplazamientos químicos de ^{13}C (ej., 2D-INADEQUATE) [Veders, 1987]. Otro método bien establecido para la identificación de las resonancias de los carbonos es la sustitución de hidrógenos por deuterios [Garson, 1979; Stothers, 1974].

Estudio del origen del esqueleto carbonado mediante el marcado con ^{13}C .

Las limitaciones instrumentales combinadas con la baja abundancia natural del ^{13}C (1,108%) y su pequeño radio magnetogírico ($6,72 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y por lo tanto baja sensibilidad, demoró la aplicación de la RMN ^{13}C al trabajo biosintético hasta 1970 [Tanabe, 1970]. Antes de esa fecha, mientras los precursores marcados con ^{13}C se hacían accesibles, la RMN ^1H se empleó en numerosos estudios de biosíntesis para observar el acoplamiento ^1H - ^{13}C debido al núcleo de carbono isotópicamente enriquecido [Tanabe, 1973]. Los avances instrumentales subsecuentes que permitieron la adquisición rápida y sensitiva de espectros de RMN ^{13}C , han hecho poco frecuente el empleo de esta técnica, pero puede haber un renacimiento de la misma con la reciente introducción de métodos de pulsos que producen espectros de RMN protónica que contienen solamente los picos acoplados [Doddrell, 1984]. A pesar de ser inherentemente más complicada que los espectros usuales de RMN ^{13}C desacoplados de ^1H , esta aproximación requiere solamente un tercio de la cantidad de muestra y no necesita la asignación de las señales en el espectro de carbono-13.

En casos en que el material es insuficiente aún para un espectro de RMN protónico, la espectrometría de masa ofrece una alternativa poderosa para la detección de ^{13}C . Tiene también la ventaja de que el número de átomos isotópicos por molécula puede ser fácilmente determinado [Rinehart, 1983]. La limitación histórica que constituía la insuficiente volatilidad de una muestra ha sido largamente eliminada por el advenimiento de sistemas de ionización suaves como FAB (bombardeo con átomos acelerados) [Fenselau, 1984]. La alta sensibilidad de las técnicas de espectrometría de masa es también ventajosa en experimentos biosintéticos con plantas superiores, ya que estas usualmente producen pequeñas cantidades de los metabolitos que son de interés y las velocidades de incorporación son generalmente bajas. Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones donde las velocidades de incorporación son razonablemente altas, el uso de la espectroscopía de RMN ^{13}C para

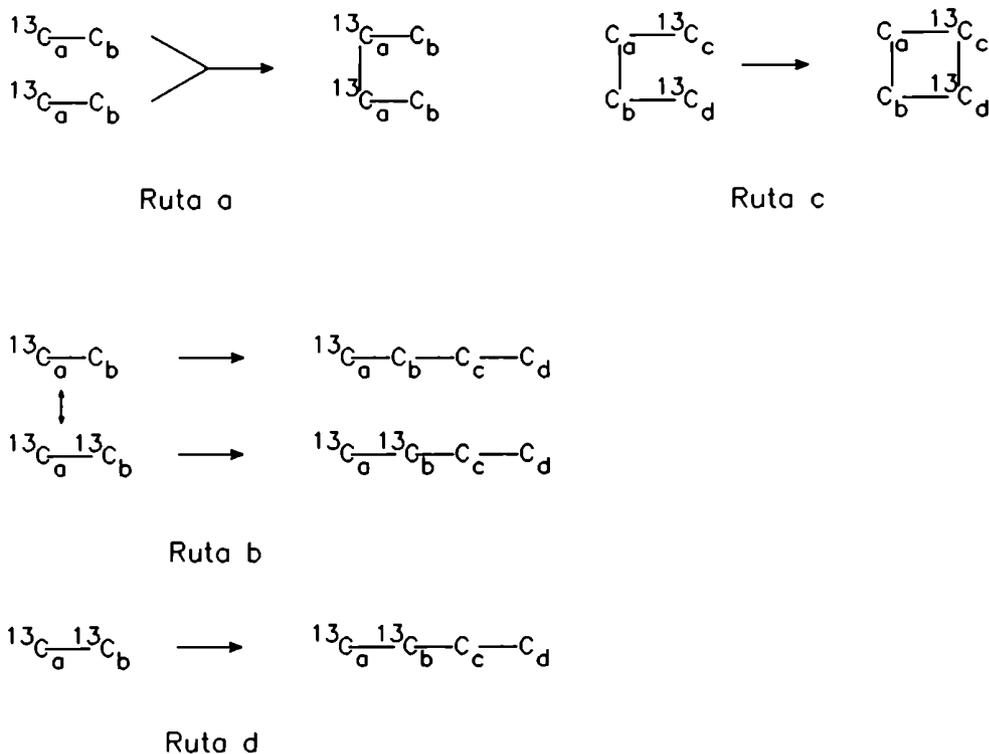
detectar incrementos en las señales es generalmente el medio más efectivo de localizar la posición y naturaleza del carbono marcado.

Actualmente es plausible sintetizar precursores altamente enriquecidos con ^{13}C (>90%) en posiciones específicas. Si el precursor marcado con ^{13}C es incorporado al producto natural final el carbono enriquecido en este compuesto tendrá una señal incrementada en su espectro de RMN ^{13}C . Como la intensidad de las señales de RMN son algo variables este método sólo funciona cuando la incorporación específica del compuesto administrado conduce a un incremento de la señal de RMN de, por lo menos, 30-40% [Leete, 1980]. Este método que usa precursores marcados con un único átomo de ^{13}C ha sido usado extensamente en el estudio de productos naturales microbianos [Puar, 1985; Chiu, 1984], con cultivos de células vegetales [Inoue, 1984] y con sistemas libres de células [Hollander, 1983], ya que estos sistemas muestran altas incorporaciones específicas.

La abundancia natural de átomos de ^{13}C contiguos es de sólo $1,11 \times 1,11\% = 0,0123\%$, por lo tanto se puede tolerar una dilución mucho mayor del precursor administrado si se marca con átomos de ^{13}C contiguos. Esto dará lugar, en el espectro de RMN ^{13}C , a picos satélites (debidos al acoplamiento spin-spin) localizados alrededor del singulete central que proviene de la abundancia natural de ^{13}C y de la incorporación de especies monomarcadas. Como ejemplos de precursores doblemente marcados tenemos al ácido acético- $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, que es actualmente el precursor más usado para determinar si un producto natural es un policétido o no, y al ácido mevalónico doblemente marcado que ha sido empleado en estudios sobre la biosíntesis de terpenos [Cane, 1976] y del colesterol [Popjak, 1977].

Como el carbono-13 tiene un spin de $1/2$ y las constantes de acoplamiento carbono-carbono a un enlace son mucho más grandes que las constantes de dos o tres enlaces, la espectrometría de RMN de ^{13}C es un método ideal para detectar carbonos marcados adyacentes en un metabolito secundario. Existen diversas maneras en las que pueden manifestarse estos acoplamientos (esquema 5):
i) dos moléculas del precursor monomarcado pueden formar un nuevo

enlace en el producto (ruta a); ii) un precursor monomarcado puede ser metabolizado por un camino secundario a una forma con doble marca (ruta b); iii) un precursor doblemente marcado en el cual los átomos de ^{13}C están aislados puede formar un enlace entre ellos (ruta c); y iv) un precursor doblemente marcado en el cual los átomos de ^{13}C están adyacentes puede ser incorporado intacto (ruta d). Está naturalmente presente durante la biosíntesis una reserva de precursor "no marcado" (1,1 % de ^{13}C) suficiente como para que las rutas a y b conduzcan, invariablemente, a una concentración de moléculas del producto doblemente marcadas en carbonos adyacentes mucho más baja que las rutas c y d. Esta dilución usual del precursor marcado con ^{13}C permite el "marcado de enlaces"; esto es, una alta concentración de especies acopladas en el producto indica, generalmente, que los enlaces entre los átomos de ^{13}C en el precursor doblemente marcado no han sido escindidos para dar fragmentos separados. Este concepto fue aplicado por primera vez en 1973 estudiando la incorporación de ^{13}C de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -acetato en policétidos (dihidrolatumicidina y mollisina) para identificar unidades intactas de acetato [Seto, 1973]. Actualmente este es el experimento biosintético más ampliamente difundido. El concepto de enlaces marcados se puede extender con facilidad a otras combinaciones de núcleos (por ejemplo ^{13}C y ^2H , ^{13}C y ^{18}O , ^{13}C y ^{15}N) que originen interacciones visibles en el espectro de RMN, como ser acoplamientos o desplazamientos isotópicos.



Esquema 5: Posibles orígenes de los patrones de acoplamiento en los espectros de RMN de ^{13}C de metabolitos marcados.

CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES PARA ESTUDIOS BIOSINTETICOS.

La idea de cultivar células vegetales *in vitro* surgió a comienzos de este siglo. Sin embargo, los primeros experimentos exitosos en el cultivo de células vegetales no organizadas durante tiempos prolongados fueron informados recién en 1939 en forma independiente por White, quién trabajó con el híbrido *Nicotiana glauca* x *N. langsdorfii* [White, 1939]; y por Gautheret quién usó zanahoria [Gautheret, 1939]. Ellos establecieron los fundamentos de la técnica en uso en nuestros días.

Cultivar tejidos vegetales consiste en desarrollar órganos, tejidos o células vegetales *in vitro*, mediante un cierto número de técnicas. Los cultivos de órganos, por ejemplo raíces aisladas, hojas, flores etc., retienen la organización del órgano

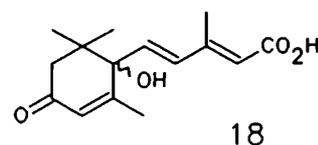
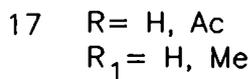
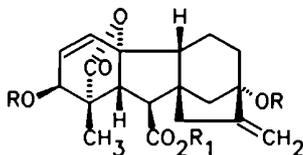
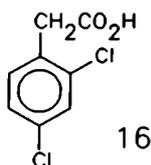
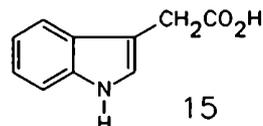
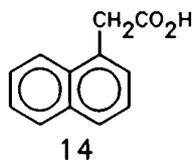
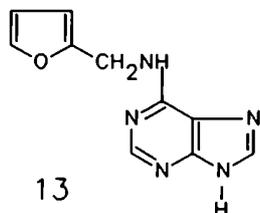
intacto; y los cultivos de callos (o cultivos de tejidos) forman una masa de células no organizadas. Estos últimos son específicos de cada especie, tanto en su morfología como en su bioquímica, pero pueden ser derivados de diferentes partes de la misma planta. Otra propiedad de los callos de interés en estudios biosintéticos es su capacidad, en respuesta a ciertos estímulos, de regenerar plántulas intactas las que, a diferencia de los callos, usualmente se asemejan a las plantas originales en su metabolismo secundario.

Las técnicas de cultivo de tejidos requieren de condiciones rigurosamente asépticas debido a que los cultivos de tejido vegetal sucumben rápidamente a las infecciones por bacterias, hongos o virus. Los medios nutrientes y los sustratos termolábiles se esterilizan mediante autoclave y filtración a través de filtros para bacterias respectivamente. Un procedimiento común para iniciar un callo consiste en germinar una semilla esterilizada y seccionar asépticamente de la plántula resultante una porción del tejido del tallo, raíz u hoja. Esta se coloca en la superficie de un medio nutriente solidificado con agar, que contiene hormonas de crecimiento (auxinas y citokininas) las que promueven la formación del tejido indiferenciado. El callo se forma dentro de las dos o tres semanas siguientes como una masa de tejido esponjoso o friable según el caso, crecida sobre el explanto original. Este callo puede ser subcultivado transfiriendo periódicamente una porción del mismo a un medio nutriente fresco, a intervalos de 2 a 3 semanas. De esta forma se pueden mantener líneas celulares durante años o décadas, pero el subcultivo continuado provoca, en algunos casos, cambios genéticos con indeseables modificaciones bioquímicas consecuentes.

Los cultivos de células en suspensión se obtienen rápidamente transfiriendo el callo crecido en agar a medio líquido (generalmente de la misma composición pero careciente de agar) y manteniendo bajo continua agitación la suspensión resultante la cual consiste en una mezcla de pequeños agregados celulares y células aisladas. El tiempo requerido para obtener un callo y un cultivo de células en suspensión es muy variable y

depende primariamente del tejido original transplantado (el explanto) y de la composición del medio de cultivo. Tanto los callos como las células en suspensión pueden ser obtenidos a partir de numerosas especies. La facilidad con la que un cultivo puede ser iniciado varía con el tipo de planta y el origen del tejido. En la actualidad la mayoría de los métodos en uso dan mejores resultados con plantas que poseen semillas. La velocidad de crecimiento de los cultivos en suspensión es generalmente mayor que en agar y produce un material celular más uniforme fisiológicamente debido a que la mayoría de las células están rodeadas por el medio de cultivo. Estos son también preferibles a los cultivos estáticos para las experiencias biosintéticas dado que ellos facilitan la administración de precursores tanto como la extracción de productos.

Han sido descriptos numerosos medios de cultivo pero la gran mayoría de ellos responden a unos pocos tipos básicos, como por ejemplo el de White [White, 1963] y el de Murashige-Skoog [Murashige, 1962], con modificaciones menores. A pesar de que los medios enteramente sintéticos son efectivos en muchos casos, la inclusión de leche de coco, hidrolisado de caseína o extracto de levadura es una práctica común. Los reguladores de crecimiento de uso generalizado son 6-N-furfurilamino-purina (kinetina) (15), ácido α -naftalenacético (NAA) (16), ácido 3-indolacético (IAA) (17), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (18), gibberelinas(19) y ácido abscísico (20).



Estas sustancias tienen profundos efectos en el crecimiento del cultivo, la producción de metabolitos y la diferenciación y son variadas empíricamente según el fin deseado.

Un obstáculo de envergadura en el estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas superiores intactas ha sido el muy frecuente bajo nivel, o en ocasiones la imposibilidad total, de incorporación del precursor. La causa básica de esto parece ser el fracaso en el transporte de precursores en su manera apropiada al sitio de biosíntesis y esto podría derivar de una variedad de factores que incluyen problemas de permeabilidad, translocación y segregación de las fuentes

metabólicas. Los cultivos de tejido poseen una organización global más simple de modo tal que, comparados con las plantas intactas, estos problemas pueden ser simplificados en gran medida. Más aún, ellos pueden desarrollarse y ser mantenidos bajo condiciones nutricionales y ambientales estrictamente controladas y reproducibles. Por lo tanto no están sujetos a las incertezas sobre clima y tipo de suelo ni a las variaciones estacionales. La necesidad de esterilidad rigurosa posee la ventaja automática de asegurar que los procesos metabólicos bajo observación son promovidos por el tejido vegetal y no por microorganismos asociados al mismo, una condición que no puede encontrarse con certeza en el trabajo con plantas intactas. También se ha encontrado que los sistemas activos libres de células y las preparaciones de enzimas purificadas pueden obtenerse rápidamente de estos cultivos de tejido, posiblemente por la ausencia de sustancias que, como los fenoles y las quinonas, son responsables de la inactivación de las enzimas en el curso de su extracción a partir de las plantas intactas [Overton, 1977]. Por otra parte, es un atractivo particular en los estudios biosintéticos que la incorporación y la evolución de precursores marcados pueda ser estudiada en períodos muy cortos, característica brindada por los cultivos de tejido.

A pesar de estos rasgos ideales el uso de cultivos de tejidos para los estudios biosintéticos no ha sido explotado debidamente. Existen de hecho dos buenas razones para ello. La primera surge de los problemas técnicos asociados con la iniciación y el mantenimiento de cultivos estériles y los tiempos largos, muchas veces años, que pueden ser necesarios para establecer un sistema que manifieste un buen crecimiento y una buena actividad metabólica. Pero el inconveniente más serio es que muchos cultivos no sintetizan nada de los compuestos característicos de la planta de la que fueron derivados o lo hacen en cantidades insignificantes. Esta incapacidad puede deberse en algunos casos a una pérdida de la información genética después de un cultivo prolongado, pero es improbable en otros donde ha sido demostrado que las células eran totipotentes, es decir que poseían toda la información necesaria para el

funcionamiento y replicación de la planta entera incluyendo su metabolismo secundario. Es más probable que el fracaso en producir metabolitos secundarios sea una consecuencia de propiedades morfológicas y fisiológicas especiales de los cultivos de tejido. En realidad las técnicas y los procedimientos de cultivos de tejido han sido diseñados para mantener a las células en el estado de división, el cual tiende a limitar la diferenciación celular y el desarrollo de sistemas de tejidos organizados. Los ejemplos extremos se ven con los cultivos en suspensión "ideales" que están compuestos por células de un solo tipo y pequeños agregados de células parenquimáticas. Como la síntesis de muchos productos secundarios está asociada tanto con tipos celulares diferenciados especiales como con sistemas de tejidos organizados, no es sorprendente que algunos metabolitos secundarios no sean producidos en cultivos. Uno de los principales factores que determina si un metabolito particular es acumulado o no es la cercanía de la relación entre la producción del compuesto y estructuras diferenciadas en la planta intacta. Otros factores, como luz, temperatura, hormonas vegetales y disponibilidad de precursores que son factores que influyen en la producción de metabolitos secundarios en plantas intactas, deben tomarse en cuenta, pero usualmente no constituyen problemas insuperables [Butcher, 1977].

La razón por la cual la diferenciación es importante para la biosíntesis de metabolitos secundarios es al presente materia de especulación. Sin embargo, es probable que factores como el arreglo espacial de las enzimas, la presencia de organelas específicas, la compartimentalización de enzimas y sustratos, y los lugares disponibles para la deposición, determinen que un compuesto específico sea producido o no. Por ejemplo, la compartimentalización puede ser importante para separar enzimas degradativas de los metabolitos acumulados, ya que es bien sabido que los tejidos intactos a menudo poseen enzimas capaces de degradar los metabolitos que ellos producen. Similarmente, un lugar adecuado para la deposición, por ejemplo paredes celulares o vacuolas celulares, puede ser esencial para la acumulación de productos, particularmente cuando estos productos son tóxicos

para el citoplasma. Si los tejidos cultivados no forman las estructuras donde los materiales tóxicos son normalmente depositados, sólo sobrevivirán aquellas células que produzcan niveles no tóxicos de esos compuestos. Si esto es correcto, los procedimientos de cultivo pueden seleccionar células que no tengan la capacidad de acumular cantidades significativas de los productos deseados. En algunos casos este problema puede ser solucionado si el medio líquido sirve como un lugar alternativo para la deposición de compuestos tóxicos. Como ejemplo están los cultivos en suspensión de *Andrographis paniculata* que excretan al medio las paniculidas tóxicas [Butcher, 1971].

En contraste con las posibilidades discutidas arriba, la síntesis de productos secundarios puede a veces ser parte de un programa de diferenciación de un tipo celular particular y no dependiente de la estructura resultante de la célula. Si este es el caso, entonces puede ser posible seleccionar mutantes en los cuales el camino metabólico "requerido" esté separado del programa de diferenciación con el cual está normalmente asociado. Las cepas altamente pigmentadas de *Haplopappus gracilis* pueden representar mutantes de este tipo [Stickland, 1972].

Con algunos metabolitos secundarios la organización real de los tejidos puede ser importante, particularmente cuando los precursores y los productos son sintetizados en diferentes tejidos del mismo órgano o en diferentes órganos. Se puede visualizar que un arreglo particular de tejidos facilitará el transporte de precursores y en consecuencia influirá en la síntesis del producto final.

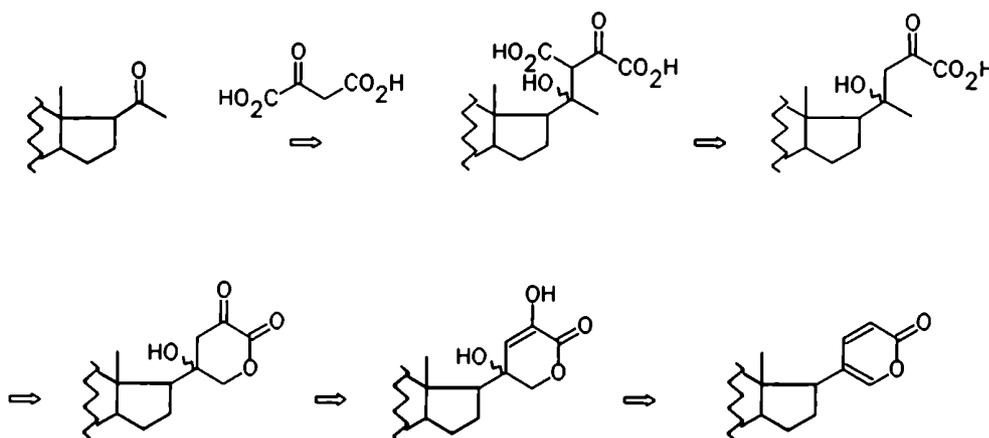
La diferenciación y la organización de los tejidos no son los únicos factores que influyen en la síntesis de metabolitos secundarios. Factores ambientales, como la luz, pueden tener una marcada influencia en la producción de ciertos metabolitos secundarios [Kreuzaler, 1973]. Los constituyentes del medio de cultivo, particularmente las hormonas vegetales, tienen en muchos casos un efecto dramático en el tipo y el patrón de los compuestos producidos. Sin embargo, no siempre es fácil decidir si estos efectos son directos o resultan de la acción de estos compuestos en el crecimiento y en la diferenciación.

El descubrimiento que ciertos cultivos de tejido producen compuestos que no habían sido descriptos previamente, como por ejemplo las paniculidas y la rutacultina fue inesperado, pero sugiere que los cultivos pueden conformar una importante fuente de nuevos compuestos [Butcher, 1971; Steck, 1971].

OBJETIVOS

El objetivo inicial del presente trabajo de tesis fue el estudio de las transformaciones biosintéticas de bufadienólidos, a nivel del anillo α -pirona, mediante el seguimiento por espectrometría de RMN ^{13}C de precursores del tipo 20-ceto-pregnanos doblemente marcados con ^{13}C en C-20 y C-21, los que serían inoculados en cultivos de tejido de la planta *Scilla maritima*.

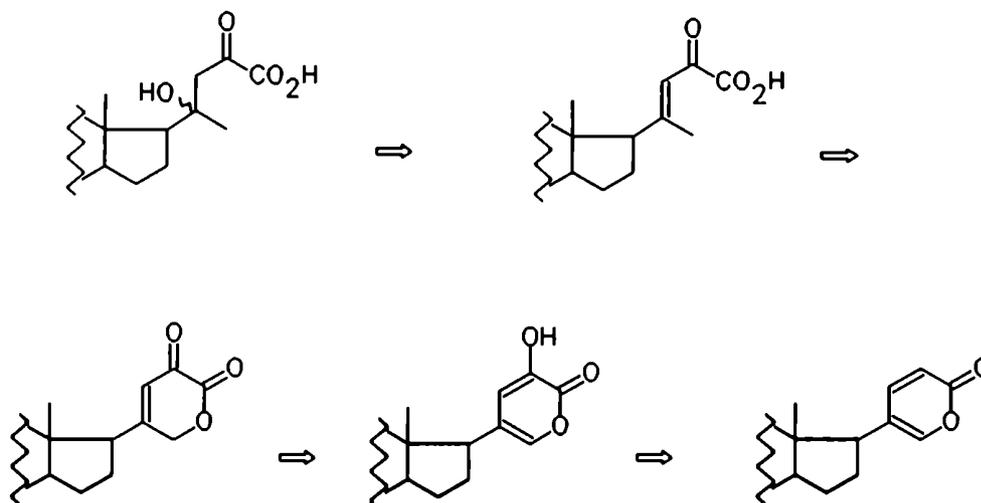
Este objetivo general surgió como consecuencia natural de la inspección del camino biosintético esbozado en el esquema 1 (ver página 11), que no aclara el mecanismo de formación del anillo α -pirona distintivo de los bufadienólidos. Se puede postular al respecto la hipótesis de la adición del ácido oxalacético al carbonilo en C-20 del 20-ceto-pregnano, seguida de una descarboxilación y cierre del anillo lactónico (esquema 6).



Esquema 6: Mecanismo hipotético de formación del anillo α -pirona en bufadienólidos vegetales.

La reducción del grupo carbonilo presente en el anillo y la pérdida de dos moléculas de agua conduciría, finalmente, al anillo α -pirona [Galagovsky, 1983].

A partir del paso de descarboxilación surge una alternativa químicamente lógica al mecanismo anterior. Esta consiste en la deshidratación del intermediario 20-hidroxiado para dar el alqueno conjugado, el que previa hidroxilación alílica sobre C-21 cerraría el anillo lactónico. La enolización de la α -cetolactona y la posterior reducción del hidroxilo enólico originarían el anillo α -pirona de acuerdo al esquema 7.



Esquema 7: Mecanismo hipotético alternativo de formación del anillo α -pirona.

Teniendo en cuenta que las plantas intactas brindan sistemas experimentales poco adecuados para la observación o captura de intermediarios de vida transitoria durante un proceso biosintético, tales como los sugeridos en los esquemas 6 y 7, se decidió desarrollar cultivos de tejido de la planta *Scilla maritima*. Coincidentemente, se encaró la síntesis de $[20,21]$ - $^{13}\text{C}_2$ -progesterona cuya evolución en el medio de cultivo, seguida mediante espectrometría de RMN ^{13}C , permitiría elucidar el mecanismo en cuestión.

Como se verá en el capítulo II, las condiciones para la iniciación y el mantenimiento de los cultivos nombrados resultaron harto dificultosas, no lográndose resultados útiles para los propósitos señalados. Esto significó el cambio del objetivo original en búsqueda de sistemas biológicos más sencillos de preparar y mantener para realizar experiencias de seguimiento mediante RMN ^{13}C del precursor indicado, preparado a la sazón.

Recordando la discrepancia existente en el mecanismo de formación del anillo butenólido de los cardenólidos entre la ruta de los pregnanos y la ruta de los ácidos norcolánicos (ver introducción), y observando la enorme potencialidad de la [20,21- $^{13}\text{C}_2$]-progesterona de aportar luz sobre esta cuestión, se pensó en los homogenatos de hojas de *Digitalis purpurea* como sistema biológico adecuado para el estudio del mecanismo biosintético de marras.

Como se explicará en detalle más adelante, los numerosos intentos por conseguir homogenatos capaces de metabolizar progesterona en cardenólidos no fueron fructíferos. Este nuevo contratiempo junto con la experiencia adquirida durante la síntesis de la [20,21- $^{13}\text{C}_2$]-progesterona forzaron el replanteo global de los objetivos del presente trabajo de tesis, dejando de lado sus aspectos biosintéticos, hacia la síntesis de [20,21- $^{13}\text{C}_2$]-colesterol y/o [21- ^{13}C]-colesterol los que permitirían aclarar, en trabajos futuros, el mecanismo de la biosíntesis de bufadienólidos en el interior de la glándula parótida de sapos.

Por otra parte, durante los estudios previos a la síntesis de la [20,21- $^{13}\text{C}_2$]-progesterona se observó que el reactivo sulfato de cobre (II) adsorbido en sílica gel efectuaba la remoción de un tioacetal cíclico regenerando el compuesto carbonílico original; promoviendo una aplicación del reactivo no descripta en la literatura. Se programó entonces un nuevo objetivo, estudiar los alcances y limitaciones del reactivo nombrado como promotor de la remoción de diversos tioacetales y acetales cíclicos.

Por último, durante el desarrollo del trabajo sintético se prepararon una serie de derivados esteroidales con funcionalidad diversa en C-3 y C-17, de los cuales no se tenían datos de RMN

¹³C. Por ello se intentó la asignación de los espectros de RMN ¹³C de dichos derivados esteroidales y el estudio de los efectos de los sustituyentes.

CAPITULO I

La síntesis parcial de progesterona doblemente marcada con ^{13}C en la cadena lateral puede ser afrontada según dos estrategias generales alternativas :

1. Introducción de la doble marca en una única reacción o
2. Marcación en dos etapas sintéticas diferentes.

La primera opción pareciera ser más elegante y económica tanto desde el punto de vista de la simplicidad del proceso como del costo de los reactivos.

Por otra parte, resulta lógica la elección como materia prima de la androst-4-en-3,17-diona (21), entre los numerosos androstenos comerciales disponibles, dada la similitud estructural a nivel del anillo A entre sustrato y producto final.

ESTUDIOS PREVIOS.

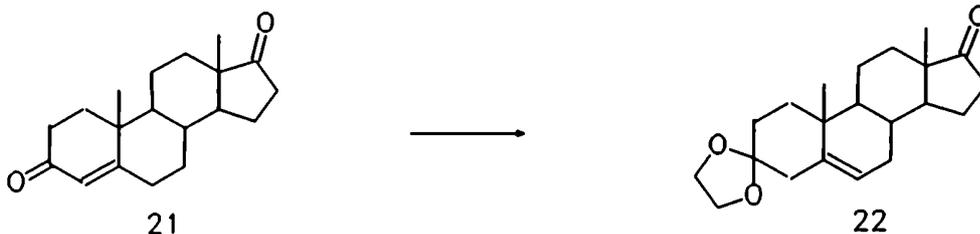
ESTRATEGIA #1.

Por las razones expuestas se comenzó con los estudios previos a la síntesis de $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -progesterona de acuerdo con la siguiente estrategia general:

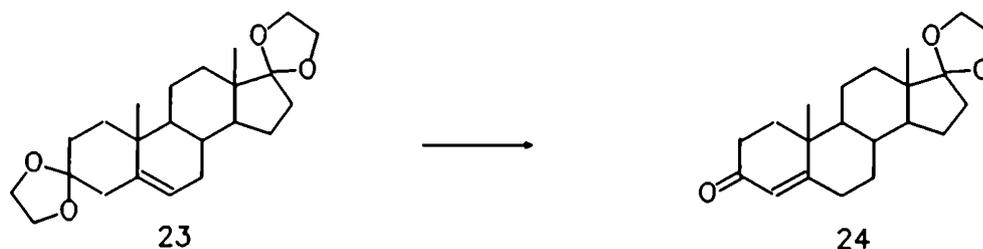
- a. Protección selectiva de la función 3-oxo-4-eno.
- b. Adición de la cadena lateral de dos carbonos al carbonilo en C-17.
- c. Interconversión de diversos grupos funcionales.
- d. Regeneración de la función 3-oxo-4-eno.

a. Protección selectiva de la función 3-oxo-4-eno.

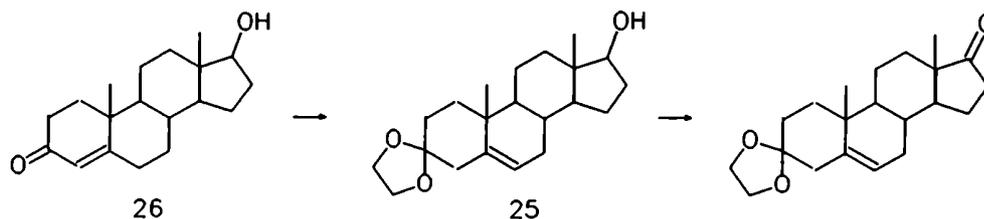
Por razones que se harán claras más adelante se decidió efectuar la protección indicada mediante un cicloetilénacetal.



Con este fin se probó, en primer lugar, una reacción de transacetalización con 2-etil-2-metil-1,3-dioxolano en presencia de TsOH (cc) [Dauben, 1954] pero la regioselectividad del método fue pobre ya que se obtuvieron el compuesto buscado **22** y el 3,17-bis-cicloetilénacetal (**23**) con 36 y 30% de rendimiento respectivamente. Tratando de incrementar la cantidad de **22** disponible se intentó la remoción selectiva del acetal en C-17 del bisacetal **23** mediante reacción con trifluoruro de boro eterato en benceno/éter etílico (1/1) como solvente [Bowers, 1959]. Sin embargo, se obtuvo 17-cicloetiléndioxi-androst-4-en-3-ona (**24**) (50%) como producto principal de esta reacción.



En vista de estos resultados se siguió una vía indirecta para la preparación de **22**. La misma se resume en el esquema 8.

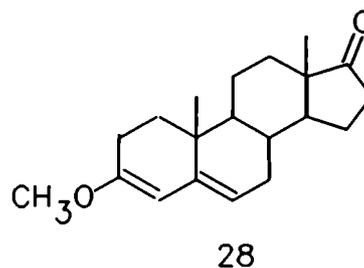
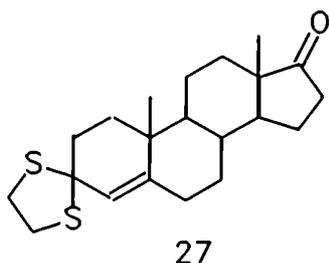


Esquema 8: Preparación del compuesto **22**.

La preparación del compuesto 3-cicloetiléndioxi-androst-5-en-17 β -ol (**25**) se consiguió con 82% de rendimiento, partiendo de testosterona (**26**) mediante tratamiento con etilén-glicol en

benceno a reflujo y TsOH [Zderic, 1959]. La oxidación del hidroxilo en C-17 al carbonilo correspondiente se ensayó inicialmente con clorocromato de piridonio (PCC) en diclorometano a 0 °C [Corey, 1975 a] obteniéndose una mezcla 70:30 de **22** y **21**. El ensayo posterior con dicromato de piridonio (PDC) en dimetilformamida (DMF) [Corey, 1979] (medio de reacción menos ácido que el anterior) rindió **22** con 80% de rendimiento siendo, entonces, 65% el rendimiento global de la secuencia.

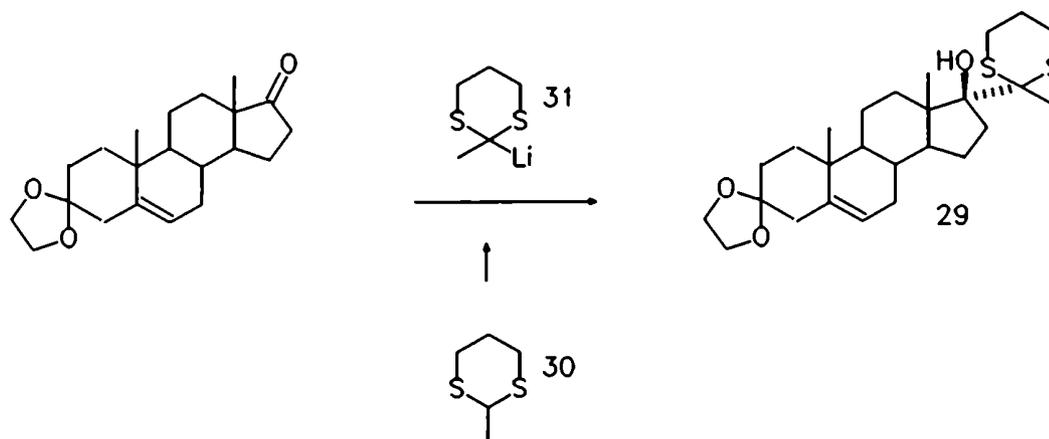
Como se verá luego, también fue necesaria la preparación de 3-cicloetilénditio-androst-4-en-17-ona (**27**) y de 3-metoxi-androst-3,5-dien-17-ona (**28**). El primero se consiguió por reacción de **21** con cantidades equivalentes de etanoditiol en presencia de trifluoruro de boro eterato como promotor y metanol como solvente [Williams, 1974]. En un todo de acuerdo con literatura, el método resultó regioselectivo pues se obtuvo el compuesto buscado con 97% de rendimiento. El segundo, compuesto **28**, se obtuvo con 55% de rendimiento a partir de una solución de **21** en DMF (anh.)/metanol (anh.) (96/4) por reacción con 2,2-dimetoxipropano y TsOH como catalizador [Nussbaum, 1961].



b. Ensayos tendientes a la adición de la cadena lateral de dos carbonos al carbonilo en C-17.

Estrategia b1.

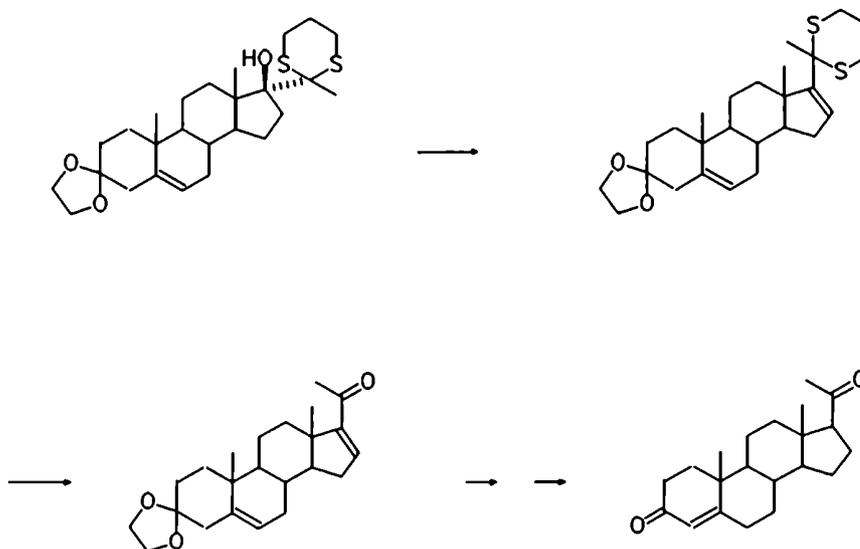
La literatura informaba que autores canadienses [Jones, 1972] habían logrado la preparación del derivado 17β-hidroxi-17α-ditianilo (**29**) con 59% de rendimiento:



También, eran conocidas diversas técnicas de probada efectividad en la preparación de 2-metil-1,3-ditiano (30) a partir de acetaldehído y 1,3-propanoditio [Corey, 1971] y se sabía de la existencia en el mercado de 1,2-¹³C₂-acetaldehído.

En consecuencia, de las diversas posibilidades que se tenían para el agregado de una cadena lateral de tipo pregnano a un androstano se decidió el empleo del 2-litio-2-metil-1,3-ditiano (31) para preparar el compuesto 29 a partir del cual se continuaría con la secuencia sintética presentada en el esquema 9.

Como es sabido, los aniones estabilizados por azufre como 31 revierten directamente el patrón normal de reactividad del grupo carbonilo y, en este sentido, constituyen equivalentes sintéticos de un anión acilo. Después de reaccionar con un electrófilo la unidad ditioacetal puede ser hidrolizada brindando la cetona correspondiente. El término "umpolung" fue acuñado por Corey y Seebach [Corey, 1965] para describir esta reversión temporaria de la reactividad característica de un grupo funcional y ha sido ampliamente adoptado desde entonces.



Esquema 9: Hipotética síntesis de progesterona mediante una reacción de "umpolung" en la etapa clave.

Como era de esperar, lo primero que se probó en esta parte del trabajo fue la técnica de preparación del compuesto **30**. Para ello se trabajó con cantidades equimolares de acetaldehído y 1,3-propanoditioi en cloroformo como solvente y cloruro de zinc anhidro como catalizador, a diferencia del trabajo original citado donde se emplea cloruro de hidrógeno seco. El rendimiento observado fue 87%. Un valor ligeramente menor se encontró cuando se probó con trifluoruro de boro eterato como catalizador.

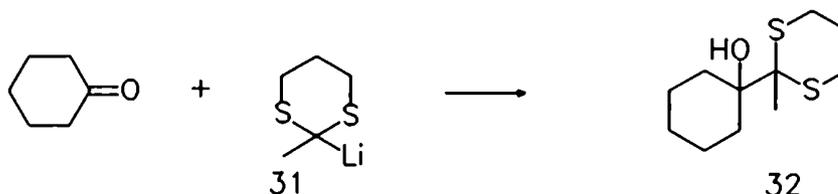
La etapa siguiente consistió en la repetición de la técnica informada por los autores canadienses para la adición del 2-litio-2-metil-1,3-ditiano al carbonilo en C-17 del compuesto **22**. Es decir que se agregó una solución de **22** en THF anhidro a otra de **31** en el mismo solvente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (preparada por agregado de cantidades equivalentes de $n\text{-BuLi}$ a **30** en THF a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) y bajo atmósfera de nitrógeno (relación molar $(31)/(22) = 5/1$). Luego de 48 hs a 0°C se trató la mezcla de reacción de la manera habitual en estos casos observándose, mediante ccd, la descomposición del sustrato en una serie de productos de mayor polaridad. Similar resultado se encontró cuando se probó el agregado de la solución del esteroide a la solución del carbanión a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 hs.

Se decidió entonces efectuar la reacción en cuestión en condiciones más suaves para lo cual se aplicaron las siguientes técnicas:

- Agregado de cantidades equivalentes de **22** a **31** a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$; mezcla de reacción a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs.
- Agregado a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ de un equivalente de **22** a dos de **31**; mezcla de reacción a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 hs y a temperatura ambiente durante 48 hs.

En ambos casos se observó que el sustrato no había sufrido ninguna modificación.

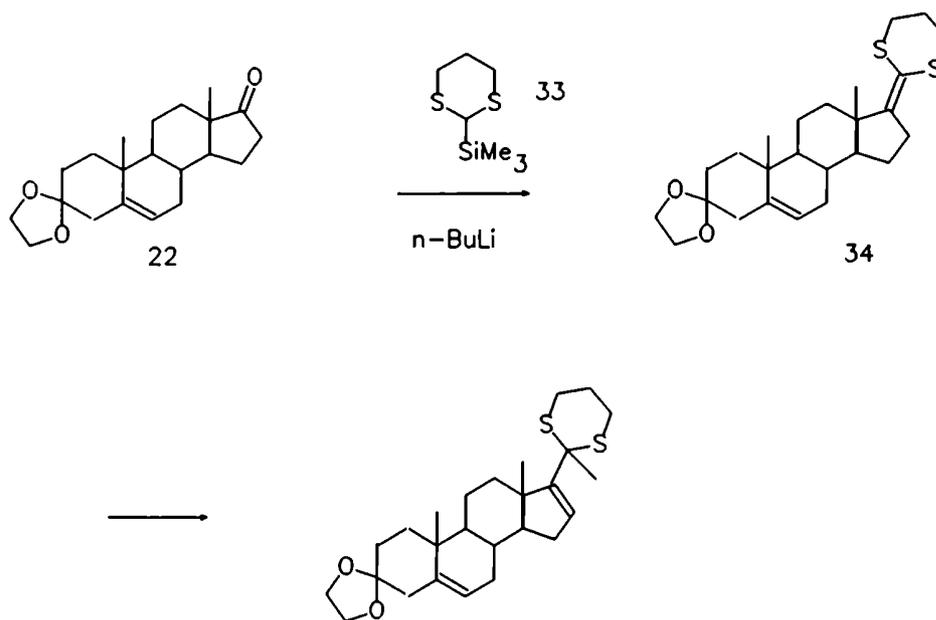
Por estos motivos se decidió probar la reacción del carbanión **31** con un compuesto carbonílico más sencillo para confirmar si se estaba trabajando correctamente en la generación del anión a partir del ditiano **30**.



Por lo tanto, a una solución de **31** preparada de la manera habitual se le agregaron cantidades equivalentes de ciclohexanona (en THF) luego de lo cual se siguió el procedimiento **b** descrito anteriormente. La purificación por columna del crudo de la reacción rindió el compuesto **32** con 84% de rendimiento. Esto verificó que la técnica seguida para la generación del carbanión en los casos discutidos era la correcta.

Teniendo en cuenta que los autores nombrados señalaron la inestabilidad del β -hidroxiditiano (**29**), el cual se descompondría a temperatura ambiente para dar una mezcla de compuestos más polares, se pensó que los problemas encontrados en la reproducción de esta reacción podrían estar asociados con la labilidad del compuesto **29**. Tratando de salvar esta dificultad se decidió probar la reacción de "umpolung" del compuesto 2-trimetilsilil-1,3-ditiano (**33**) sobre la androstenona **22** que brindaría el tioacetal de cetena **34**. Esta reacción de adición-

eliminación (en realidad una modificación de la reacción de Peterson [Peterson, 1968]) implica la formación en primer lugar de un α -trimetilsilil- β -hidroxi-ditiano no aislable, el cual se descompone en el medio de reacción para dar el tioacetal de cetena correspondiente. Esto, evidentemente, conlleva un cambio en la estrategia general hacia la introducción de la doble marca. Según esta secuencia, la doble marcación se realizaría en pasos diferentes del camino sintético el cual se completaría con la metalación de (34) con n -BuLi en presencia de HMPA y posterior alquilación del carbanión con yodometano [Seebach, 1974] según el esquema 10.



Esquema 10: Hipotética preparación del tioacetal de cetena 34.

Para ello, en primer lugar, se preparó el reactivo 33 a partir de ditiano comercial siguiendo la técnica de literatura [Seebach, 1973] con 61% de rendimiento. Sin embargo, la reacción de "umpolung" posterior no pudo concretarse pese a diversos intentos realizados. Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

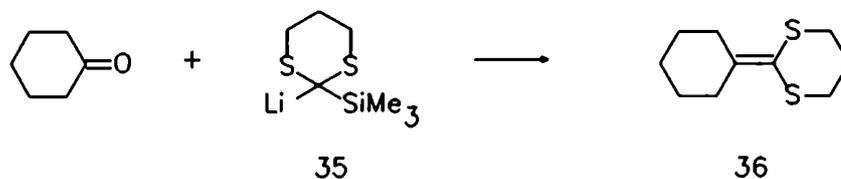
1. A una solución 0,5 M de 2-litio-2-trimetilsilil-1,3-ditiano (35) en THF, preparada según literatura, se le agregó la cantidad equivalente de 22 en THF a -78 °C y bajo atmósfera de nitrógeno.

Se dejó subir la temperatura lentamente hasta 20 °C y se continuó la agitación durante 10 hs adicionales (condiciones de Seebach).

2. Idem 1. con 2,2 moles de 35 por mol de 22 y 24 hs a temperatura ambiente.

3. Idem 2. con 4,0 moles de 35 por mol de 22.

En ninguno de los casos señalados se observó modificación alguna del sustrato por lo que, nuevamente, se decidió ensayar la reacción de un compuesto carbonílico más sencillo que la androstenona 22. La reacción de 35 con ciclohexanona según la técnica 1. brindó el compuesto 2-ciclohexilidén-1,3-ditiano (36) con 50% de rendimiento.



Esto permitió corroborar que el carbanión se genera en las condiciones de reacción empleadas y que el carbonilo en 17 de androstanos es un grupo funcional poco reactivo frente a carbaniones derivados de ditianos.

Todos estos hechos experimentales ponen en duda la veracidad de la preparación del compuesto 29 por parte de los autores canadienses nombrados. Esta duda se agiganta cuando se revisan los datos de RMN ¹H atribuidos por los autores al compuesto en discusión. Asignan un valor de 2,03 ppm a los protones del metilo 21, valor que se encuentra por fuera del rango 1,54-1,83 ppm encontrado en literatura para distintos 2-metil-β-hidroxi-1,3-ditianos ([Bulman Page, 1989] y referencias allí citadas). Más aún, teniendo en cuenta que los protones del metilo 21 resuenan en 2,08 ppm para 20-ceto-pregnanos 17β-hidroxilados (corrimiento hacia campos altos de 0,19 ppm respecto de los derivados α-hidroxilados) [Jankowski, 1968] y en 2,00 ppm para 17β-hidroxi-17α-acil-estranos [Baldwin, 1976], y que la transformación de una metilcetona en un metilditiano induce un desplazamiento hacia

campos altos de la señal correspondiente a los protones del metilo de 0,45-0,60 ppm ([Corey, 1971] y referencias allí citadas) sería de esperar que la señal en cuestión apareciera en el rango 1,40-1,63 ppm.

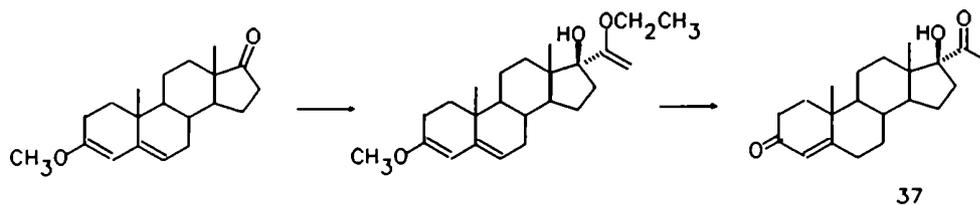
Estos autores tampoco informan de señales en la zona de las 2,90 ppm característica de los protones de metilenos unidos en α a los átomos de azufre de ditianos, región generalmente limpia en los espectros de RMN ^1H de androstanos y pregnanos. Describen, por otra parte, la imposibilidad de proteger el hidroxilo 17 β del compuesto **29** como su acetato a pesar de diversas condiciones ensayadas cuando es bien conocido el hecho de la facilidad con la que se obtienen 17 β -acetatos a partir de los alcoholes correspondientes por simple calentamiento en presencia de Ac_2O , como es el caso de las cianhidrinas en C-17 [Garraffo, 1985].

Un último intento de efectuar la reacción de "umpolung" consistió en la preparación del anión del 2-metil-1,3-ditiano con un contraión diferente al litio. Para ello se recurrió a la sodamida cuyas propiedades básicas pueden ser fuertemente modificadas por la acción de alcóxidos metálicos formando, las así llamadas, bases complejas que son capaces de generar carbaniones de tri y difenilmetano y de otros sustratos como los ditianos. En el caso de estos últimos la adición de electrófilos brinda productos alquilados con rendimientos comparables a los procedimientos que usan al litio como contraión [Carre, 1984].

Entonces, a una suspensión de 2-sodio-2-metil-1,3-ditiano en THF, preparada modificando ligeramente la técnica de literatura, se agregó a 0 $^{\circ}\text{C}$ y bajo atmósfera de nitrógeno una solución en THF de la androstenona **26** (1 equivalente por 2 de carbanión) manteniendo la mezcla de reacción a 20 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 hs. Por ccd se observó la descomposición parcial del sustrato en diversos productos de mayor polaridad.

Estrategia b2.

Como consecuencia de todo lo discutido, los carbaniones derivados de ditianos fueron descartados y se pensó en la reacción del compuesto **28** con α -etoxivinillitio (EVL) para efectuar la siguiente transformación:



Este método presenta como antecedente en el campo de los esteroides la preparación de un cetol similar a **37** a partir del éter metílico de la estrona y α -metoxivinillitio y posterior hidrólisis del aducto con ácido acético en metanol acuoso a temperatura ambiente [Baldwin, 1976].

Como puede verse, esta aproximación tiene como rasgo atractivo la posibilidad de hidrolizar el enol éter formado, simultáneamente con el enol éter protector, en condiciones acídicas extremadamente suaves lo que constituye una ventaja no compartida por otros reactivos equivalentes de acilo como los ditioacetales. Sin embargo presentaría como inconveniente la preparación del reactivo etil vinil éter puesto que la única técnica encontrada en literatura informa un rendimiento menor al 40% partiendo de acetaldehído y etanol [Fieser, 1967]. Este rendimiento no es muy satisfactorio teniendo en cuenta que se debería partir de 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -acetaldehído.

Debido a esto se decidió probar, en primer lugar, la técnica de generación del EVL mediante su reacción con ciclohexanona. Partiendo de etil vinil éter anhidro comercial se siguió la técnica de Baldwin agregando cantidades equimoleculares de t-BuLi en pentano a una solución de etil vinil éter en tetrahidrofurano anhidro a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ y añadiendo, luego de 1 hora, la cantidad equivalente de ciclohexanona en THF. Después de 24 horas a temperatura ambiente el sustrato no había sufrido ninguna modificación.

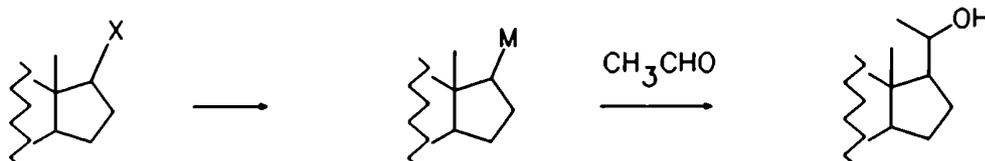
Pensando que la dificultad se encontraba en la metalación del enol éter se decidió probar con la técnica de Schöllkopf que

emplea 1 equivalente de *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina (TMEDA) por equivalente de *t*-BuLi [Schöllkopf, 1972], método que tampoco resultó apropiado.

Teniendo en cuenta estos contratiempos y el bajo rendimiento teórico en la preparación del enol éter se decidió discontinuar esta ruta.

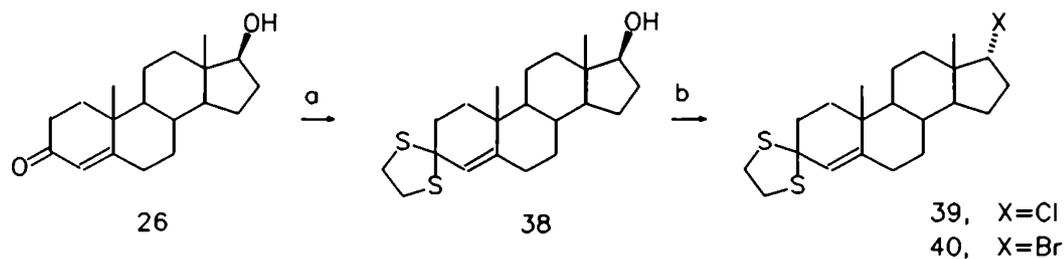
Estrategia b3.

Un nuevo intento de introducir la cadena lateral en un solo paso comprendía un cambio en la reactividad de los fragmentos a unir, utilizando como electrófilo al acetaldehído y como nucleófilo un carbanión en C-17 obtenido mediante la transformación de algún halogenuro esteroidal en un compuesto organometálico, según el siguiente esquema formal:



Esta idea forzaba la preparación previa de los androstenos halogenados en C-17, adecuadamente protegidos en C-3, los que se obtuvieron siguiendo el esquema 11.

El compuesto **38** se preparó siguiendo el método habitual en esta tesis, con 95% de rendimiento. Los halo derivados **39** y **40** se consiguieron con 77 y 79% de rendimiento respectivamente.



a. $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, MeOH

b. para 39: CCl_4 , Ph_3P , MeCN

para 40: CBr_4 , Ph_3P , CHCl_3

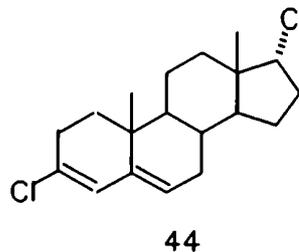
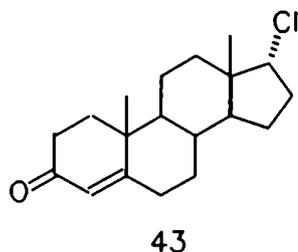
Esquema 11: Preparación de 17-halo-androstenos.

A la concreción de la secuencia indicada se llegó luego de realizar numerosos ensayos previos, ya que en literatura no existían referencias concretas sobre su preparación. Estos ensayos previos comenzaron con la prueba de la sustitución del mesilato en C-17 de los compuestos 3-ciclo-etiléndioxi-17 β -mesil-androst-5-eno (41) y 3-cicloetilénditio-17 β -mesil-androst-4-eno (42) (preparados por mesilación [Djerassi, 1955] de los correspondientes alcoholes 17 β 25 y 38). El tratamiento de los mesilatos con LiBr en acetona o butanona [Howden, 1966] condujeron a resultados negativos que se detallan en la parte experimental.

Posteriormente se intentó la reacción del compuesto 25 con SOCl_2 en benceno a 0 °C durante 7 hs., método empleado en la preparación de 2-cloro-colestanos a partir de los esteroides correspondientes [Shoppee, 1965], obteniéndose testosterona en forma cuantitativa. En vista de la labilidad del grupo protector, las pruebas siguientes se realizaron directamente sobre la testosterona. Las reacciones de halogenación intentadas fueron:

- a. SOCl_2 en benceno, 0 °C a 20 °C, 48 hs.
- b. PBr_3 en piridina, 0 °C a 20 °C, 24 hs [Smith, 1955].
- c. $\text{Ph}_3\text{P/CBr}_4$, acetonitrilo o diclorometano a 20 °C, 24 hs.
- d.1. $\text{Ph}_3\text{P/CCl}_4$, diclorometano a 20 °C, 96 hs [Weiss, 1970].
- d.2. $\text{Ph}_3\text{P/CCl}_4$, acetonitrilo a 80 °C.

En los dos primeros casos se observó la descomposición del sustrato en diversos productos. En el caso **c** no hubo reacción y cuando se aplicó la misma técnica, en acetonitrilo a reflujo durante 24 hs, sobre el compuesto **25** se obtuvo testosterona nuevamente como producto principal. En **d.1** la formación del producto buscado fue incipiente (menor al 10%) y en **d.2** se emplearon dos relaciones diferentes del complejo $\text{Ph}_3\text{PCl}^+\text{CCl}_3^-$ al sustrato: i) 2,5 a 1. La reacción no avanzó más allá de un 50% de conversión luego de 40 hs. ii). 8 a 1. Luego de 8 hs se obtuvo una mezcla del 17 α -cloro-androst-4-en-3-ona (**43**) y de un compuesto de menor polaridad caracterizado como 3,17 α -dicloro-androst-3,5-dieno (**44**) en una relación 6 a 1 aproximadamente.



Son comunes los métodos de preparación de 3-cloro-3,5-dienos por tratamiento de las correspondientes cetonas esteroidales 4-en-3-ceto con diversos reactivos usados frecuentemente en la preparación de cloruros a partir de alcoholes como ser, cloruro de oxalilo y otros cloruros de acilo, oxiclорuro de fósforo, penta y tricloruro de fósforo ([Ross, 1964] y referencias allí citadas). Estos antecedentes sugerían que el compuesto minoritario de la reacción **d.2** poseía la estructura indicada, lo que se confirmó con datos espectroscópicos.

La aparición en el espectro de masas de **44** de tres picos de m/z 328, 326 y 324 en una relación 1/6/9 indica claramente que se

trata de un compuesto diclorado de peso molecular consistente con la fórmula molecular propuesta, mientras que la pérdida del fragmento $C_9H_{12}Cl$ a partir del M^+ y del $M+2$ conducente a los picos de m/z 169 y 171 respectivamente, corresponde a la ruptura alílica de los enlaces C7-C8 y C9-C10 característica de los Δ^3, Δ^5 dienos esteroidales [Zaretskii, 1976]. La señal de 1620 cm^{-1} observada en el espectro de IR está de acuerdo con el valor encontrado en literatura para un 3-cloro-3,5-dieno [Moersch, 1963], y los multipletes a campos bajos de su espectro de RMN 1H de 5,40 y 6,06 ppm guardan relación con los valores de 5,57 y 5,98 ppm informados para un 3-bromo-3,5-dieno [Dahl, 1971]. En tanto que, en el espectro de RMN ^{13}C se observaron cuatro señales entre 120 y 140 ppm las cuales, mediante la técnica de desacople retardado [Bigler, 1983], se diferenciaron en dos carbonos cuaternarios a 140,3 y 130,1 ppm, asignados a C-5 y C-3 respectivamente, y en dos carbonos metínicos a 126,8 y 123,7 ppm correspondientes a los carbonos 4 y 6. Cabe aclarar que estas asignaciones son intercambiables pues no se encontraron en literatura datos de RMN ^{13}C de compuestos similares que permitieran verificar lo propuesto.

Un párrafo aparte merece la asignación de la configuración en C-17 de los compuestos 39, 40 y 43. Resultaba lógico pensar que estas configuraciones eran las indicadas ya que es conocido que las reacciones de sustitución de hidroxilos secundarios por halógeno mediante un tetrahalo-metano y trifenilfosfina se producen con inversión de la configuración del sustrato [Weiss, 1971]. Sin embargo, ante la escasez de datos espectroscópicos de compuestos relacionados con los preparados (se encontró, únicamente, el espectro de RMN ^{13}C del compuesto 3 β -acetoxi-17 α -cloro-androst-5-eno [Blunt, 1977] cuyos carbonos 17 y 18 resuenan a 70,9 y 17,8 ppm respectivamente, en concordancia con lo observado para 39 y 43) se decidió calcular las constantes de acoplamiento H-17-H-16 α y H-17-H-16 β de los compuestos en cuestión y las de los correspondientes epímeros 17 β -halogenados (compuestos 45, 46 y 47), con el propósito de efectuar una comparación cualitativa de estos valores con los experimentales.

Las constantes de acoplamiento se calcularon mediante la

ecuación de Altona [Haasnoot, 1980] que relaciona las constantes de acoplamiento $^1\text{H}-^1\text{H}$ a tres enlaces con los ángulos dihedros e incluye una corrección por la electronegatividad de los sustituyentes. El término de corrección es escrito como una función de la electronegatividad, del ángulo de torsión H-C-C-H y de la orientación de cada sustituyente relativa a los protones acoplados, de tal modo que la ecuación puede escribirse como:

$$^3J_{\text{HH}} = P_1 \cos \varphi + P_2 \cos \varphi + P_3 + \sum \Delta\chi_i \{P_4 + P_5 \cos^2(\xi_i \varphi + P_6 |\Delta\chi_i|)\}$$

En esta relación φ es el ángulo de torsión protón-protón y $\sum \Delta\chi_i$ es la sumatoria de las diferencias en electronegatividad entre los sustituyentes del fragmento H-C-C-H en estudio y el hidrógeno. Los parámetros P_1 - P_6 usados en los cálculos fueron los del set B del trabajo original de Altona, es decir 13,7; -0,73; 0; 0,56; -2,47 y 16,9° respectivamente y los valores de $\Delta\chi$ empleados fueron 0,344; 0,75 y 0,95 para C, Br y Cl respectivamente.

A su vez, los valores de los ángulos dihedros H-17-H-16 α y H-17-H-16 β de los compuestos en estudio se obtuvieron mediante el programa de computación PCMODEL 386 el cual efectúa los cálculos de mecánica molecular mediante el campo de fuerza MMX (versión extendida y modificada del campo de fuerza MM2 de Allinger [Burkert, 1982]). Como ilustración se presenta en la figura 2 la conformación de mínima energía brindada por este programa para el compuesto **40**, a partir de la cual fue factible obtener los ángulos dihedros indicados.

Es necesario aclarar que no fue posible efectuar el análisis del espectro experimental para obtener las constantes de acoplamiento, como consecuencia de que la parte AB del sistema ABX en estudio pertenece a la zona de absorción de metilenos, la cual no es observable en forma clara en el espectro protónico a 100 MHz. No obstante ello, dado que la zona X (H-17) se observa con claridad (el espectro de RMN ^1H de **40** se presenta en la figura 3) es posible evaluar los resultados del cálculo considerando que en un sistema ABX la diferencia entre las

resonancias a menor y mayor frecuencia del núcleo X corresponde a la suma de las constantes de acoplamiento $J_{AX} + J_{BX}$ [Abraham, 1981].

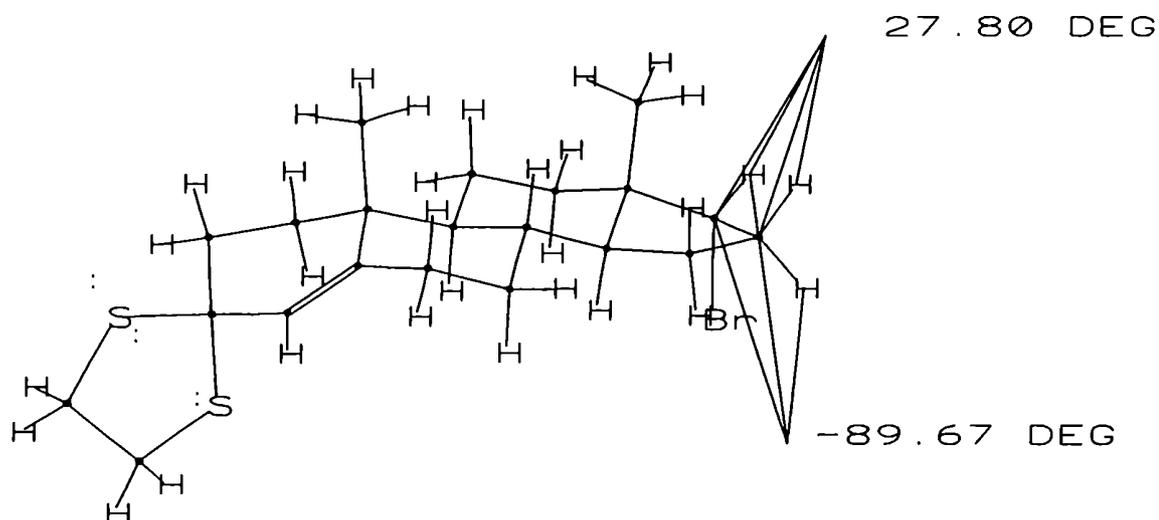


Figura 2: Conformación de mínima energía del compuesto 40.

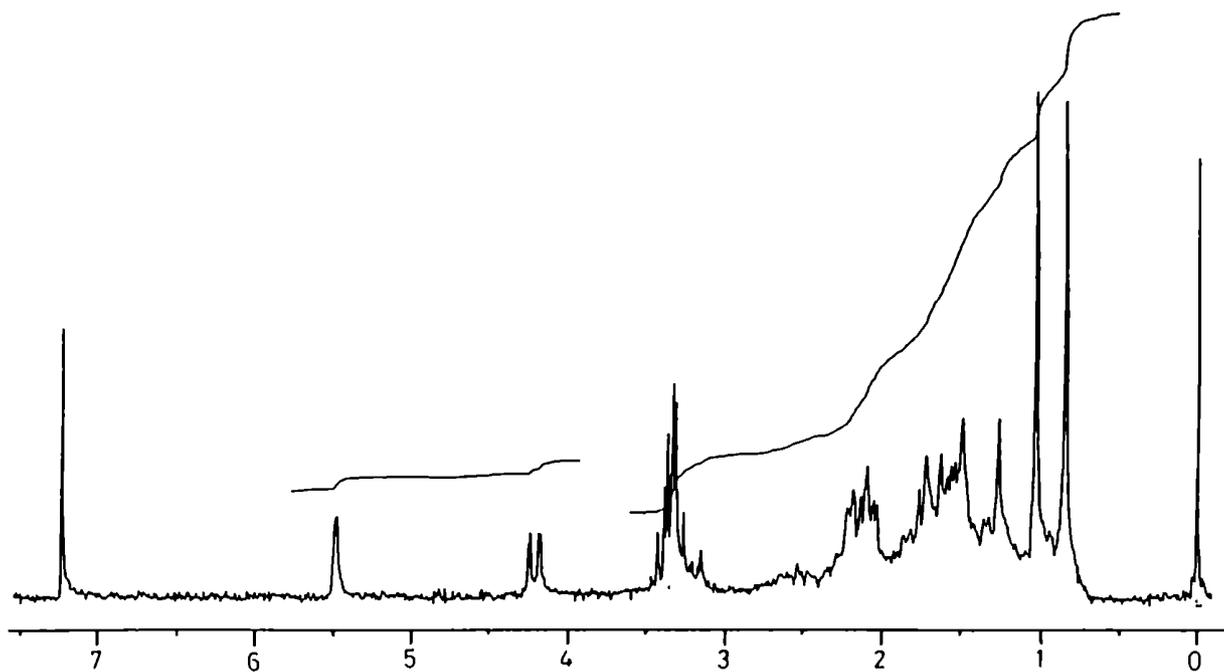


Figura 3: Espectro de RMN ^1H del compuesto 40.

Los resultados de los cálculos y los valores experimentales se presentan en la tabla 1.

TABLA 1						
	43	45	39	46	40	47
ϕ 17-16 α	93,19	29,04	92,87	29,21	89,67	30,64
J (Hz)	0,7	7,2	0,7	7,2	0,7	7,4
ϕ 17-16 β	24,74	148,75	25,05	148,95	27,80	150,70
J (Hz)	8,8	8,3	8,8	8,3	8,5	9,0
$J_{AX}+J_{BX}$ (Hz)	9,5	15,5	9,5	15,5	9,2	16,4
$J_{AX}+J_{BX}$ experim.	8,0 Hz		8,0 Hz		8,5 Hz	

Se puede apreciar que los valores experimentales concuerdan con los valores calculados para los compuestos 17 α -halogenados pero difieren notablemente de los correspondientes a los epímeros 17 β . De esta manera, se corrobora la suposición inicial sobre la configuración en C-17 de los compuestos 39, 40 y 43; y análogamente se justifica la configuración en C-17 del compuesto 44.

Una vez en posesión de los compuestos halogenados apropiados se ensayaron las reacciones de formación de los derivados organometálicos.

En primer lugar se probó la preparación del reactivo de Grignard correspondiente al cloro derivado 39, trabajando con éter etílico o THF a reflujo como solventes. En ninguno de los dos casos se formó el reactivo.

Es sabido que el orden de reactividad para la preparación de reactivos de Grignard es R-I > R-Br > R-Cl. Se intentó, por ende, la preparación del 17-iodo derivado a partir de 39 por reacción con NaI en butanona anhidra [Ford-Moore, 1963] en dos condiciones: i) 24 hs a 80 °C y ii) 30 hs a 150 °C en tubo cerrado. Ambas pruebas resultaron fallidas.

Si bien se podrían haber intentados otros métodos para la formación del Grignard, como por ejemplo la preparación de magnesio activo por reducción de $MgCl_2$ anhidro con potasio metálico en THF a reflujo (método que permite la formación del reactivo de Grignard correspondiente a partir de haluros conformacionalmente rígidos como los de norbornilo [Rieke, 1977]), se decidió dejar esto de lado y probar la metalación de **40** con t-BuLi. Este reactivo brinda, con retención de la configuración de los bromuros de partida, los ciclopropiltio derivados que son capturados por reacción con acetona. Se obtienen así ciclopropildimetilcarbinoles con alto rendimiento [Corey, 1975 b].

Entonces, a una solución de **40** en THF anhidro a $-78\text{ }^{\circ}C$ y bajo atmósfera de nitrógeno se agregó un 10% en exceso de t-BuLi en pentano. Luego de 4 hs se añadieron 5 equivalentes de acetaldehído manteniéndose la mezcla de reacción durante 3 hs a $-78\text{ }^{\circ}C$ y una hora adicional a $0\text{ }^{\circ}C$. El análisis mediante RMN 1H del crudo de la reacción mostró al sustrato inalterado lo que significaba que la metalación no se había producido.

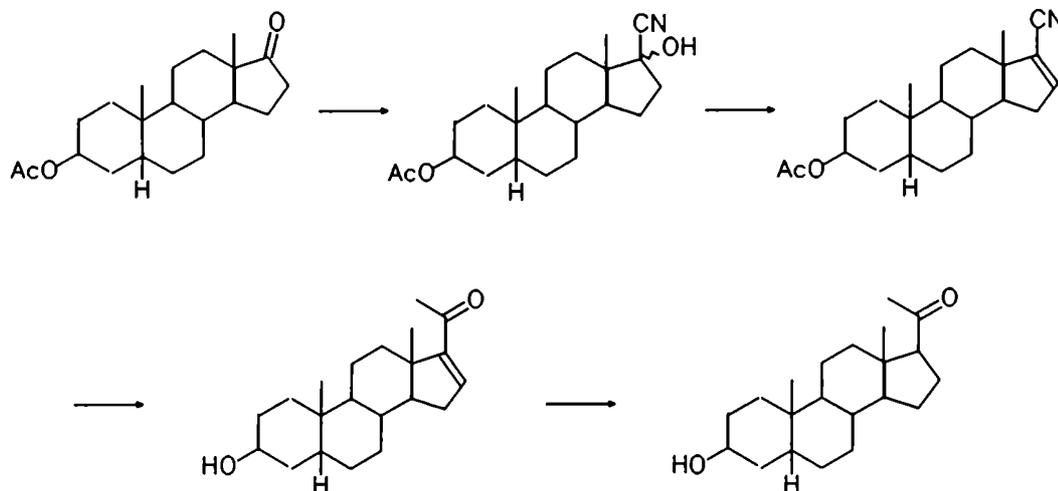
Ensayos posteriores, en los que se aumentó el exceso de t-BuLi por equivalente de bromuro y se prolongó el período previo al agregado del acetaldehído, tampoco sirvieron para efectuar la reacción inicial de metalación.

ESTRATEGIA #2.

Por todo lo expuesto se decidió abandonar la estrategia de introducción de la doble marca en un único paso y enfocar la atención en la segunda alternativa señalada al principio de este capítulo.

Por lo tanto, teniendo en mente la idea de marcación en dos etapas diferentes del camino sintético se tomó en cuenta un procedimiento usado previamente para la síntesis de 20-ceto pregnanos a partir de 3β -acetoxi- 5β -androstano-17-ona [Garraffo, 1982 b]. Este consiste básicamente en la formación de la cianhidrina derivada del 17-ceto androstano, transformación de la misma en un nitrilo α,β -insaturado sobre el que se efectúa una reacción de Grignard seguida de una hidrogenación, para llegar

finalmente el 20-ceto-pregnano, como se puede observar en el esquema 12.



Esquema 12: Síntesis de 5 β -pregnanolona.

Sobre este procedimiento se diseñaron diversas modificaciones, unas obligadas por la diferente estructura del material de partida a emplear y otras necesarias para incrementar los rendimientos de las dos etapas claves (las reacciones de formación de uniones carbono-carbono).

Partiendo de la androstenediona **21**, la estrategia de síntesis comprendía las siguientes etapas:

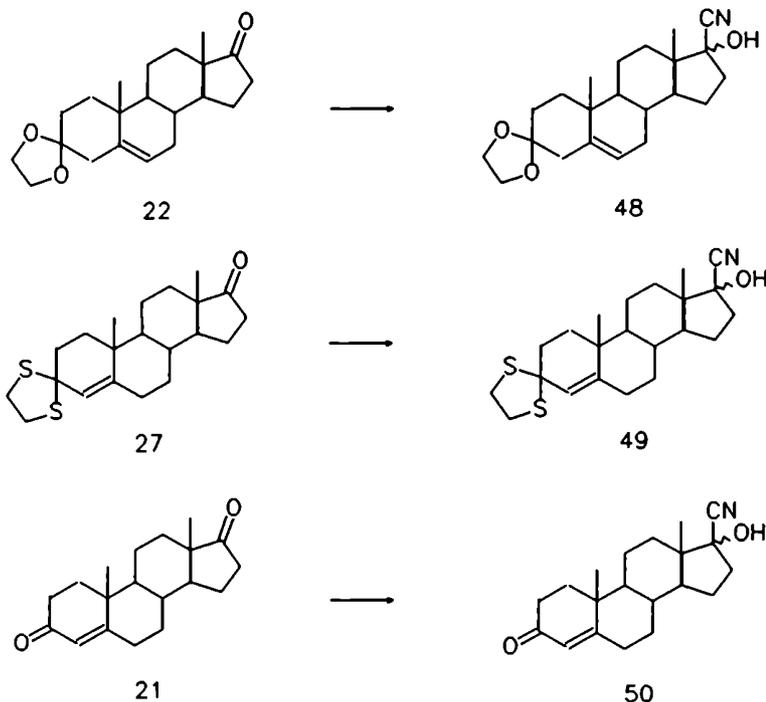
1. Protección del carbonilo en C-3.
2. Formación de la cianhidrina en C-17.
3. Deshidratación para obtener el nitrilo α,β -insaturado.
4. Hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17).
5. Formación del 20-ceto-pregnano.
6. Remoción del grupo protector.

Sin embargo, el camino de síntesis no fue tan directo como podría intuirse de la enumeración anterior. En casi todas las etapas esbozadas surgieron inconvenientes que se discutirán en

detalle y que obligaron a alterar parcialmente el orden presentado.

Formación de la cianhidrina en C-17.

Se prepararon los compuestos 17-ciano-17-hidroxi-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (48), 17-ciano-17-hidroxi-3-cicloetilénditio-androst-4-eno (49) y 17-ciano-17-hidroxi-androst-4-en-3-ona (50).



La reacción de la androstenona **22** con KCN (5 moles a 1) y AcOH en exceso, en etanol, ensayada originalmente según la técnica de literatura [Garraffo, 1985], brindó **48** en una mezcla 1 a 1 de sustrato y producto (ccd). Con el fin de optimizar el rendimiento de esta reacción se realizaron diversas modificaciones a la técnica cuyas condiciones y resultados se presentan en la tabla 2.

TABLA 2			
CASO	KCN/22 (molar)	TIEMPO (hs)	RENDIMIENTO (%)
1	5	24	70*
2	10	24	80*
3	12	48	83

*Rendimientos aproximados, se determinaron por ccd. En todos los casos se empleó exceso de AcOH respecto al KCN y etanol como solvente.

Estos resultados no fueron convincentes dado que en el mejor de los casos (item 3) el rendimiento obtenido es moderado para el gran exceso de reactivo empleado. Por esta razón y por problemas encontrados en la reacción de deshidratación de **48**, que se discutirán más adelante, se decidió la preparación de la cianhidrina **49**, partiendo de la androstenona **27**.

Con este propósito se hicieron diversas pruebas, resumidas en la tabla 3.

Puede verse que con la preparación de **49** la situación no cambió sustancialmente puesto que, si bien el mejor rendimiento encontrado (caso 2) es mayor que en el caso anterior, la cantidad de KCN necesaria es también mayor.

La relación óptima entre rendimiento en la formación de la cianhidrina y cantidad de reactivo empleado se halló en la preparación de **50** a partir de la androstenediona **21w** siguiendo la técnica de Nitta y colaboradores [Nitta, 1985]. Esto es, a una suspensión de 1 mol de **21** y 4,2 moles de KCN en metanol a 25 °C se agregaron 2 moles de AcOH para obtener estereoselectivamente el epímero 17 β -ciano-17 α -hidroxi de la cianhidrina **50** en forma prácticamente cuantitativa.

TABLA 3				
CASO	KCN/27 (moles)	TIEMPO (hs)	SOLVENTE	RENDIMIENTO (%)
1	10	24	etanol	60*
2	15	48	etanol	91
3	2,5	48	etanol	25*
4	5	48	DMF	80

*Rendimientos aproximados (ccd). En todos los casos se empleó exceso de AcOH respecto del KCN. El uso de metanol como solvente en los casos 1,2 y 3 brindó resultados similares.

Los espectros de RMN ^1H de los compuestos **48**, **49** y **50** (figura 4) ofrecen datos cuya comparación con los valores informados en literatura [Nitta, 1985] permiten construir la tabla 4 para las resonancias (ppm) de los protones de C-18.

TABLA 4			
Resonancia en δ (ppm) para metilo-18			
	48	49	50
β -ciano- α -hidroxi	0,95	0,96	0,99
α -ciano- β -hidroxi	0,88	0,89	0,92

La comparación de los datos de la tabla 4 con los espectros presentados en la figura 4 indica que el epímero β -ciano- α -hidroxi es el componente principal (91%) de la mezcla de epímeros de **50**, el epímero α -ciano- β -hidroxi es el mayoritario en **48** (82%) y, análogamente, se puede concluir que en el caso de **49** el epímero mayoritario es el α -ciano- β -hidroxi (87%).

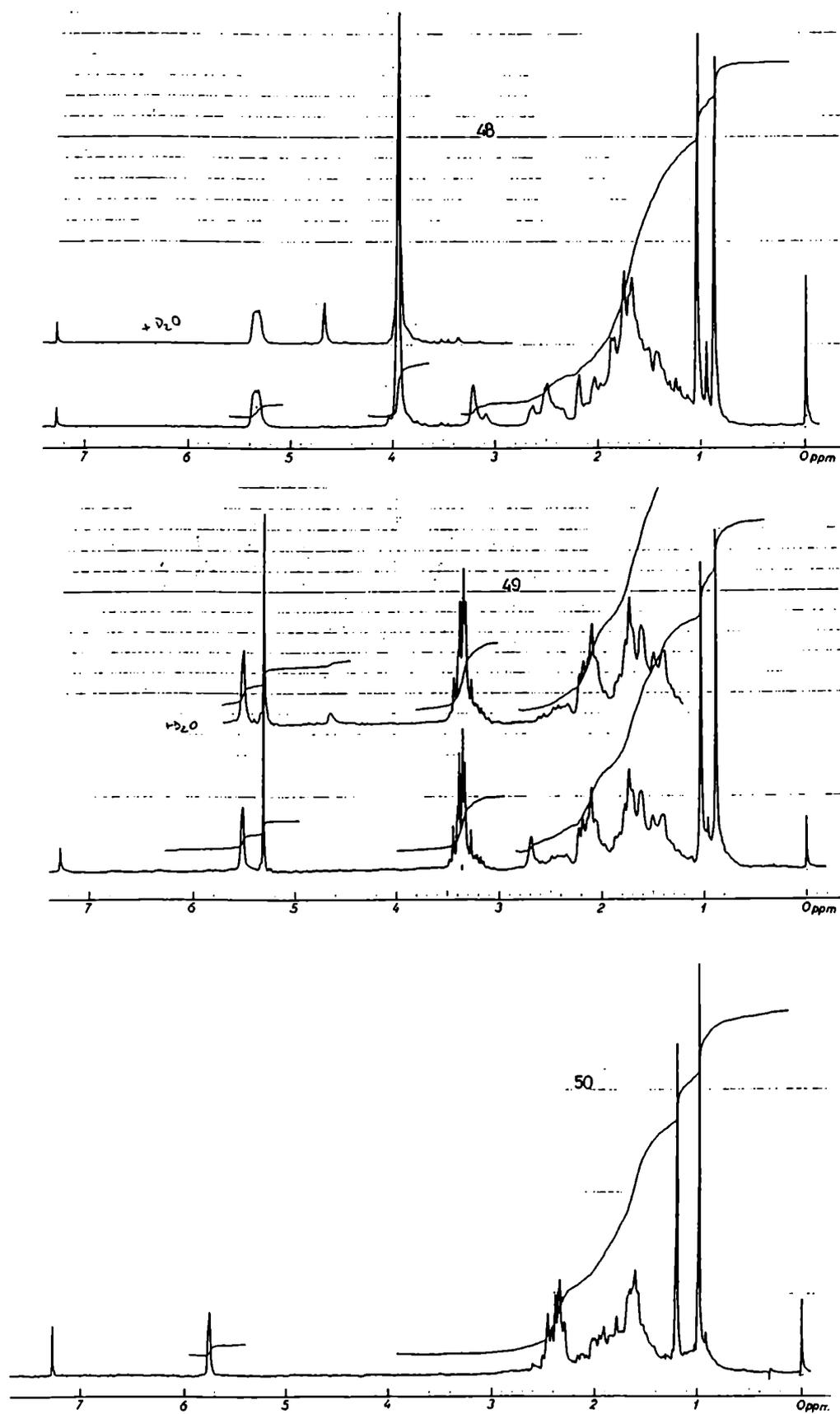


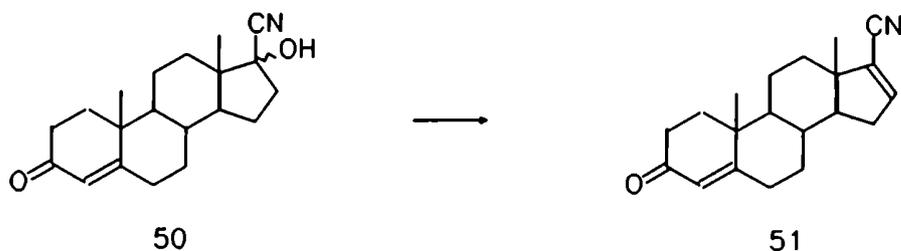
Figura 4: Espectros de RMN ^1H de 48, 49 y 50.

La diferencia en la estereoselectividad se explicaría por las distintas condiciones de reacción empleadas para la preparación de **50** por un lado y **49** y **48** por otro. En el caso de **50** la cianhidrina α -ciano- β -hidroxi que se formaría inicialmente por ataque del anión cianuro a la cara menos impedida del carbonilo en C-17, es convertida en su epímero bajo condiciones de equilibrio (presencia de KCN) y este último, menos soluble, cristaliza preferentemente. En los casos de **48** y **49** las reacciones se desarrollan bajo condiciones de control cinético debido al exceso de ACOH (ausencia de KCN) en la mezcla de reacción.

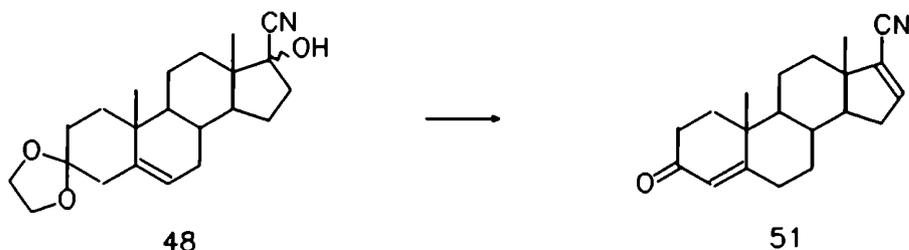
A pesar de que la estereoselectividad de la reacción de formación de **50** es de suma importancia en la síntesis parcial de la cadena lateral de corticoides [Nitta, 1985] y que, por otro lado, la inducción asimétrica inversa encontrada para **48** y **49** sería el primer paso de potenciales métodos de síntesis de pregnanos y colestanos con cadena lateral α (no naturales), no se avanzó más en el estudio de estas reacciones dado que, para los fines de este trabajo, la quiralidad introducida en el carbono 17 se pierde en el siguiente paso del proceso. En consecuencia, lo más importante del método de preparación de **50** es la cantidad de KCN empleada (sólo 4,2 moles por mol de **21**) y la regioselectividad del mismo. Los procedimientos convencionales utilizan un exceso mucho más grande de KCN y brindan las cianhidrinas en C-17 junto con las 3,17-bis(cianhidrinas) [Fried, 1972].

Preparación del nitrilo α,β -insaturado.

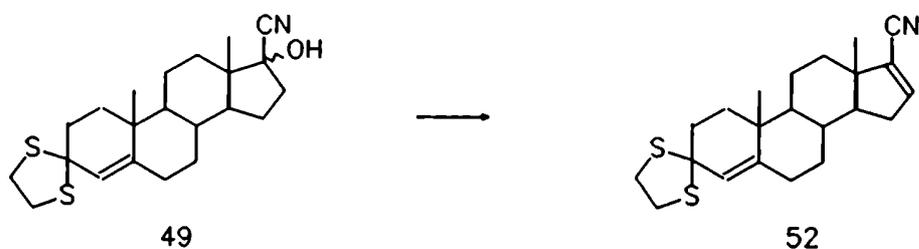
La deshidratación de **50** con oxiclорuro de fósforo (5,5 moles por mol de sustrato) en piridina a 150 °C [Meyer, 1946], durante 10 ó 24 hs., dió rendimientos cercanos al 50% del compuesto 17-ciano-androst-4,16-dien-3-ona (**51**)



Como este es un método muy energético, se pensó que efectuando la reacción de deshidratación sobre una cianhidrina que presentara protegido el carbonilo en C-3 se podría incrementar su rendimiento. Sin embargo la reacción de **48** con oxicloruro de fósforo (7,6 moles por mol de sustrato) en piridina a 150 °C durante 90 minutos provocó no sólo la deshidratación buscada sino también la remoción del grupo protector brindando el compuesto **51** con 46% de rendimiento.



Debido a esto se decidió probar la reacción de deshidratación sobre una cianhidrina que portara un grupo protector del carbonilo más resistente que un acetal. Se efectuó, entonces, la siguiente transformación:



Sin embargo, esta reacción (7,4 moles de oxiclورو de fósforo por mol de sustrato en piridina a 150 °C durante 2 hs) originó el compuesto 17-ciano-3-cicloetilénditio-androst-4,16-dieno (52) con rendimiento muy pobre (18%) (mediante ccd se observó la formación de 27 como producto secundario). Tratando de incrementar este rendimiento se efectuaron diversas modificaciones de la reacción en cuestión, cuyas condiciones se presentan en la tabla 5.

TABLA 5			
CASO	POCl ₃ /49 (moles)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (hs)
I	9	120	3
II	2	120	4
III	9	25	24
IV	2	60	24

En las condiciones del caso I la cianhidrina revierte parcialmente al derivado carbonílico original obteniéndose una mezcla de 27 y el producto buscado, este último como componente minoritario (ccd). Pensando que el origen de la descomposición parcial del sustrato estaba en el gran exceso de reactivo usado se ensayó el caso II el cual brindó un resultado similar al del caso anterior. Las pruebas a menor temperatura (casos III y IV) tuvieron como consecuencia la transformación cuantitativa del sustrato en el compuesto carbonílico 27.

Estos resultados, y los presentados anterioremente, indican que la reacción de deshidratación tiene lugar, al menos parcialmente, a temperatura mayor que la de ebullición del solvente y que, a estas temperaturas, se obtiene una proporción variable del producto de descomposición 27 independientemente del exceso de reactivo empleado. Por otra parte, pruebas no presentadas sugieren que esta reacción de deshidratación de cianhidrinas es muy sensible a la calidad de la piridina empleada

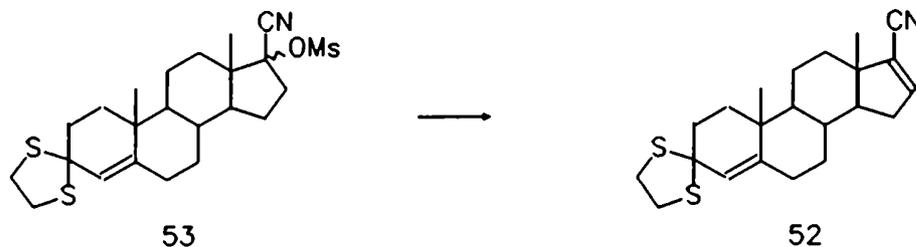
encontrándose que la reacción de descomposición es más importante cuanto menor es la calidad del solvente.

Teniendo en cuenta, entonces, la labilidad de la cianhidrina 49 se probaron métodos más suaves de deshidratación de alcoholes. Estos se resumen en la tabla 6.

TABLA 6					
METODO	REACTIVO	SOLVENTE	T (°C)	t (hs)	REFERENCIA
A	P ₂ O ₅	piridina	20	48	[March, 1985]
B	SOCl ₂	piridina	0	24	[Garraffo, 1985]
C	TsOH	benceno	80	24	[March, 1985]
D	TsOH	tolueno	110	72	"
E	HC(OEt) ₃ TsOH(cc)	benceno	80	12	[Rogic, 1974]
F	MsCl, TEA	THF	20	65	[Stork, 1976]
G	CuSO ₄ / SiO ₂	tolueno	110	3	[Nishiguchi, 1987]

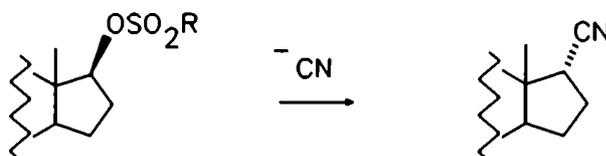
Con los métodos A y C el sustrato no sufrió ninguna modificación; con D y E se obtuvo una mezcla del sustrato como producto principal junto con algunos productos minoritarios de menor polaridad; con B se formó una mezcla compleja de productos y el método F, si bien no brindó el producto de eliminación deseado, sirvió para preparar el compuesto 17-ciano-17-mesil-3-cicloetilénditio-androst-4-eno (53), intermediario en el proceso de deshidratación. En el caso del método G se observó un resultado muy interesante que originó el desarrollo del método de remoción de tioacetales discutido en el capítulo siguiente.

Dada la facilidad y el buen rendimiento observado en la preparación del mesilato 53 se decidió intentar la transformación que se indica, en condiciones más enérgicas que las empleadas en el caso F.



Con este objetivo se ensayaron las reacciones: i) TEA, THF, 40 °C, 65 hs ii) t-butóxido de potasio, DMSO, 25 °C, 24 hs [Snyder, 1964] las que no modificaron al sustrato.

Todos estos contratiempos en la optimización del rendimiento de la reacción de deshidratación de cianhidrinas obligaron a replantear la estrategia de síntesis, buscando un camino alternativo que obviara el pasaje por un producto de eliminación. Surgió la idea de efectuar una sustitución en C-17 de un grupo saliente adecuado por cianuro, con la consiguiente formación del nitrilo saturado según el siguiente esquema general:



El desarrollo de esta estrategia comprendió la reacción del mesilato 41 con KCN en DMF a 50 °C [Newman, 1958] durante 48 hs sin obtenerse cambio alguno en el sustrato. La sustitución tampoco tuvo lugar trabajando con un tosilato como sustrato (17β-tosil-cicloetilénditio-androst-4-eno (54) preparado a partir de 38), por lo que esta idea fue abandonada.

Después de todo estas pruebas quedó claro que la reacción de deshidratación no se podía optimizar y que se tenía que aceptar como inmejorable el rendimiento de aproximadamente 50% en la preparación del nitrilo α,β-insaturado 51.

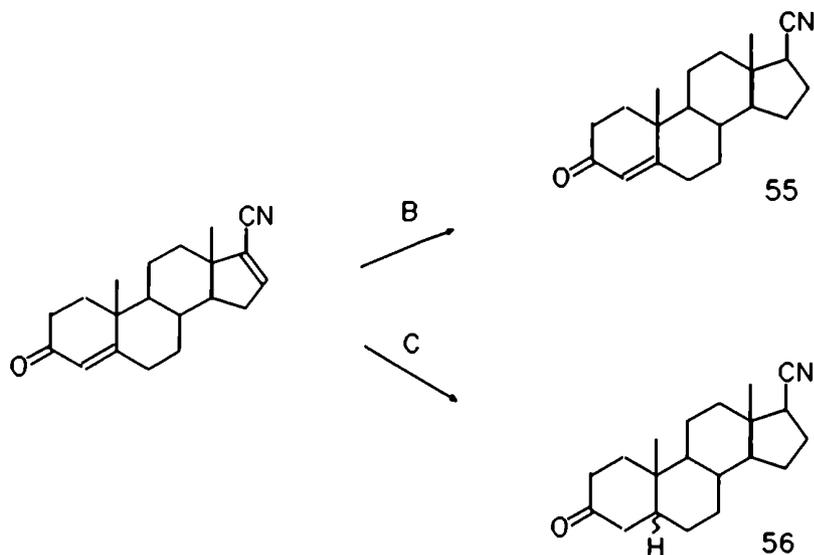
Hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17)

La selectividad de las hidrogenaciones catalíticas en esteroides que contienen dobles enlaces conjugados depende en grado sumo del catalizador y del solvente empleados, y por esta razón se puede encontrar un número relativamente grande de ejemplos en la literatura [Loewenthal, 1959]. Uno de ellos informa que los dobles enlaces en C-16, C-17(20), C-20 y grupos etinilo en C-17 pueden ser hidrogenados con catalizadores de paladio en condiciones neutras (Pd sobre carbón, EtOH) o levemente alcalinas (Pd sobre CaCO₃, piridina) antes de la reducción de un doble enlace 3-ceto-4-eno, aunque encontraron dificultades en la selectividad de la reducción de dobles enlaces conjugados en C-16 en presencia de un 3-ceto-4-eno [Hershberg, 1951]. Otro trabajo informa la reducción selectiva de un doble enlace conjugado en C-16 en un trieno portador de un 4-en-3-ceto y un doble enlace 9(11) con Pd(2%) sobre SrCO₃ en isopropanol [Barkley, 1956].

En consecuencia se decidió aplicar este último método (reemplazando el soporte por CaCO₃) para reducir selectivamente el doble enlace 16(17) del compuesto 51. Sin embargo, luego de 2 horas de reacción (condiciones de literatura) no se observó (RMN ¹H) ninguna modificación en el sustrato. A raíz de ello se aumentó la cantidad de catalizador y se cambió el soporte del mismo (condiciones de Hershberg) para efectuar las pruebas que se resumen en la tabla 7.

TABLA 7			
METODO	CATALIZADOR	PRESION (atm)	TIEMPO (hs)
A	Pd/C (5%)	1	48
B	Pd/C (10%)	1	20
C	Pd/C (10%)	1	36
D	Pd/C (10%)	3	3

En el caso A el sustrato no fue afectado. En el caso B, una primera prueba en pequeña escala (50 mg de 51) brindó el resultado esperado con alto rendimiento, pero la reacción no pudo reproducirse cuando se aumentó de escala (500 mg de 51). El caso C sirvió para obtener un androstano completamente saturado (17 β -ciano-5- ξ -androst-3-ona (56)) y en una situación intermedia entre los casos B y C, es decir el caso D, se obtuvo una mezcla aproximadamente 1 a 1 de 55 y 56.

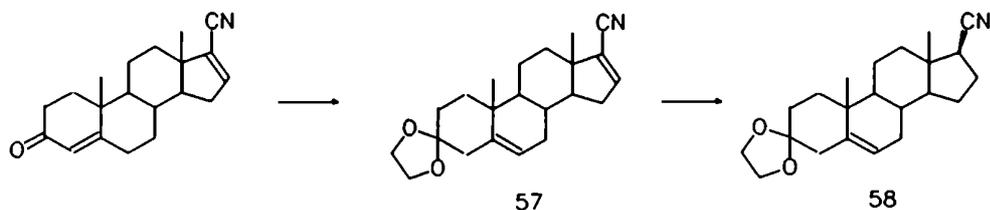


Una alternativa para conseguir la reducción selectiva en discusión consiste en evitar la hidrogenación catalítica del doble enlace de una 4-en-3-ona mediante la formación de su cicloetilénacetal y el concomitante desplazamiento del doble enlace a la posición 5, ya que un doble enlace en esta posición no es afectado en condiciones en las que son saturados dobles enlaces en posiciones 16, 17(20) y 20 [Loewenthal, 1959].

Así fue como el problema de la hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17) se resolvió siguiendo el esquema 13.

El compuesto 17-ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5,16-dieno (57) se preparó, partiendo de 51, aplicando dos técnicas diferentes: a) etilénglicol en benceno a reflujo, TsOH, 72 hs (80% de rendimiento) [Zderic, 1959] y b) etilénglicol, orto-

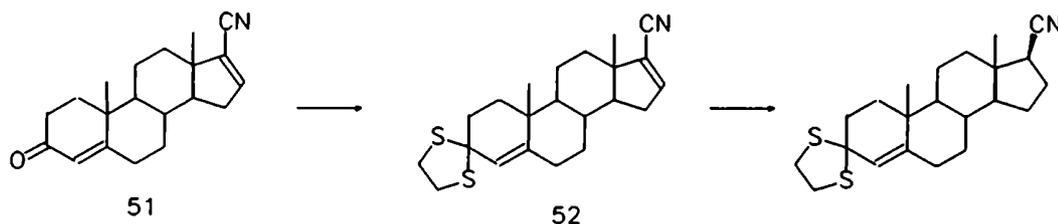
formiato de etilo, 40 °C, TsOH, 24 hs (91% de rendimiento)
[Nitta, 1985].



Esquema 13: Hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17).

A continuación se obtuvo **58** hidrogenando cuantitativamente el compuesto **57** con Pd sobre C (10%) en acetato de etilo bajo 1 atmósfera de presión de hidrógeno. La hidrogenación catalítica de **57** ocurre exclusivamente por la cara α del esteroide debido a la interferencia estérica que provoca el metilo angular en C-18. Es así como el producto **58** tiene el grupo ciano en C-17 orientado β al igual que la cadena lateral de los pregnanos naturales.

Problemas asociados con la reacción de Grignard sobre el nitrilo **58** (ver próxima sección) obligaron a cambiar el acetal protector del carbonilo en C-3 de este compuesto por un tioacetal, previamente a la reacción de Grignard. Como esto introducía en el camino sintético una reacción adicional inesperada, se evaluó la posibilidad de preparar el compuesto requerido como sustrato para la reacción de Grignard según se indica:



La transformación de 51 en 52, siguiendo la técnica habitual, se logró con alto rendimiento (93%). Por el contrario, la búsqueda de condiciones para reducir selectivamente el doble enlace 16(17) del compuesto 52 transitó por los siguientes tipos de reacciones:

a. Hidrogenación catalítica en fase heterogénea.

Se realizaron dos reacciones, ambas en i-propanol y a 1 atmósfera de presión. Tanto cuando se empleó Pd/CaCO₃ (2%) como catalizador y 3 hs de reacción, como cuando se incrementó la cantidad del catalizador (Pd/CaCO₃ (10%)) y el tiempo de la reacción (16 hs) no se obtuvo ninguna modificación en el sustrato.

b. Hidrogenación catalítica en fase homogénea.

Se recurrió a este método ante la eventualidad de que la hidrogenación en fase heterogénea hubiera fallado por envenenamiento del Pd ocasionado por el sustrato azufrado. Trabajando con el catalizador Rh(PPh₃)₃Cl (I) (catalizador de Wilkinson) en benceno/etanol (1/1) como solvente [Djerassi, 1966] se probaron dos condiciones de reacción: 1) 1 atmósfera durante 36 hs y 2) 3,8 atmósferas durante 12 hs. El análisis mediante RMN ¹H del crudo obtenido en cada una de estas reacciones indicó que el sustrato permanecía inalterado.

c. Reducción de dobles enlaces conjugados.

Es sabido que la reducción de una 14,16-dien-20-cetona con sodio en propanol o litio en amoníaco líquido conduce a la configuración normal 17β y que el NaBH₄ puede ser aplicado a la reducción selectiva del enlace etilénico de un gran número de compuestos orgánicos simples que exhiben insaturación α,β. De acuerdo a estos antecedentes se ensayaron diversas reacciones cuyas condiciones se resumen en la tabla 8.

En los dos primeros casos se observó que el sustrato no reaccionaba, y en el tercero se obtuvo una mezcla de productos de mucha menor polaridad que el sustrato (ccd) cuyo espectro de RMN ¹H mostró la ausencia de las señales correspondientes

al protón olefínico unido a C-16 y a los protones metilénicos del grupo ditiolano.

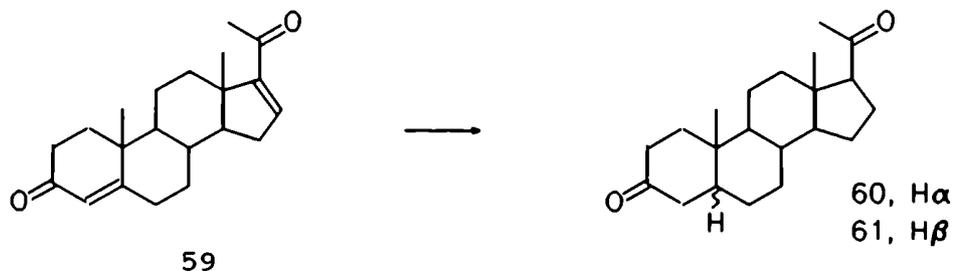
TABLA 8				
REACTIVO	SOLVENTE	T (°C)	t (hs)	REFERENCIA
Sodio	n-propanol	25	3	Heuser, 1955
NaBH ₄	i-propanol	25	16	Kadin, 1966
Litio	NH ₃ (l)/ dioxano	-78	1	Bowers, 1961

Por razones que se clarificarán en la próxima sección se ensayó también la hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17) de la 16-dehidroprogesterona (59) mediante los procedimientos señalados anteriormente. Las condiciones aplicadas se presentan en la tabla 9.

TABLA 9			
CASO	SOLVENTE	CATALIZADOR	t (min)
1	etanol	Pd/C (10%)	60
2	i-propanol	Pd/CaCO ₃ (10%)	30
3	i-propanol	Pd/CaCO ₃ (2%)	20
4	i-propanol	Pd/CaCO ₃ (2%)	60

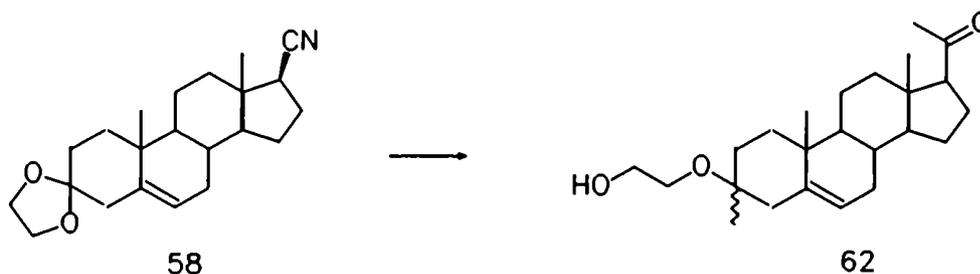
En los dos primeros casos se obtuvo el compuesto completamente saturado como una mezcla de los epímeros 5 α y 5 β de pregnan-3,20-diona (60 y 61 respectivamente) (esta formación de una mezcla de productos que contienen los anillos A/B fusionados *cis* y *trans* es lo esperado para la reducción catalítica de 3-ceto-4-enos [Loewenthal, 1959]). En condiciones más suaves que las anteriores (caso 3) no hubo reacción y prolongando el tiempo de esta última reacción (caso 4) se observó una mezcla, aproximadamente 1 a 1) de 59 y (60 + 61). Se deduce de esto que,

en las condiciones estudiadas, la hidrogenación del doble enlace conjugado 16(17) ocurre a la misma velocidad que la del 3-ceto-4-eno.

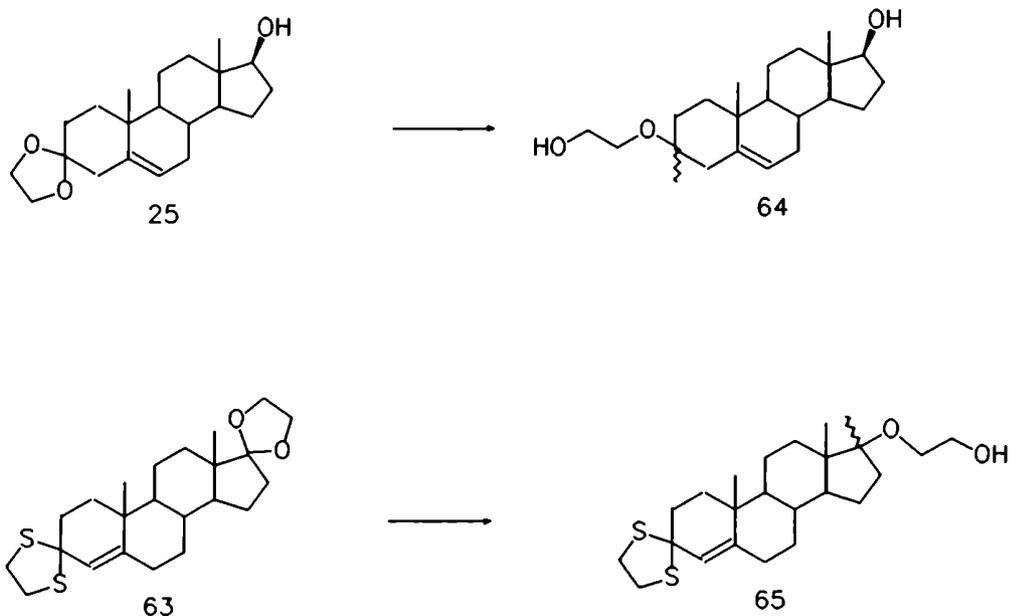


Formación del 20-ceto-pregnano.

Cuando el nitrilo **58** se sometió a la reacción de Grignard en benceno a reflujo, con ioduro de metilmagnesio (preparado en éter etílico) en gran exceso se aisló, como único producto, el compuesto 3-(2-hidroxi-etoxi)-3-metil-pregn-5-en-20-ona (**62**) cuya configuración en C-3 no fue posible asignar (ver más adelante).



La generalidad de la reacción de Grignard con cicloetilénacetales esteroidales se demostró haciendo reaccionar los acetales **25** y 3-cicloetilénditio-17-cicloetilén-dioxi-androst-4-eno (**63**) (preparado para la ocasión a partir del tioacetal **27**) con ioduro de metilmagnesio en exceso, obteniéndose los compuestos **64** (81% de rendimiento) y **65** (29% de rendimiento) respectivamente. La configuración de C-3 en **64** y la de C-17 en **65** no pudo confirmarse fehacientemente.



El bajo rendimiento encontrado en la preparación de 65, sensiblemente inferior al de la preparación de 62 y, más aún al de 64, puede ser atribuido a la baja reactividad del sustrato 63, causada por la gran congestión estérica del acetal en C-17. Apoya esta idea la recuperación de un 40% del sustrato 63 que permanece sin reaccionar luego de 48 hs. En las mismas condiciones son consumidos completamente los sustratos 58 y 25.

Los espectros de RMN ^1H de los compuestos 58 y 62, y 63 y 65 se presentan, con fines comparativos, en la figuras 5 y 6 respectivamente .

La apertura de acetales por reactivos de Grignard no es una reacción inusual. En la década del 50 se la empleaba para preparar amino éteres N-sustituidos partiendo de aminoacetales [Kaye, 1951], y más recientemente han aparecido numerosos trabajos concernientes a esta reacción donde se estudiaron acetales de aldehídos α,β -insaturados, aril etil acetales, 1,3-dioxolanos y ortoésteres ([Abell, 1985] y referencias allí citadas). En todos estos casos la relación molar reactivo de Grignard/acetal fue mayor que 8 a 1.

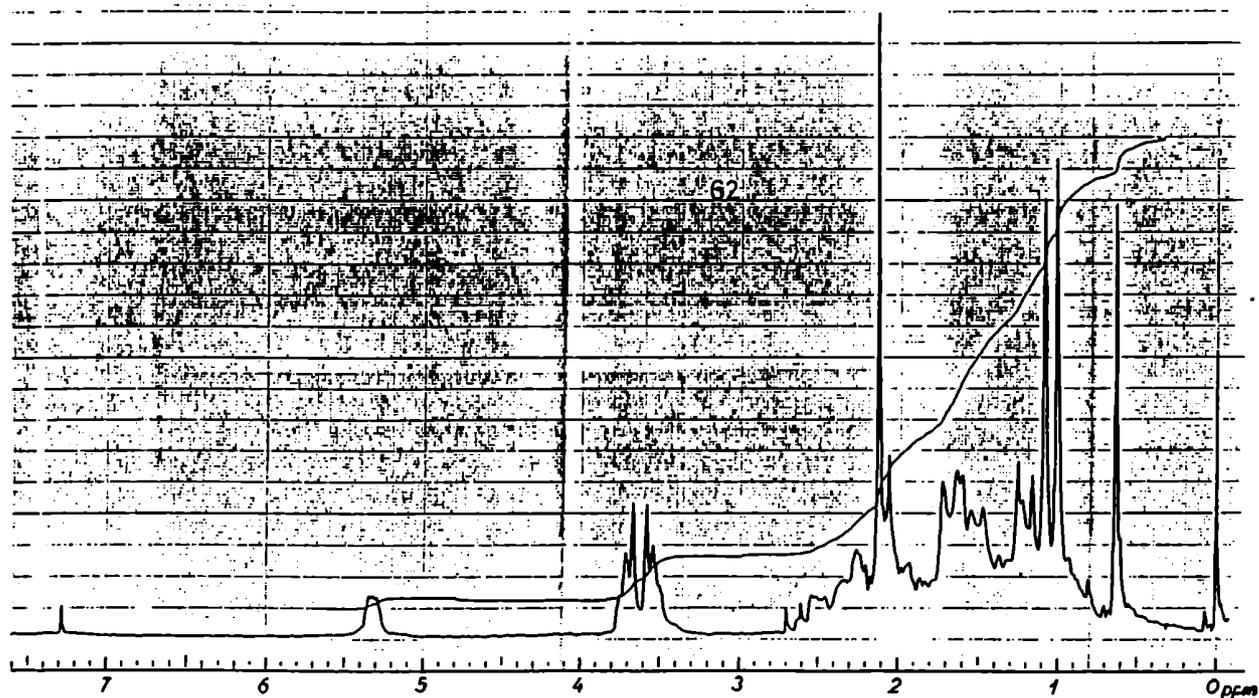
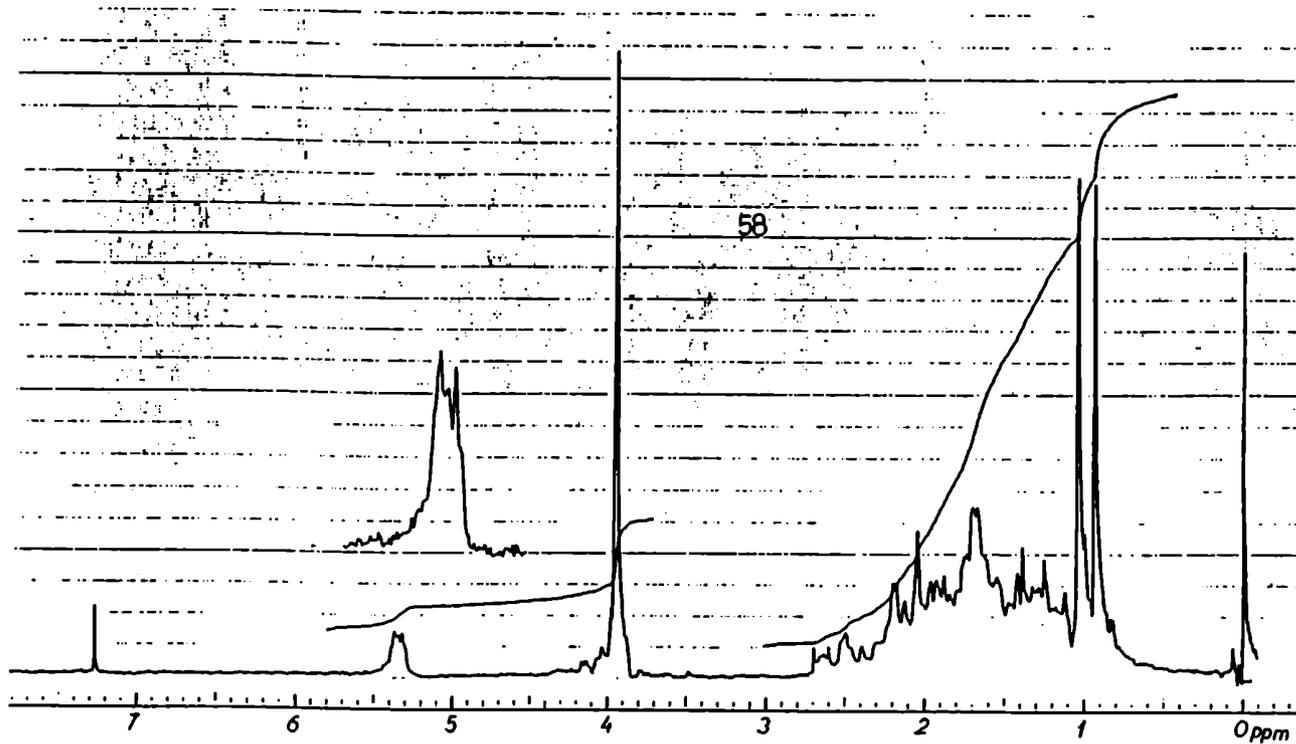


Figura 5: Espectros de RMN ^1H de los compuestos 58 y 62.

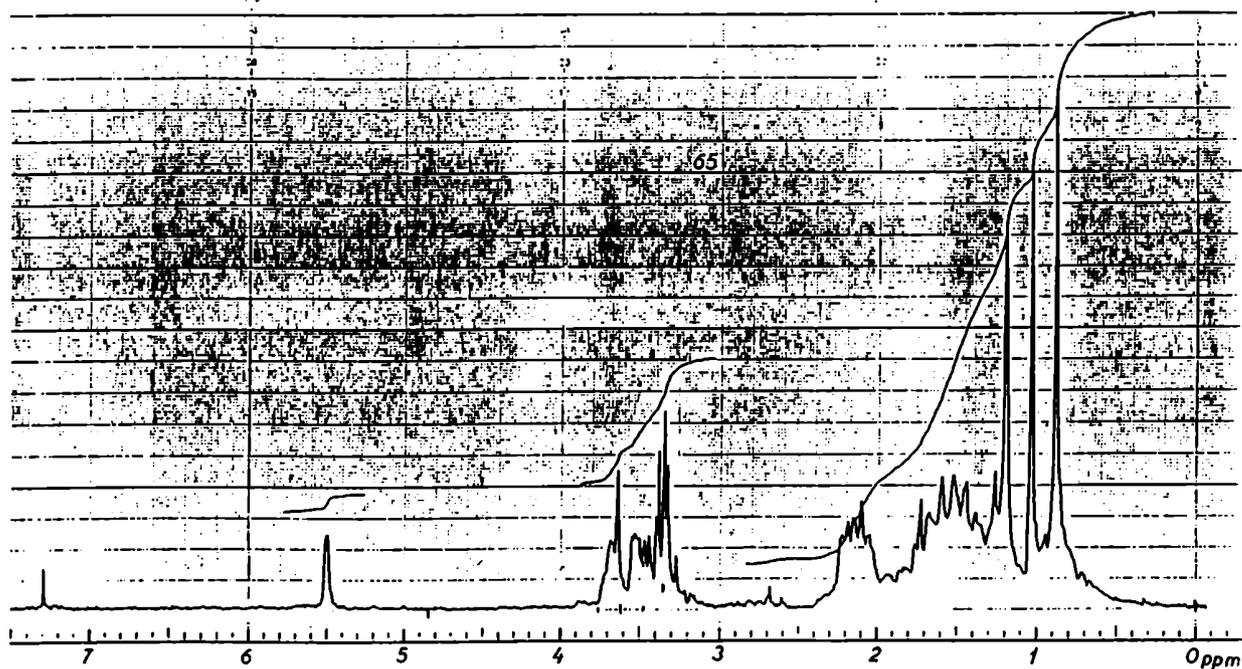
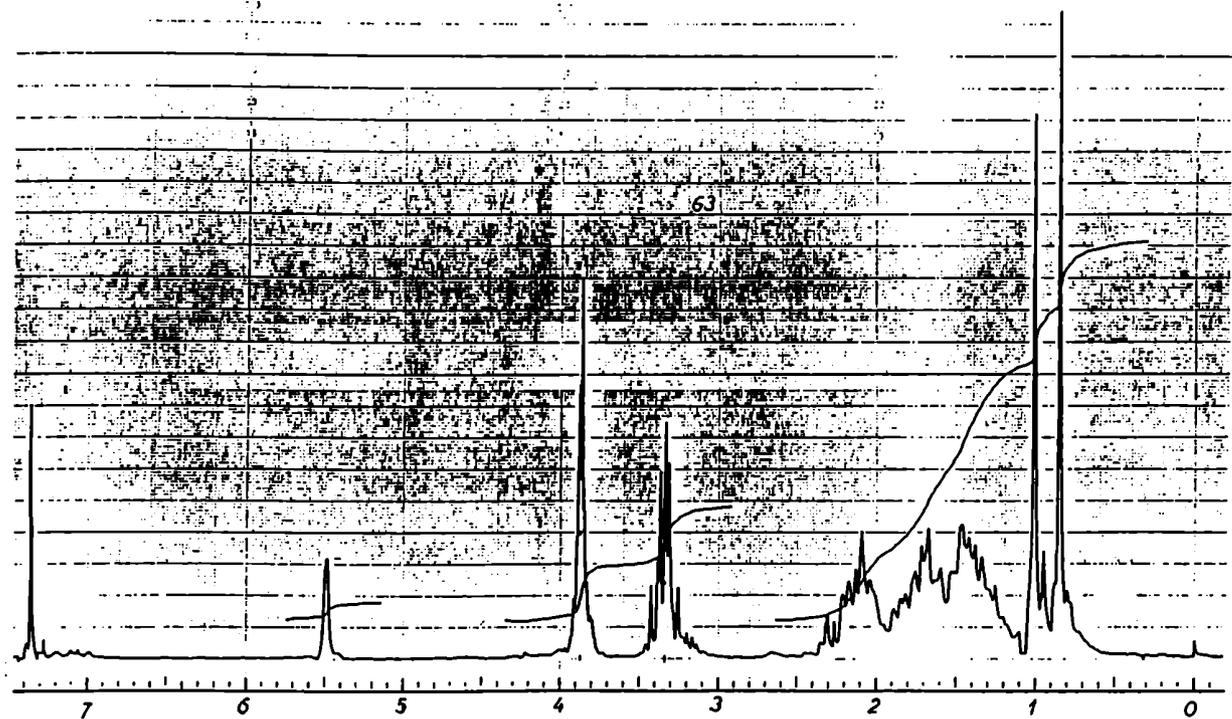
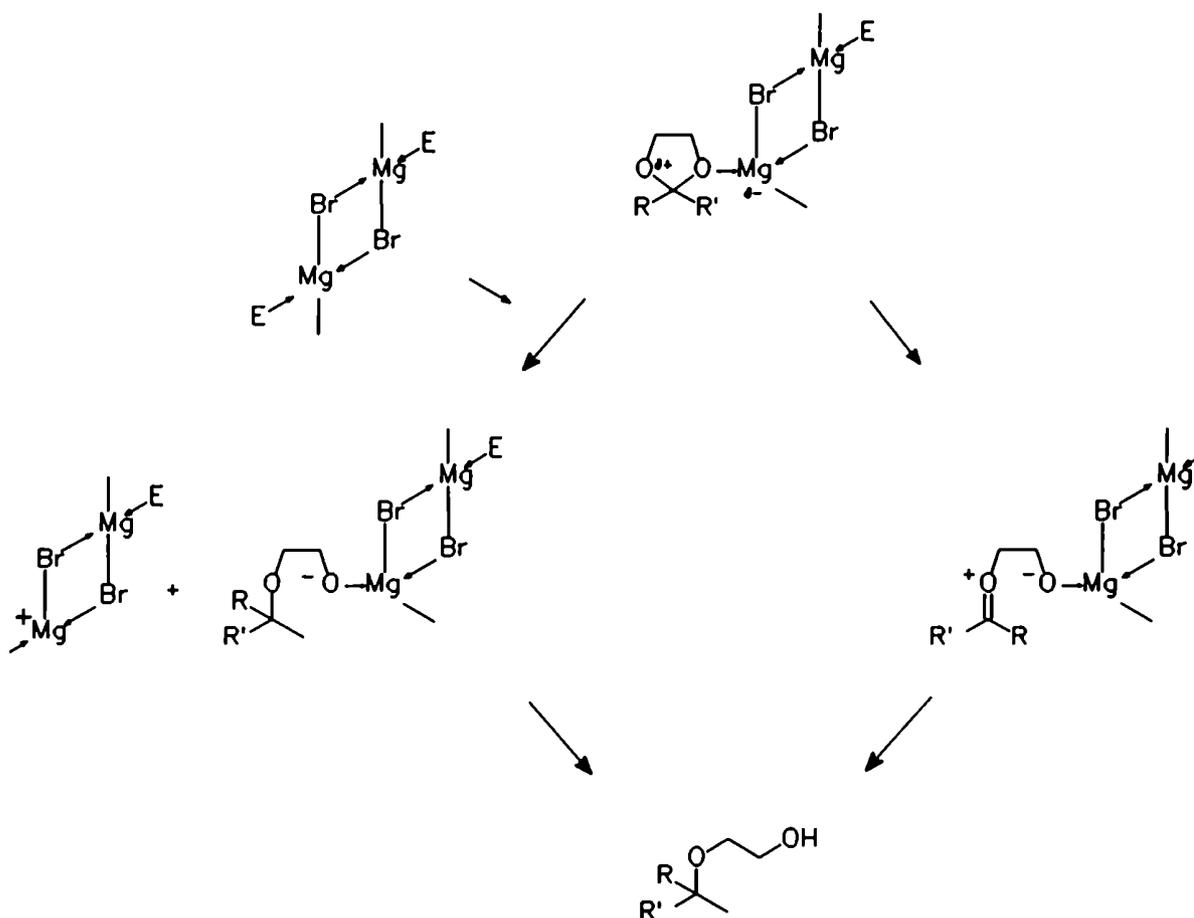


Figura 6: Espectros de RMN ^1H de los compuestos 63 y 65.

En el mecanismo de la reacción de 1,3-dioxolanos-2-sustituidos con reactivos de Grignard en benceno, en presencia de pequeñas cantidades de un solvente etéreo, ha sido postulada la intervención de un complejo $(RMgX)_2 \cdot E \cdot D$ (E=éter etílico, propílico o THF; D=dioxolano) [Westera, 1978]. Este complejo reacciona via un camino de primer orden o via un camino de segundo orden según las condiciones de la reacción. En el primer caso (relación reactivo/dioxolano baja), el complejo es transformado en un ión oxocarbonio que existe como un intermediario discreto, a partir del cual la reacción procede intramolecularmente hacia los productos de adición (otros autores encontraron evidencias que, si bien confirman la participación de un ión oxocarbonio, no concuerdan con la formación de productos por adición intramolecular exclusivamente [Abell, 1985]). El segundo camino es el preeminente cuando está presente una alta concentración de especies diméricas tales como $(RMgX \cdot E)_2$, es decir cuando la relación reactivo/dioxolano es muy alta. La secuencia de etapas involucradas en la apertura de anillo de un dioxolano para ambos procesos se presenta en el esquema 14.

En el caso de las reacciones presentadas al principio de esta sección, el gran exceso de reactivo de Grignard empleado (22 a 1 aproximadamente), y la formación de uno sólo de los epímeros en C-3 o en C-17 están a favor del camino de segundo orden. Esto es así dado que la participación de un ión oxocarbonio como intermediario de reacción conduciría necesariamente a una mezcla de epímeros en C-3 para **62** y **64** y en C-17 para **65**.

El compuesto **65** probablemente sea el epímero que posee el grupo metilo de C-17 en α puesto que la adición de un reactivo voluminoso como el dímero $(MeMgI \cdot Et_2O)_2$ por la cara β estaría desfavorecida por razones estéricas. Sostiene esta conjetura la concordancia observada entre el desplazamiento químico de los protones del metilo en C-17 de **65** (1,20 ppm) y los encontrados en literatura para diversos 17α -metil- 17β -hidroxi-androstanos (1,22-1,25 ppm) [Hampel, 1966; Hauranek, 1966] (las resonancias de los protones en C-18 guardan una relación similar; 0,89 ppm para **65** y 0,90-0,92 ppm para los compuestos de literatura).



Esquema 14: Mecanismo de la reacción de reactivos de Grignard con 1,3-dioxolanos.

No fue factible efectuar una comparación análoga para los compuestos **62** y **64** pues no se encontraron en literatura datos espectroscópicos de compuestos relacionados.

Se decidió, entonces, hacer espectros de NOE diferencia homonuclear con **62** para verificar la posición del grupo metilo unido a C-3. Si su ubicación fuera 3α , la distancia promedio entre H-6 y los protones del metilo unido a C-3, obtenida de la conformación de mínima energía de **62** presentada en la figura 7, sería de $4,086 \text{ \AA}$. Este valor se encuentra justo en el límite (4 \AA) más allá del cual no es factible observar incremento de señales por NOE [Neuhaus, 1989].

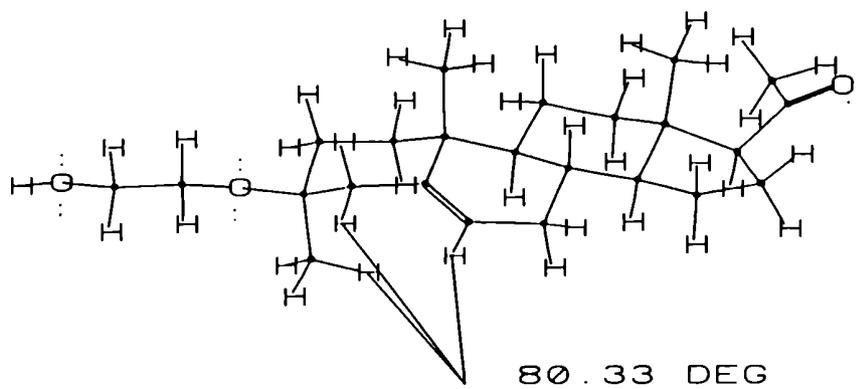
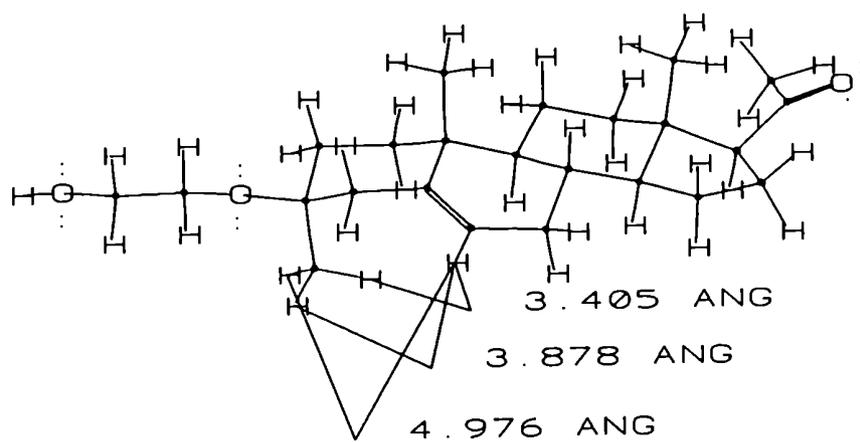


Figura 7: Conformación de mínima energía del compuesto **62**.

Por esta razón fue necesario eliminar el oxígeno disuelto en el solvente deuterado de la muestra (ver parte experimental), inmediatamente antes de efectuar estas experiencias, ya que es sabido que el oxígeno molecular incrementa la velocidad de los procesos de relajación espín-red sin afectar la velocidad de la relajación cruzada reduciendo, en consecuencia, la intensidad de los incrementos. A pesar de estas precauciones, los espectros de NOE diferencia obtenidos por irradiación selectiva de las señales a 1,09 ppm (Me-C-3) y a 5,35 ppm (H-6) no mostraron incremento alguno en la intensidad de la señal de H-6 ni en la de los protones del grupo metilo unido a C-3.

La ausencia de un incremento particular en este tipo de experimentos puede deberse a una variedad de causas distintas a una distancia larga entre los espines involucrados. Sólo cuando estas otras posibles causas han sido descartadas, puede tomarse justificadamente la ausencia de un incremento como evidencia de una distancia larga.

Uno de estos factores son los efectos indirectos, operativos en sistemas de tres espines A-B-C cuando se irradia el núcleo A y se observa C (se mide el incremento $f_c\{A\}$). Para moléculas como la analizada, donde $n_{max} > 0$, estos efectos son negativos y pueden llegar a cancelar las contribuciones directa. En gráficos del incremento $f_c\{A\}$ (obtenido mediante cálculos) en función del ángulo α formado por los espines A-B-C se encuentra que ambas contribuciones se cancelan mutuamente cuando el ángulo α es aproximadamente 78° [Neuhaus, 1989].

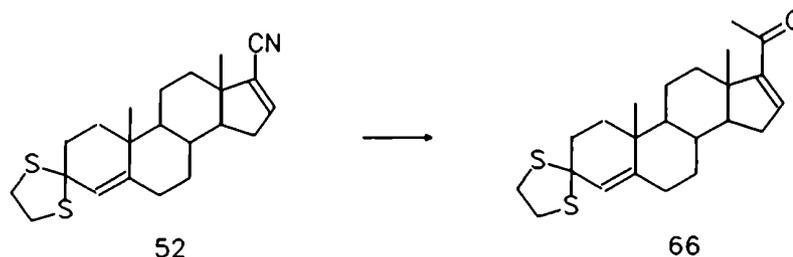
Puede observarse en la figura 7 que el ángulo formado por H-6, H-4e y el protón del metilo en C-3 más cercano a H-6 es de 80° . Por lo tanto, la ausencia de incremento en la intensidad de las señales indicadas en los espectros de NOE diferencia efectuados sobre **62** no prueba, de ninguna manera, que el metilo unido a C-3 esté en posición β .

Retomando el análisis del camino sintético, se presentaban dos caminos alternativos para eludir el obstáculo de la labilidad de los 1,3-dioxolanos frente al ioduro de metilmagnesio:

- I. Reacción de Grignard sobre el nitrilo **52**.
- II. Cambio de grupo protector del nitrilo **58**.

I. Reacción de Grignard sobre el nitrilo 52.

Como no fue posible efectuar la reducción selectiva del doble enlace 16(17) de **52**, la reacción del título sería la primera de una secuencia que en su última etapa correspondería a la hidrogenación selectiva de dicho doble enlace en la 16-dehidroprogesterona:



La transformación de **52** en **66** se intentó inicialmente empleando un exceso de ioduro de metilmagnesio (100 a 1) comparable al de literatura para obtener **66** con rendimiento muy pobre (30% aproximadamente). En vista de esto se decidió probar la reacción del nitrilo **52** con metillito (exceso de 10 a 1), preparado en el momento por reacción de iodometano y n-butillitio en hexano, en distintas condiciones que se resumen en la tabla 10.

Los resultados encontrados con estos métodos no fueron satisfactorios dado que en los casos primero y tercero se observó, mediante ccd, una mezcla compleja de productos, y en el segundo no hubo reacción.

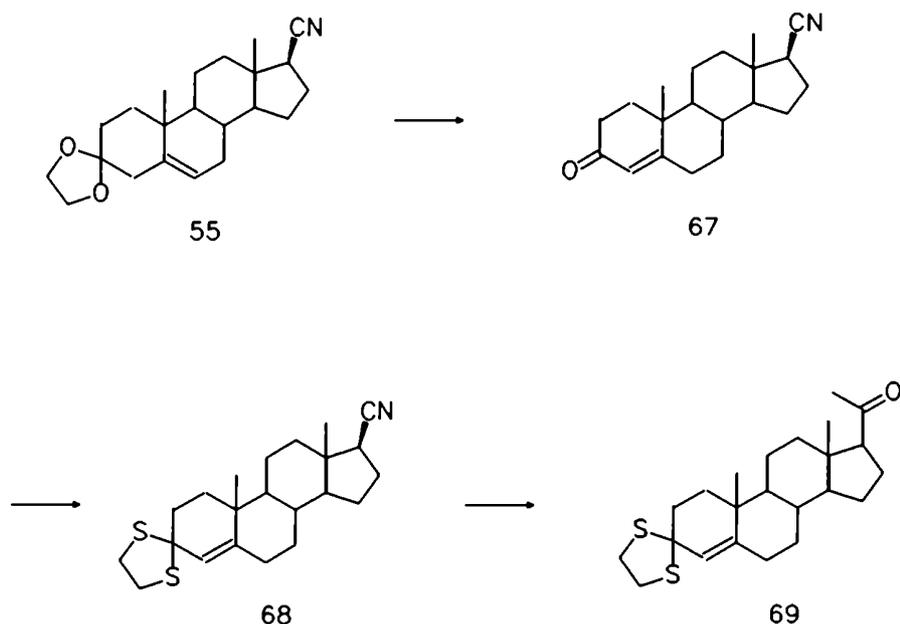
TABLA 10		
SOLVENTE	T (°C)	t (h)
tolueno	110	3
THF	25	24
THF	65	24

En vista de estas dificultades y de la imposibilidad de efectuar la hidrogenación selectiva del sustrato **56**, como se discutió anteriormente, este camino alternativo se cerró.

II. Cambio del grupo protector del nitrilo 55.

Teniendo en cuenta la transformación 60 --> 62, resultaba adecuada la elección de un ditiolano como grupo protector del carbonilo en C-3 debido a su estabilidad en las condiciones de la reacción de Grignard necesarias para la conversión de un nitrilo en una metil cetona.

La introducción de este grupo protector requería la hidrólisis previa del acetal en condiciones suaves. Así fue como 55 tratado con HCl (5%) en THF a 20 °C [Grieco, 1977] brindó el compuesto 67 con muy buen rendimiento. Este, bajo la acción del etanoditiol, dió el tioacetal 68 en forma prácticamente cuantitativa. A su vez, 68 sometido a la reacción de Grignard según : i) CH_3MgI (20/1) en benceno a reflujo durante 40 hs ii) NH_4Cl (ss) a temperatura ambiente durante 1 hora, brindó la metil cetona buscada 69 con 53 % de rendimiento.

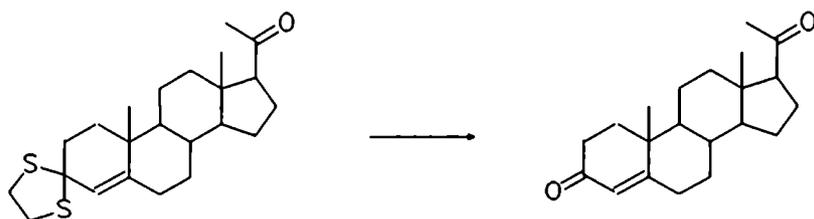


La técnica aplicada para esta última transformación significa una notable mejora del método original de preparación de pregnanos a partir de nitrilos, que emplea un exceso de 150 a 1 del reactivo de Grignard respecto al nitrilo en su primera etapa y una solución 40% de ácido acético a reflujo para la etapa

hidrolítica [Garraffo, 1985]. A pesar de ello, y teniendo en cuenta que posteriormente se debería trabajar con $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ se probó bajar la relación de reactivo a sustrato de 20 a 1 a 5 a 1, observándose que el rendimiento de la reacción bajaba también a 21 %.

Remoción del grupo protector.

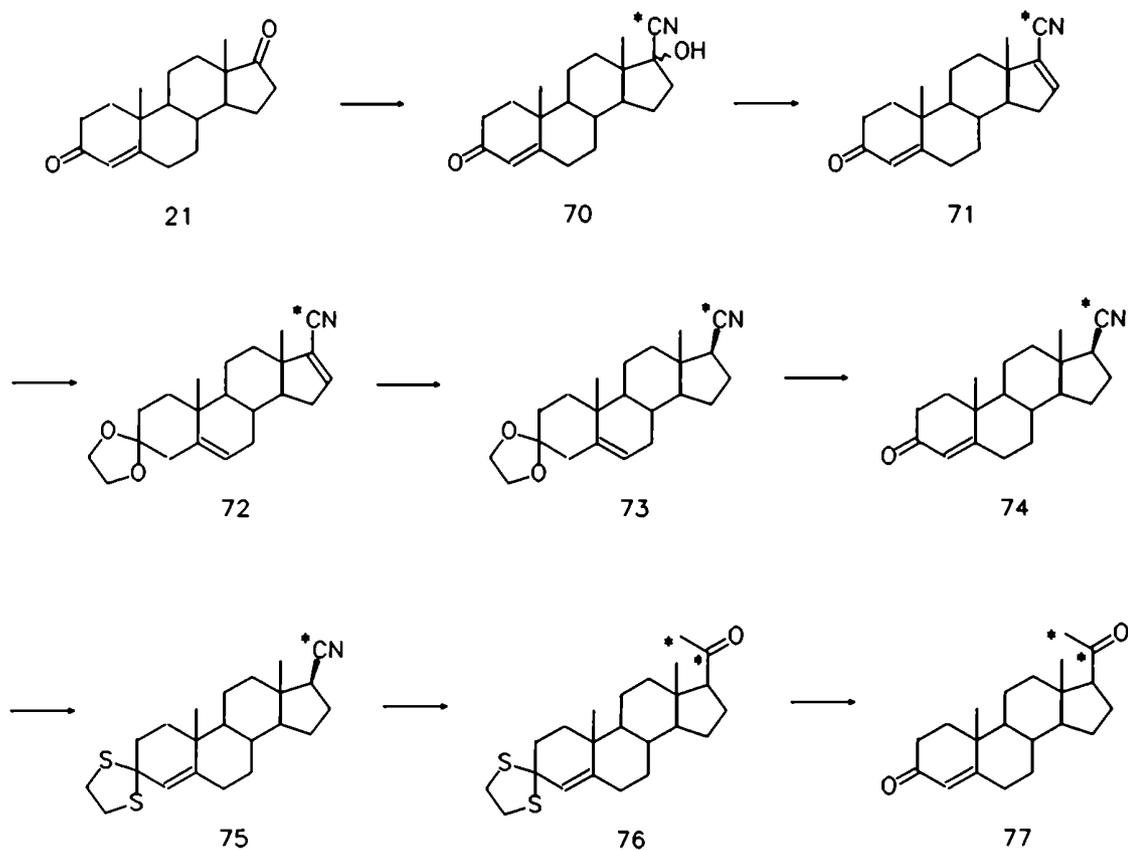
La última etapa de la secuencia sintética en estudio, es decir la transformación del tioacetal **69** en progesterona se consiguió mediante el reactivo sulfato de cobre (II) adsorbido sobre sílica gel; de acuerdo al procedimiento de detioacetalización desarrollado en el presente trabajo de tesis (ver próximo capítulo). Particularmente, esta última reacción se probó en dos condiciones: 1) benceno a reflujo durante 14 hs (70% de rendimiento) y 2) cloroformo a reflujo durante 5 hs (80% de rendimiento).



SINTESIS DE [20-21- $^{13}\text{C}_2$]-PROGESTERONA.

La síntesis de progesterona marcada en C-20 y C-21 se desarrolló de acuerdo al procedimiento final discutido en la sección anterior. Este proceso puede resumirse en el esquema 15.

La condensación de la androstenediona **21** con cianuro de potasio- ^{13}C produjo la cianhidrina **70** como una mezcla de epímeros; siendo el 17 β -ciano-17 α -hidroxi el componente mayoritario. El compuesto **70** fue deshidratado al nitrilo α,β -insaturado correspondiente **71** por reacción con oxiclورو de fósforo en piridina. La protección de la función 3-ceto-4-eno de **71** como su correspondiente acetal **72** fue necesaria para isomerizar el doble enlace de Δ^4 a Δ^5 . De esta manera la



Esquema 15: Camino de síntesis de la 20,21- $^{13}\text{C}_2$ -progesterona.

hidrogenación catalítica de **72** rindió el compuesto **73** con 100% de rendimiento. Este último se hidrolizó en condiciones suaves brindando **74** con buen rendimiento. El compuesto **74** se trató con 1,2-etanoditiol para dar el tioacetal **75** con rendimiento prácticamente cuantitativo. A su vez, **75** reaccionó con ioduro de metilmagnesio- ^{13}C , preparado partiendo de ioduro de metilo marcado, originando el 20-ceto-pregnenetioacetal **76**. La etapa final se efectuó con el reactivo sulfato de cobre (II) adsorbido en sílica gel en cloroformo a reflujo, obteniéndose la

progesterona doblemente marcada 77 con excelente rendimiento. El rendimiento global de toda la secuencia sintética a partir de 21 fue de 14%.

Los espectros de masas de $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -progesterona y de progesterona se presentan en la figura 8. Puede observarse la diferencia de dos unidades de masa entre los iones correspondientes a M^+ , M^+-CH_3 , M^+-cetena y CH_3CO^+ entre otros.

Los espectros de RMN ^1H de 76 y 77 se muestran en la figura 9. Se observa claramente en ambos espectros el doble doblete correspondiente a H-21 centrado en 2,13 ppm, con constantes de acoplamiento de aproximadamente 127 Hz y 6 Hz características de los acoplamiento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}-\text{C}-^1\text{H}$ respectivamente.

Los espectros de RMN ^{13}C de 77 con desacople de banda ancha y con desacople retardado se muestran en la figura 10. Se pueden apreciar los dobletes a 31,3 y 208,7 con constantes de acoplamiento de 39,2 Hz que corresponden al acoplamiento $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ de los carbonos 21 y 20.

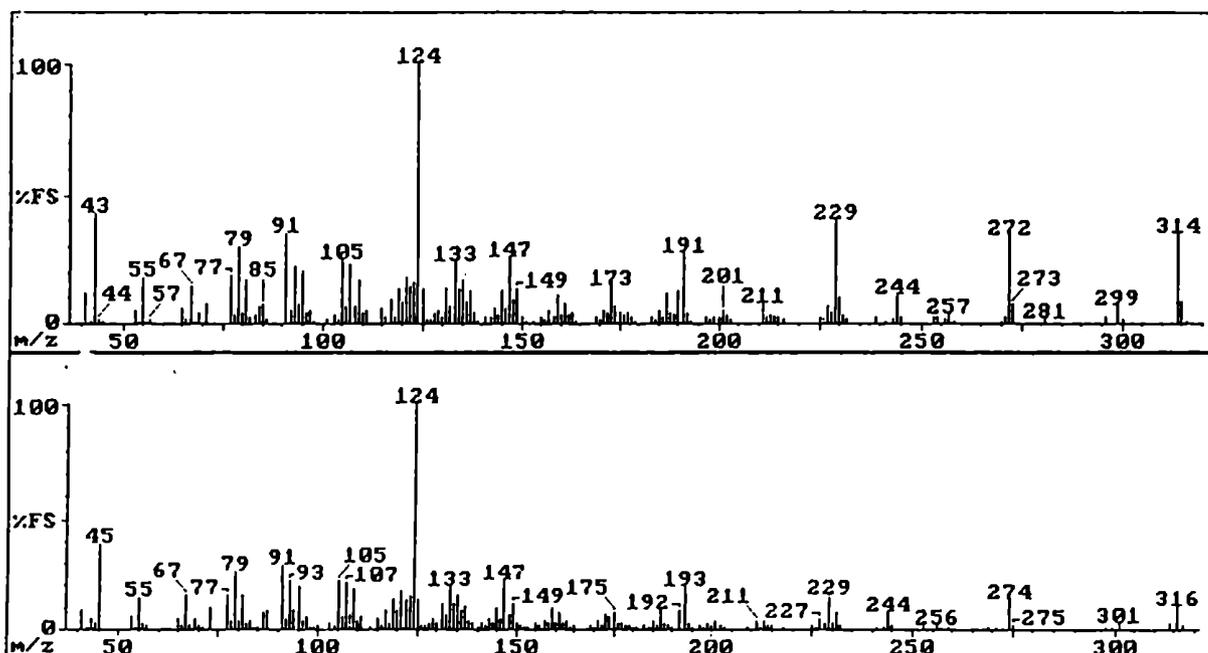


Figura 8: Espectros de masas de progesterona y de $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -progesterona

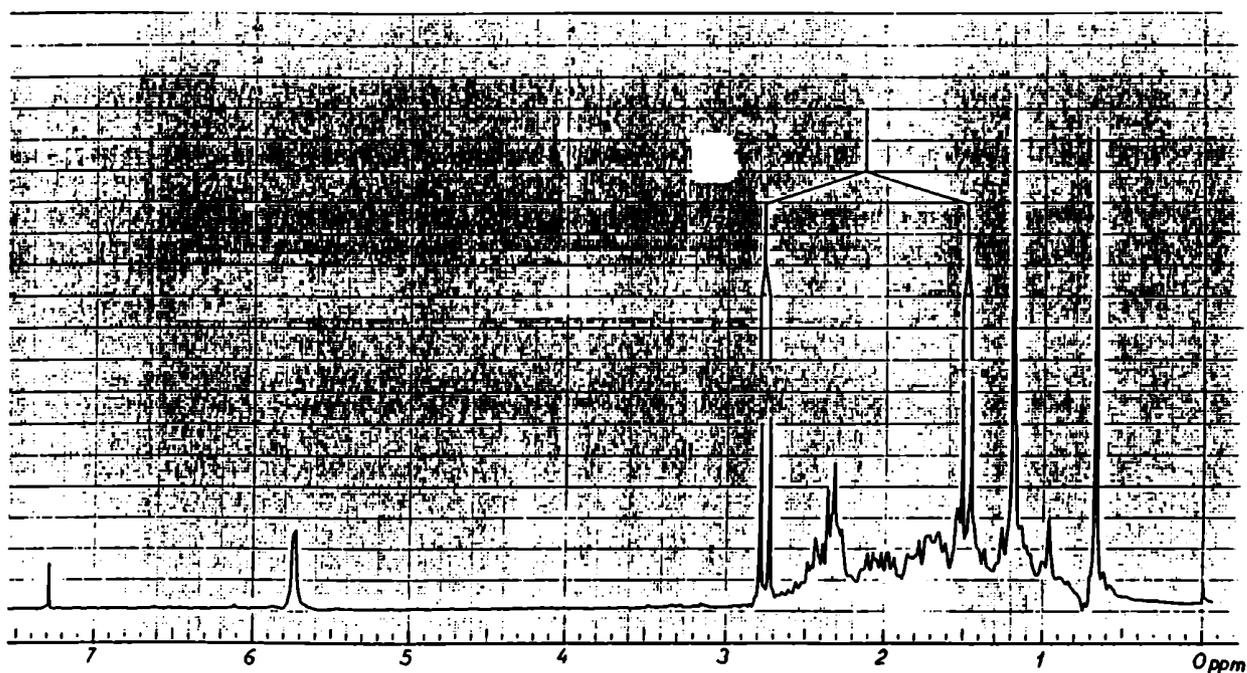
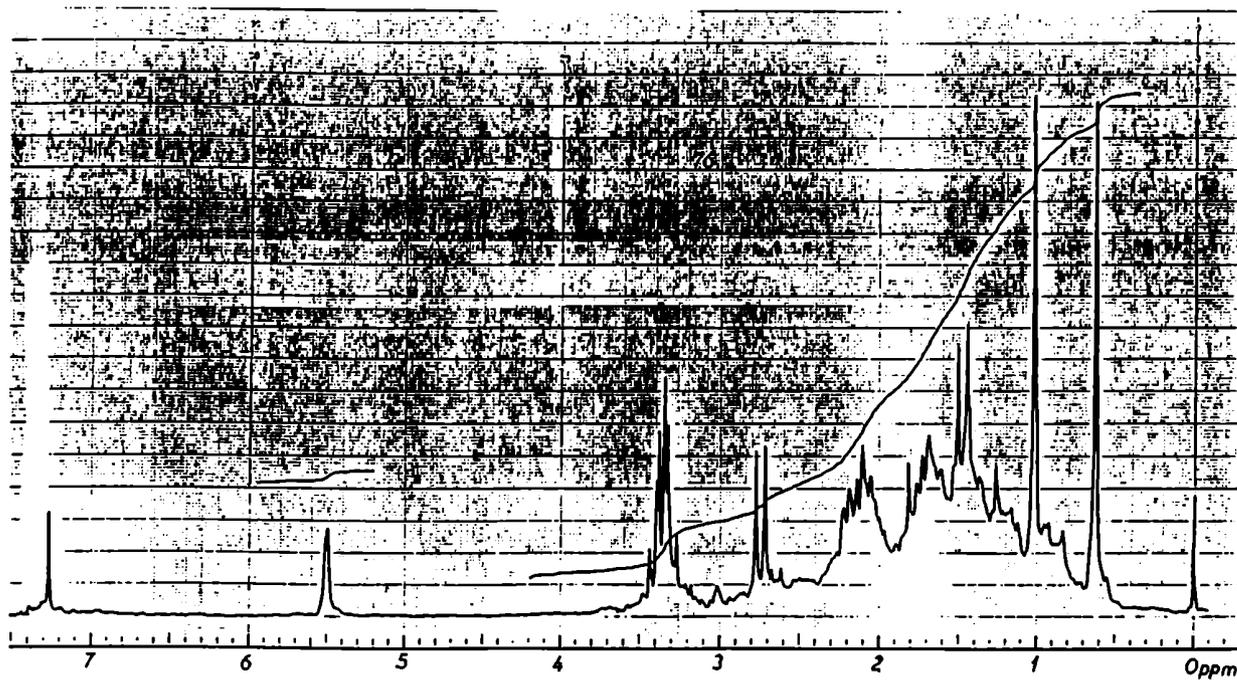


Figura 9: Espectros de RMN ^1H de 76 y 77.

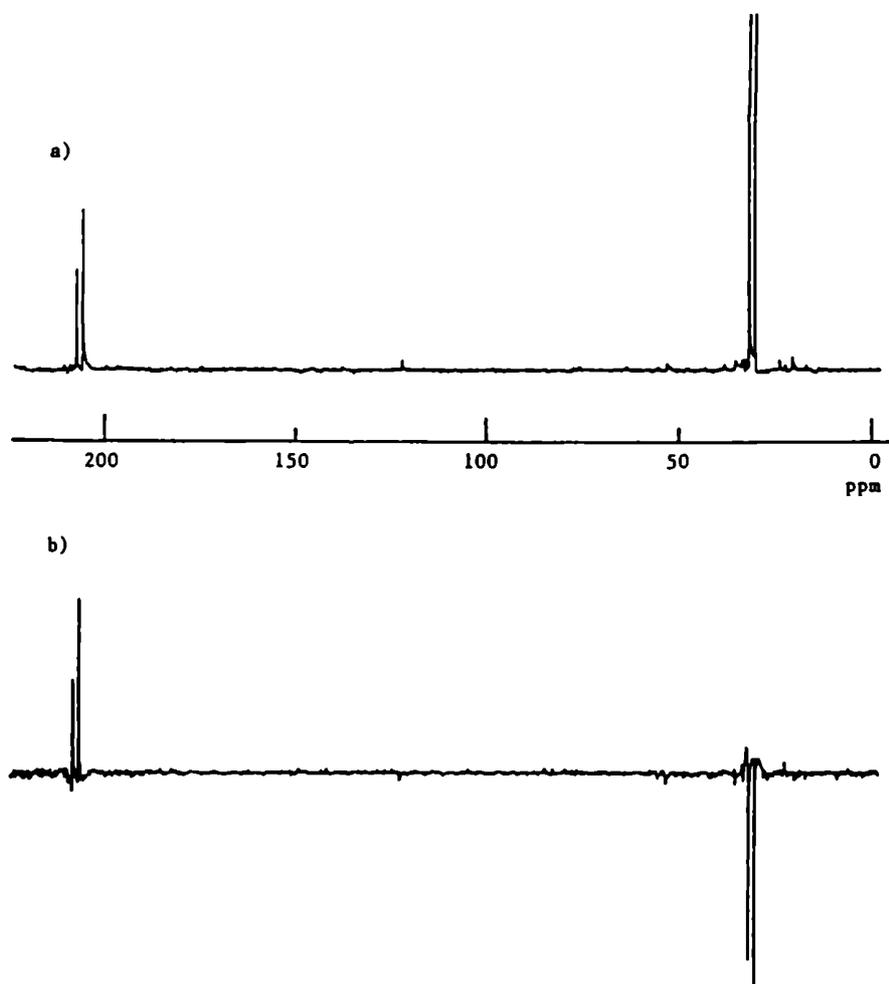
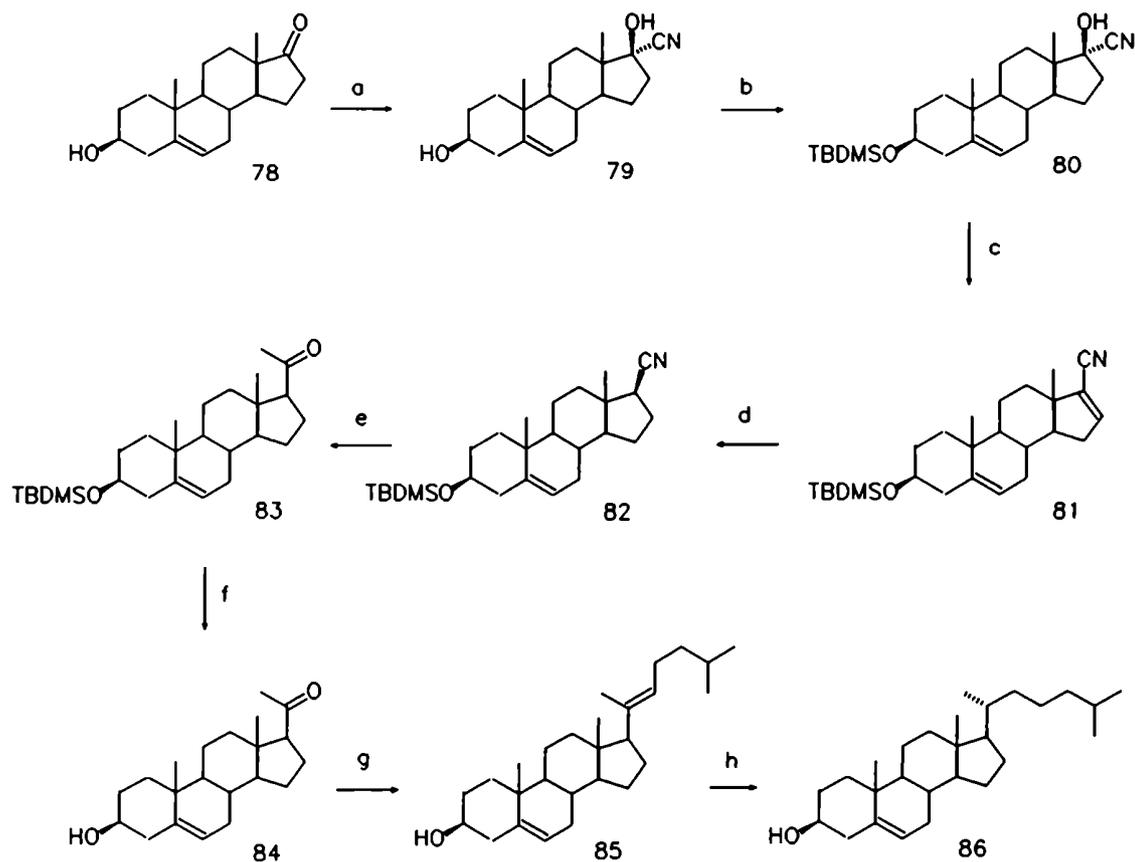


Figura 10: Espectros de RMN ^{13}C de 77, a) desacople de banda ancha, b) desacople retardado.

SINTESIS DE COLESTEROL

Como extensión a la síntesis de $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -progesterona se diseñó el camino de síntesis presentado en el esquema 16, con el objetivo de establecer las condiciones óptimas para la introducción de marcación isotópica en C-20 y C-21 de la pregnenolona (84) y para la construcción, a partir del nitrilo 82, de $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol.

Se discuten a continuación las diversas pruebas realizadas para establecer las condiciones más adecuadas para cada una de las etapas del proceso esquematizado.



a. KCN, AcOH, EtOH
 b. TBDMSiCl, Im, DMF
 c. POCl₃, Py
 d. H₂, Pd/C, AcOEt

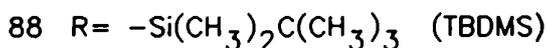
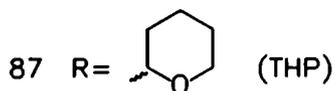
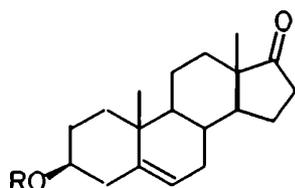
e. CH₃MgI, benceno
 f. TBAF, THF
 g. Ph₃P=CH(CH₂)₂CH(CH₃)₃, dioxano
 h. H₂, PtO₂, dioxano:AcOH (50:1)

Esquema 16: Síntesis de colesterol.

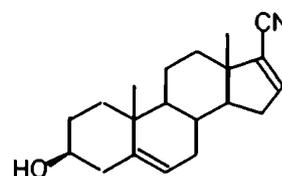
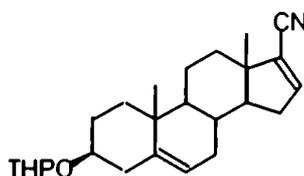
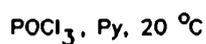
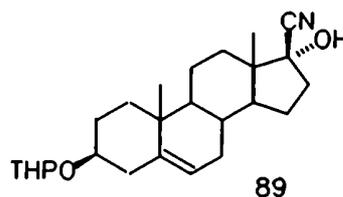
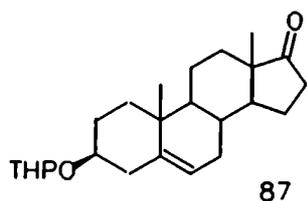
a. Formación de la cianhidrina en C-17 y protección del hidroxilo 3β (78-->80).

A causa de las ya comentadas reglas básicas para el trabajo con compuestos marcados, en un primer momento se ensayó la secuencia inversa, es decir, protección del hidroxilo 3β y posterior formación de la cianhidrina.

La protección del hidroxilo 3 β se efectuó, partiendo de **78**, por dos métodos diferentes, preparándose los compuestos 3 β -O-(tetrahidropiranyl)-androst-5-en-17-ona (**87**) (como mezcla de epímeros en C-1') y 3 β -O-(t-butildimetilsilil)-androst-5-en-17-ona (**88**). Ambos se consiguieron de manera prácticamente cuantitativa, mediante procedimientos de probada efectividad en el campo de los esteroides ([Miyashita, 1977] y [Hosoda, 1973] respectivamente).



La formación del derivado 17 β -ciano-17 α -hidroxilado (**89**) a partir de **87** se logró con muy buen rendimiento modificando ligeramente la técnica empleada en la preparación de **50** (ver parte experimental). Sin embargo, la reacción posterior de deshidratación con POCl_3 en piridina, a pesar de llevarse a cabo en condiciones más suaves que las discutidas anteriormente, produjo la remoción parcial del grupo protector según se indica:



A raíz de este resultado indeseable se preparó el compuesto **88** que posee un grupo protector de alcoholes más resistente a las condiciones de la reacción de deshidratación y, como ventaja adicional, no genera un nuevo centro quiral como sucedía en la formación de **87**. La preparación de la cianhidrina **80**, partiendo de **88**, se ensayó inicialmente mediante el método de Nitta el cual brindó un rendimiento sorprendentemente pobre para este tipo de reacción (70%). Con el objeto de mejorar el rendimiento se probaron diversas condiciones de reacción, siguiendo la técnica del exceso de ACOH en el medio de reacción. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11.

TABLA 11			
METODO	KCN/ 88	SOLVENTE	RENDIMIENTO
I	5,5	EtOH	60%
II	7	EtOH	70%
III	10	EtOH	90%
IV	5,5	MeCN	40%
V	5	DMF	70%

Puede observarse que tal como ocurría en la preparación de las cianhidrinas **48** y **49** (ver páginas 53 y 54), el método que dió mejor resultado en este caso implicó el empleo de un gran exceso de KCN respecto del compuesto **88**, y brindó mayoritariamente el epímero 17 β -hidroxi-17 α -ciano de **80** según se determinó por RMN ¹³C.

Como sucedió con la preparación de **50**, la relación óptima entre rendimiento de la cianhidrina/masa de KCN se obtuvo trabajando con un 17-oxo-androsteno cuya funcionalidad en C-3 no está protegida. Así fue como se obtuvo **79** partiendo de **78** con 100% de rendimiento empleando 4,2 moles de KCN por mol de **78** en etanol como solvente, según el método de Nitta. El espectro de RMN ¹³C del producto permitió determinar que, contrariamente a lo encontrado en las preparaciones de **50** y de **89**, el epímero

mayoritario fue el 17 β -hidroxi-17 α -ciano. Esta anomalía en la estereoselectividad de la reacción podría atribuirse al cambio de solvente, metanol en los casos de **50** y **89** y etanol en este último, y también a la menor solubilidad en etanol que presentaría el epímero 17 β -hidroxi-17 α -ciano de **79**, respecto del epímero 17 α -hidroxi-17 β -ciano. La formación de este último se vería, entonces, desfavorecida por la rápida precipitación del epímero producido por control cinético.

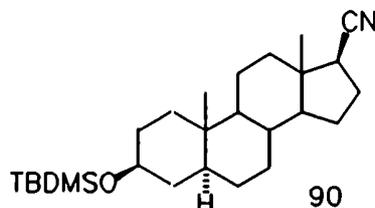
La consiguiente protección del hidroxilo 3 β de **79** como su t-butildimetilsililéter (compuesto **80**) fue también cuantitativa y no afectó al hidroxilo 17 α debido al impedimento estérico de esta posición, y al gran tamaño del reactivo protector. Como antecedente, el compuesto androst-5-en-3 β ,17 β -diol brinda únicamente el derivado 3 β -sililado [Hosoda, 1973]).

b. Deshidratación de la cianhidrina e hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17) (80--->82).

La transformación de la cianhidrina **80** en el nitrilo α,β -insaturado **81** se realizó con POCl₃ (22 mmoles por mmol de sustrato) en piridina a temperatura ambiente. Este cambio en las condiciones de la reacción respecto a las empleadas con la cianhidrina **50** supuso una mejora en la limpieza de la reacción y facilitó el tratamiento posterior de la mezcla reaccionante; aunque no implicó un aumento en el rendimiento de la misma. Se observaron rendimientos en el rango 42%-60% para tiempos de reacción que variaron entre 48 y 72 horas. Se observó también que, independientemente del exceso de reactivo usado (7/1 o 22/1), el empleo de piridina Mallinckrodt secada sobre lentejas de KOH en vez de piridina anhidra Aldrich traía aparejado la reversión de la cianhidrina al compuesto carbonílico original; con el primero de esos solventes se obtenía, luego de 48 hs, el compuesto **88** como único producto de la reacción.

La hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17) del compuesto **81** se consiguió en condiciones similares a las empleadas en el caso del dieno **57** es decir, acetato de etilo como solvente y Pd/C (10%) como catalizador. El tiempo de esta reacción debió reducirse a 7 horas (20 horas en el caso de **57**)

para obtener cuantitativamente el nitrilo 17 β **82**, ya que prolongando el tiempo de la hidrogenación a 20 horas se obtenía como único producto el nitrilo completamente saturado 3 β -o-(t-butildimetilsilil)-17 β -ciano-5 α -androstando (**90**).



Se desprende de esto último que la hidrogenación catalítica en fase heterógena es más regioselectiva con el dieno **57** que con el dieno **81**. Esta diferencia en la regioselectividad de la reacción puede explicarse por el mayor impedimento estérico que muestra la cara α de los anillos A y B del compuesto **57** (ver página 64) originado por la presencia en C-3 del anillo cicloetilénacetil, mientras que **81** es portador en C-3 del grupo t-butildimetilsililo el cual, si bien voluminoso, está orientado β .

c. Reacción de Grignard y remoción del sililéter (82--->84).

Para la conversión del nitrilo **82** en la metilcetona correspondiente **83** se siguió la misma técnica que en la preparación del compuesto **69** empleándose 10 mmoles de ioduro de metilmagnesio por mmol de nitrilo con un rendimiento de 70%. Este resultado significó una nueva mejora en las condiciones de esta reacción (20 mmol de reactivo de Grignard por mmol de sustrato para rendimientos de alrededor de 50% en el caso de **69**). Tratando de optimizar un poco más la relación reactivo de Grignard/nitrilo se realizó una prueba con un exceso de 8 a 1. Sin embargo, el rendimiento de la reacción se redujo notablemente a 53%.

Es conocido que los sililéteres son estables en condiciones hidrolíticas ácidas pero pueden ser eliminados por la acción del anión fluoruro [Corey, 1972]. De esta manera, el tratamiento del sililéter **83** con fluoruro de tetra-n-butilamonio (TBAF) en THF anhidro durante 20 horas a temperatura ambiente produjo

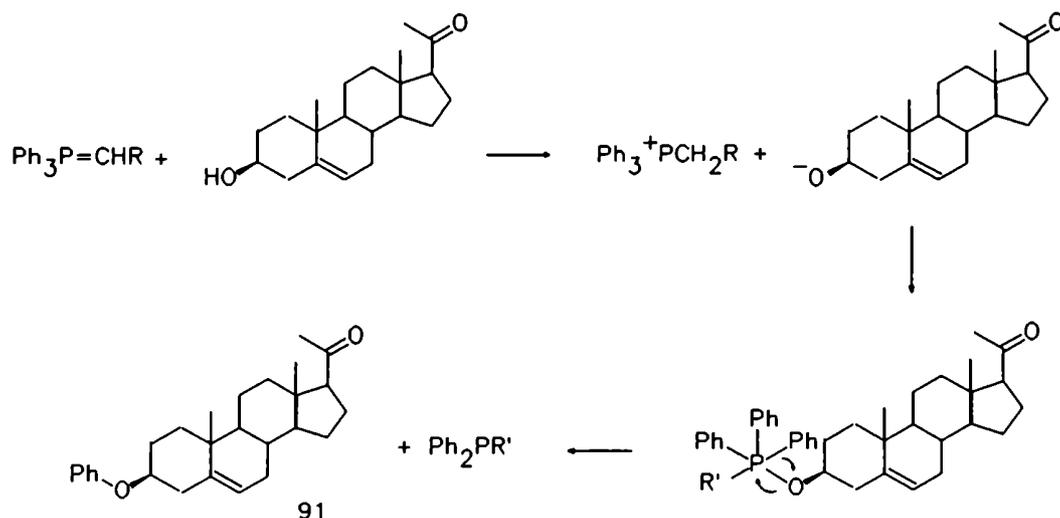
pregnenolona (84) de manera prácticamente cuantitativa.

d. Reacción de Wittig sobre el carbonilo en C-20 (84--->85).

La literatura muestra numerosos ejemplos de la reacción de Wittig con 20-oxo esteroides que señalan rendimientos pobres incluso con iluros relativamente pequeños. Sin embargo, existen otros ejemplos de reacciones de Wittig exitosas con pregnenolona y fosforanos voluminosos, preparados a partir de las correspondientes sales de fosfonio y t-amilato de sodio o de potasio, en benceno o tolueno a reflujo durante 2-3 horas, que rinden exclusivamente los E-20(22)-dehidro esteroides ([Schow, 1979] y referencias allí citadas).

Teniendo en cuenta este antecedente se ensayó la transformación 84 ---> 85 generando el iluro del bromuro de trifenil-1-(4-metil)-pentil-fosfonio (7/1 respecto al sustrato) con t-amilato de potasio (preparado según literatura con alcohol t-amílico y KH) en tolueno a reflujo durante 3 hs. Mediante ccd se observó la formación incipiente del producto buscado. Se prolongó la reacción durante 21 horas adicionales para obtener 85 con 12% de rendimiento y un 50% de sustrato sin reaccionar. Se realizó entonces una segunda prueba, esta vez en tolueno a reflujo durante 20 horas obteniéndose 85 (23%) y el compuesto 3 β -fenoxi-pregn-5-en-20-ona (91) (21%). Este producto proviene, muy probablemente, de la adición del alcóxido esteroideal al fósforo positivo (formados ambos en la reacción ácido-base entre la pregnenolona y el fosforano), seguida del colapso interno del intermediario fosforado pentacovalente [Eyles, 1966] de acuerdo al esquema 17.

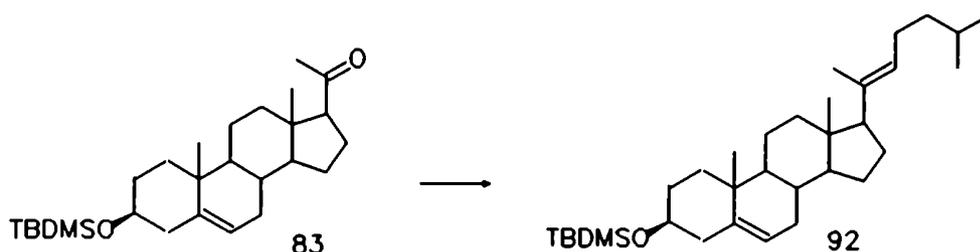
Para evitar la formación del feniléter 91 y, en consecuencia, incrementar el rendimiento de la reacción se disponían de dos posibilidades: 1) emplear como sustrato un 20-oxo-pregnano con el hidroxilo 3 β protegido como el compuesto 83, ó 2) efectuar la reacción de Wittig sobre 84 en condiciones más suaves que las presentadas (es sabido que tiempos de reacción más prolongados o mayores excesos de fosforano a sustrato conducen a la aparición de cantidades más grandes del feniléter en C-3 [Schow, 1979]).



Esquema 17: Mecanismo de formación del compuesto 91.

Se estudiaron exhaustivamente ambas posibilidades:

d.1. Reacción de Wittig sobre 83.



Las condiciones de las pruebas efectuadas y los resultados obtenidos en las mismas se resumen en la tabla 12.

Puede observarse que la protección del hidroxilo 3 β previa a la reacción de Wittig no trajo como consecuencia una mejora sustancial en el rendimiento de la reacción, a pesar de las diversidad de condiciones de reacción practicadas. Se observa también que grandes excesos de iluro respecto al sustrato (casos 2 y 7) implicaron rendimientos de reacción muy pobres, principalmente a causa de dificultades en la purificación de los productos

crudos. El empleo de medios de reacción "libres de sales" brindó resultados no muy superiores a los obtenidos con solventes como el dioxano que solubilizan parcialmente la sal formada durante la preparación del iluro (compárese casos 1,4 y 6).

TABLA 12					
CASO	ILURO/83 (molar)	BASE	SOLVENTE	TIEMPO (hs)	RENDIMIENTO (%)
1	7	t-AmOK	benceno	15	24
2	10	n-BuLi	benceno	72	10*
3	3	n-BuLi	tolueno	18	23
4	7	n-BuLi	tolueno	24	28
5	5	n-BuLi	THF	24	0
6	6	n-BuLi	dioxano	30	21
7	10	n-BuLi	dioxano	24	11
8	5	NaNH ₂	THF	24	0
9	8	NaNH ₂	THF	48	10*

* Rendimientos aproximados (ccd). En todos los casos, excepto en 5, la solución del iluro se preparó por separado y se agregó a la solución del sustrato. Todas las reacciones se hicieron a la temperatura de ebullición del solvente.

d.2. Reacción de Wittig sobre **84** en condiciones más suaves que las originales.

Considerando los resultados presentados en la sección anterior, para estas pruebas se descartó el uso de THF como solvente y de NaNH₂ como base. Se desechó también el empleo de t-amilato de potasio debido a lo engorroso de su preparación en tanto que su empleo no presenta ventaja alguna. Por estos motivos, en los ensayos que se presentan en la tabla 13 el iluro se generó con n-BuLi como base.

TABLA 13				
CASO	ILURO/ 84 (molar)	SOLVENTE	TIEMPO (hs)	RENDIMIENTO (%)
1	5	tolueno	48	20
2	6	benceno	48	21
3	6	dioxano	20	37
4	10	dioxano	48	10

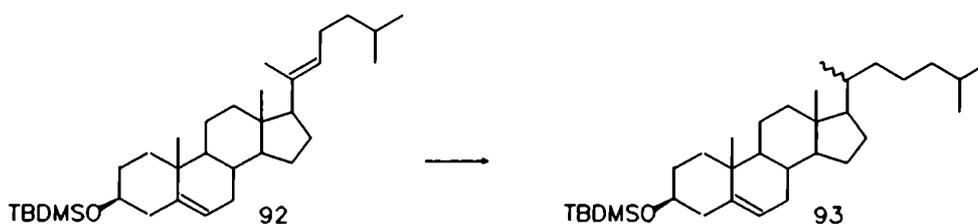
En ninguna de estas pruebas se observó la aparición del feniléter 91 como producto secundario por lo que puede concluirse que su formación se evita trabajando a temperatura menor o igual a 100 °C (temperatura de ebullición del dioxano) o con relación molar de iluro a sustrato no superior a 5/1. A pesar de esto, el mejor rendimiento obtenido no es bueno (caso 3) y no fue posible optimizarlo realizando pequeñas modificaciones a la técnica, como ser tiempos de reacción más prolongados y formación *in situ* del iluro. Más aún, el tiempo y el rendimiento de este caso no resultaron enteramente reproducibles. Los tiempos necesarios para la desaparición del sustrato oscilaron entre 6 y 24 hs y los rendimientos encontrados estuvieron en el rango 20-37%. Por otra parte, el empleo de un exceso más grande de iluro (caso 4) redunda, nuevamente, en menor rendimiento de la reacción.

e. Hidrogenación del doble enlace E-20(22) (85--->86).

Hace diez años se informó que la reducción regio y estereoselectiva de E-20(22)-dehidroesteroides puede lograrse con PtO₂ prereducido como catalizador en dioxano-AcOH (98:2) a presión ligeramente superior a la atmosférica. La selectividad de la estereoquímica natural sobre la no natural que es posible encontrar en estas condiciones puede alcanzar a 70:30 en favor de la configuración natural C-20(R). Estos resultados son intermedios entre los más antiguos de Nes y Uskokovic por un lado, quienes sugerían que esta reducción no era selectiva, y Piraux y McMorris por el otro, quienes postulaban selectividades

en el rango 4:1 a completa, favorable al estero natural ([DuBois, 1982] y referencias allí citadas). Este último autor especuló que esta disparidad puede originarse en diferencias en la actividad del catalizador empleado por los distintos investigadores.

En base a estos antecedentes, las primeras pruebas de la hidrogenación selectiva se efectuaron con el dieno **92** al que se hidrogenó a presión atmosférica en dioxano:AcOH (50:1) en presencia de PtO₂ (70 mg/mmol durante 4 hs luego de las cuales se agregó una segunda porción de PtO₂) [Schow, 1979] durante 30 hs para obtener casi cuantitativamente el compuesto **93** como mezcla de epímeros en C-20 según se indica:

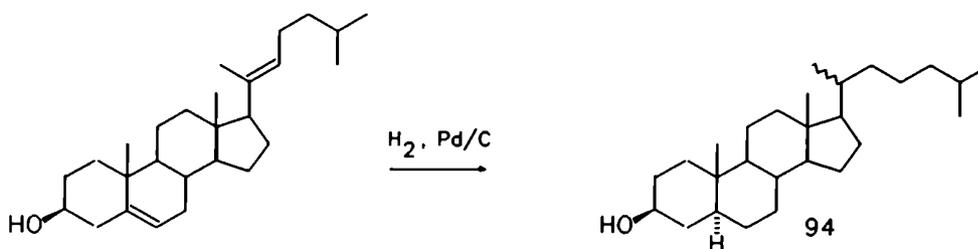


La composición de la mezcla de epímeros se determinó, en forma aproximada, mediante RMN ¹³C promediando la relación de las intensidades de las señales correspondientes a los carbonos 17,18 y 20 de los epímeros 20(R) y 20(S), claramente diferenciables en el espectro de la mezcla. Este método se basa en la suposición de que los tiempos de relajación, y los incrementos en intensidad de las señales por NOE, de los carbonos en observación son similares en ambos epímeros. De esta manera se encontró un valor de 78:22 favorable al epímero 20(R).

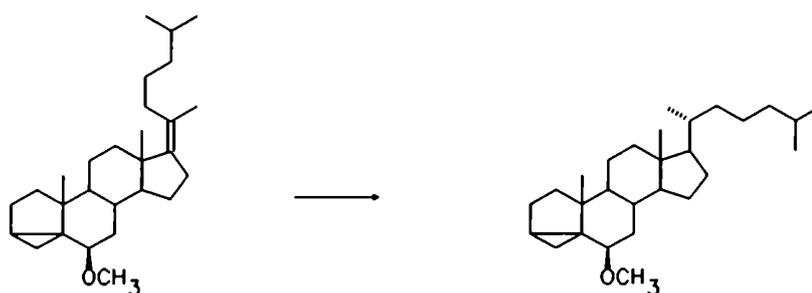
La hidrogenación del dieno **85** efectuada en las mismas condiciones que **92** produjo colesterol (**86**) como mezcla de epímeros en C-20 (60%) (la separación por CLAR de fase reversa permitió obtener los epímeros puros en relación 20(R):20(S) = 65:35) y un 8% del compuesto completamente saturado 20(R,S)-5 α -colesta-3 β -ol (**94**). Disminuyendo el tiempo de la reacción a 10 horas se obtuvo con 85% de rendimiento la mezcla de epímeros en C-20 del colesterol y no se observó la aparición del producto de

sobrerreducción. La composición de esta mezcla, determinada por RMN ^{13}C , fue 62:38 favorable al epímero natural 20(R). Un valor más preciso de la composición de la mezcla de epímeros se obtuvo midiendo el poder rotatorio de la mezcla y de los epímeros puros. Los valores obtenidos fueron $\alpha_M = -8,99^\circ$, $\alpha_{20(R)} = -6,83^\circ$ y $\alpha_{20(S)} = -14,26^\circ$, cuyas magnitudes relativas están de acuerdo con las observaciones de Uskokovic y colaboradores quienes estudiaron una serie de colestanos isoméricos en C-20 y encontraron que los isómeros 20(S) tienen una rotación específica menor o más negativa que los 20(R) [Narwid, 1974]. Estos valores permitieron calcular una relación de 71:29 favorable al epímero 20(R).

Se buscaron otras condiciones de reacción que posibilitaran incrementar la selectividad obtenida. Se probó, por un lado, con níquel Raney en etanol a 50°C , el cual había sido empleado exitosamente en la reducción estereoselectiva de un dieno esteroideal 20(22)-23(24) [Kyler, 1984], sin observarse reacción luego de 15 hs. En tanto que la hidrogenación con Pd/C en AcOEt durante 20 hs brindó con 100% de rendimiento la mezcla de epímeros en C-20 de **94** con composición 20(R):20(S) igual a 70:30 (según RMN ^{13}C). Con tiempos de reacción más cortos la hidrogenación del doble enlace 20(22) no se completa. Esto indica que este método, si bien presenta una estereoselectividad comparable a la del PtO_2 , no es regioselectivo y no permite evitar la reacción de sobrerreducción.



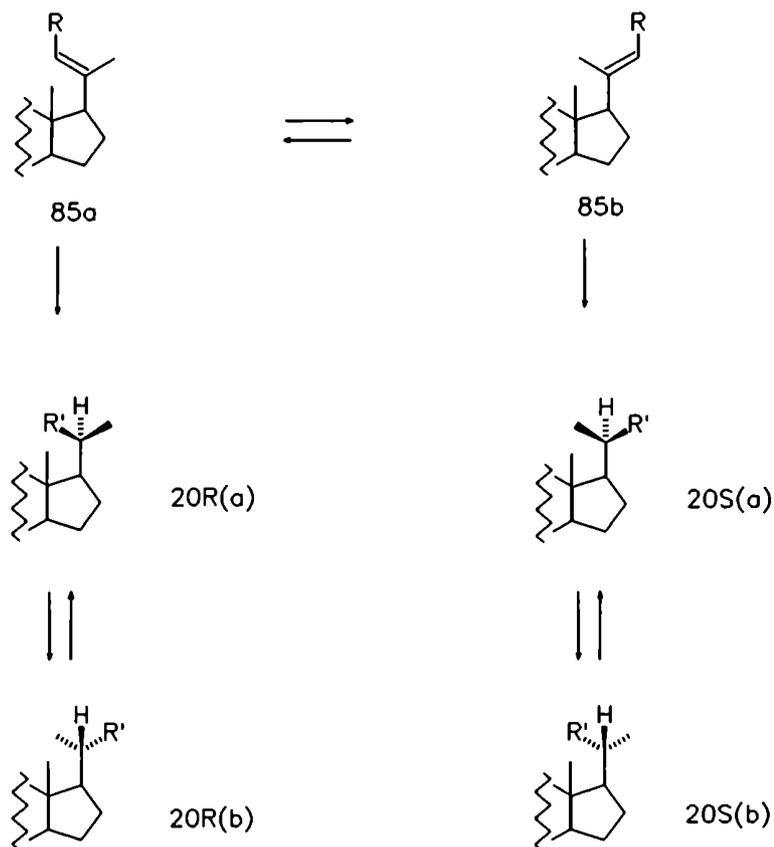
Naturalmente surge la pregunta sobre el origen de la estereoselectividad encontrada en estas reacciones de hidrogenación. Está bien documentado, y se verificó en esta tesis, que la adición de hidrógeno a dobles enlaces 5(6) ocurre por la cara α del esteroide. Este ataque por atrás también opera en dobles enlaces de la cadena lateral cercanos al anillo D, como se demostró en la hidrogenación del compuesto 3,5-ciclo-6 β -metoxi-(Z)-17(20)-dehidrocolesterol que rindió exclusivamente el esteroide 17(R),20(R) [Nes, 1976].



Esta estereoquímica estaría dictada por la adsorción mayoritaria del dehidroesteroide por su cara α , de igual manera que en el caso de los Δ^5 esteroides. De esta forma, en la hidrogenación catalizada por Pt el sistema tetracíclico debiera estar fijo en el espacio respecto a los átomos de hidrógeno entrantes.

Nes extrapola este resultado y postula que, si el doble enlace es ahora movido desde 17(20) a la posición 20(22), la configuración en C-20 también debería ser determinada por el ataque de un átomo de H desde la cara posterior del núcleo esteroidal, ya que no sería razonable asumir que la superficie del catalizador pueda ubicarse por delante del C-20 dado que la ubicación del Pt en esta posición sería dificultada, como en el caso 17(20), por C-18. Específicamente, un complejo Pt-H que atacara a C-20 desde el frente estaría en una relación 1-3 diaxial con C-18 lo que es mucho menos favorable que el ataque desde atrás donde C-18 no interfiere. De estas premisas Nes saca la conclusión de que la configuración en C-20 de los productos obtenidos por reducción de 20(22)-esteroides derivaría

primariamente de la posición de C-22 relativa al núcleo esteroidal [Nes, 1978]; la adición por la cara α del doble enlace 20(22) de los rotámeros **85a** y **85b** daría lugar a la mezcla de 20(R) y 20(S)-colesterol respectivamente, con sus correspondientes isómeros rotacionales según se detalla en el esquema 18.



Esquema 18 : Rotámeros involucrados en la reducción del doble enlace 20(22) del compuesto **85**.

El mismo autor efectúa, a continuación, una estimación de la posición del equilibrio conformacional entre los rotámeros **85** sobre las bases del principio de Curtin-Hammett [Eliel, 1965]. Supone que la velocidad de reducción es menor que la de equilibrio entre los conformeros y que los estados de transición que conducen a colesterol y 20-isocolesterol tienen,

aproximadamente, la misma energía, por lo tanto la composición del producto de hidrogenación reflejaría las poblaciones relativas de los rotámeros **85a** y **85b** en el 20(22)-dehidrocolesterol inicial. Nes informa una relación de productos 1:1 de donde deduce que la composición del equilibrio rotacional **85a** \leftrightarrow **85b** sería 1:1.

Sin embargo, esta hipótesis sobre el origen de la selectividad en estas reacciones de hidrogenación no resiste un análisis más detallado. En efecto, los cálculos de mecánica molecular efectuados en el presente trabajo sobre los rotámeros del compuesto **85**, cuyas estructuras de mínima energía se presentan en la figura 11, revelan que **85b** es más estable que **85a** en 2,42 kcal/mol (los valores de energía MMX son 45,46 y 47,98 kcal/mol respectivamente). Esta diferencia de energía indica que en el equilibrio la proporción de **85b** debería ser aproximadamente 98% (un cálculo más riguroso que tomara en cuenta el ΔS entre los rotámeros no se alejaría mucho de esta proporción), lo que significa que la posición del equilibrio rotacional es muy distinta a la predicha por Nes y, por consiguiente, de ser válidas sus hipótesis, la composición del producto de hidrogenación debería ser aproximadamente 98 a 2 favorable al 20(S)-colesterol).

En consecuencia, carece de validez la suposición de que las energías de los estados de transición que llevan a colesterol y 20-isocolesterol son comparables. El estado de transición conducente a colesterol debe ser, necesariamente, de menor energía.

Se evaluó la posibilidad de que la selectividad de esta reacción estuviera controlada por la estabilidad de los productos, para lo cual se calcularon, mediante el programa PCModel, las energías de los rotámeros de colesterol y 20-isocolesterol presentados en el esquema 18. Los valores de energía obtenidos se presentan en la tabla 14 y las estructuras de mínima energía se muestran en las figuras 12 y 13.

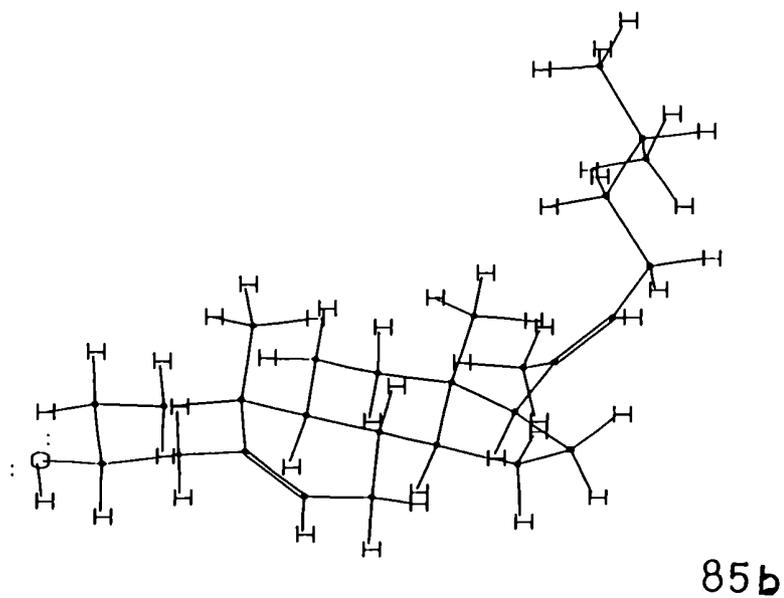
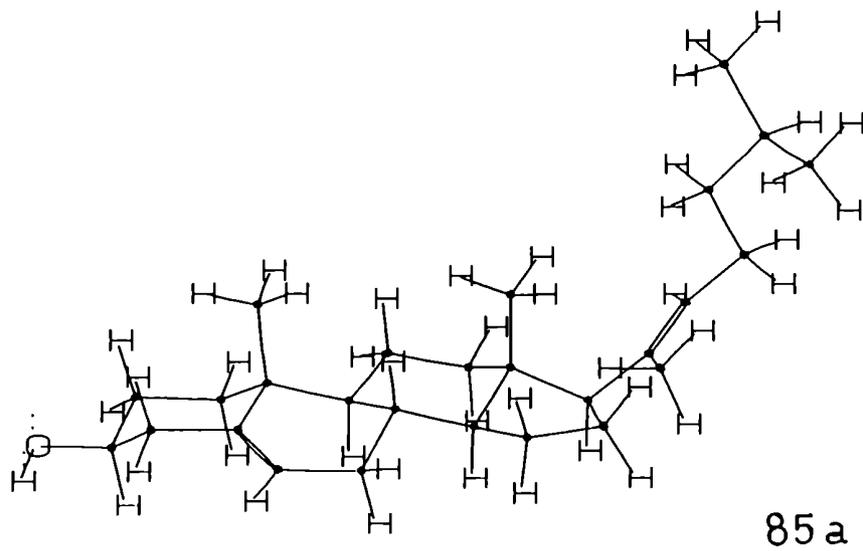
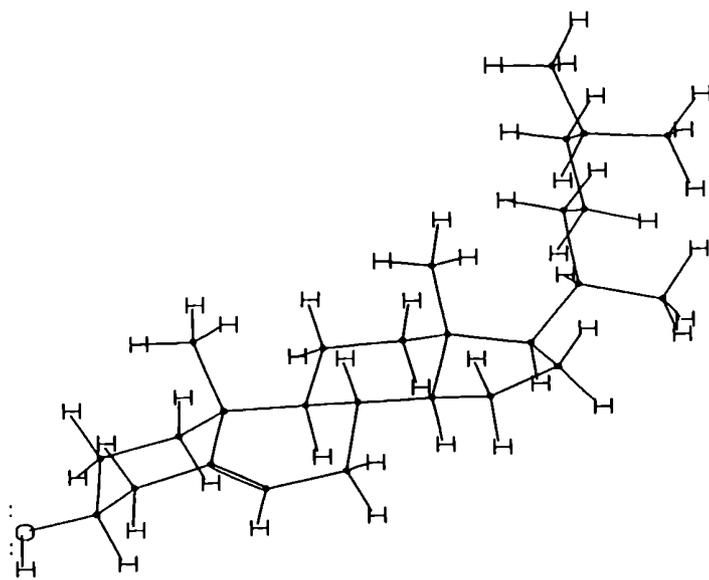
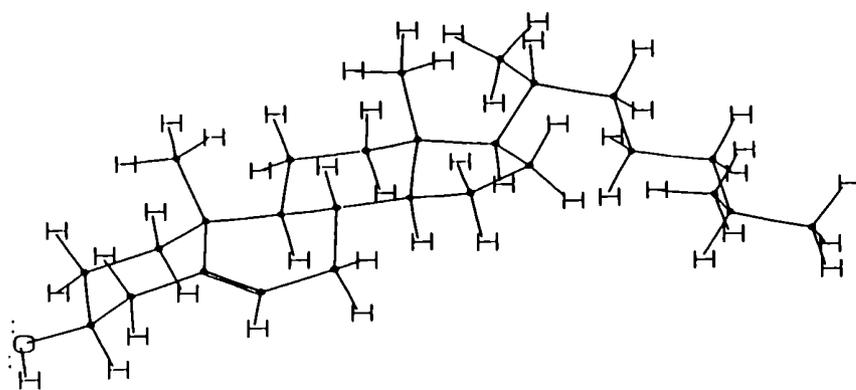


Figura 11: Conformaciones de mínima energía de los rotámeros 85a y 85b.

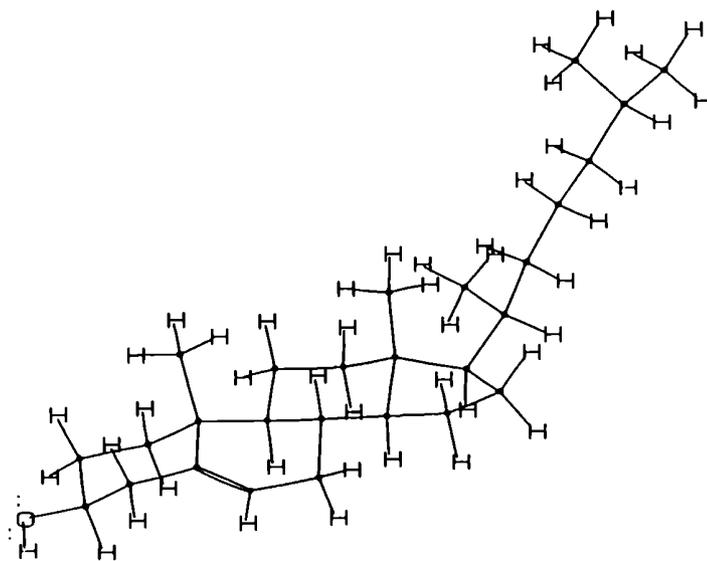


20R(a)

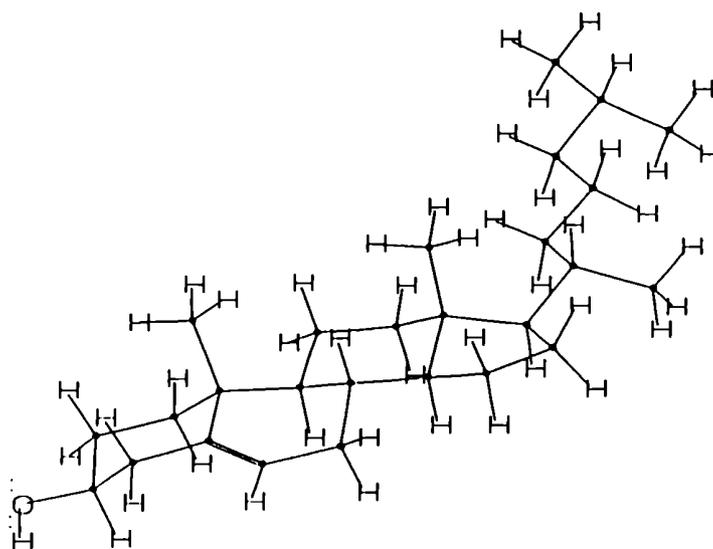


20R(b)

Figura 12: Conformaciones de mínima energía de los rotámeros 20R(a) y 20R(b).



20S(a)



20S(b)

Figura 13: Conformaciones de mínima energía de los rotámeros 20S(a) y 20S(b).

TABLA 14			
Energías de los rotámeros de colesterol y 20-isocolesterol (kcal/mol)			
20R(a)	20R(b)	20S(a)	20S(b)
52,98	47,41	50,98	47,43

Estos resultados descartan, por dos razones, la idea de un estado de transición cercano a los productos. En primer lugar la diferencia de energía entre los productos saturados **20R(a)** y **20S(a)** y los sustratos **85a** y **85b** respectivamente, esta en el orden de las 5 kcal/mol. La reacción es, por lo tanto, levemente endotérmica y de acuerdo al postulado de Hammond este sería un caso cercano a un proceso térmicamente balanceado en el cual el estado de transición no posee un análogo de estructura química convencional [Hammond, 1955]; en otras palabras, el estado de transición no se parece ni al sustrato ni al producto. No obstante esto, el producto **20S(a)** es más estable que **20R(a)** en 2 kcal/mol, por lo tanto, la hipótesis de la selectividad de la reacción dirigida por la estabilidad de los productos predice que el epímero mayoritario debería ser el 20-isocolesterol.

Por su parte, Mc Morris y colaboradores [Schow, 1979] observaron que la hidrogenación sobre Pt de un 20(22)-dehidro-24-acetoxicolestano producía, además de la mezcla de epímeros en C-20, la hidrogenólisis del acetato homoalílico en C-24. De este resultado deducen la existencia de un reordenamiento del doble enlace 20(22) a la posición 22(23) para dar el acetato alílico el cual sufriría la hidrogenólisis y concluyen, por consiguiente, que la hidrogenación del doble enlace 20(22) no es simplemente la adición *syn* de dos átomos de hidrógeno sino que parecería ser un proceso en etapas que involucraría intermediarios π -alílicos.

No sería esta la situación en este trabajo de tesis. Efectivamente, los espectros de RMN de ^1H de la mezcla de hidrogenación efectuados a tiempos menores de 10 horas no permitieron observar señales olefínicas diferentes a las de H-6 y H-22; y es poco probable que la interacción de los complejos π -

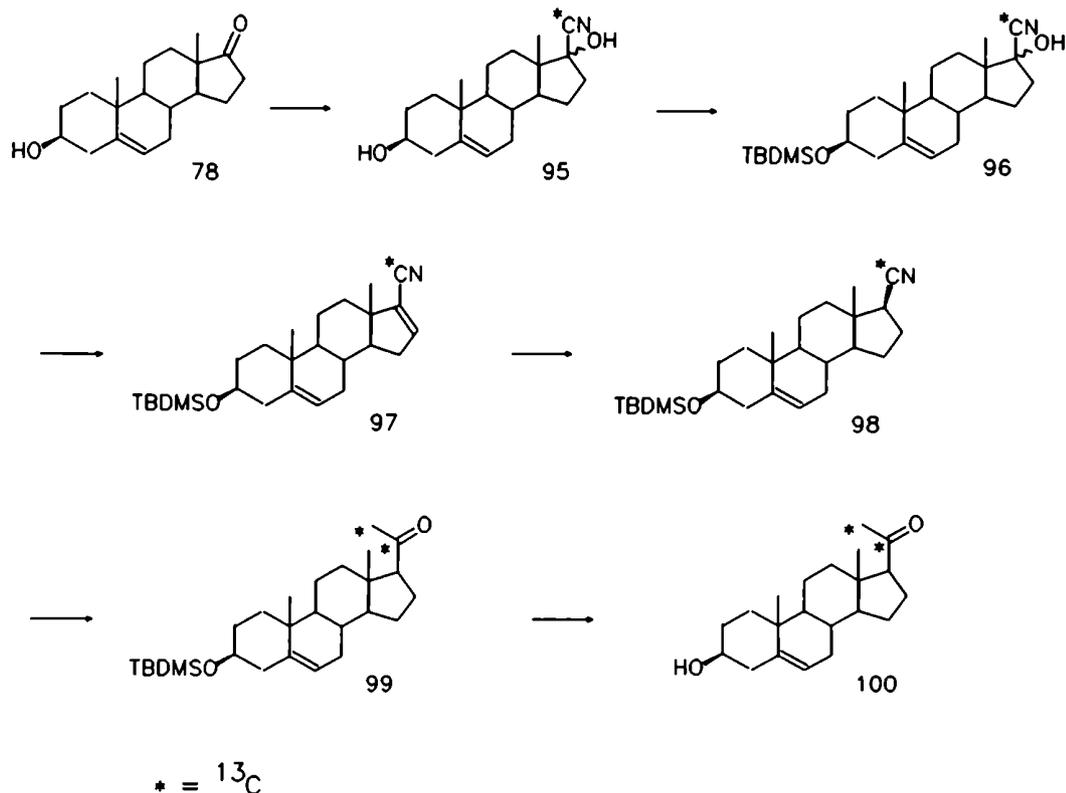
alílicos con la superficie del catalizador fuera lo suficientemente intensa como para impedir la liberación de las olefinas reordenadas al seno de la solución hasta después de ocurrida la hidrogenación.

Queda sin contestar la pregunta acerca del origen de la estereoselectividad de la hidrogenación del doble enlace 20(22) del compuesto **85**. Quizás, un análisis más detallado, donde se evaluaran las energías de los distintos estados de transición involucrados en la adición por la cara α y por la cara β de los rotámeros **85**, podría otorgar apoyo teórico al resultado experimental obtenido.

SINTESIS DE [20,21- $^{13}\text{C}_2$]-PREGNENOLONA

La síntesis de pregnenolona marcada en los carbonos 20 y 21 se consiguió siguiendo el procedimiento presentado en el esquema 19.

La condensación de la androstenolona **78** con cianuro de potasio- ^{13}C condujo a la cianhidrina **95**. El hidroxilo 3β de este compuesto se protegió como su t-butildimetilsililéter tratando una suspensión de **95** en DMF anhidra con t-butildimetilclorosilano e imidazol. El compuesto **96**, así obtenido, fue deshidratado al nitrilo α,β -insaturado correspondiente por reacción con oxiclóruo de fósforo en piridina a temperatura ambiente durante 72 hs, brindando **97** con 45% de rendimiento luego de la purificación por cromatografía en columna. La hidrogenación catalítica de **97** a presión atmosférica en presencia de Pd/C durante 7 hs rindió el 17β -ciano derivado **98** con 100% de rendimiento. A su vez, **98** reaccionó con ioduro de metilmagnesio- ^{13}C , preparado a partir de ioduro de metilo marcado, originando el pregneno doblemente marcado **99** con buen rendimiento (70%). El tratamiento de **99** con TBAF en THF anhidro condujo, finalmente, a la pregnenolona doblemente marcada **100** con 95% de rendimiento. El rendimiento global del proceso sintético fue, entonces, de 30% a partir de **78**.



Esquema 19: Síntesis de [20,21- $^{13}\text{C}_2$]-pregnenolona.

Los espectros de RMN de ^1H de **99** y **100** se muestran en la figura 14. Puede observarse en ambos el doble doblete centrado en 2,13 ppm correspondiente a H-21, originado por los acoplamiento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}-\text{C}-^1\text{H}$. En la figura 15 se presenta también el espectros de RMN de ^{13}C de **100** donde se puede apreciar los dobletes originados por el acoplamiento $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ correspondientes a los carbonos 20 y 21. Los espectros de masas de 20,21- $^{13}\text{C}_2$ -pregnenolona y de pregnenolona se presentan, con fines comparativos, en la figura 16.

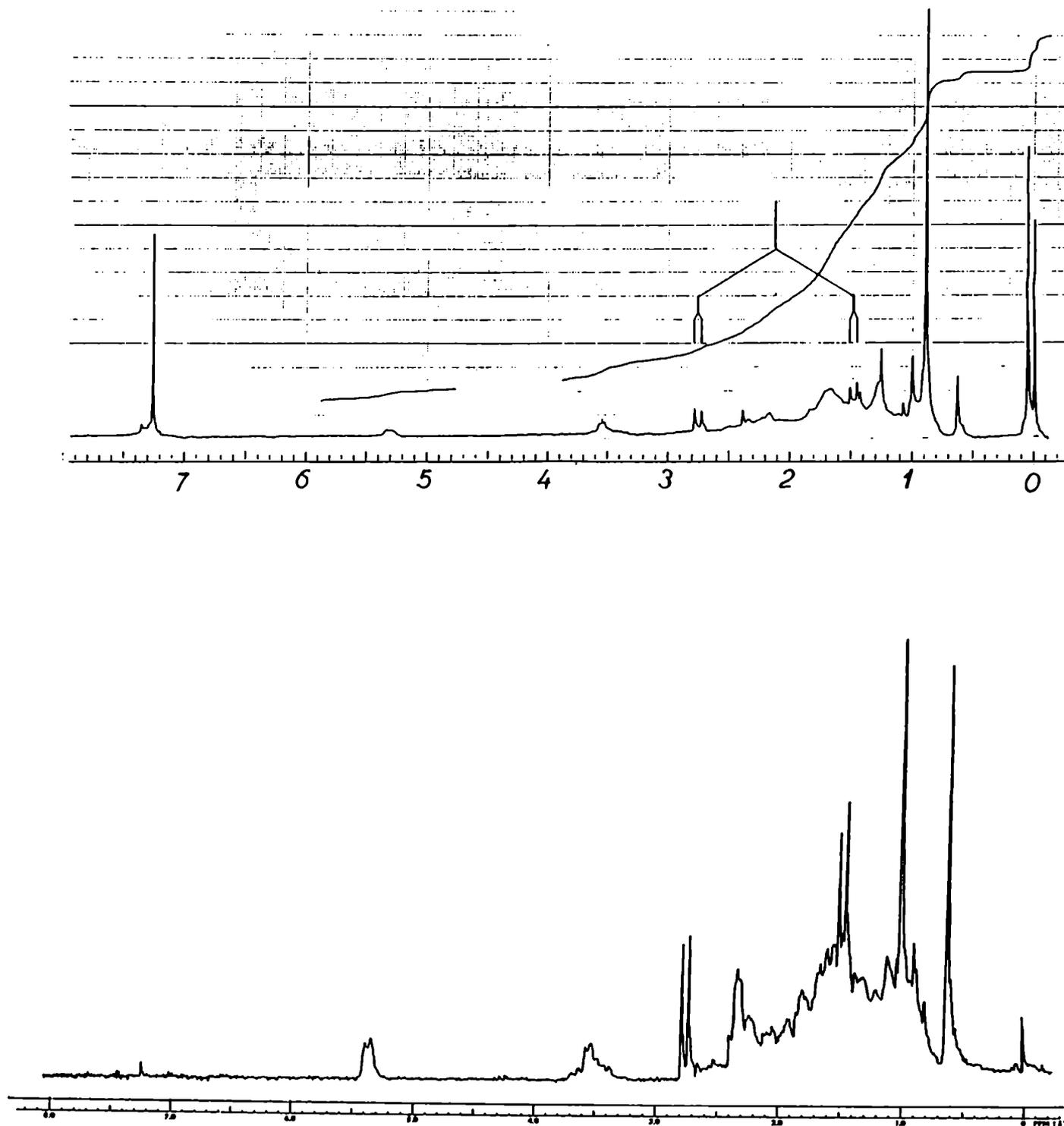


Figura 14: Espectros de RMN ^1H de los compuestos 99 y 100.

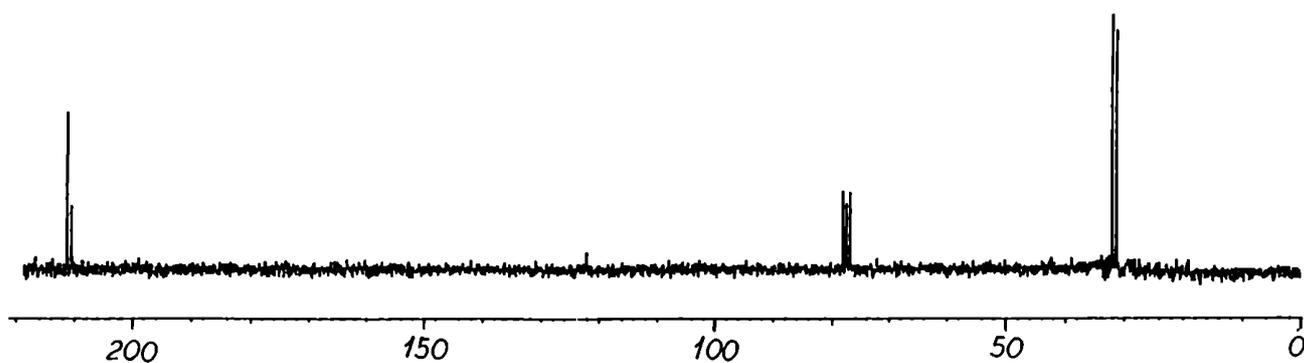


Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C de $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -pregnenolona.

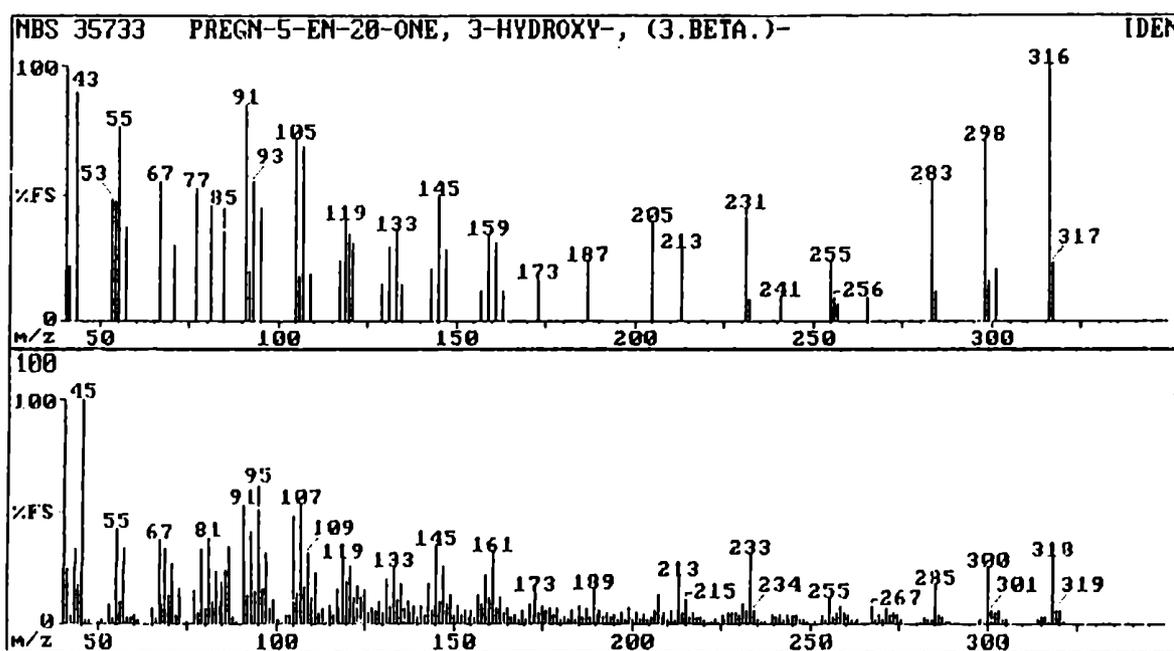
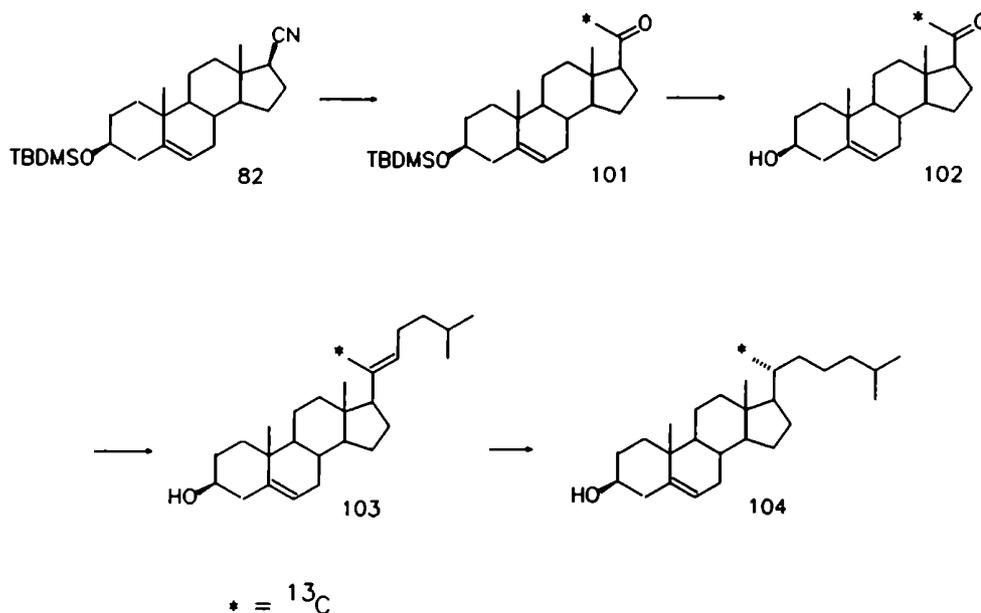


Figura 16: Espectros de masas de pregnenolona y $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -pregnenolona.

SINTESIS DE [21-¹³C]-COLESTEROL.

La síntesis de colesterol marcado con ¹³C en C-21 se realizó partiendo del nitrilo **82**, preparado según se describió con anterioridad, de acuerdo al procedimiento presentado en el esquema 20.

Esquema 20: Síntesis de [21-¹³C]-colesterol.

La reacción de Grignard efectuada sobre el nitrilo **82** con ioduro de metilmagnesio-¹³C permitió obtener el pregneno **101** con 65% de rendimiento. La remoción del sililéter protector en **101** mediante reacción con TBAF en THF llevó a 21-¹³C-pregnenolona (**102**) con 95% de rendimiento. La reacción de Wittig sobre **103** con trifenil-1-(4-metil)-pentil-fosforano (preparado por reacción de la sal de fosfonio correspondiente con n-BuLi) en dioxano a ebullición brindó, luego de 20 hs, el colesteno **103** con 25% de rendimiento. En la figura 17 se presentan los espectros de RMN ¹H de la metilcetona **101**, donde se puede apreciar el doblete centrado en 2,13 ppm (J= 127 Hz) correspondiente a H-21, originado por el acoplamiento ¹³C-¹H; y el del colesteno **103** en donde se puede desbrozar un doblete centrado en 1,62 ppm (J= 124

Hz) correspondiente a H-21, cuya señal a campos altos se superpone con la señal de H-19.

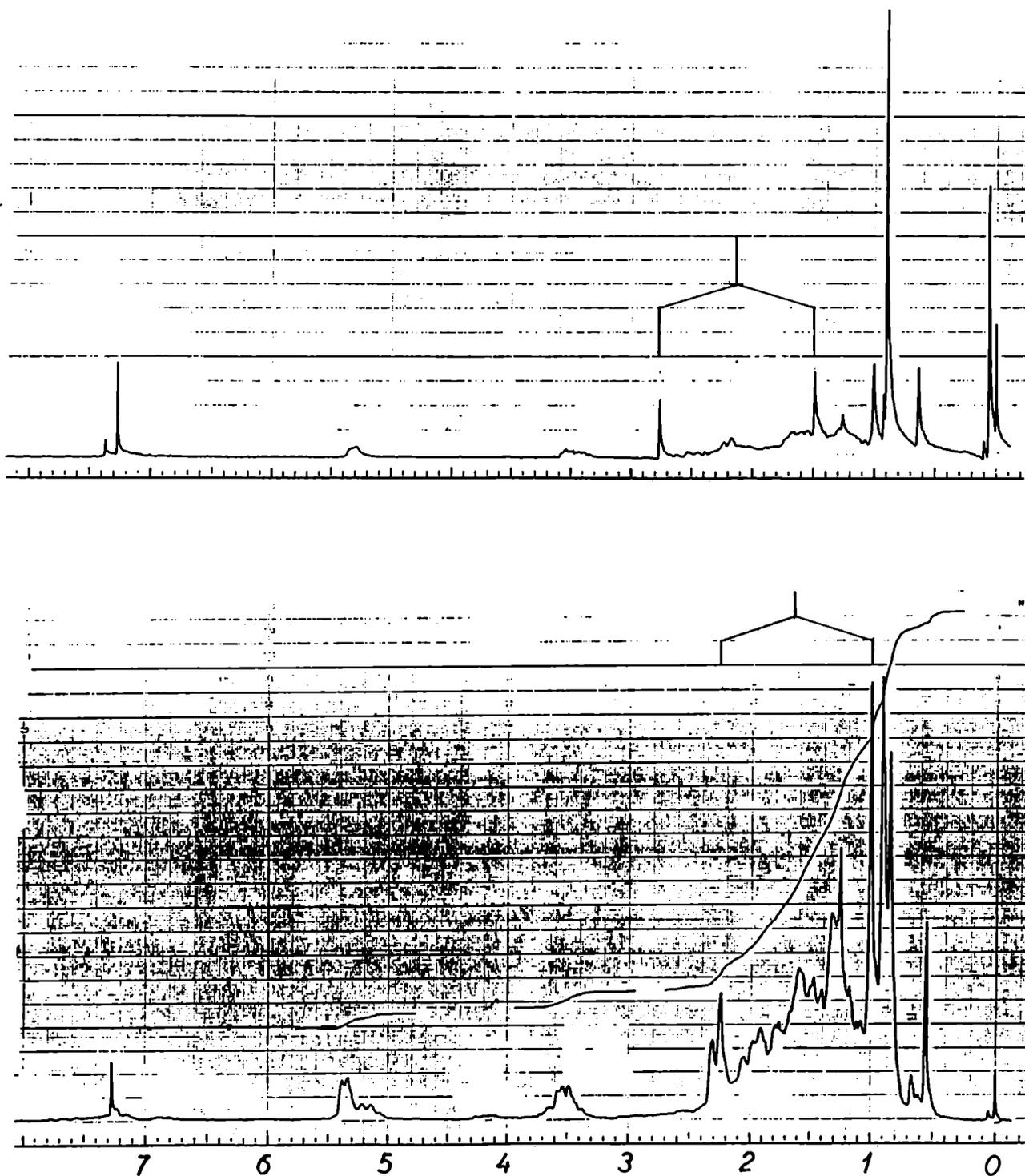


Figura 17: Espectros de RMN ^1H de 101 y 103.

A su turno el colesteno 103 se sometió a hidrogenación catalítica en presencia de PtO_2 durante 36 hs para dar, con 85% de rendimiento, la mezcla de epímeros en C-20 del colesterol la que se separó por CLAR de fase reversa. El cromatograma presentado en la figura 18 informa una relación 20R:20S de 77:23 siendo, en consecuencia, 65% el rendimiento en $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol (104) de esta última reacción. Esto significa que el rendimiento de la secuencia sintética presentada en el esquema 20 es del 10%. Recordando que el rendimiento en la preparación del nitrilo 82 fue 45%, se puede inferir que el rendimiento global en la preparación de 104 a partir de androstenolona alcanza al 4,5%.

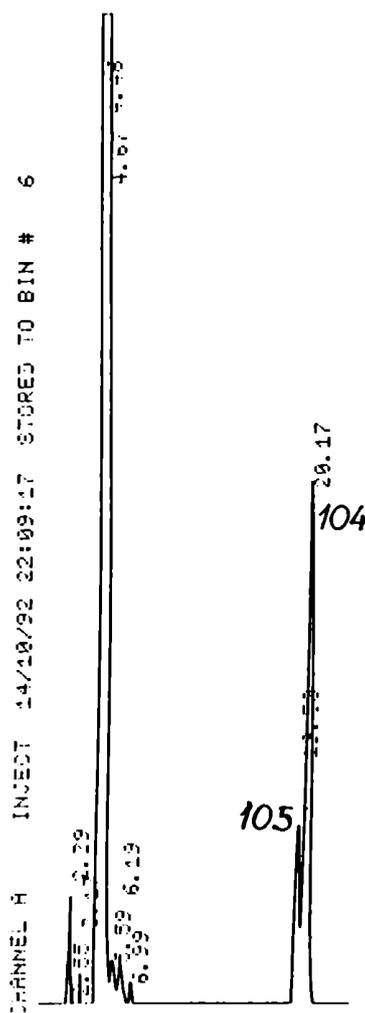


Figura 18: Cromatograma de la mezcla de epímeros en C-20 de 104.

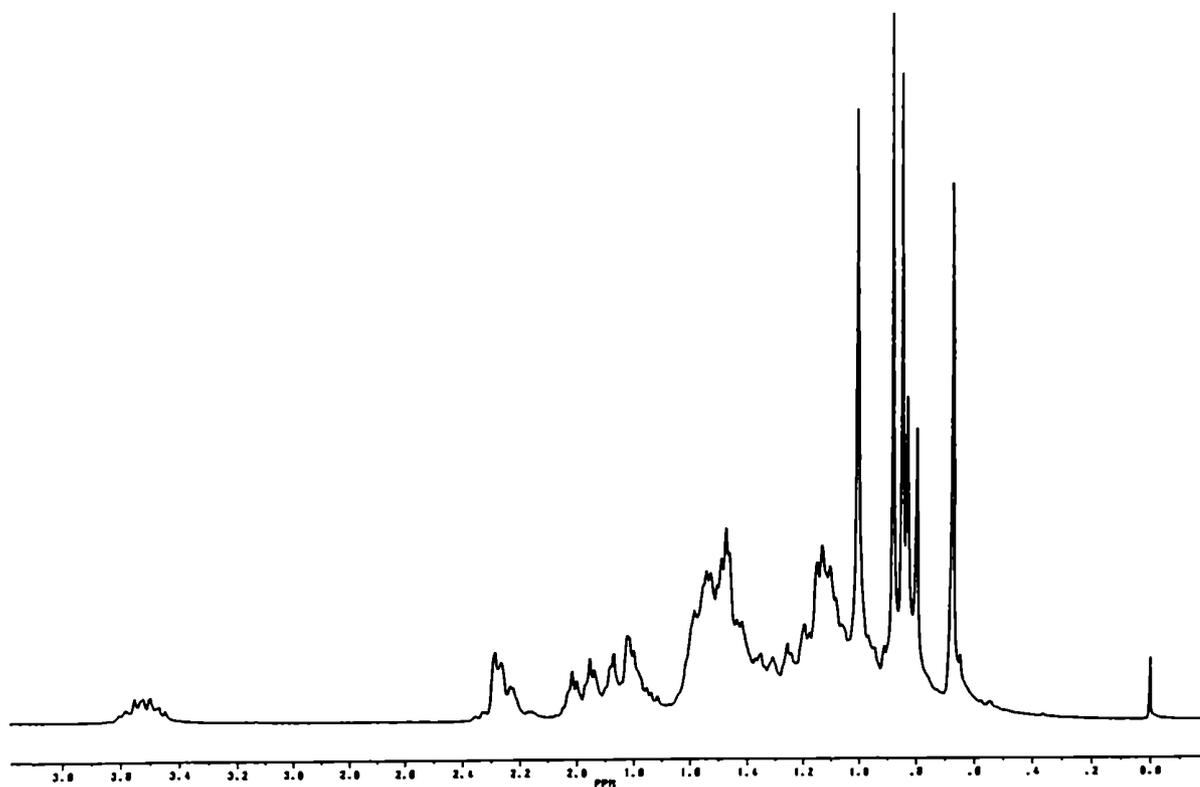
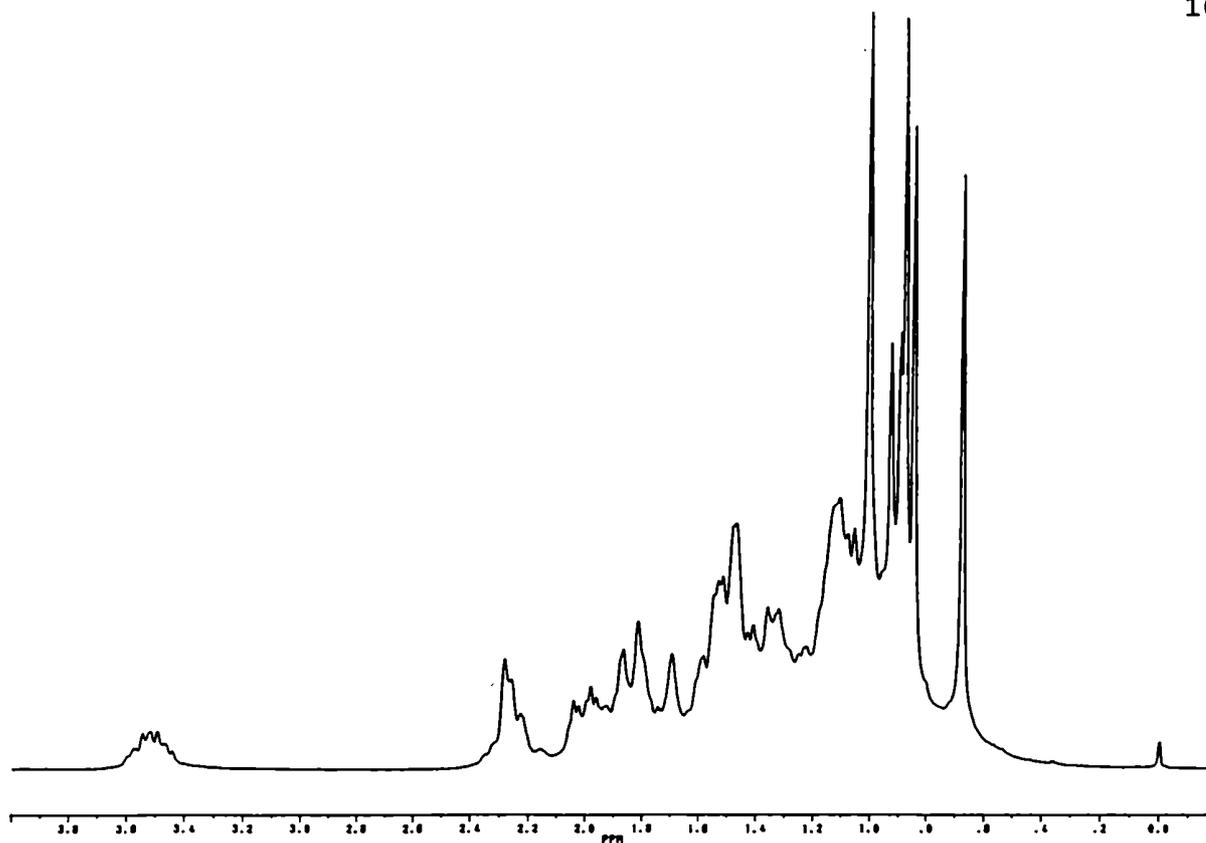


Figura 19: Ampliaciones entre 4 y 0 ppm de los espectros de RMN ^1H de colesterol y 20-isocolesterol.

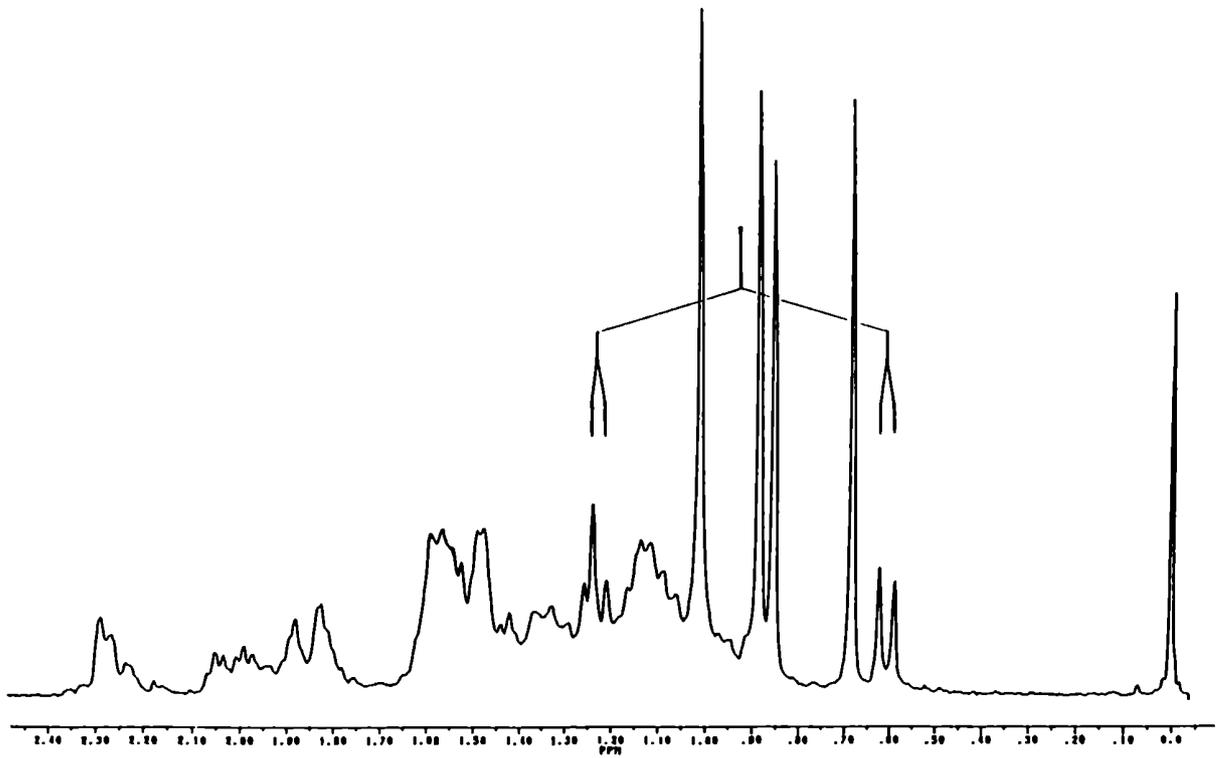
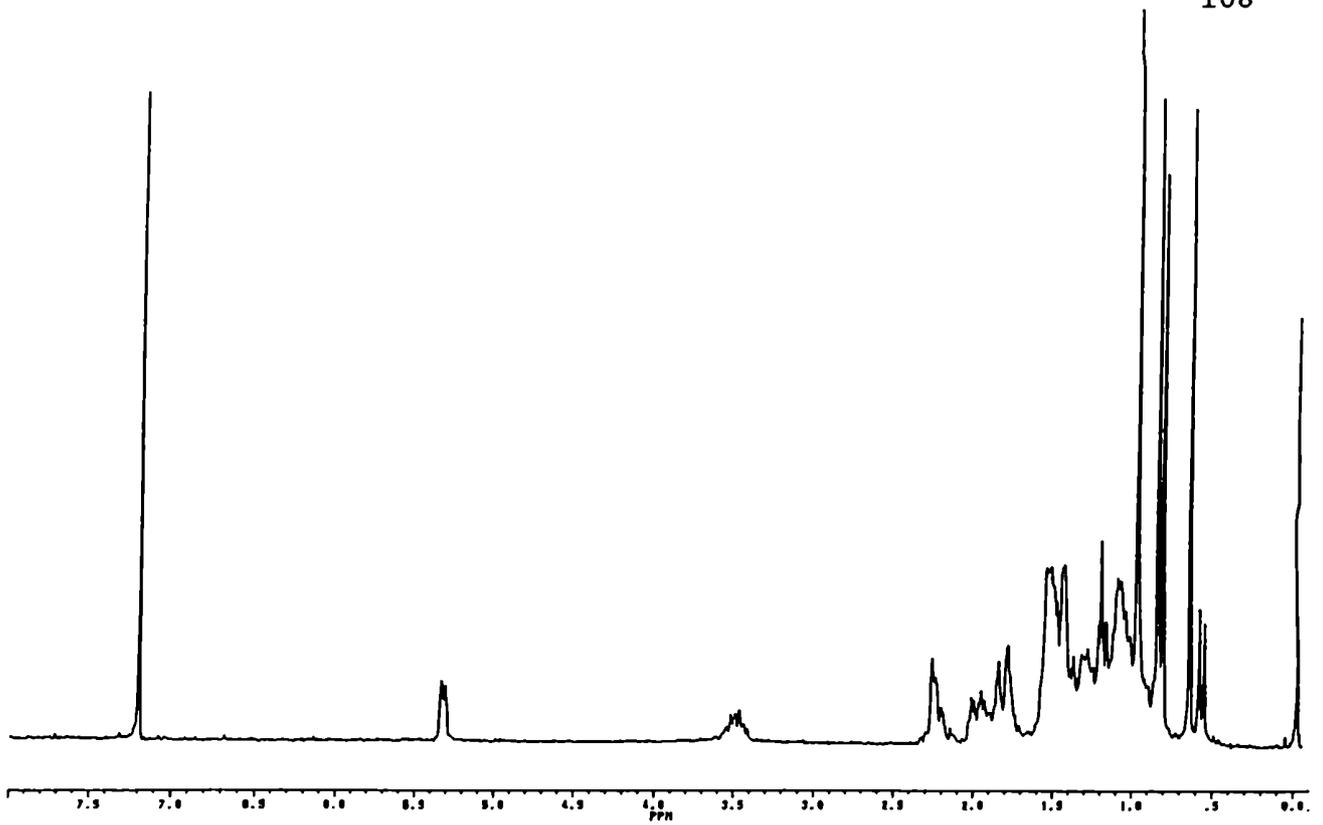


Figura 20: Espectro de RMN ^1H de $[21\text{-}^{13}\text{C}]$ -colesterol y su ampliación entre 2,5 y 0 ppm.

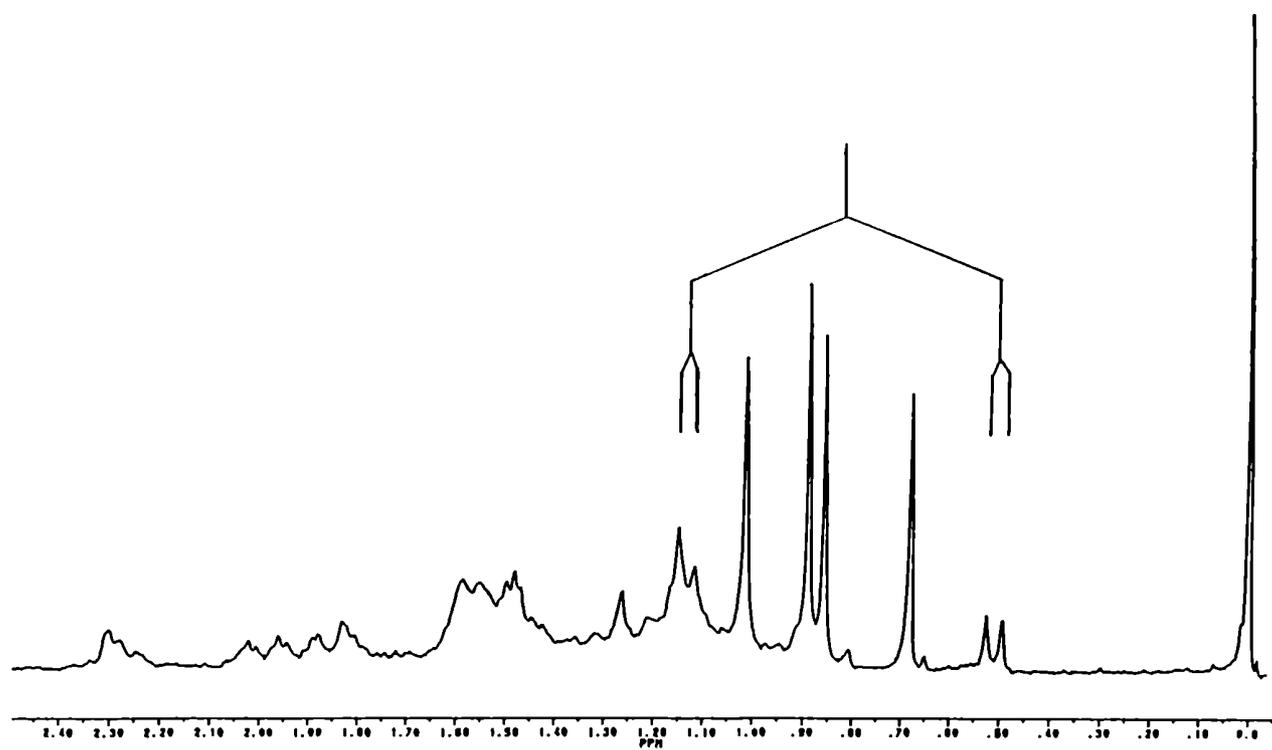
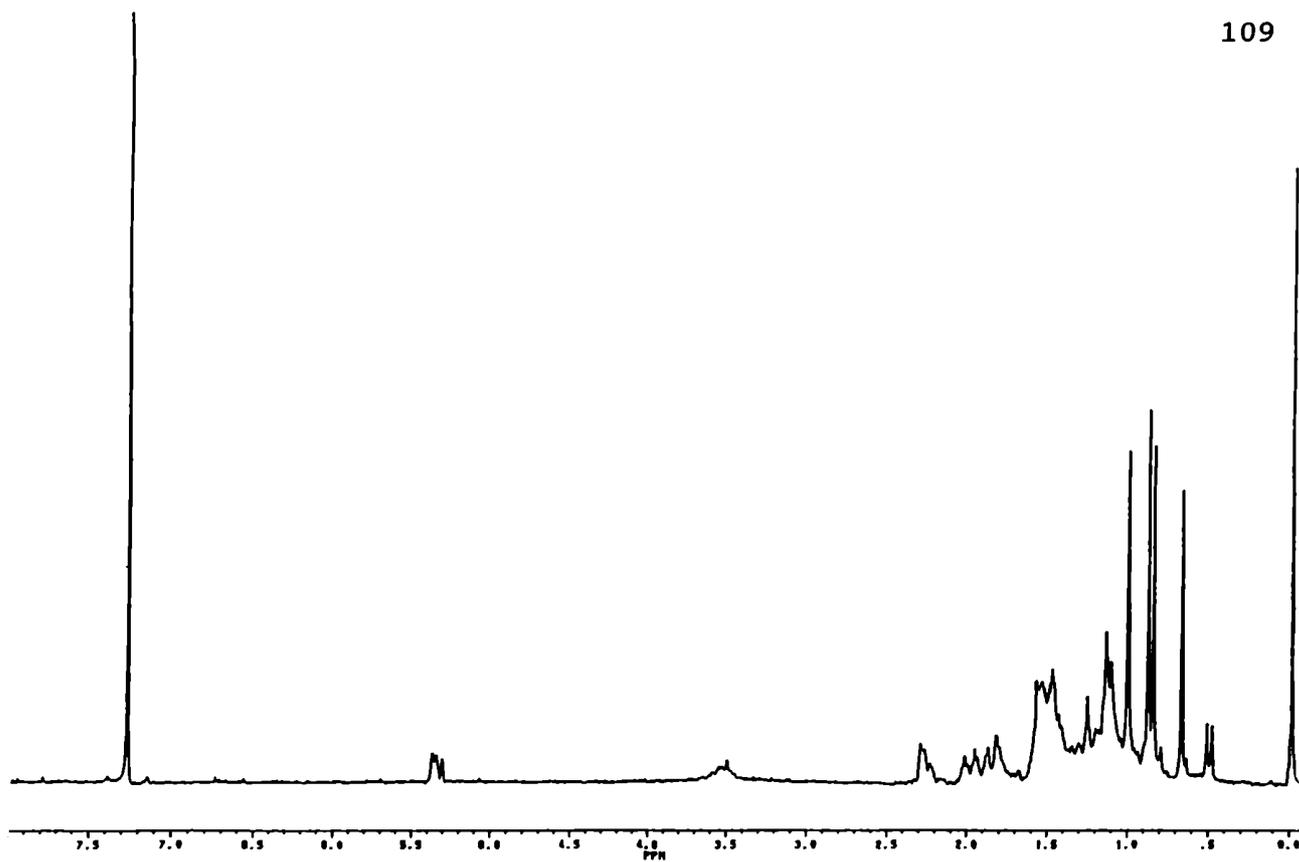


Figura 21: Espectro de RMN ^1H de [21- ^{13}C]-20(S)-colesterol y su ampliación entre 2,5 y 0 ppm.

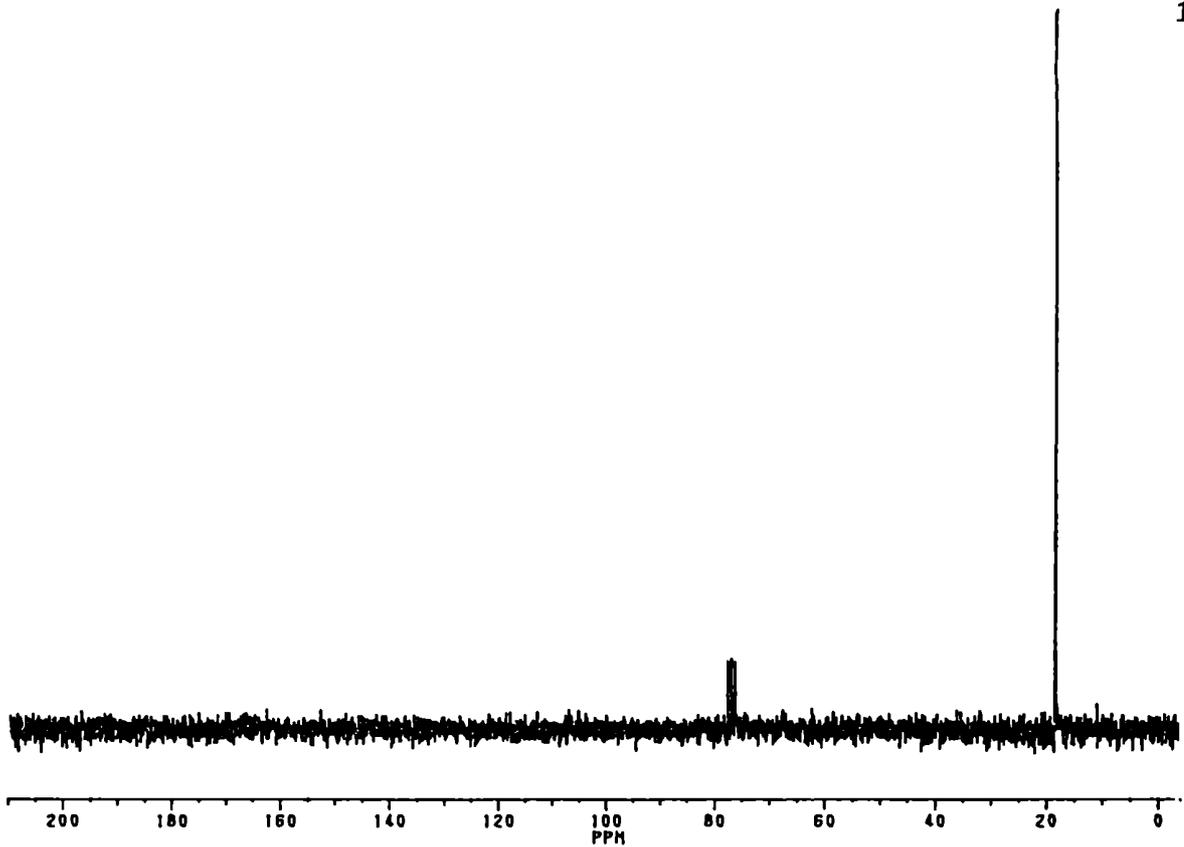


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C de $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol.

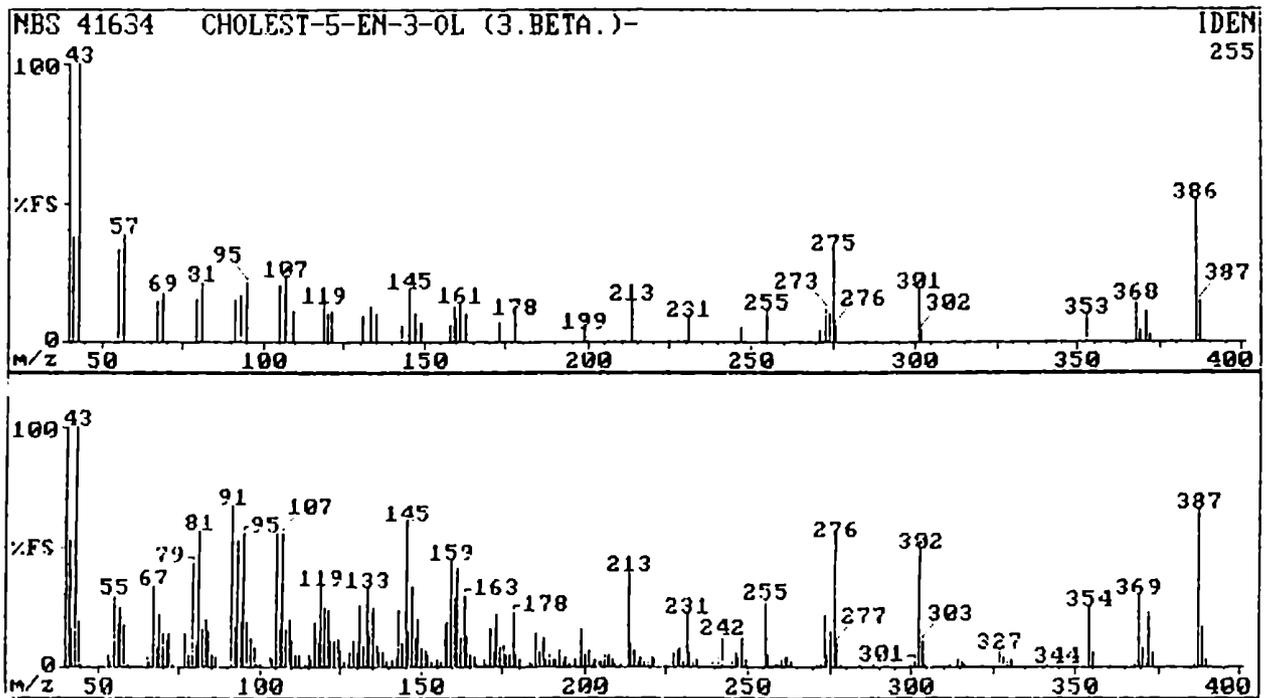


Figura 23: Espectros de masas de colesterol y $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol.

Con fines comparativos se presentan en la figura 19 las ampliaciones efectuadas entre 4 y 0 ppm de los espectros de RMN ^1H de colesterol y de 20(S)-colesterol; y en la figuras 20 y 21 se muestran los espectros de RMN ^1H de $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol y de $[21-^{13}\text{C}]$ -20(S)-colesterol (105) respectivamente, y sus correspondientes ampliaciones entre 2,5 y 0 ppm. En estas últimas se pueden apreciar con más claridad los dobles dobles correspondientes a H-21 originados por los acoplamientos $^1\text{H}-^1\text{H}$ y $^1\text{H}-^{13}\text{C}$. El espectro de RMN ^{13}C de 104, y los espectros de masas de $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol y de colesterol se exhiben en las figuras 22 y 23 respectivamente.

El bajo rendimiento encontrado en la síntesis de $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol habla a las claras de que es necesario trabajo adicional en pos de optimizar las condiciones de reacción en la secuencia de síntesis desarrollada, para lograr una preparación eficiente, y por ende, de bajo costo, de colesterol doblemente marcado en los carbono 20 y 21. El énfasis mayor deberá ser puesto en la reacción de Wittig o en reacciones alternativas a la misma que permitan la unión, con alto rendimiento, del apéndice 4-metil-1-pentilo a la $[20-21-^{13}\text{C}_2]$ -pregnenolona.

CAPITULO II

ESTUDIOS TENDIENTES A LA PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO ADECUADO PARA LOS ESTUDIOS BIOSINTÉTICOS

Cultivos de tejido de *Scilla maritima*.

Se intentó el desarrollo de cultivos en medio agaroso de tejido de bulbo de *Scilla maritima* los que, mediante subcultivos adecuados, permitirían la preparación de cultivos en medio líquido aptos para la inoculación de precursores marcados con ^{13}C como para la observación de su evolución mediante RMN de ^{13}C . Si bien se carecía de antecedentes directos sobre la generación de este tipo de cultivos, se sabía de la existencia de un método de propagación *in vitro* de la planta *Scilla maritima* [El Grari, 1987], proceso que en su etapa inicial implica el cultivo de porciones de tejido de bulbo en medio de Murashige-Skoog suplementado con hormonas vegetales tales como ácido naftalenacético y 6-bencil-aminopurina. En consecuencia, los primeros ensayos se realizaron en base a ese trabajo.

Ante la ausencia de formación de callos y la aparición de contaminación fúngica y bacteriana luego de una semana de incubación, se decidió modificar la técnica de literatura. Empleando el procedimiento de esterilización del material vegetal descrito en la parte experimental se consiguió reducir notablemente el problema de la contaminación a un 40% de los explantos colocados en cajas de Petri y un 10% de los ubicados en tubos de ensayos. Pese a esto y pese a la variedad de medios de cultivo probados, en un solo caso se observó crecimiento de callos luego de dos semanas de incubación. No obstante, estos resultaron muy pequeños e hicieron impracticables los repiques posteriores necesarios para el desarrollo de una masa de tejido indiferenciado. Por lo tanto se desistió de esta faceta del trabajo de tesis.

Ensayos previos a la preparación de homogenatos de hojas de *Scilla maritima*.

La existencia de antecedentes sobre la incorporación de 2- ^{14}C -acetato de sodio en bufadienólidos en trabajos realizados con hojas de la planta *Scilla maritima* [Kopp, 1983] condujo a la

evaluación de la posible utilización de homogenatos de hojas de la planta en cuestión como material biológico apto para el desarrollo de estudios biosintéticos.

Para ello se procedió a determinar, en primer lugar, si el contenido de scillirósido en las hojas de los ejemplares de *Scilla maritima* disponibles era el apropiado para la realización de experiencias de biosíntesis. El proceso extractivo detallado en la parte experimental brindó un extracto cuyo análisis mediante ccd y RMN-¹H indicó que el contenido de bufadiénolidos en las hojas de los ejemplares analizados era nulo dentro de los límites de detección de los métodos empleados, tanto en las experiencias realizadas a fines del otoño como a principios de la primavera.

Homogenatos de hojas de *Digitalis purpurea*.

Como primera aproximación se controló el contenido de cardenólidos en las hojas de las plantas en estudio, empleando una técnica extractiva similar a la de la sección anterior. Seleccionados los ejemplares más adecuados se prepararon los homogenatos, a los que se inoculó progesterona tritiada comercial tratando de establecer las condiciones óptimas de observación del proceso de biosíntesis de cardenólidos con el fin ulterior de preparación de homogenatos libres de células como fuente de enzimas. A estos se agregarían progesterona-¹³C₂ o pregnenolona-¹³C₂ para estudiar el proceso biosintético mediante RMN de ¹³C.

Lamentablemente, los diferentes intentos por lograr homogenatos que fueran aptos para metabolizar progesterona en cardenólidos no dieron resultados positivos. En primer lugar se probaron las condiciones experimentales empleadas en estudios de oxidación de esteroides mediante homogenatos de hojas de *Digitalis purpurea* y de otras plantas [Stohs, 1971] y luego se ensayaron numerosas modificaciones. Se emplearon tres métodos de homogeneización: potter de vidrio esmerilado, punta ultrasónica y licuadora a máxima velocidad; distintos buffers, fosfato a pH 6,0, 6,6, 7,2 y 7,8 y Tris a pH 7,4, enriquecidos en algunos casos con sacarosa, MgCl₂, clorhidrato de L-cisteína y albúmina bovina y distintas temperaturas y tiempos de incubación, 25°C y

28°C y 2, 6 y 24 horas respectivamente (ver detalles en parte experimental).

Como se indicó, en ninguno de los intentos se obtuvo homogeneizados activos.

CAPITULO III

DESPROTECCION DE TIOACETALESAntecedentes

El enmascaramiento temporario de grupos carbonilo mediante la preparaci3n de tioacetales c3clicos ha sido ampliamente usado, no s3lo para la protecci3n del grupo carbonilo, sino tambi3n para el vers3til m3todo sint3tico basado en el carban3n del 1,3-diti-ano. Se han desarrollado en consecuencia numerosos procedimientos de detioacetalizaci3n, cuya existencia debe ser tomada como evidencia de que la desprotecci3n de tioacetales es, en muchos casos, extremadamente dif3cil de conseguir especialmente para derivados complejos y l3biles. No existe un 3nico m3todo que pueda ser aplicado en forma general y, por lo tanto, a3n existe una gran necesidad de nuevos procedimientos de desprotecci3n.

Se han informado s3lo unos pocos m3todos de hidr3lisis genuinamente novedosos desde que Seebach recopil3 los m3todos corrientes hasta el a3o 1975 (Gr3bel, 1977). Un listado de los mismos, que no pretende ser exhaustivo, incluye a los siguientes:

METODO	REACTIVO/CONDICIONES	RENDIMIEN- TOS	REFERENCIA
A	PbO ₂ , BF ₃ .Et ₂ O THF/H ₂ O, ta, 60'	80-96%	[Ghringhelli, 1982]
B	HgO, 35% HBF ₄ , THF/H ₂ O, ta, 5'	92-100%	[Degani, 1981]
C	Nitrito de isoamilo, CH ₂ Cl ₂ , 40°C, 2h	65-93%	[Fuji, 1978]
D	Tl(NO ₃) ₃ , MeOH/CHCl ₃ 25-50°C, 5-60'	0-98%	[Fujita, 1978]
E	Hg(ClO ₄) ₂ .3H ₂ O 2 eq. MeOH/CH ₂ Cl ₂ , ta, 5'	75-96%	[Fujita, 1978]

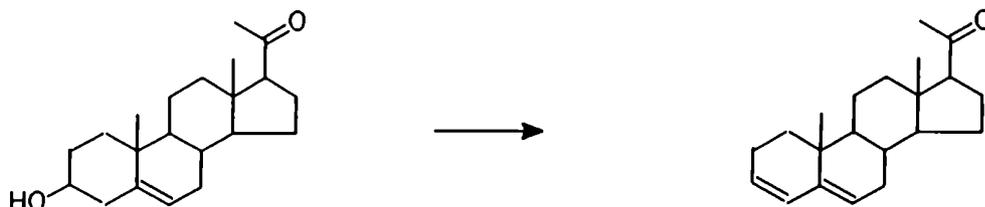
F	(CH ₃) ₃ OBF ₄ , CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O, ta, 5'	89-94%	[Stahl, 1981]
G	lámpara de Hg, O ₂ hexano, ta, 2-5h	57-87%	[Takahashi, 1977]

Estos procedimientos presentan algunas características dignas de mención. El método B mejora notablemente los tiempos y rendimientos de reacción encontrados en el método que emplea BF₃.Et₂O como promotor, originalmente desarrollado por los mismos autores. En el caso C los autores observaron quimio y regioselectividad del reactivo. Las condiciones de reacción aplicadas en el caso D no afectaron a triples enlaces, metilenos activos, cetonas, ésteres y lactonas. Los mismos autores desarrollaron el método E que muestra un rango de solventes posibles superior al del caso anterior. Comparado con las técnicas clásicas que emplean sales de Hg(II), el método E presenta diversas características ventajosas, como por ejemplo, menores tiempos y temperaturas de reacción, condiciones de reacción homogéneas y suaves que no afectan otros grupos funcionales, etc. El procedimiento fotolítico G difiere de los métodos convencionales en el empleo de condiciones de reacción neutras y por lo tanto puede ser aplicado con sustratos portadores de unidades lábiles como ésteres o lactonas.

Sin embargo, entre la variedad de reactivos usados para la ruptura de tioacetales existen pocos ejemplos del uso de sales de Cu(II) con este propósito. Investigadores japoneses desarrollaron un método que emplea 2 moles de CuCl₂ y 4 moles de CuO por mol de tioacetal. Las reacciones son conducidas en acetona acuosa a temperatura ambiente durante 1 h aproximadamente y los rendimientos informados se encuentran alrededor del 90% [Mukaiyama, 1972]. La modificación de la estequiometría de esta técnica a una relación molar de tioacetal:óxido cúprico:cloruro cúprico igual a 1:1,2:2,4 fue aplicada en la etapa hidrolítica de una preparación de 3-alquil y 3-acil indoles [Stütz, 1988]. Otro grupo japonés ideó un procedimiento que emplea una solución acuosa al 3% de sulfato de cobre (II) para provocar la hidrólisis

oxidativa de sales de sulfonio intermediarias preparadas por reacción de tioacetales con tetrafluorborato de trietiloxonio [Oishi, 1972]. Por su parte, el grupo de Laszlo consiguió la desprotección de diversos ditianos y ditiolanos mediante el reactivo "claycop", el cual consiste en nitrato cúprico depositado sobre arcilla K-10. Estas reacciones se llevan a cabo en solventes poco polares como tolueno o diclorometano con rendimientos superiores a 90% [Balogh, 1984]. A su vez, Hojo y colaboradores desarrollaron otro método de detioacetalización en fase heterogénea que consiste en el tratamiento del tioacetal con SO_2Cl_2 en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente en presencia de sílica gel húmeda; con rendimientos promedios de 70% [Kamitori, 1986].

Los dos últimos casos presentados son sólo un ejemplo de las numerosas reacciones orgánicas que han sido planeadas para ser efectuadas mediante un reactivo depositado en algún soporte sólido inorgánico. Este tipo de reacciones son generalmente más suaves, más selectivas y operacionalmente más simples de llevar a cabo que las correspondientes reacciones homogéneas [Cornelis, 1985; Laszlo, 1986]. Para ilustrar estas afirmaciones basta con citar la reacción de deshidratación de alcoholes promovida por el reactivo sulfato de cobre (II) adsorbido sobre sílica gel. En efecto, este reactivo promueve la deshidratación de la pregnenolona (84) al 3,5-dieno correspondiente en tolueno a reflujo durante 60 min. con 86% de rendimiento; mientras que la reacción efectuada con sulfato de cobre (II) anhidro requiere una temperatura superior a los 180 °C y el rendimiento del dieno no llega al 60% [Nishiguchi, 1987].



El motivo primordial para adsorber sustratos orgánicos y reactivos en la superficie de un sólido inorgánico es, quizás, la reducción concomitante en la dimensionalidad del espacio de

reacción. Esta transcurrirá principalmente sobre la superficie del soporte donde la difusión de los reactivos restringida a un espacio bidimensional conduce a mayores frecuencias de choques entre los reactivos y, por lo tanto, a menores tiempos de reacción. Sin embargo, la visión euclidea de una superficie plana como una entidad bidimensional perfectamente regular, suave y careciente de espesor no se puede aplicar a las superficies irregulares, de espesor finito, que caracterizan a los soportes sólidos comunes. Una aproximación novedosa a este problema consiste en el empleo de conceptos de la "geometría fractal" [Mandelbrot, 1977] en la cual las superficies de irregularidad progresivamente creciente son caracterizadas por dimensiones fractales D progresivamente crecientes [Avnir, 1983, 1984]. Esta dimensión fractal D puede entenderse como la dimensión efectiva, usualmente un número fraccionario entre 2 y 3, de una curva o superficie irregular. El significado de un valor de D próximo a 2 es que la superficie es muy llana y suave y en consecuencia cercana a la superficie euclidea bidimensional plana. Un valor de D próximo a 3 significa que la superficie es muy irregular y tortuosa y que tiende a llenar todo el espacio cercano a ella. Por ende, las moléculas adsorbidas en una superficie porosa con una dimensión fractal próxima a 3 llenan el espacio casi tan eficientemente como lo harían en un volumen tridimensional [Turro, 1987].

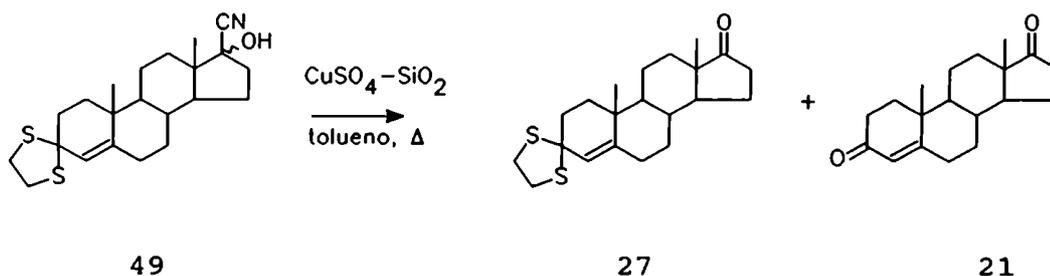
De todo lo anterior se podría inferir que los sólidos laminares como el grafito y las arcillas, que poseen valores de $D \approx 2$, son superiores (desde el punto de vista de la cinética de las reacciones) como soportes difusionales a los sólidos porosos que presentan valores de $D \approx 3$ tales como el carbón o la sílica gel. Pero esto no deja de ser una simplificación ya que un aspecto clave en la catálisis heterogénea es la presencia de sitios activos en el sólido para los cuales no existen equivalentes en la reacción de referencia en ausencia de un soporte. Por lo tanto, una superficie con un alto valor de D , como las de los sólidos finamente divididos, es a menudo óptima [Laszlo, 1986].

Laszlo y colaboradores señalan otras ventajas de los

reactivos depositados sobre soportes inorgánicos [Cornelis, 1985]:

1. Microentornos de diferente polaridad y con sitios ácidos o básicos.
2. Activación o estabilización de los reactivos.
3. Promoción de modos de reacción selectivos y
4. Tratamiento de la mezcla de reacción facilitado por la inmovilización de los productos secundarios.

Sin embargo, el descubrimiento de la utilidad del reactivo sulfato de cobre (II) adsorbido sobre sílica gel (de ahora en adelante $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$) como promotor de reacciones de detioacetilización, realizado durante el presente trabajo, fue accidental. Este reactivo, un polvo de color celeste pálido, había sido descrito en reacciones de deshidratación de alcoholes secundarios y terciarios, conducidas en solventes poco polares como tolueno o benceno a reflujo [Nishiguchi, 1987]. Durante la búsqueda, ya comentada, de métodos alternativos de deshidratación de la cianhidrina en C-17 se intentó con el reactivo en cuestión (preparado con tres partes de sílica gel Merck de malla 230-400 por una de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$), en tolueno a reflujo durante 8 hs, la conversión del compuesto 17-Ciano-17-hidroxi-3-cicloetilenditio-androst-4-eno (49) en el nitrilo α,β -insaturado correspondiente. Sin embargo, el análisis por CGL-EM del producto crudo de la reacción indicó la presencia de dos sustancias en relación 3 a 1 aproximadamente como puede verse en la figura 24. La inspección de los EM correspondientes reveló que había ocurrido la siguiente transformación:



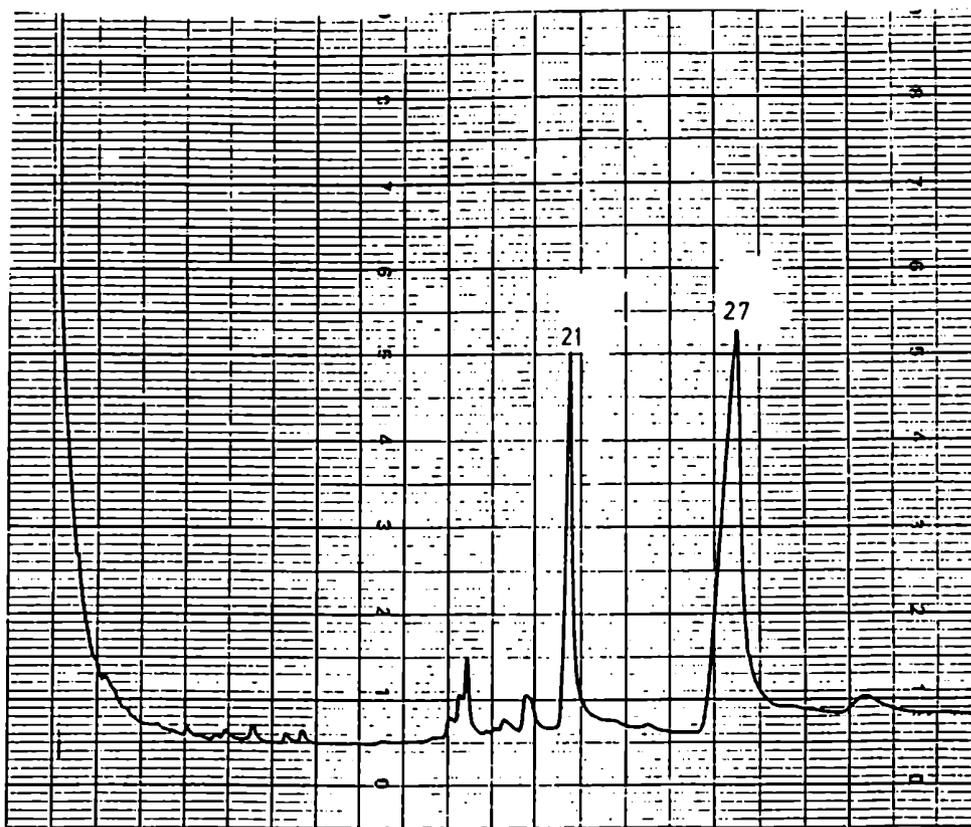


Figura 24: Cromatograma de la mezcla de reacción del compuesto 49 con $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$.

La primera, y obvia, conclusión de este resultado era que el método no servía para el fin buscado; la segunda, y sorprendente, era la capacidad del reactivo para remover tioacetales. Esta capacidad se vió corroborada posteriormente luego de prolongar el tiempo de la reacción a 30 hs. Se obtuvo entonces, con 60% de rendimiento, el compuesto 21 como único producto. Con este aliciente, se decidió afrontar la realización de un estudio sistemático, desde el punto de vista sintético, de los alcances y limitaciones del reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ como promotor en reacciones de detioacetalización.

Resultados y discusión.

1. Preparación de tioacetales.

Como primera parte de este estudio fue necesaria la preparación de una serie de ditianos y ditiolanos a partir de los compuestos carbonílicos correspondientes. Para ello, estos fueron

tratados con etanoditiol o propanoditiol según el caso, siguiendo, con ligeras modificaciones, el procedimiento diseñado por Williams para la protección regioselectiva del carbonilo en 3 de la androstenediona [Williams, 1974]. Se preparó también un hemitioacetal por reacción del compuesto carbonílico con mercaptoetanol, según literatura [Romo, 1951]. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Preparación de tioacetales.

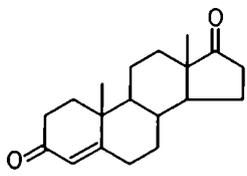
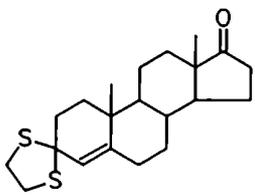
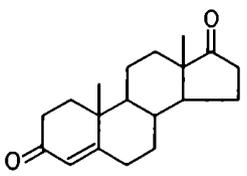
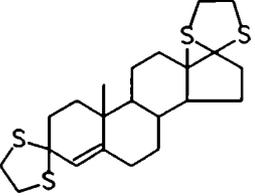
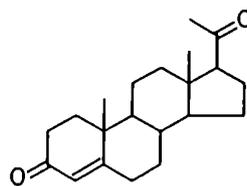
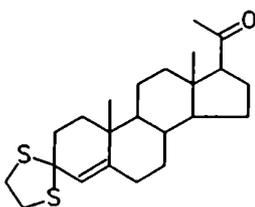
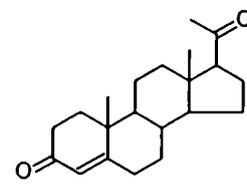
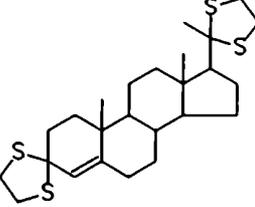
CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	t (h)	%	obs.
1			1	97	a
2		 106	1	95	b
3			1	89	a
4		 107	1	98	b

Tabla 15. Continuación.

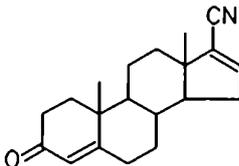
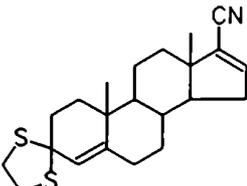
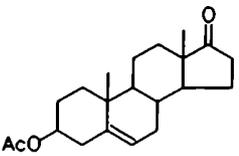
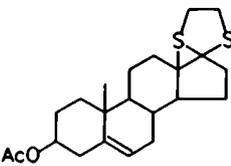
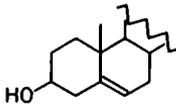
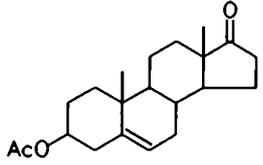
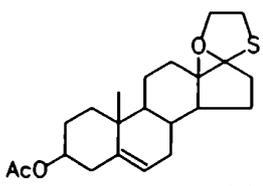
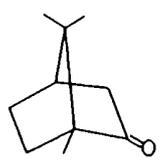
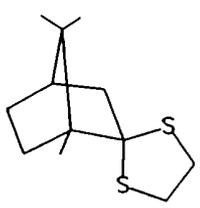
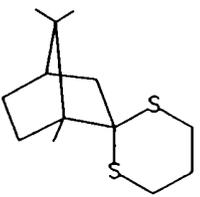
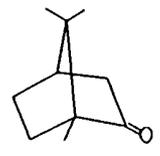
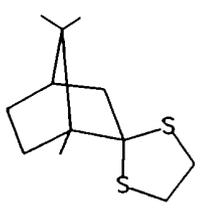
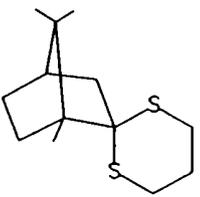
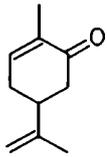
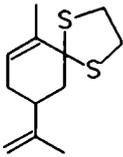
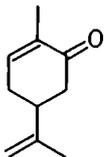
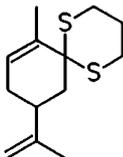
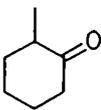
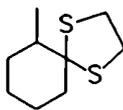
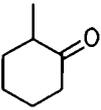
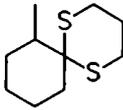
CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	t (h)	%	obs.
5			1,5	93	
6		 108	20	9:72	
		 109	1	40:<1	c
7		 110	20	82	d
8		 111	24	77	
		 112	24	69	e
9		 111	24	67	
		 112	24	35	f

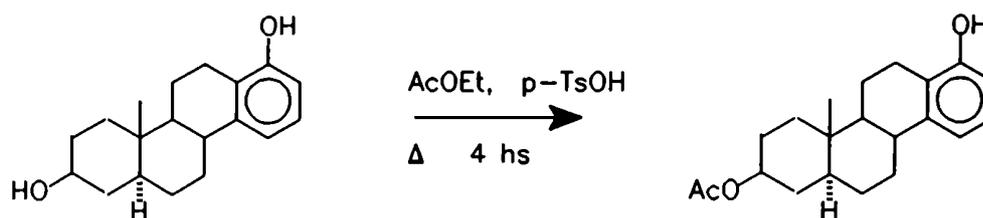
Tabla 15. Continuación.

CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	t (h)	%	obs.
10		 113	24	76	
11		 114	24	91	
12		 115	5	86	
13		 116	5	97	

Se empleó metanol anhidro, a temperatura ambiente, como solvente de reacción y un 30% de exceso del ditiol correspondiente y del promotor trifluoruro de boro eterato respecto del compuesto carbonílico. En algunos casos se efectuaron modificaciones, como ser: ^alas cantidades del ditiol y del promotor fueron equivalentes a la del sustrato respectivo; ^bla relación de ditiol y promotor a sustrato fue 2 a 1; ^del reactivo protector empleado fue mercaptoetanol, el solvente fue dioxano y el promotor cloruro de zinc; ^ecloroformo como solvente y trifluoruro de boro (50% en metanol) como promotor; ^fcloroformo como solvente y cloruro de zinc como promotor.

Surge de los datos de la tabla 15 la bondad de la adaptación del método de Williams para la preparación, con altos rendimientos, de los ditianos y ditiolanos presentados. Puede observarse también (casos 8 y 9) que el reemplazo del trifluoruro de boro eterato como promotor de estas protecciones por otros ácidos de Lewis como el cloruro de zinc o una solución al 50% de trifluoruro de boro en metanol no ofrece ventaja alguna.

Como inconveniente de esta técnica de preparación de tioacetales aparece la labilidad de acetatos (caso 6) en metanol acidificado, medio que favorece la transesterificación del solvente. Como acotación, la labilidad de acetatos en medio ácido fue observada por Johnson quién la aprovechó para desarrollar un método de transesterificación de un diol, precursor en la preparación de esteroides, según el siguiente esquema [Johnson, 1956]:



2. Remoción de tioacetales.

Los tioacetales preparados como se indicó, junto con los conseguidos por otros medios para los fines discutidos oportunamente (compuestos 27, 36, 38, 39, 40 y 49), como también el hemitioacetal 110, se sometieron a la acción del reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ (2,0g; 2,2 mmol de CuSO_4 /mmol de sustrato; excepto en los casos indicados en la tabla 16) en solventes orgánicos a reflujo. El progreso de las reacciones se siguió, en primera instancia, por el cambio de color de las mezclas reaccionantes que viraban de celeste a azul oscuro, o negro, excepto en el caso de los ditianos cuyas mezclas de reacción viraban a amarillo intenso. Los resultados encontrados se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Remoción de tioacetales promovida por $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$.

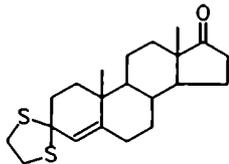
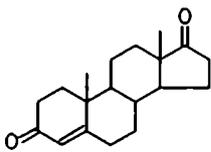
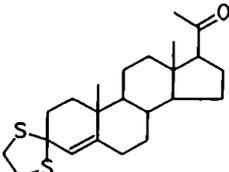
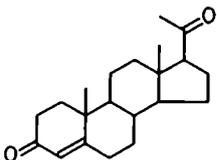
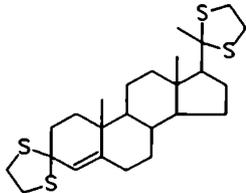
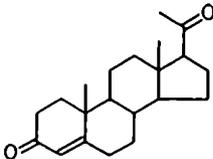
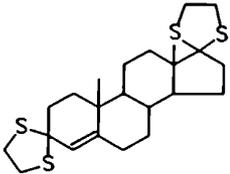
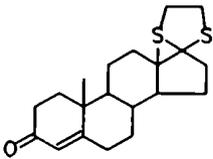
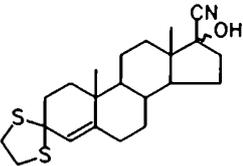
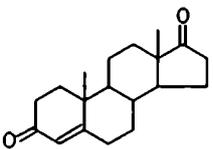
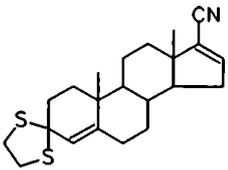
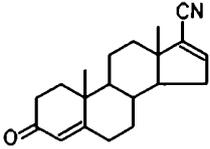
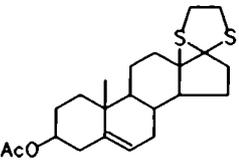
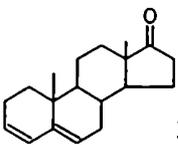
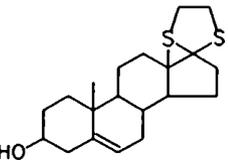
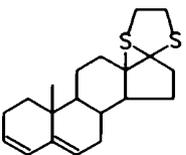
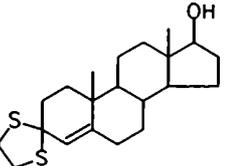
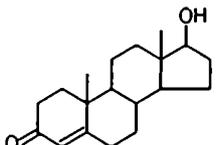
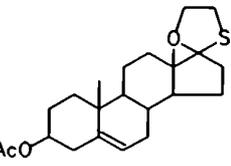
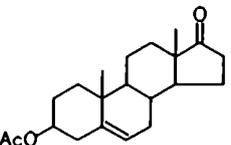
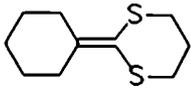
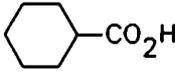
CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	SOLVENTE	TIEMPO (h)	%
1			benceno	18	85
			tolueno	16	70 ^a
2			benceno	14	83
			cloroformo	5	80
			cloroformo	24	0 ^b
3			benceno	20	70 ^c
4			cloroformo	3	90 ^a
			benceno	36	65
		117			
5			tolueno	30	62 ^d

Tabla 16. Continuación.

CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	SOLVENTE	TIEMPO (h)	%
6			benceno	15	86
7			benceno	48	118
8			cloroformo	30	31 ^e
9			cloroformo	20	52 ^e
10			cloroformo	4	90 ^c
			tolueno	4	30 ^a
			cloroformo	4	0 ^b
11			benceno	12	91

120

Tabla 16. Continuación.

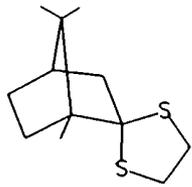
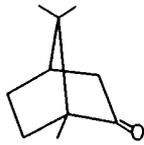
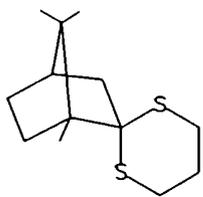
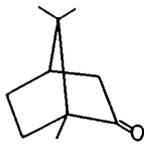
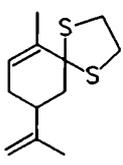
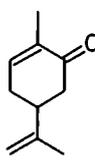
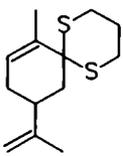
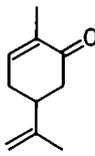
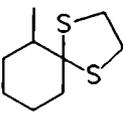
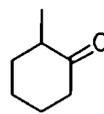
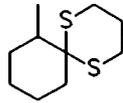
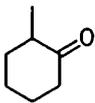
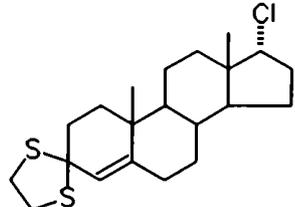
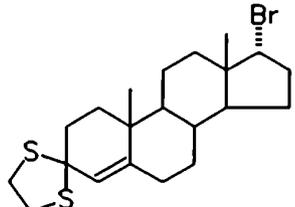
CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	SOLVENTE	TIEMPO (h)	%
12			cloroformo	20	60 ^c
13			cloroformo	2	80
14			tolueno	5	30 ^c
			cloroformo	24	0 ^c
15			cloroformo	2	50
			tolueno	4	31 ^c
16			n-hexano	20	80 ^c
			cloroformo	10	0 ^c
			tetracloruro de carbono	24	0 ^c

Tabla 16. Continuación.

CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	SOLVENTE	TIEMPO (h)	%
17			cloroformo	7	70
18		?	cloroformo	3	-
19		X	cloroformo	3	-

Las cantidades de reactivo por mmol de sustrato fueron: ^a1,5 g (1,65 mmol de CuSO₄); ^b2,0 g (0,02 mmol de CuSO₄); ^c2,5 g (2,75 mmol de CuSO₄); ^d1,0 g (1,1 mmol de CuSO₄) y ^e2,0 g (sílica gel Riedel-de Haën de malla 230-400). En el caso 3 se obtuvo también un 5% del compuesto **69** y en el 7 un 7% del compuesto **119**.

El avance de las reacciones se monitoreó por ccd y/o CGL y los productos se aislaron por filtración de la mezcla de reacción a través de una columna corta de sílica gel eluida con pequeños volúmenes de acetato de etilo o de mezclas de hexano:acetato de etilo de distinta composición. Los rendimientos se calcularon pesando los productos obtenidos y verificando su pureza mediante CGL.

Como ejemplo del seguimiento de una reacción por cgl se tienen los cromatogramas de la figura 25, correspondientes al caso 13 de la tabla 16.

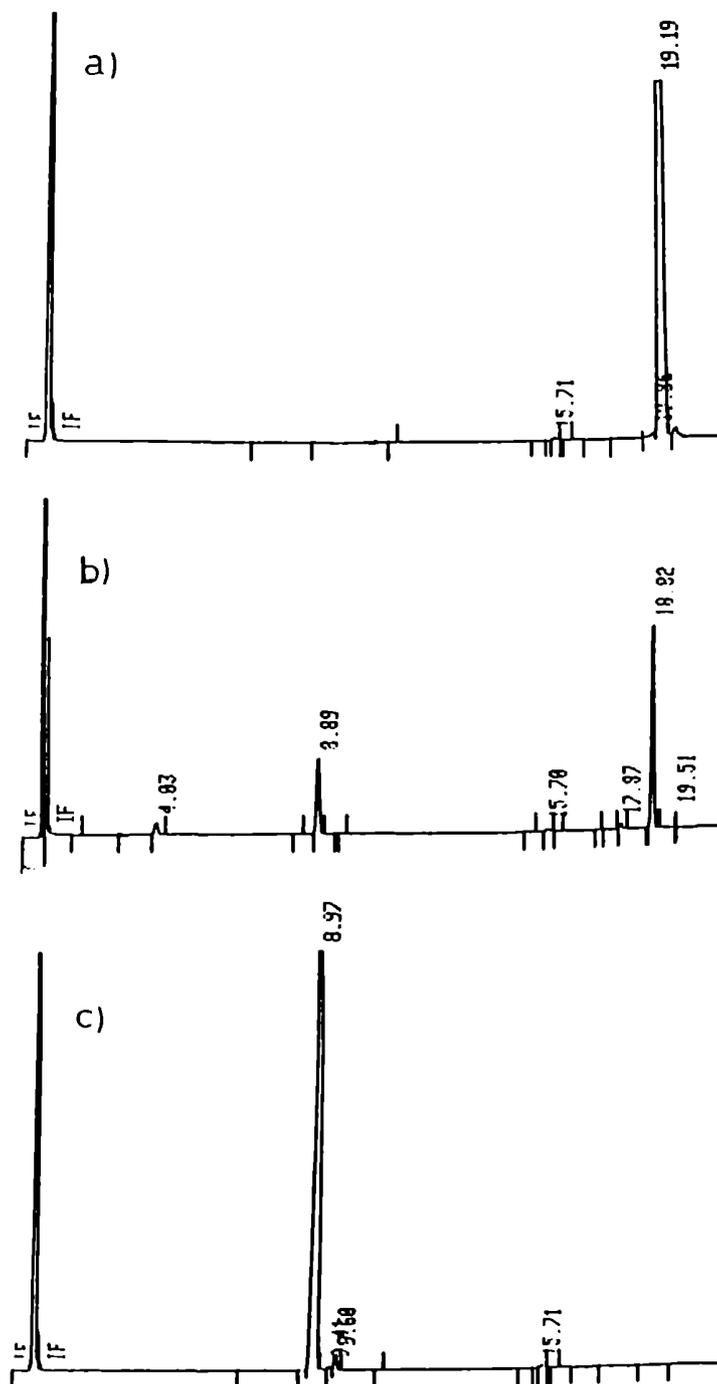
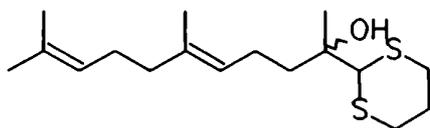


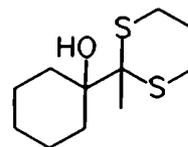
Figura 25: Cromatogramas de la mezcla de reacción del caso 13 de la tabla 16; a) $t = 0$ h; b) $t = 0,5$ h; c) $t = 2$ h.

De los datos presentados se puede concluir que este procedimiento de desprotección de tioacetales brinda rendimientos de reacción de buenos a muy buenos excepto en los casos 14 y 15 (el rendimiento pobre encontrado aquí puede ser atribuido a la labilidad intrínseca de la carvona) y, al igual que el método fotolítico nombrado anteriormente, presenta la ventaja del empleo de condiciones neutras de reacción, y no afecta a dobles enlaces, grupos éster y grupos nitrilo; pero si provoca la deshidratación de alcoholes secundarios no impedidos estéricamente (cf. casos 8 y 9) confirmando lo observado por otros autores [Nishiguchi, 1987].

Esto último estaría sugiriendo que la principal limitación del método sería la incapacidad del reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ de promover la transformación de β -hidroxi-1,3-ditianos, unidades estructurales resultantes del ataque del carbanión de un 1,3-ditiano sobre un grupo carbonilo, en las correspondientes β -hidroxicetonas. Efectivamente, los sustratos 121 [Rodriguez, 1990] y 32 ensayados con el reactivo en las condiciones usuales no dieron resultados positivos. El compuesto 121 sometido a la acción del reactivo en benceno a reflujo no sufrió ninguna modificación según se observó por ccd. Luego del agregado de 2 equivalentes adicionales del reactivo y de 12 hs más de reacción se constató (ccd) la formación incipiente de un producto menos polar que el sustrato, lo que estaría indicando el comienzo de la reacción de deshidratación no deseada. Por su parte, el compuesto 32 luego de 7 hs a reflujo de tolueno brindó un producto polimérico, y en cloroformo a temperatura ambiente (20 hs) y a reflujo (2 hs) no sufrió ninguna modificación.



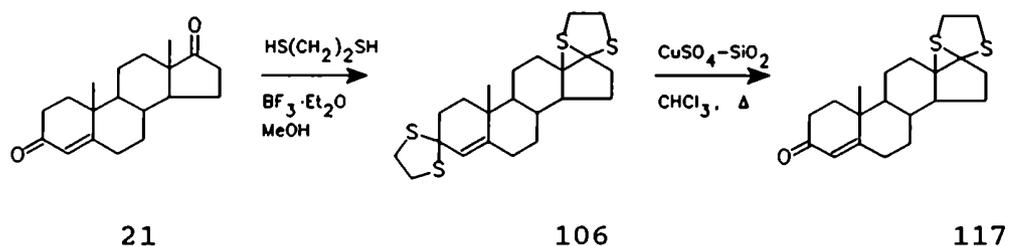
121



32

El reactivo también afecta, de un modo que no se pudo determinar, a sustratos halogenados, casos 18 y 19; observándose en este último la descomposición del sustrato. El espectro de RMN ^1H del producto obtenido en el caso 18 mostró claramente la presencia de la funcionalidad 3-ceto-4-en esperada, y la ausencia del doblete en 4,04 ppm indicativo de un átomo de Cl unido en α al C-17. Sin embargo, a pesar de los datos de RMN ^{13}C y de EM coincidentes con lo anterior, no fue posible determinar correctamente la estructura del anillo D del producto. Evidentemente, es necesario más trabajo experimental para dilucidar el modo de acción del reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ con sustratos halogenados, pero podría estar relacionado con la conocida capacidad del Cu (II) de formar complejos con los halógenos.

En las condiciones apropiadas, el método llega a ser regioselectivo (caso 4). El corolario de esta última observación es el hallazgo de una ruta indirecta para la protección selectiva del carbonilo en C-17 de la 4-androsten-3,17-diona (21), de acuerdo al esquema 21.



Esquema 21: Preparación de 17-Cicloetilénditio-androst-4-en-3-ona (los espectros de RMN ^1H de los compuestos 106, 117 y 27 se muestran en la figura 26).

Este procedimiento indirecto es importante ya que no es posible la formación directa del tioacetal en C-17 por ninguno de los métodos existentes en la actualidad. En efecto, cuando la 4-androsten-3,17-diona es tratada con etanoditioil en ácido acético como solvente y TsOH como catalizador se obtienen el 3-tioacetal 27 (85%) y el 3,17-bistioacetal 106 (8%) [Ralls, 1954] y con

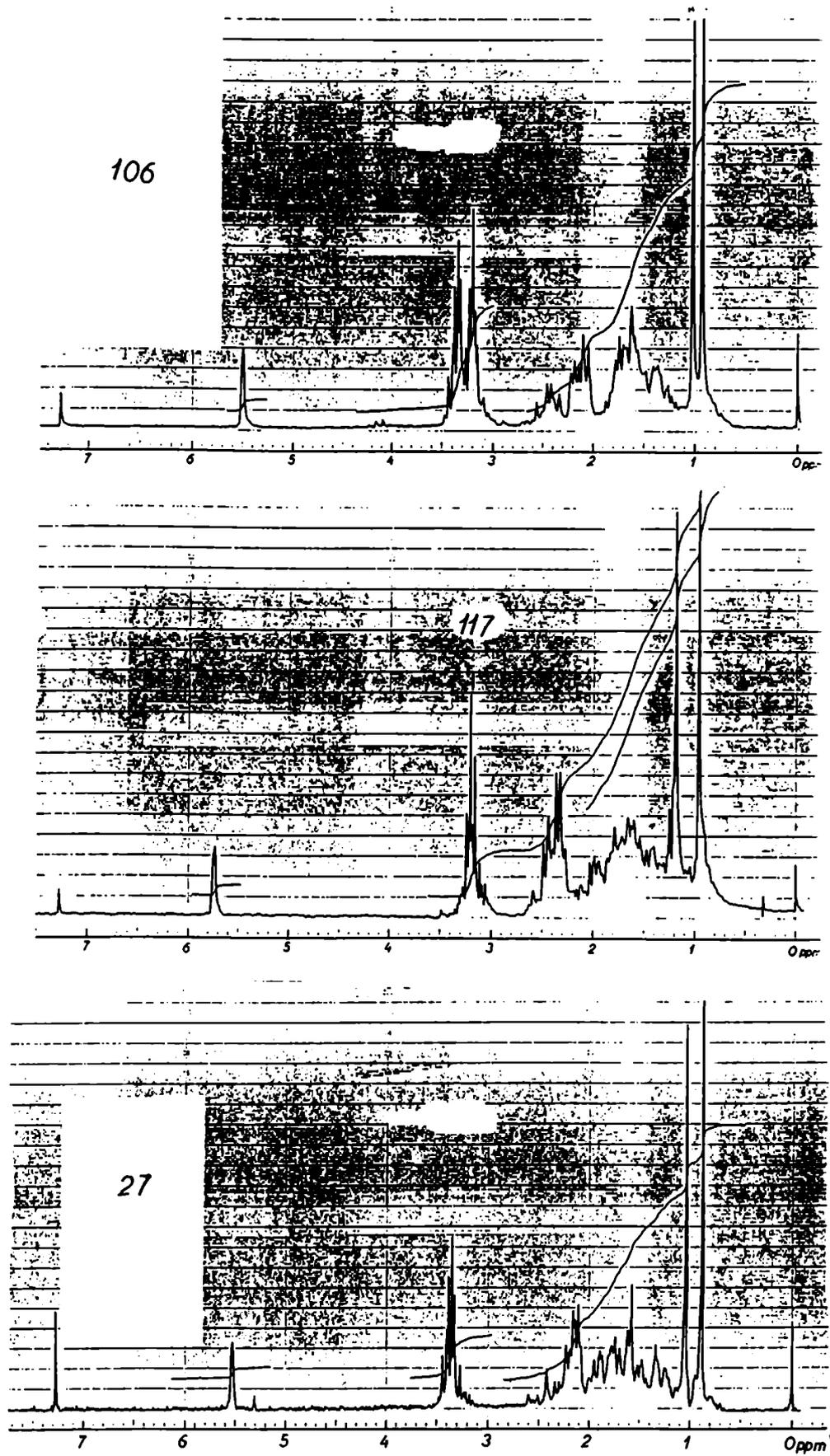


Figura 26: Espectros de RMN ^1H de los compuestos 106, 117 y 27.

metanol como solvente y trifluoruro de boro eterato como catalizador se obtienen el 3-tioacetal 27 (85%) junto con un 12% de sustrato sin reaccionar [Williams, 1974]. Como se indicó anteriormente, la aplicación de este último procedimiento en el presente trabajo de tesis brindó el compuesto 27 con rendimiento superior al 95% como único producto de reacción. Empleando como reactivo protector el tiosilano etilénditiobis(trimetilsilano) en cloroformo como solvente e ioduro de zinc como catalizador los productos son, nuevamente, el 3-tioacetal 27 (94%) y el 3,17-bistioacetal 106 (5%) [Evans, 1977]. El camino presentado en el esquema 21 permite obtener rápidamente el 17-tioacetal 117 con 85% de rendimiento y libre de productos secundarios.

Volviendo a los datos presentados en la tabla 16 se puede señalar que otra limitación, de menor cuantía, del método en discusión es el tipo de solventes apropiados para conseguir rendimientos altos. Solventes de polaridad baja a media (en el rango hexano-cloroformo) dan resultados satisfactorios, no siendo el caso con solventes de mayor polaridad como el acetato de etilo o solventes de polaridad aún mayor. Esto sugiere que la capacidad de adsorción del reactivo, obviamente mayor en solventes de polaridad media a baja, juega un rol fundamental en el curso de estas reacciones de detioacetalización. Apoya esta suposición el hecho de que la actividad del reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$, empleado en condiciones comparables, se ve debilitada cuando se prepara con sílica gel de rango de tamaño de partícula superior a los 40-63 μm (malla 230-400). En efecto, la transformación correspondiente al ítem 13 de la tabla 16, llevada a cabo en las mismas condiciones con el reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ preparado con sílica gel Davison (malla 100-200) brindó un 50% de conversión (ccd) luego de 12 horas de reflujo.

La importancia de la capacidad adsorbente del soporte en la actividad del reactivo depositado fue señalada por Nishiguchi y colaboradores. Ellos encontraron que la actividad del $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ en reacciones de oxidación de alcoholes secundarios a cetonas depende, entre otros factores, de la naturaleza fisicoquímica del sólido inorgánico usado como soporte. La sílica gel 60 de malla 230-400 presentó la máxima actividad, mientras que la de malla

70-230 tuvo la mitad de la anterior. Otros soportes como el carbón activado, bentonita, alúmina, celite y tamices moleculares (3A) en polvo, fueron prácticamente inefectivos como así también el nitrato, pulverizado y seco, sin soporte [Nishiguchi, 1989].

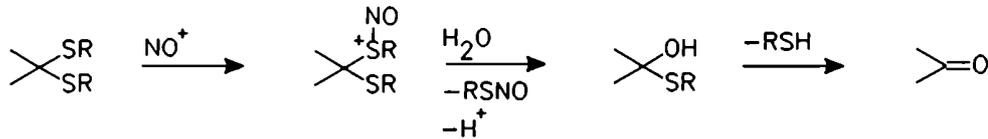
Estos autores, en el mismo trabajo, observaron rendimientos variables para la oxidación de ciclododecanol a ciclododecanona de acuerdo a la marca comercial de la sílica de malla 230-400 empleada como soporte del $Zn(NO_3)_2$. La sílica gel BW-300 de Fuji-Davidson les brindó rendimientos ligeramente superiores a la sílica gel 60 de Merck. De igual manera, la confrontación de los casos 2,4 y 9 de la tabla 16 permite arribar a la conclusión que el reactivo $CuSO_4-SiO_2$ preparado con sílica Riedel-de Haën no presenta la misma eficiencia que aquel preparado a partir de sílica Merck.

El mecanismo de esta reacción no está completamente clarificado pero, evidentemente, la misma no es catalítica. Cuando distintos sustratos fueron sometidos a la acción del reactivo preparado con 2 moles % de sulfato de cobre (II) no se observó cambio alguno en los mismos luego de varias horas de reacción (items 2 y 10 de la tabla 16).

Se debe descartar también la posibilidad de que la reacción en cuestión sea una remoción oxidativa efectuada por el oxígeno del aire y promovida por la presencia de Cu (II) (es conocido que el benceno a reflujo es oxidado a fenol en presencia de sales de Cu (II) [Barton, 1979]). En efecto, la transformación correspondiente al item 13 de la tabla 16, llevada a cabo en atmósfera de nitrógeno libre de oxígeno, brindó rendimientos comparables en idéntico tiempo al obtenido en las condiciones habituales. Además, dado que los valores de solubilidad del oxígeno en los distintos solventes empleados, a 1 atmósfera de presión de aire y 25 °C, son del orden de 2-3 mmoles/l [Murov, 1973], el oxígeno disuelto tampoco puede tener ninguna influencia en estas reacciones.

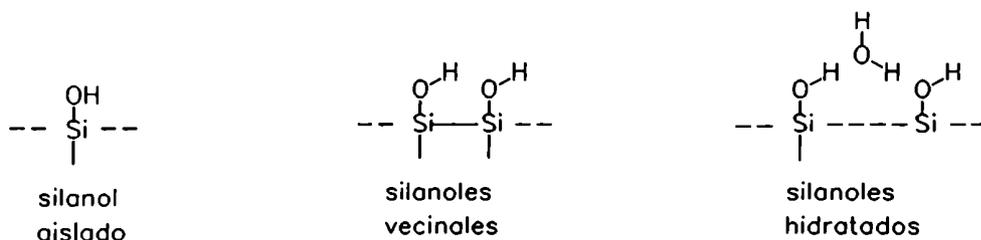
Por otro lado, en la reacción de remoción de tioacetales promovida por nitrato de cobre (II) depositado sobre arcilla, el reactivo, al igual que su análogo de hierro (III), actúa como fuente de iones nitrosonio (NO^+) los que transforman los

tioacetales en los compuestos carbonílicos correspondientes sin necesidad de una fuente externa de agua, que es provista por la estructura interna de la arcilla [Balogh, 1984]. Si bien los autores no especifican el mecanismo de esta última reacción, este debe ser, muy probablemente, similar al propuesto para la desprotección de tioacetales mediante nitrito de isoamilo [Fuji, 1978] o mediante NaNO_2 acuoso [El-Wassimy, 1983] (esquema 22).



Esquema 22: Mecanismo de la desprotección de tioacetales promovida por nitritos.

Considerando lo señalado anteriormente respecto al origen del agua en la reacción de tioacetales con "claycop", es importante recordar aquí que la composición de la sílica está dada por la fórmula $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_x$ y que la estructura, generalmente aceptada, de su "superficie" consiste en una red interconectada de enlaces silanoles (SiOH) y siloxanos (SiOSi), acompañados de moléculas de agua adsorbidas cuya cantidad influye notoriamente en la actividad de la sílica gel. Los silanoles se pueden clasificar en aislados o libres (1), vecinales o activos (2) e hidratados (3) (esquema 23).



Esquema 23: Tipos de grupos silanoles presentes en la superficie de la sílica.

Los silanoles activos están posicionados en la superficie de la sílica de modo tal que permiten el enlace por puente hidrógeno de silanoles próximos. En términos de capacidad adsorbente, los silanoles activos son los más eficientes mientras que los aislados muestran menor aptitud enlazante y menor aún los hidratados y los enlaces siloxanos. Los silanoles libres son característicos de superficies relativamente ordenadas o cristalinas y, a su vez, los activos lo son de la sílica amorfa [Turro, 1987]. Los grupos silanoles en general son los responsables de los sitios de adsorción de las moléculas orgánicas en la superficie de la sílica gel y las fuerzas causantes de esta adsorción son 1) interacciones electrostáticas 2) fuerzas de London originadas en interacciones de dipolos inducidos y 3) enlaces puente hidrógeno. La adsorción, comparativamente fuerte, de moléculas orgánicas que contienen enlaces π o pares de electrones no compartidos se debe mayormente a enlaces de hidrógeno con los silanoles o con el agua adsorbida; en consecuencia el grado de interacción dependerá del tratamiento previo de la sílica gel y de la polaridad del sustrato [Farwaha, 1985].

Teniendo en cuenta que para superficies equilibradas se aceptan generalmente valores de $\approx 6 \text{ SiOH/nm}^2$ [Farwaha, 1985] y que el área superficial de la sílica gel de malla 230-400 es de aproximadamente $500 \text{ m}^2/\text{g}$ [Nishiguchi, 1989], se puede calcular que 1 g de la sílica en cuestión contiene 50 mmoles de grupos SiOH y, por lo tanto, el reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ empleado en el presente trabajo posee aproximadamente 37,5 mmoles de SiOH por gramo de reactivo. Esto implica que las mezclas de reacción contienen de 37,5 a 93,8 mmoles de OH, según el caso, por mmol de tioacetal (ver tabla 16).

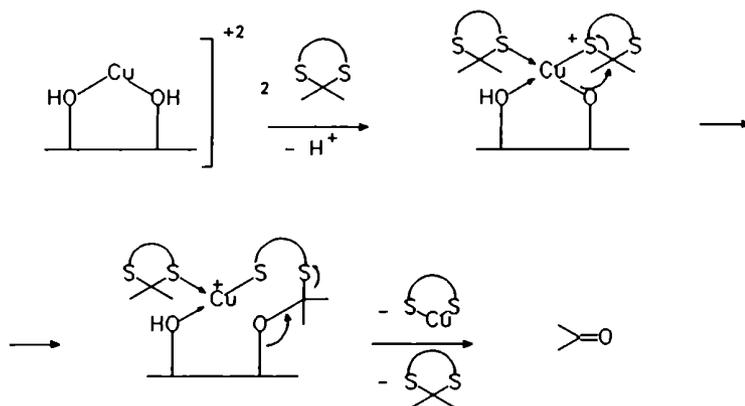
Estos últimos valores están sugiriendo fuertemente que la sílica gel cumple una función adicional a la de soporte para el reactivo sulfato de cobre (II) y los sustratos, interviniendo como reactivo en la etapa hidrolítica de estas reacciones de detioacetalización.

Corresponde recordar, también, la postulada formación de complejos entre el Cu(II) y compuestos azufrados en solventes

aromáticos o etéreos [Mukaiyama, 1969, 1970], y que ha sido informado que otros cationes de metales pesados (Ag(I) por ejemplo) son capaces de formar aductos con ditiolos permitiendo la remoción de los grupos azufrados incluso en ausencia de agua en el medio de reacción [Satchell, 1987].

Por otra parte, los colores observados al finalizar las reacciones en cuestión podrían deberse a la formación de algún tipo de sulfuro de Cu (II) en el caso de los ditiolanos, o de un complejo molecular entre los productos azufrados y el Cu (II) en el caso de los ditiolos (ha sido postulada la formación de complejos moleculares de color naranja o amarillo en la reacción entre sales de Bunte y CuCl_2 [Affleck, 1950]).

Por todo lo anterior se puede concluir que un probable mecanismo de las reacciones de detioacetilización en discusión sería la formación, en primer lugar, de un quelato que involucra al azufre bivalente coordinado con el Cu (II) y la hidrólisis posterior de este complejo promovida por los grupos OH presentes en la superficie de la sílica gel, de acuerdo al siguiente esquema 24.



Esquema 24: Probable mecanismo de la detioacetilización promovida por $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$.

DESPROTECCION DE ACETALES Y TETRAHIDROPIRANILETERES

Antecedentes

La transformación de grupos hidroxilos en éteres tetrahidropiranílicos y la de grupos carbonilo en acetales constituyen reacciones de protección ampliamente usadas en la química sintética [Green, 1981].

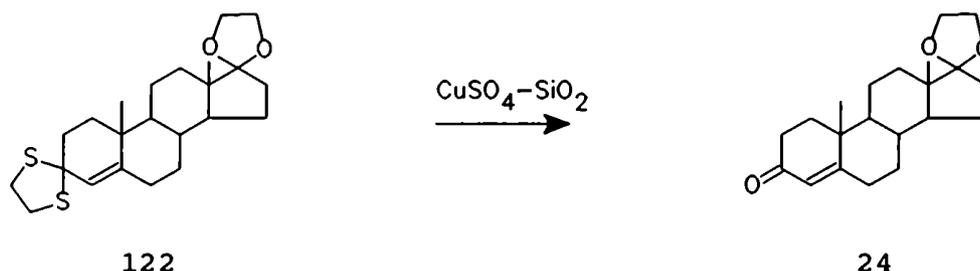
La gran mayoría de los métodos existentes para la remoción de estos grupos protectores hacen uso de medios de reacción acuosos acidificados con ácidos minerales o no acuosos acidificados con ácidos orgánicos como por ejemplo TsOH (*cf.* [Corey, 1978; Bauduin, 1978]). Existen unos pocos ejemplos de métodos que permiten la transformación de acetales en las cetonas correspondientes bajo condiciones no acuosas y neutras. Entre estos se encuentra el procedimiento diseñado por Jung y colaboradores que implica el tratamiento del acetal con el reactivo electrofílico trimetiliodosilano en diclorometano o cloroformo a temperatura ambiente durante 15 minutos, con rendimientos típicos superiores al 84% [Jung, 1977]. Un caso de desacetilización oxidativa es el tratamiento de acetales cíclicos con el reactivo tetrafluorborato de tritilo, en diclorometano a temperatura ambiente, el cual oxida suavemente la función glicol a un α -cetol. El agregado posterior de agua al medio de reacción permite obtener las cetonas correspondientes con rendimientos superiores al 60% [Barton, 1971].

Un ejemplo interesante de un método de desacetilización que involucra al reactivo adsorbido sobre un soporte inorgánico es el que emplea cloruro férrico adsorbido sobre sílica gel [Kim, 1985]. El reactivo, en cantidades catalíticas (0,8 moles% de FeCl_3) permite la desprotección eficiente y selectiva de acetales en solución clorofórmica y a temperatura ambiente con muy buenos rendimientos, sin afectar a acetatos, éteres bencílicos y enlaces glicosídicos. Por otro lado, la ruptura de *t*-butildimetilsilil y tritil éteres con este reactivo es dificultoso. Sin embargo los autores encontraron buenos resultados solamente en la desprotección quimioselectiva de acetales de moléculas que también contienen *t*-butildimetilsilil éteres. No observaron la

remoción preferencial de acetales en presencia de tritil éteres y también establecieron que el reactivo es incapaz de distinguir entre acetales y tetrahidropiranyléteres a pesar de que la velocidad de hidrólisis de estos últimos es ligeramente menor.

Como precedente de la aplicación del sulfato de cobre (II) como reactivo para la desprotección de acetales se encuentra la técnica diseñada por Posner y colaboradores [Posner, 1984]. La desacetilización en este caso es una transacetilización promovida por el sulfato de cobre (II) en acetona como solvente, en condiciones suaves, y con rendimientos superiores al 90%.

Teniendo en cuenta los dos últimos casos señalados se podría suponer, *a priori*, que el reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ tiene la propiedad de actuar como promotor en reacciones de desacetilización. Sin embargo, ante la ausencia de referencias bibliográficas específicas sobre este tema y considerando los resultados de los casos 1 y 4 de la tabla 16, se decidió probar la transformación siguiente, buscando una alternativa de alto rendimiento al proceso presentado en el capítulo I para la preparación del compuesto 17-Cicloetiléndioxi-androst-4-en-3-ona (24).



Para ello fue necesaria la preparación previa del compuesto 3-Cicloetilénditio-17-cicloetiléndioxi-androst-4-eno (122) partiendo de 3-Cicloetilénditio-androst-4-en-17-ona (27). La aplicación del método tradicional [Zderic, 1959] brindó 122 con 66% de rendimiento mientras que con el método de Nitta (ver más adelante) se logró un 87% de rendimiento. Por lo tanto 122 puede prepararse con 84% de rendimiento global a partir de androst-4-en-3,17-diona (21).

Se sometió, a continuación, el compuesto 122 a la acción del

reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$, en diclorometano a reflujo durante 4 horas y, no sorprendentemente, se frustró el objetivo perseguido; ya que se obtuvo 27 con 95% de rendimiento. Pero ante la evidencia experimental de que la suposición anterior era correcta, se decidió comprobar, con un mayor número de casos y condiciones de reacción, la utilidad del reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ en la remoción de cicloacetales y tetrahidropiranyléteres.

Resultados y discusión

La nueva meta obligaba, necesariamente, a la preparación de diversos cicloacetales. Para ello, una serie de cetonas esteroideas comerciales y el alcanfor se convirtieron en sus acetales respectivos mediante el procedimiento desarrollado originalmente por Roberts y Caserio [Caserio, 1958], y aplicado posteriormente en el campo de los esteroides por Nitta y colaboradores [Nitta, 1985]. Este consiste en la agitación a 40 °C de una suspensión del sustrato en etilén-glicol (exceso de 35 a 1 o superior) y ortoformiato de etilo, con cantidades catalíticas de p-TsOH. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Preparación de cicloacetales.

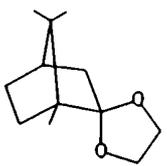
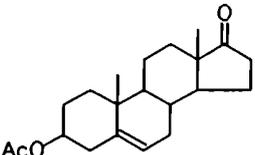
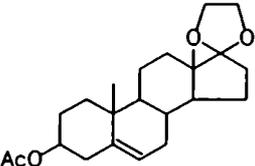
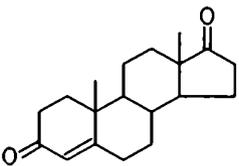
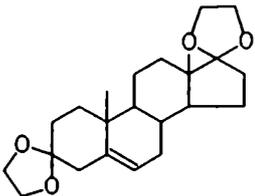
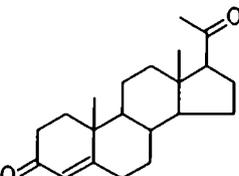
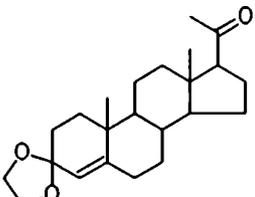
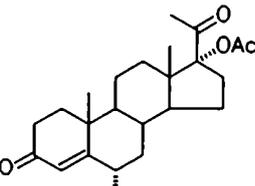
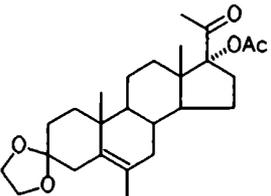
SUSTRATO	PRODUCTO	t (h)	%
	 123	24	88
 124	 125	3	77

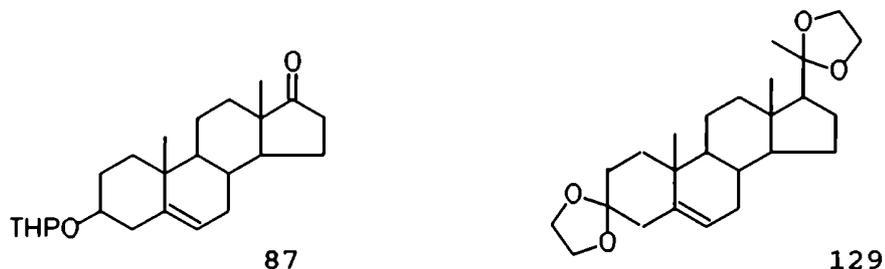
Tabla 17. Continuación.

SUSTRATO	PRODUCTO	t (h)	%
	 23	3	71
	 126	6	77
 127	 128	72	46

Es interesante la comparación de los tres últimos casos presentados. La formación del 3,17-bis-cicloacetal (23) ocurre rápidamente y con buen rendimiento pero, contrariamente a lo esperado, el método no permite obtener el 3,21-bis-cicloacetal (129) brindando, en cambio, el 3-mono-cicloacetal (126) con un rendimiento sorprendentemente alto. Una explicación posible para esto puede estar en la temperatura moderada de la reacción, que se sumaría a la conocida menor facilidad de acetalización del carbonilo 20 comparado con los carbonilos 3 y 17 [Loewenthal, 1959], para originar el monoacetal como único producto, a pesar del gran exceso de etilén-glicol involucrado. Este resultado trae como inesperada consecuencia una mejora sustancial de los antiguos métodos indirectos de protección selectiva del carbonilo

en C-3 de la progesterona. Estos requieren de la preparación previa del 3,21-bis-acetal (129) que es hidrolizado selectivamente al 3-mono-acetal (126) mediante trifluoruro de boro eterato en eter:benceno (1:1) (74% de rendimiento global) [Bowers, 1959], o mediante TsOH en acetona (74% de rendimiento global) [Maier, 1985].

No sorprende ahora la formación del 3-monoacetal (128) como producto mayoritario en el último caso de la tabla (junto con muy pequeñas cantidades del 3,21-bisacetal). El rendimiento bajo puede estar relacionado con el prolongado tiempo de reacción, que a su vez sería una consecuencia de la menor reactividad del carbonilo 3 de (127), originada por la congestión estérica que causa el grupo metilo en α unido al C-6.



Los acetales preparados según la discusión anterior se sumaron a los compuestos obtenidos con anterioridad (25, 48, 87 y 122) y a los tetrahidropiranyléteres 130 y 131 [Rodríguez, 1990] para someterlos a la acción del reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ (preparado de igual modo que en el caso de los tioacetales) en los solventes y condiciones que se indican. Se lograron los resultados presentados en la tabla 18.

Tabla 18: Remoción de acetales y tetrahidropiranyléteres promovida por $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$.

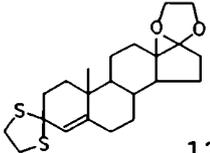
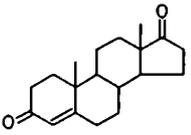
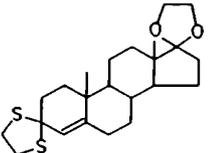
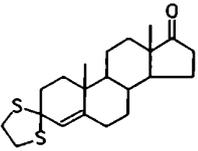
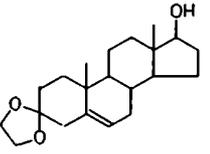
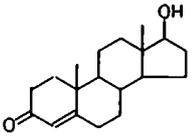
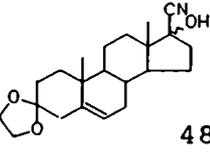
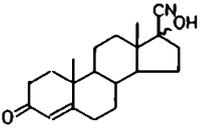
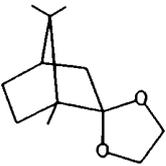
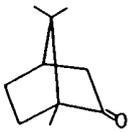
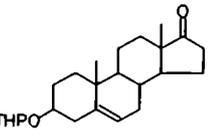
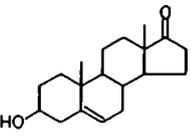
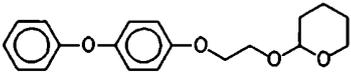
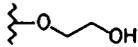
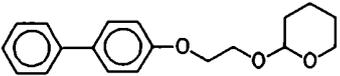
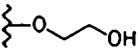
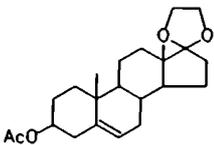
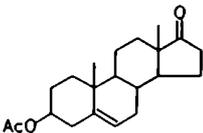
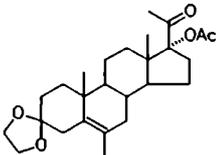
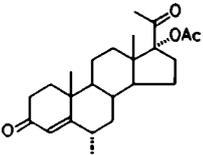
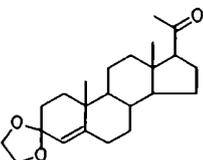
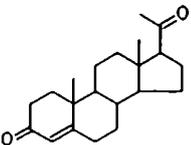
CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	SOLVENTE	T(°C)	t(h)	%
1	 122		benceno	80	5	90 ^a
2	 122		dicloro- metano	40	4	95 ^a
3	 25		cloroformo	60	3	82 ^a
4	 48		cloroformo	60	4	61 ^b
5			cloroformo	20	48	70 ^b
6	 87		cloroformo	20	72	65 ^a
			cloroformo	20	96	0 ^c
			dicloro- metano	40	24	70 ^d

Tabla 18. Continuación.

CASO	SUSTRATO	PRODUCTO	SOLVENTE	T(°C)	t(h)	%
7	 130		cloroformo	60	18	80 ^e
			cloroformo	20	24	41 ^e
			benceno	20	18	30 ^e
8	 131		cloroformo	60	16	78 ^a
9			cloroformo	60	5	93 ^e
10			cloroformo	60	2	81 ^e
11			cloroformo	60	24	85 ^e
			cloroformo	20	20	22 ^e
			AcOEt	20	96	0 ^e
			THF	20	60	0 ^e

Los gramos de reactivo por mmol de sustrato fueron los siguientes: ^a3,0; ^b2,0; ^c3,0 (0,02 moles de CuSO₄); ^d3,5 y ^e2,5.

De los resultados presentados se pueden sacar diversas conclusiones sobre las cualidades del método:

i) los rendimientos son de buenos a muy buenos cuando el solvente de reacción es un solvente clorado de polaridad media como el

diclorometano o el cloroformo, observación que concuerda con el método de desacetilización mediante $\text{FeCl}_3\text{-SiO}_2$ [Kim, 1985] ;

ii) solventes de polaridad mayor que los mencionados, como acetato de etilo o tetrahidrofurano, inhiben completamente la actividad del reactivo (caso 11) de igual modo que solventes como la acetona la cual, en principio, favorecería el proceso de transacetilización con la consiguiente eliminación de los acetales protectores (ver más adelante caso 12d);

iii) en las condiciones apropiadas el método permite la remoción quimioselectiva de acetales en presencia de tioacetales (casos 1 y 2);

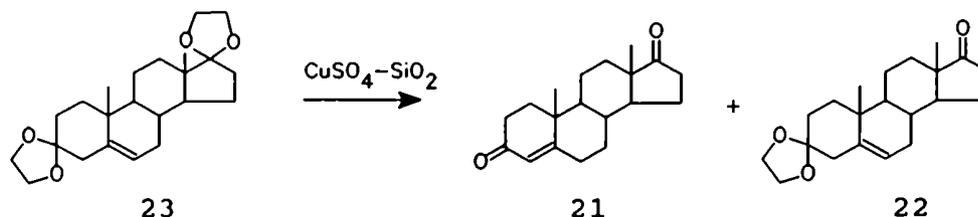
iv) grupos funcionales como cianhidrinas y acetatos no son afectados por el procedimiento en las condiciones empleadas (casos 4, 9 y 10);

v) tal cual se desprende de los casos 3, 7 y 8, el reactivo, en cloroformo a reflujo, tampoco afecta a alcoholes primarios y secundarios impedidos estéricamente.

El caso 6 ilustra acerca de la importancia del control de la temperatura en este tipo de reacciones. En efecto, aumentando 20 °C la temperatura de la reacción se alcanzan rendimientos comparables en un tercio del tiempo, en solventes similares; un aumento adicional de 20°C (es decir cloroformo a reflujo como medio de la reacción) durante 24 horas reduce notablemente el rendimiento debido a la formación de un producto de deshidratación del alcohol formado inicialmente, de acuerdo a datos de ccd. Si bien no se aisló este producto secundario, se podría suponer que se trata del dieno androst-3,5-dien-17-ona (118) ya que, en condiciones de reacción similares, el colesterol y la pregnenolona rindieron los 3,5-dienos correspondientes [Nishiguchi, 1987] al igual que el compuesto 109 presentado en el caso 8 de la tabla 16 (ver página 126).

Estos buenos resultados iniciales plantearon la necesidad de llevar el método un poco más allá. La comparación de los casos 2 y 3, y 9 y 11 de la tabla anterior estaba señalando que el cicloacetal ubicado en C-17 es más lábil que en C-3, dejando entrever la capacidad potencial del reactivo como promotor de reacciones de desacetilización regioselectivas.

A pesar de ello, la búsqueda de condiciones para la remoción regioselectiva de cicloacetales mediante el reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ resultó infructuosa. En efecto, el bis-cicloacetal **23** bajo la acción del reactivo brindó, mayoritariamente, los productos que se indican:



Las condiciones empleadas y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

CASO	SOLVENTE	T(°C)	t(h)	g Reactivo	RENDIMIENTO (%21 : %22)
				mmol S	
12a	cloroformo	60	1	2,5	50:23
12b	cloroformo	20	24	2,0	12:42
12c	diclorometano	40	24	2,0	48:25
12d	acetona	20	72	2,5	0:<1

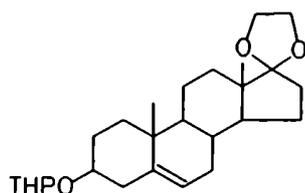
Los porcentajes del 17-cicloacetal **24** fueron, en todos los casos, menores al 5%.

Estos datos experimentales, si bien confirman la presunción inicial de la mayor labilidad del cicloacetal en C-17 comparado con el cicloacetal en C-3 (contrariamente a lo observado en reacciones de desprotección de acetales en fase homogénea [Loewenthal, 1959]), indican que la diferencia de reactividad entre estos grupos frente al reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ no es grande y, por lo tanto, no permite ningún tipo de selectividad de utilidad sintética.

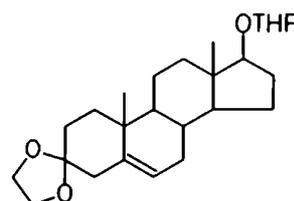
Por otra parte, la aparente diferencia de estabilidad de acetales y tetrahidropiranyléteres en presencia del reactivo, sugerida por la confrontación de los casos 2, 3 y 6 de la tabla

18, estaría indicando la posibilidad de establecer condiciones de reacción quimioselectivas.

Para ello, fue necesaria la preparación previa de sustratos portadores de ambos grupos protectores cicloetilénacetal y tetrahidropiranyléter. Se encaró entonces la preparación de los compuestos 132 y 133.

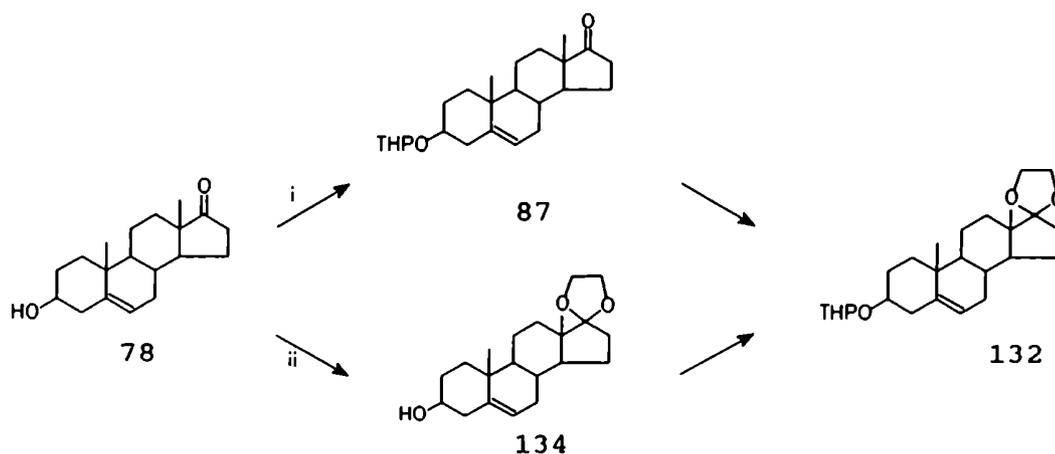


132



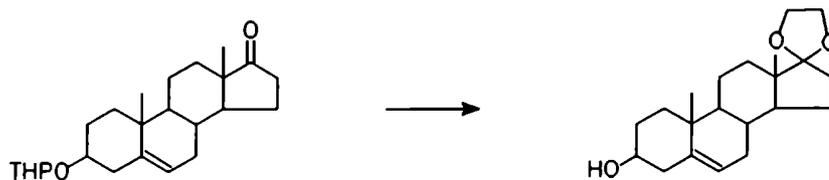
133

La obtención del compuesto 132 no fue sencilla. Un primer análisis del problema indica que existen dos caminos alternativos, en principio equivalentes, hacia el compuesto en cuestión que deben partir necesariamente del esteroide comercial 3 β -hidroxi-androst-5-en-17-ona (78) : i) formación, en primera instancia, del compuesto 87 seguida de la acetalización de la función 17-ceto ó ii) preparación, en primer lugar, de 134 seguida de la protección del grupo 3 β -hidroxi:



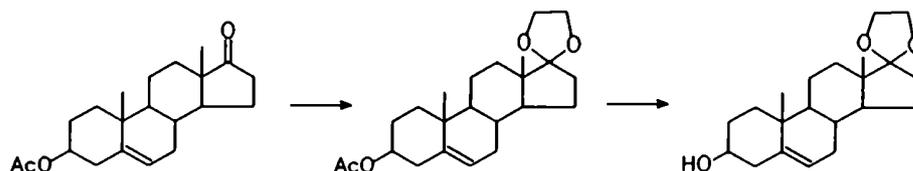
Una inspección rápida de la ruta i sugería la posibilidad de que en el segundo paso de la misma ocurriera la remoción del

grupo tetrahidropiraniilo de **87** simultáneamente con la protección de la función 17-ceto, ya que un exceso de un alcohol en medio ácido favorece el intercambio del grupo tetrahidropiraniilo entre los alcoholes presentes en la reacción, hacia el alcohol más abundante [Miyashita, 1977].



De todas maneras, se intentó la transformación de **87** en **132** debido a que en ese momento se contaba con el compuesto **87**, preparado con anterioridad, y no se disponía del sustrato comercial. Pero, tal cual lo especulado, la reacción de **87** con etilénglicol en ortoformiato de etilo a 40 °C en presencia de TsOH rindió **134** con 83% de rendimiento.

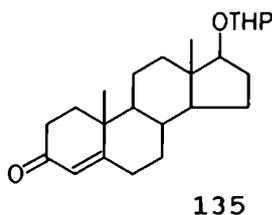
Los esfuerzos debieron dirigirse, entonces, a la segunda ruta. Sin embargo el compuesto intermediario **134** tuvo que prepararse de manera indirecta, por el motivo ya apuntado, a partir del esteroide comercial 3β-acetoxi-androst-5-en-17-ona (**124**), siguiendo el camino que se esquematiza a continuación:



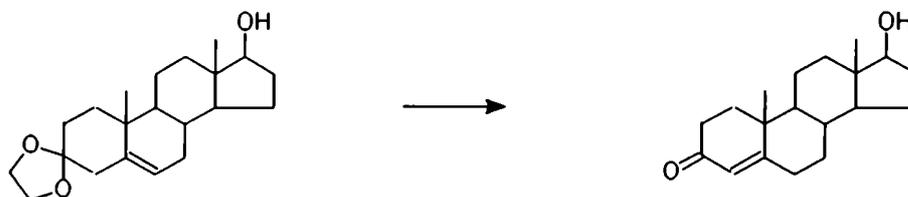
El compuesto **125** se preparó por el método de Nitta con rendimiento aceptable (77%). El tratamiento posterior de **125** con hidruro de aluminio y litio, en tetrahidrofurano a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno, implicó la ruptura reductiva del grupo acetato con la consiguiente liberación de la

función 3 β -hidroxi con alto rendimiento (80%), y la formación de una pequeña cantidad de **78** según se observó por ccd. El compuesto **134**, así preparado, tratado ahora con dihidropirano en las condiciones habituales condujo al compuesto buscado con 77% de rendimiento. Por lo tanto, el rendimiento global en la preparación de **132** fue de 47%.

La preparación de **133**, si bien más directa y sencilla que la anterior, brindó una nueva sorpresa. En efecto, la reacción de 3-Cicloetilénacetal-androst-5-en-17 β -ol (**25**) con dihidropirano en diclorometano a temperatura ambiente y empleando p-toluen-sulfonato de piridonio (PPTS) como catalizador condujo al compuesto **133** buscado (38% de rendimiento) e inesperadamente a 17 β -Tetrahidropiranyl-androst-4-en-3-ona (**135**) (31% de rendimiento) por desacetilización del sustrato.

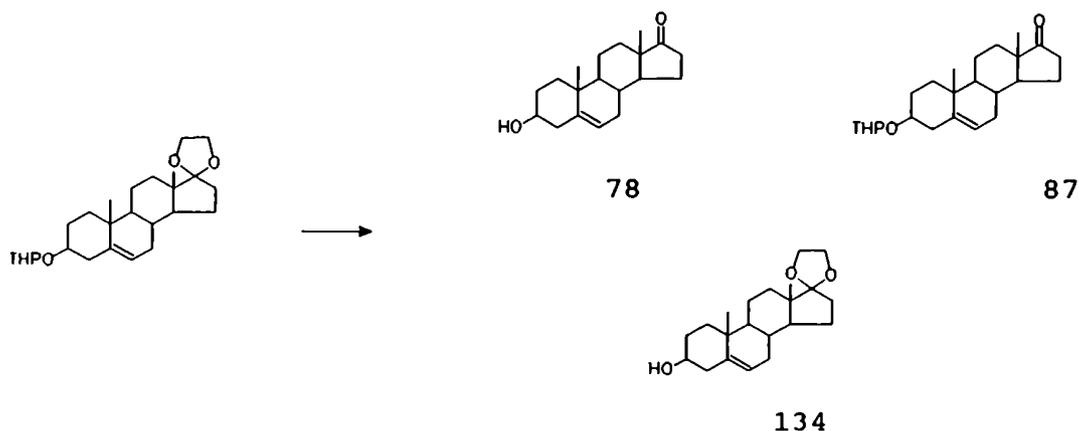


La formación de este último compuesto es un indicio de la labilidad del acetal protector frente al ácido débil PPTS empleado en cantidades catalíticas; hecho que se puso de manifiesto, nuevamente, cuando la transformación indicada más adelante se concretó con 87% de rendimiento luego de 72 horas de agitación del acetal en diclorometano a temperatura ambiente, con cantidades catalíticas de PPTS (sin embargo, la reacción no llega a completarse).



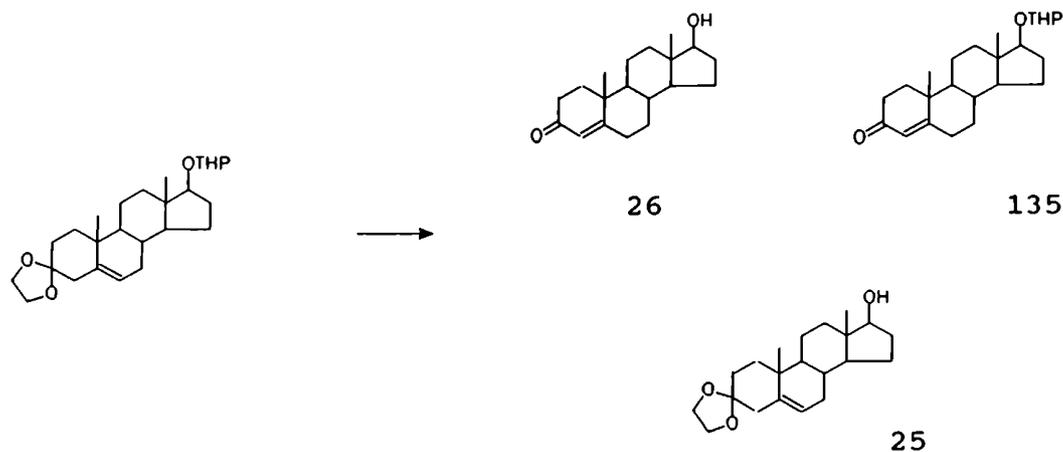
La inestabilidad de los cicloacetales indicados en las condiciones descritas es inusual. La revisión de la literatura revela la existencia de un método de desacetilización, en el cual la agitación de 1,3-dioxolanos en acetona acuosa a reflujo durante 1-3 horas, en presencia de PPTS, rinde las cetonas correspondientes con rendimientos de 90-95 % [Sterzycki, 1979]. Sin embargo, las condiciones del método de Sterzycki son más enérgicas que las de las reacciones en discusión ya que la temperatura es significativamente mayor y la mezcla de solventes induce, evidentemente, la transacetilización de los 1,3-dioxolanos.

En posesión de los sustratos adecuados **132** y **133** el paso siguiente fue la prueba de su reactividad frente al reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$. Los resultados del caso 12, visto anteriormente, aconsejaban la necesidad de emplear condiciones suaves de reacción en pos de lograr quimioselectividad. No obstante ello, los intentos de remoción quimioselectiva de un cicloacetal en presencia de un tetrahidropiranyléter, o viceversa, tampoco dieron resultados satisfactorios. Los compuestos **132** y **133** en presencia del reactivo (3,0 g/mmol de sustrato), condujeron, en todos los casos, a una mezcla de tres productos, según se indica en el esquema:



CASO	SOLVENTE	T(°C)	t(h)	RENDIMIENTO (%78 :%87 :%134)
13a	cloroformo	20	40	51:30: 6
13b	benceno	20	40	17: 2:59

(porcentajes de sustrato sin reaccionar; a:<1; b:13)



CASO	SOLVENTE	T(°C)	t(h)	RENDIMIENTO (%26 :%135 :%25)
14a	cloroformo	20	16	57: 4:10
14b	benceno	20	16	2: 4:19

(porcentajes de sustrato sin reaccionar; a: <1; b: 40)

Estos resultados desalentaron la continuidad de las investigaciones sobre las propiedades del reactivo como promotor de diversas reacciones de desprotección. Sin embargo, la escasez de datos experimentales no es óbice para efectuar algunas consideraciones particulares sobre los últimos casos presentados.

De los resultados surge con claridad que la diferencia de reactividad entre un enlace tetrahidropiranílico y un grupo acetal frente al $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ no es grande, afirmación que está de acuerdo con lo observado por otros autores en el caso de la reacción de esos mismos grupos protectores frente al reactivo $\text{FeCl}_3\text{-SiO}_2$ [Kim, 1986]. Por otra parte, los porcentajes de

conversión son, evidentemente, mayores en cloroformo que en benceno en ambos casos; aunque en este último solvente el grupo cicloacetal pareciera ser más resistente que el enlace tetrahidropiranílico, independientemente de la posición que ocupan ambos grupos en el anillo esteroidal. Por lo tanto, el caso 13b es el único de los casos presentados donde se observa una cierta quimioselectividad que podría derivar, trabajo experimental adicional mediante, en condiciones de reacción de utilidad sintética general.

No obstante los resultados poco convincentes, en cuanto a la regio y quimioselectividad, de los tres últimos casos presentados, el reactivo $\text{CuSO}_4\text{-SiO}_2$ se ofrece como un eficaz promotor de reacciones de desprotección de grupos cicloacetales y tetrahidropiraniléteres en condiciones suaves, neutras y no acuosas; convirtiéndose, de esta manera, en una alternativa más a los numerosos métodos de remoción de acetales existentes en la actualidad.

Respecto al mecanismo de estas reacciones de desacetilización, considerando todos los antecedentes sobre el uso de sales de Cu (II) en este tipo de transformaciones, se puede suponer que el Cu (II) actúa como un ácido de Lewis promoviendo la ruptura hidrolítica de la unión C-O-C de un modo similar a lo planteado para las detioacetilizaciones (ver página 137); si bien no se realizaron experiencias para confirmar estas suposiciones.

Queda planteada la necesidad de extender los alcances del método en discusión mediante, por ejemplo, modificaciones en las propiedades físicas del reactivo (composición, tipo de soporte, etc.), pruebas de su reactividad frente a otros grupos protectores como ser t-butildimetilsilil y tritil éteres, acetales y tetrahidropiraniléteres más complejos etc.

CAPITULO IV

INTRODUCCION

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C es actualmente el método, basado en desplazamientos químicos, más adecuado para el análisis estructural de compuestos orgánicos. A esto ha contribuido el gran número de correlaciones entre desplazamientos químicos de ^{13}C y estructuras, conjuntamente con la muy buena resolución espectral del núcleo de ^{13}C , originada en el valor alto que presenta el cociente entre ancho espectral y ancho de línea a media altura ($\Delta:\Delta\nu_{1/2}$) (diez veces mayor que el del núcleo de ^1H para el mismo campo magnético). Más aún, los desplazamientos químicos de ^{13}C proporcionan información más directa referida al esqueleto de átomos de carbono que la obtenida de desplazamientos protónicos. Por otra parte, los espectros de RMN de ^{13}C son, a menudo, más fácilmente asignables que los correspondientes espectros protónicos debido a la simplificación del espectro causada no sólo por el desacople de banda ancha o fuera de resonancia, sino también por la baja abundancia natural de ^{13}C , lo cual asegura que los acoplamientos homonucleares ^{13}C - ^{13}C se pierden en el ruido.

Es sabido que el valor del desplazamiento químico obtenido por RMN de ^{13}C para un átomo de carbono dado, refleja el entorno estérico y electrónico del mismo. Dentro de una familia de compuestos, un sustituyente determinado produce efectos similares en el carbono al cual está unido y en aquellos carbonos cercanos al sitio de sustitución. Estos efectos se atenúan rápidamente a medida que aumenta la distancia al sitio de sustitución y, por ello, los efectos más importantes son los que sufre el carbono que lleva el sustituyente y sus vecinos inmediatos, es decir los efectos α , β , γ y δ .

Estos efectos son aproximadamente aditivos, excepto en los casos donde existen interacciones entre los sustituyentes, y se han publicado tablas con efectos de sustituyentes que permiten derivar desplazamientos químicos en alcanos, cicloalcanos, alquenos y diversos compuestos aromáticos [Breitmaier, 1987]. En este contexto la asignación de espectros de RMN ^{13}C se ve facilitada por la comparación con compuestos estrechamente relacionados.

A lo largo del presente trabajo se sintetizaron diversos androstanos variadamente sustituidos, la mayoría de los cuales no contaban con antecedentes espectrales de RMN de ^{13}C . Como un aporte a la recopilación de datos necesarios para la elucidación estructural de compuestos relacionados se registraron los espectros correspondientes, y se intentó su asignación completa.

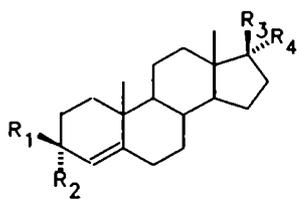
Todos los espectros presentados en este capítulo se realizaron en el mismo solvente (cloroformo- d_1) para evitar las incongruencias que surgen de comparar señales de espectros realizados en diferentes solventes. Esto es así por el desplazamiento de las señales de ^{13}C inducido por solvente. Por ejemplo, para la señal de ^{13}C del cloroformo se observan desplazamientos hacia campos bajos de más de 4 ppm, yendo de solventes no polares como ciclohexano o tetracloruro de carbono a medios susceptibles de formar enlaces de hidrógeno como piridina o hexametilfosforamida. Debe recordarse, también, que la resonancia de ^{13}C del TMS, utilizado como referencia interna, sufre desplazamiento por solventes del orden de -1,5 a +1,5 ppm en los solventes comunes de RMN, incluso a dilución infinita.

Por otra parte, teniendo en cuenta que los desplazamientos por dilución de las señales de ^{13}C pueden alcanzar una magnitud de varias ppm, los espectros presentados se efectuaron a concentración aproximadamente constante (60-90 mg por 0,4 ml de solvente). Por este motivo, y dado que no se trabajó a temperatura constante, carece de sentido expresar los datos de desplazamiento químico con precisión mayor de 0,1 ppm.

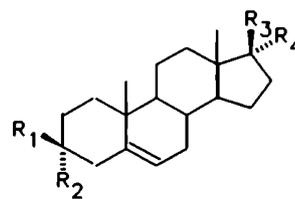
RESULTADOS

Las estructuras de los compuestos estudiados se muestran en la figura 27. Todos ellos, excepto los androstanos comerciales, fueron preparados según se describió en los capítulos I y III. Los valores de desplazamiento químico de los compuestos analizados se presenta en la tabla 19. La asignación de las señales se efectuó por comparación con datos de literatura ([Blunt, 1977] y [Breitmaier, 1987]) junto con el uso de diversas técnicas espectroscópicas, desacople por irradiación selectiva (SFD), ecos de espin con desacople alternado (APT) y desacople

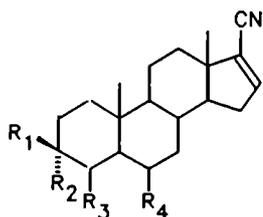
retardado de pulso único (SPDD).



A



B



C

Espectro	Compuesto	Estructura base	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	21	A	O		O	
2	26	A	O		OH	H
3	27	A	SCH ₂ CH ₂ S		O	
4	38	A	SCH ₂ CH ₂ S		OH	H
5	55	A	O		CN	H
6	68	A	SCH ₂ CH ₂ S		CN	H
7	50	A	O		CN	OH
8	49	A	SCH ₂ CH ₂ S		OH	CN
9	43	A	O		H	Cl
10	39	A	SCH ₂ CH ₂ S		H	Cl
11	40	A	SCH ₂ CH ₂ S		H	Br

Espectro	Compuesto	Estructura base	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
12	42	A	SCH ₂ CH ₂ S		OMs	H
13	51	C	O		Δ ⁴	
14	52	C	SCH ₂ CH ₂ S		Δ ⁴	
15	78	B	OH	H	O	
16	25	B	OCH ₂ CH ₂ O		OH	H
17	57	B	OCH ₂ CH ₂ O		CN	H
18	48	B	OCH ₂ CH ₂ O		OH	CN
19	22	B	OCH ₂ CH ₂ O		O	
20	23	B	OCH ₂ CH ₂ O		OCH ₂ CH ₂ O	
21	57	C	OCH ₂ CH ₂ O		Δ ⁵	
22	88	B	ΣO	H	O	
23	80	B	ΣO	H	OH	CN
24	82	B	ΣO	H	CN	H
25	81	C	ΣO	H	Δ ⁵	
26	87	B	THPO	H	O	
27	89	B	THPO	H	CN	OH
28	132	B	THPO	H	OCH ₂ CH ₂ O	
29	41	B	OCH ₂ CH ₂ O		OMs	H
30	122	A	SCH ₂ CH ₂ S		OCH ₂ CH ₂ O	
31	124	B	AcO	H	O	
32	125	B	AcO	H	OCH ₂ CH ₂ O	
33	134	B	OH	H	OCH ₂ CH ₂ O	
34	106	A	SCH ₂ CH ₂ S		SCH ₂ CH ₂ S	
35	117	A	O		SCH ₂ CH ₂ S	
36	108	B	AcO	H	SCH ₂ CH ₂ S	
37	109	B	OH	H	SCH ₂ CH ₂ S	

Figura 27: Estructura de los compuestos estudiados por RMN ¹³C.

TABLA 19							
Carbono	Espectro						
	1	2	3	4	5	6	7
1	35,5	35,6	36,6	36,5 ^a	35,6	36,5	35,6
2	33,7	33,8	39,5 [*]	39,5 ^b	33,8	39,5 ^a	33,8
3	198,9	199,4	65,5	65,7	198,7	65,5	199,7
4	123,9	123,6	124,6	124,0	123,8	124,4	123,7
5	170,1	171,0	145,5	146,2	170,0	145,4	171,0
6	32,3	32,7	31,7	32,2 ^c	32,5	32,5 ^b	32,7
7	31,1	31,5	31,4	32,0 ^c	31,7	31,8 ^b	31,9
8	34,9	35,0	35,3	35,8	35,8	36,1	35,9
9	53,6	53,9	54,1	54,2	53,3	53,8	53,1
10	38,4	38,6	39,9 [*]	39,9 ^b	38,4	39,9 ^a	38,5
11	20,1	20,6	20,5	20,9	20,6	20,9	20,4
12	30,5	36,4	31,4	36,6 ^a	36,6	36,9	29,3
13	47,3	42,7	47,6	42,8	44,0	44,2	49,0
14	50,6	50,4	50,9	50,5	53,6	53,8	47,6
15	21,5	23,2	21,7	23,3	24,4	24,5	23,9
16	35,5	30,1	35,7	30,4	26,4	26,5	38,1
17	220,0	81,0	220,5	81,6	40,0	40,1	77,6
18	13,5	11,0	13,7	11,1	14,2	14,3	16,3
19	17,2	17,3	18,5	18,6	17,3	18,5	17,4
20	-	-	-	-	120,7	120,9	120,8
-SCH ₂	-	-	37,2	37,3	-	-	-
	-	-	37,9	38,0	-	-	-

TABLA 19 (continuación)						
Carbono	Espectro					
	8	9	10	11	12	13
1	36,5	35,7	36,6	36,5	36,2 ^a	35,3
2	39,5 ^a	33,9	39,5 [*]	39,5 [*]	39,5 ^b	33,7
3	65,5	198,9	65,7	65,6	65,6	198,6
4	124,4	123,7	124,2	124,1	124,3	123,7
5	145,4	170,5	145,8	145,7	145,6	169,9
6	32,0 ^b	32,7	32,9	32,7	32,0 ^c	32,4
7	31,8 ^b	32,1	32,0	31,9	31,8 ^c	31,4
8	36,1	36,0	36,2	36,2	35,5	33,7
9	53,3	53,2	53,6	53,4	53,9	53,6
10	40,0 ^a	38,5	39,9 [*]	39,9 [*]	39,9 ^b	38,5
11	20,8	20,8	21,1	21,3	20,6	20,5
12	33,2	34,1	34,2	34,8	36,5 ^a	32,6
13	47,0	45,9	46,1	45,8	42,9	47,8
14	50,2	47,8	47,9	48,0	49,6	55,0
15	23,1	24,5	24,6	24,6	23,3	33,8
16	37,0	33,4	33,6	35,9	27,9	147,1
17	80,6	70,6	70,9	65,7	89,4	126,7
18	12,2	17,9	18,0	17,4	11,7	16,2
19	18,5	17,4	18,7	18,6	18,5	17,0
20	122,0	-	-	-	-	115,3
-SCH ₂	37,2	-	37,3	37,2	37,2	-
	37,9	-	38,0	37,9	37,9	-
CH ₃ SO ₃	-	-	-	-	38,1	-

TABLA 19 (continuación)						
Carbono	Espectro					
	14	15	16	17	18	19
1	36,6	37,8	36,2	36,3	36,2	36,2
2	39,4 ^a	32,1	31,0	31,0	30,9	31,0
3	65,4	71,3	109,2	109,1	109,2	109,1
4	124,5	42,9	41,7	41,7	41,6	41,7
5	145,2	142,4	140,0	140,1	139,8	140,2
6	32,2 ^b	120,7	121,6	121,3	121,3	121,2
7	31,7 ^b	32,1	31,3	31,5	31,1	31,4
8	34,1	32,1	31,9	32,2	32,3	31,4
9	54,2	51,1	49,7	49,3	48,9	49,8
10	39,9 ^a	37,2	36,5	36,9	36,5	36,7
11	20,8	20,9	20,6	20,7	20,6	20,3
12	32,7	31,2	36,2	36,6	33,2	30,6
13	48,0	47,5	42,6	44,1	46,8	47,4
14	55,3	52,2	51,2	54,5	50,8	51,7
15	33,8	22,2	23,4	24,6	23,3	21,8
16	147,0	35,7	30,3	26,5	37,1	35,7
17	127,1	219,0	81,5	40,1	80,6	220,5
18	16,2	13,5	11,0	14,1	12,1	13,5
19	18,3	19,5	18,9	18,9	18,9	18,9
20	115,5	-	-	121,1	122,0	-
-OCH ₂	-	-	64,1	64,1	64,1	64,1
	-	-	64,2	64,3	64,3	64,3
-SCH ₂	37,0	-	-	-	-	-
	37,8	-	-	-	-	-

TABLA 19 (continuación)						
Carbono	Espectro					
	20	21	22	23	24	25
1	36,2	36,1	37,4	37,4*	37,5	37,3
2	31,0	30,9	30,9	31,4	31,9	31,5
3	109,1	109,0	72,5	72,5	72,4	72,4
4	41,7	41,7	42,9	42,8	42,8	42,9
5	139,9	140,4	141,7	141,5	141,7	142,0
6	121,6	121,0	120,3	120,4	120,4	120,2
7	31,1	31,1	32,1	32,1	32,1	32,1
8	32,2	30,3	31,6	32,5	32,4	30,6
9	49,4	49,8	50,4	49,6	50,0	50,6
10	36,6	36,7	36,8	36,6	37,1	36,9
11	20,4	20,5	20,4	20,7	20,8	20,7
12	30,5	32,9	31,6	33,3	36,0	33,0
13	45,6	47,9	47,6	47,0	44,3	48,2
14	50,4	55,8	51,9	51,0	54,7	56,1
15	22,7	33,9	22,0	23,4	24,8	34,1
16	34,1	147,1	35,9	38,3*	26,7	147,2
17	119,2	127,1	220,9	80,9	40,3	127,5
18	14,1	16,1	13,6	12,2	14,2	16,2
19	18,8	18,7	19,5	19,6	19,5	19,4
20	-	115,5	-	122,1	121,0	115,8
Me ₃ CSi	-	-	25,9	26,0	26,0	26,0
Me ₃ CSi	-	-	18,3	18,4	18,3	18,2
-OCH ₂	64,0	64,1	-	-	-	-
	64,2	64,3				
	64,4					
	64,9					

TABLA 19 (continuación)						
Carbono	Espectro					
	26	27	28	29	30	31
1	36,8	36,8	36,7	36,2	36,5	36,9
2	31,2	31,2	31,2	30,9	39,5*	27,7
3	75,7	75,9	75,8	109,1	65,7	73,6
4	40,1	40,1	40,2	41,7	124,0	38,1
5	140,9	140,8	140,8	140,0	146,1	139,9
6	120,5	121,0	121,0	121,3	32,0	121,8
7	30,7	32,0	31,2	31,1	32,0	31,5
8	31,4	32,4	32,1	31,7	36,0	31,5
9	50,2	49,7	50,0	49,4	53,9	50,1
10	37,3	37,4	37,4	36,5	39,9*	36,7
11	20,3	20,5	20,4	20,3	20,7	20,4
12	31,2	29,7	30,5	36,2	30,5	30,8
13	47,3	49,2	45,6	42,7	45,8	47,4
14	51,7	48,4	50,5	50,2	49,8	51,6
15	21,8	24,2	22,7	23,3	22,6	21,9
16	35,6	38,2	34,1	27,8	34,0	35,8
17	220,2	77,8	119,3	89,5	119,0	220,6
18	13,5	16,3	14,1	11,6	14,3	13,5
19	19,3	19,5	19,3	18,9	18,6	19,4
20	-	121,0	-	-	-	-
C-2'	96,2	96,3	96,7	-	-	-
	96,7	96,8	94,4	-	-	-
C-6'	62,5	62,5	62,7	-	-	-
-OCH ₂	-	-	64,4	64,1	64,4	-
	-	-	65,0	64,3	65,0	-
-SCH ₂	-	-	-	-	37,3	-
	-	-	-	-	38,0	-
SO ₃ CH ₃	-	-	-	38,0	-	-
CH ₃ COO-	-	-	-	-	-	21,4
CH ₃ COO-	-	-	-	-	-	170,2

TABLA 19 (continuación)						
Carbono	Espectro					
	32	33	34	35	36	37
1	36,9	37,2	36,5	35,6	36,9	37,2
2	27,7	31,6	39,9*	33,9	27,7	31,5
3	73,8	71,5	65,6	199,1	73,8	71,5
4	38,0	42,2	124,1	123,7	38,0	42,1
5	139,4	140,6	145,9	170,7	139,5	140,6
6	122,2	121,2	31,9	32,7	122,1	121,1
7	31,2	31,2	31,9	31,8	31,5	31,5
8	32,1	32,1	37,1	37,0	33,2	33,2
9	50,4	49,9	53,5	53,2	49,5	49,6
10	36,5	36,5	39,2*	38,5	36,6	36,5
11	20,4	20,9	20,9	20,7	20,7	20,8
12	30,5	30,5	32,3	31,6	31,9	31,9
13	45,6	45,7	48,9	48,8	48,8	48,8
14	49,8	50,5	51,8	51,8	52,6	52,6
15	22,7	22,7	23,8	23,8	24,0	24,0
16	34,1	34,1	42,7	42,7	42,8	42,8
17	119,2	119,3	80,2	80,1	80,3	80,3
18	14,1	14,2	17,2	17,2	17,1	17,1
19	19,3	19,4	18,6	17,4	19,3	19,4
SCH ₂ (3)	-	-	37,2	-	-	-
	-	-	37,9	-	-	-
SCH ₂ (17)	-	-	39,5	39,2	39,2	39,2
	-	-	-	39,6	39,5	39,5
-OCH ₂	64,4	64,4	-	-	-	-
	65,0	65,0	-	-	-	-
CH ₃ COO	21,3	-	-	-	21,4	-
CH ₃ COO	170,2	-	-	-	170,2	-

Las señales indicadas con a, b, c ó * como superíndices pueden ser intercambiadas.

DISCUSION

La correlación de los datos obtenidos permitió analizar el efecto producido por cambios configuracionales y funcionales en C-17, como ser mesilación del hidroxilo 17 β , conversión de la funcionalidad 17-oxo en un dioxolano o un ditiolano, sustitución en 17 β -ciano derivados del H 17 α por un hidroxilo con inversión de la configuración de C-17, inversión de la configuración de cianhidrinas en C-17; y el efecto producido por la introducción de un doble enlace 16(17) en derivados 17 β -ciano.

El análisis de los efectos mencionados se llevó a cabo comparando las resonancias de los siguientes pares de compuestos:

Efecto de la mesilación del hidroxilo 17 β .

- a. 3-cicloetilénditio-17 β -mesil-androst-4-eno y 3-cicloetilénditio-androst-4-en-17 β -ol (espectro 12 - espectro 4).
- b. 3-cicloetiléndioxi-17 β -mesil-androst-5-eno y 3-cicloetiléndioxi-androst-5-en-17 β -ol (espectro 29 - espectro 16).

Efecto de la acetalización en C-17.

- c. 3,17-bis-cicloetiléndioxi-androst-5-eno y 3-cicloetiléndioxi-androst-5-en-17-ona (espectro 20 - espectro 19).
- d. 3-cicloetilénditio-17-cicloetiléndioxi-androst-4-eno y 3-cicloetilénditio-androst-4-en-17-ona (espectro 30 - espectro 3).
- e. 3 β -acetoxi-17-cicloetiléndioxi-androst-5-eno y 3 β -acetoxi-androst-5-en-17-ona (espectro 32 - espectro 31).
- f. 17-cicloetiléndioxi-androst-5-en-3 β -ol y androst-5-en-3 β -ol-17-ona (espectro 33 - espectro 15).

Efecto de la tioacetalización en C-17.

- g. 3,17-bis-cicloetilénditio-androst-4-eno y 3-cicloetilénditio-androst-4-en-17-ona (espectro 34 - espectro 3).
- h. 17-cicloetilénditio-androst-4-en-3-ona y androst-4-en-3,17-diona (espectro 35 - espectro 1).
- i. 3 β -acetoxi-17-cicloetilénditio-androst-5-eno y 3 β -acetoxi-androst-5-en-17-ona (espectro 36 - espectro 31).
- j. 17-cicloetilénditio-androst-5-en-3 β -ol y androst-5-en-3 β -ol-17-ona (espectro 37 - espectro 15).

Efecto de la sustitución del H 17 α por OH 17 β en 17 β ciano derivados con inversión de la configuración.

- k. 17 α -ciano-17 β -hidroxi-3-cicloetilénditio-androst-4-eno y 17 β -ciano-3-cicloetilénditio-androst-4-eno (espectro 8 - espectro 6).
- l. 17 α -ciano-17 β -hidroxi-3 β -o-(t-butildimetilsilil)-androst-5-eno y 3 β -o-(t-butildimetilsilil)-17 β -ciano-androst-5-eno (espectro 23 - espectro 24).
- m. 17 α -ciano-17 β -hidroxi-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno y 17 β -ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (espectro 18 - espectro 17).

Efecto de la inversión de la configuración de cianhidras en C-17.

- n. 17 β -ciano-17 α -hidroxi-androst-4-en-3-ona y 17 β -ciano-androst-4-en-3-ona (espectro 7 - espectro 5).
- ñ. 17 α -ciano-17 β -hidroxi-3 β -o-(t-butildimetilsilil)-androst-5-eno y 17 β -ciano-17 α -hidroxi-3 β -o-(tetrahidropiranyl)-androst-5-eno (espectro 23 - espectro 27).
- o. (k-n).

Efecto del doble enlace 16(17) en 17 β -ciano-androstanos.

- p. 17-ciano-androst-4,16-dien-3-ona y 17 β -ciano-androst-4-en-3-ona (espectro 13 - espectro 5).
- q. 17-ciano-3-cicloetilénditio-androsta-4,16-dieno y 17 β -ciano-3-cicloetilénditio-androst-4-eno (espectro 14 - espectro 6).
- r. 17-ciano-3-cicloetiléndioxi-androsta-5,16-dieno y 17 β -ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (espectro 21 - espectro 17).
- s. 3 β -o-(t-butildimetilsilil)-17-ciano-androsta-5,16-dieno y 3 β -o-(t-butildimetilsilil)-17 β -ciano-androst-5-eno (espectro 25 - espectro 24).

Por otra parte, datos adicionales tomados de literatura permitieron evaluar de manera indirecta el efecto como sustituyente en C-17 del grupo ciano en β y de cloro y bromo en α . La evaluación directa del efecto de un sustituyente X, que se hace calculando la diferencia $Z = \delta_{RX} - \delta_{RH}$, resulta imposible en

este trabajo por carecerse de datos de los androstanos RH relacionados con los androstanos sustituidos RX preparados durante el trabajo de tesis. Pero, si en la expresión de Z se introduce, sumando y restando, un término que corresponde a los desplazamientos químicos de un compuesto de referencia conocido se obtiene lo siguiente:

$$Z = Z_1 + Z_2 \quad \text{donde} \quad Z_1 = \delta_{RX} - \delta_{ROH} \quad \text{y} \quad Z_2 = \delta_{ROH} - \delta_{RH}$$

El término Z_2 se obtiene de literatura [Blunt, 1977] y el término Z_1 se puede evaluar con datos espectroscópicos propios por comparación de las resonancias de los siguientes pares de compuestos.

Sustitución del hidroxilo 17 β por 17 α cloro o 17 α bromo.

- t. 3-cicloetilénditio-17 α -cloro-androst-4-eno y 3-cicloetilénditio-androst-4-en-17 β -ol (espectro 10 - espectro 4).
- u. 17 α -cloro-androst-4-en-3-ona y androst-4-en-17 β -ol-3-ona (espectro 9 - espectro 2).
- v. 3-cicloetilénditio-17 α -bromo-androst-4-eno y 3-cicloetilénditio-androst-4-en-17 β -ol (espectro 11 - espectro 4).

Sustitución de 17 β OH por 17 β CN.

- w. 17 β -ciano-3-cicloetilénditio-androst-4-eno y 3-cicloetilénditio-androst-4-en-17 β -ol (espectro 6 - espectro 4).
- x. 17 β -ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno y 3-cicloetiléndioxi-androst-5-en-17 β -ol (espectro 17 - espectro 16).
- y. 17 β -ciano-androst-4-en-3-ona y androst-4-en-17 β -ol-3-ona (espectro 5 - espectro 2).

Resultados preliminares no presentados indicaron que, dentro de la precisión conseguida, los carbonos C-1 a C-7, C-9, C-10 y C-19 no varían apreciablemente su desplazamiento químico, cualquiera sea el sustituyente en C-17. Este comportamiento es el esperado dada la relación espacial entre los carbonos enumerados y C-17, y la escasa transmisión conformacional existente desde esta posición.

Por esta razón, se presentan en la tabla 20 únicamente los valores obtenidos para los carbonos afectados por las

sustituciones indicadas, es decir los carbonos α , β , γ y δ al sustituyente en cuestión.

En la parte final de la tabla se presentan los valores de Z_2 para hidroxilo 17 β , Z_1 para cloro 17 α (promedio entre t y u) y para ciano 17 β (promedio entre w, x e y) y los valores de Z_{RCN} , Z_{aCl} y Z_{aBr} .

TABLA 20						
Carbono	a	b	c	d	e	f
8	-0,3	-0,2	0,8	0,7	0,6	0,0
11	-0,3	-0,3	0,1	0,2	0,0	0,0
12	-0,4	0,0	-0,1	-0,9	-0,3	-0,7
13	0,1	0,1	-1,8	-1,8	-1,8	-1,8
14	-0,9	-1,0	-1,3	-1,1	-1,8	-1,7
15	0,0	-0,1	0,9	0,9	0,8	0,5
16	-2,5	-2,5	-1,6	-1,7	-1,7	-1,6
17	7,8	8,0	-101,3	-101,5	-101,4	-99,7
18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7

TABLA 20 (continuación)							
Carbono	g	h	i	j	k	l	m
8	1,8	2,1	1,7	1,1	0,0	0,1	0,1
11	0,4	0,6	0,3	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1
12	0,9	1,1	1,1	0,7	-3,7	-2,7	-3,4
13	1,3	1,5	1,4	1,3	2,8	2,7	2,7
14	0,9	1,2	1,0	0,4	-3,6	-3,7	-3,7
15	2,1	2,3	2,1	1,8	-1,4	-1,4	-1,3
16	7,0	7,2	7,0	7,1	10,5	11,6	10,6
17	-140,3	-139,9	-140,3	-138,7	40,5	40,6	40,5
18	3,5	3,7	3,6	3,6	-2,1	-2,0	-2,0
20	-	-	-	-	1,1	1,1	0,9

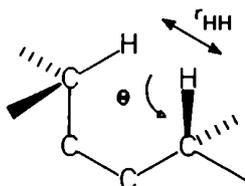
TABLA 20 (continuación)							
Carbono	n	ñ	o	p	q	r	s
8	0,1	0,1	-0,1	-2,0	-2,0	-1,9	-1,8
11	-0,2	0,2	0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1
12	-7,3	3,6	3,6	-4,0	-4,2	-3,7	-3,0
13	5,0	-2,2	-2,2	3,8	3,8	3,8	3,9
14	-6,0	2,6	2,4	1,4	1,5	1,3	1,4
15	-0,5	-0,8	-0,9	9,4	9,3	9,3	9,3
16	11,7	-0,8	-1,2	120,7	120,5	120,6	120,5
17	37,6	3,1	2,9	86,7	87,0	87,0	87,2
18	2,1	-4,1	-4,2	2,0	1,9	2,0	2,0
20	0,1	1,1	1,0	-5,4	-5,3	-5,6	-5,2

TABLA 20 (continuación)						
Carbono	t	u	v	w	x	y
8	0,4	1,0	0,4	0,3	0,3	0,8
11	0,2	0,2	0,4	0,0	0,1	0,0
12	-2,4	-2,3	-1,8	0,3	0,4	0,2
13	3,3	3,2	3,0	1,4	1,5	1,3
14	-2,6	-2,6	-2,5	3,3	3,3	3,2
15	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2
16	3,2	3,3	5,5	-3,9	-3,8	-3,7
17	-10,7	-10,4	-15,9	-41,5	-41,4	-41,0
18	6,9	6,9	6,3	3,2	3,1	3,2

TABLA 20 (continuación)

Carbono	Z_2	$Z_1(\text{CN})$	Z_{RCN}	$Z_1(\text{Cl})$	Z_{aCl}	Z_{aBr}
8	-0,2	0,5	0,3	0,7	0,5	0,2
11	-0,4	0,0	-0,4	0,2	-0,2	0,0
12	-2,1	0,3	-1,8	-2,4	-4,5	-3,9
13	2,3	1,4	3,7	3,3	5,3	5,3
14	-3,4	3,3	-0,1	-2,6	-6,0	-5,9
15	-2,1	1,2	-0,9	1,3	-0,8	-0,8
16	10,1	-3,8	6,3	3,3	13,4	15,6
17	41,6	-41,3	0,3	-10,6	31,0	25,7
18	-6,4	3,2	-3,2	6,9	0,5	0,1

El efecto de sustituyentes en RMN ^{13}C puede racionalizarse fundamentalmente en términos de efectos inductivos (α y β), efectos de campos eléctricos (β), e interacciones estéricas entre hidrógenos espacialmente cercanos (γ y δ). Esta perturbación estérica de un enlace C-H hace que la carga se desplace hacia el carbono y los orbitales de enlace se expandan originando un efecto de protección ya que el término paramagnético de la constante de apantallamiento es inversamente proporcional al cubo de la distancia entre un electrón 2p y el núcleo. Por su parte Grant desarrolló un modelo donde el desplazamiento estérico δ_{St} depende de la fuerza repulsiva protón-protón F_{HH} la cual es función de la distancia protón-protón (r_{HH}) y también del ángulo θ entre el eje H-H y el enlace C-H perturbado [Grant, 1967].



$$\delta_{\text{St}} = \text{const} \cdot F_{\text{HH}} (r_{\text{HH}}) \cos\theta$$

Esta ecuación muestra que el signo de δ_{st} puede cambiar con el valor del ángulo θ . En conclusión, las interacciones estéricas no deben asociarse únicamente con desplazamientos hacia campos altos.

Deben tenerse en cuenta también las distorsiones conformacionales provocadas por la introducción de un sustituyente, especialmente en sistemas tales como los anillos de cinco miembros que poseen poca rigidez conformacional.

Se encuentra fuera de los alcances de este trabajo de tesis encontrar una justificación rigurosa de los efectos observados. No obstante resultan válidos los siguientes comentarios.

Efecto de la mesilación del hidroxilo 17 β .

El efecto del desplazamiento por mesilación es similar al efecto producido por acetilación, en el sentido que acentúa la desprotección sobre la posición α y disminuye la desprotección sobre posiciones β , aunque el efecto sobre C-13 es despreciable, y δ . Sin embargo, la magnitud del efecto α producido por mesilación en C-17 es mayor que el de acetilación en, aproximadamente, 7 ppm. El efecto sobre posiciones β se debe, presumiblemente, al efecto γ gauche del grupo sulfonilo que afectaría únicamente a C-16 ya que C-13 es un carbono cuaternario.

Otra similitud con la acetilación del hidroxilo 17 β se encuentra en el efecto producido sobre posiciones γ y dado que C-18 se desprotege, C-14 se protege y C-15 y C-12 no se ven afectados.

Efecto de la acetalización en C-17.

Este efecto es fuertemente protector en la posición α (100 ppm aproximadamente) debido al cambio de hidridización del carbonilo sp^2 al dialcoxicarbono sp^3 . La concomitante disminución en la electronegatividad de C-17 explicaría la protección sufrida por los carbonos β del orden 1,6-1,8 ppm. Pero no es clara la razón por la cual el efecto γ sobre C-18 y C-15 es de desprotección (0,6-0,9 ppm) y de protección sobre C-14 (1,5 ppm) y C-12 (0,5 ppm). El efecto δ en C-11 es despreciable y desprotector en C-8 (0,7 ppm).

Efecto de la tioacetalización en C-17.

La señal del carbono α se ve notablemente desplazada hacia campos altos (140 ppm aproximadamente) por idénticas razones que en la sección anterior. La protección adicional sufrida por el carbono tioacetálico respecto al carbono acetálico se puede explicar por la menor electronegatividad y por el mayor número de electrones de los átomos de azufre comparado con el oxígeno, los que son responsables del incremento en la protección diamagnética (efecto del átomo pesado).

Contrariamente a lo observado en la sección precedente los carbonos β se desprotegen en 7,1 y 1,4 ppm de promedio para C-16 y C-13 respectivamente. Este efecto es similar al encontrado en tioacetales formados en el anillo A del ciclo esteroideal; en la tabla 19 compárese, por ejemplo, las señales correspondientes a C-2 en los pares de espectros 3-1, 6-5, 7-8 y 9-10. Evidentemente la menor electronegatividad del carbono tioacetálico comparado con el carbono carbonílico es largamente compensada por un factor contrapuesto cuyo origen se desconoce.

El efecto sobre las posiciones γ es de desprotección en todas las posiciones 3,6; 2,1; 0,9 y 1,0 ppm para C-18, C-15, C-14 y C-12 respectivamente. El comportamiento disímil de los carbonos γ de tioacetales y acetales en C-17 podría atribuirse a diferentes grados de la distorsión conformacional imbricada en la transformación del carbono carbonílico C-17 en un carbono sp^3 de tipo spiro. Esta idea podría desarrollarse en mayor profundidad analizando comparativamente las conformaciones de mínima energía obtenidas por cálculos de mecánica molecular para los compuestos carbonílicos, acetálicos y tioacetálicos.

El efecto δ , de igual modo que lo observado en la acetalización, es de desprotección y más intenso en C-8 (1,7 ppm) que en C-11 (0,4 ppm).

Efecto de la sustitución del H 17 α por OH 17 β en 17 β ciano derivados con inversión de la configuración, e influencia de la inversión de la configuración de cianhidrinas en C-17.

Para una serie de androstanos variadamente sustituidos Djerassi y colaboradores encontraron que el desplazamiento

inducido por un hidroxilo en el carbono α puede relacionarse con el número n de carbonos γ *gauche* y con el número p de interacciones δ *syn*-diaxiales entre el grupo hidroxilo y un átomo de hidrógeno unido a un C- δ (interacciones "skew pentane") de acuerdo a la ecuación Δ_{α} (ppm) = 45,0 + 3,5p - 3,5n. Los desplazamientos predichos por esta ecuación difieren en aproximadamente 2 ppm de los valores experimentales [Eggert, 1976].

Para facilitar la discusión subsiguiente, que se basará en el trabajo mencionado, se presentan en la tabla 21 los valores de los ángulos dihedros C_{γ} -O de las cianhidrinas epímeras en C-17, obtenidos a partir de las conformaciones de mínima energía.

TABLA 21		
Angulo dihedro	Cianhidrina	
	17 β -OH-17 α -CN	17 α -OH-17 β -CN
OC ₁₇ C ₁₃ C ₁₈	39	162
OC ₁₇ C ₁₃ C ₁₄	159	78
OC ₁₇ C ₁₃ C ₁₂	86	37
OC ₁₇ C ₁₆ C ₁₅	139	100

Puede observarse que para los epímeros 17 β -hidroxi existen dos carbonos γ en relación más cercana a *gauche* que a *trans* con el OH (C-18 y C-12), y tres para los epímeros 17 α -hidroxi (C-14, C-12 y C-15). En ambos epímeros $p=0$, por lo tanto los valores calculados serían $38,0 \pm 2$ ppm y $34,5 \pm 2$ ppm para las cianhidrinas 17 β -OH y 17 α -OH respectivamente. Los valores experimentales del efecto α en las cianhidrinas 17 β -OH y 17 α -OH son 40,5 y 37,6 ppm respectivamente, los que se encuentran ligeramente por encima de los valores teóricos pero responden a la tendencia general de que los hidroxilos axiales protegen más la posición α que los ecuatoriales (véase también los casos x e y de la tabla 20).

En el trabajo citado se proponen, además, ecuaciones del tipo Δ_{β} (ppm) = A - B.q , donde q es el número de interacciones

y *gauche* del hidroxilo con los carbonos γ unidos al carbono β en cuestión, que resumen el efecto β producido por un grupo hidroxilo en los anillos de seis miembros. El efecto β de hidroxilos en el anillo D no sigue cuantitativamente ninguna relación de este tipo pero muestra una tendencia similar. Los efectos β promedio para hidroxilos libres de interacciones estéricas son 12-13 ppm, y en el anillo D este valor también se reduce en proporción al número q . En las cianhidrinas 17 β -hidroxil los valores experimentales para C-13 (2,7 ppm) y para C-16 (10,9 ppm) se corresponden con los valores del parámetro q , 2 y 0 respectivamente. La misma tendencia puede observarse en las cianhidrinas 17 α -hidroxil donde C-16 se desprotege 11,7 ppm y C-13 5 ppm.

Pero, por otro lado, no surge con claridad la razón por la cual el efecto β es más intenso en las cianhidrinas 17 α que en las 17 β (1 ppm para C-16 y 2,2 ppm para C-13). La ecuación anterior sugiere el resultado inverso para C-16 ya que en las primeras $q=0$ y en las segundas $q=1$, e indica para C-13 idéntico desplazamiento para ambos epímeros. No obstante esto, esta relación es similar a la presentada por los epímeros del 17-androstanol, donde el epímero 17 α muestra efectos β más intensos que el 17 β , esto es, 1,1 y 2,2 ppm para C-16 y C-13 respectivamente.

Como era de prever, el efecto γ es de protección en los carbonos C-12, C-14 y C-15 de ambos epímeros y en C-18 del epímero 17 β -hidroxil, y de desprotección (2 ppm) en el carbono C-18 de los epímeros 17 α . Esto último está de acuerdo con los datos de literatura que informan que solamente los carbonos γ *trans* (como C-18 en este caso) cuaternarios o metílicos presentan desplazamientos nulos o hacia campos bajos. De igual modo, la influencia de la configuración en C-17 sobre las magnitudes del efecto γ 3,6; 2,5; -0,9 y -4,2 ppm para C-12, C-14, C-15 y C-18 respectivamente están en el mismo orden que lo encontrado por Djerassi para 17-androstanoles (5,3; 2,4; -1,2 y -6 ppm).

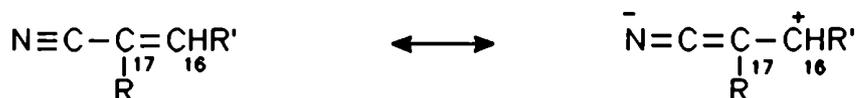
Los efectos δ de grupos hidroxilos son, en general, despreciables excepto cuando existen interacciones δ *syn*-diaxiales OH-CH₃. No es esta la situación en este caso y puede observarse que

el efecto δ es insignificante para ambas configuraciones.

Efecto del doble enlace 16(17) en 17 β -ciano-androstanos.

Para el análisis de este efecto se tomó como base un trabajo de Djerassi y colaboradores quienes examinaron los cambios en las resonancias de los carbonos producidos por la introducción de un doble enlace en diferentes posiciones del anillo esteroidal, 16(17) entre ellas [Eggert, 1981].

La llamativa desprotección presentada por C-16 (120,5 ppm) y C-17 (87,1 ppm) responde al cambio de hidridización de los carbonos en cuestión. La desprotección mayor de C-16 refleja la contribución de la forma canónica polarizada al sistema conjugado.



Esta desigual distribución de la carga en dobles enlaces conjugados también explica las diferencias encontradas con los desplazamientos inducidos por un doble enlace 16(17) en androstanos, C-16 (108,8 ppm) y C-17 (103,6 ppm), y la protección en 5,4 ppm del carbono del grupo ciano.

Los carbonos alílicos C-13 y C-15 sufren desplazamientos hacia campos bajos, 3,8 ppm para C-13 y 9,3 ppm para C-15, valores que se encuentran 1,1 ppm por debajo y 6,6 ppm por arriba respectivamente de los datos para Δ^{16} -androstenos no conjugados. Nuevamente, la polarización del doble enlace C-C da cuenta de esta discrepancia. Los desplazamientos encontrados para los carbonos homoalílicos C-14 (1,4 ppm) y C-12 (-3,8 ppm en promedio) se encuentran dentro del rango informado por literatura para este tipo de carbonos (-6 a +7 ppm).

En los Δ^{16} -androstenos el efecto sobre el metilo homoalílico C-18, ligeramente protector (0,4 ppm), es atribuido a la eliminación de la interacción 1,3-diaxial metilo-18 : hidrógeno-16 β . Este factor no opera esta situación ya que C-18 se

desprotege en 2 ppm. La razón de esta discrepancia podría estar en la distorsión conformacional adicional que presentaría el alqueno conjugado comparado con el aislado.

El efecto observado para los carbonos a tres enlaces de distancia del doble enlace concuerdan con los datos de Djerassi, esto es, despreciable para C-11 y protector para C-8 (1,9 ppm).

Efecto del sustituyente 17 α cloro y 17 α bromo.

La desprotección de la posición α , y la intensidad relativa de este efecto (31,0 ppm para el cloro y 26 ppm aproximadamente para el bromo) se explican en el orden de electronegatividades $\text{Br} < \text{Cl}$. Los desplazamientos observados son comparables a los mostrados por ciclohexano sustituido con un halógeno axial, 33 y 28 ppm para cloro y bromo respectivamente [Breitmaier, 1987].

El efecto β es desprotector y presenta la misma tendencia que el observado con otros sustituyentes polares en C-17, es decir es más intenso en C-16 que en C-13 tanto para cloro como para bromo.

Los valores de los ángulos dihedros formados por los carbonos en γ al halógeno en 17 α son similares a los presentados en la tabla 21 para las cianhidrinas 17 α -hidroxi. Puede observarse que C-14 es el carbono más próximo a una relación γ *gauche* con el sustituyente seguido de C-12 y luego C-15, estando C-18, prácticamente, en relación γ *trans*. El orden en la intensidad de la protección del efecto γ que se podría deducir de esta relación es el que se observa con los datos experimentales C-14 > C-12 > C-15 > C-18 para ambos halógenos (el efecto sobre C-18 es levemente desprotector análogamente a lo observado con 17 α -androstanos). El efecto γ protector de heteroátomos no unidos a hidrógeno se observó también con otros sustituyentes en C-17 como acetatos [Blunt, 1977].

Efecto del sustituyente 17 β ciano.

El efecto α es ligeramente desprotector (0,3 ppm) como el efecto producido por un grupo ciano ecuatorial en ciclohexanos (0,5 ppm). El efecto β de desprotección es, nuevamente, más intenso en C-16 que en C-13. El efecto γ es de protección en todas las posiciones y su intensidad sigue el orden esperado de acuerdo a la cercanía a la relación *gauche* entre el carbono γ y el sustituyente, es decir C-18 > C-12 > C-15 > C-14. Con este se tiene un caso adicional de efectos de protección causados por sustituyentes no unidos a hidrógeno sobre carbonos γ .

EXPERIMENTAL

Generalidades.

Los puntos de fusión (Pf) se determinaron en un aparato de Fisher-Jonhs y no están corregidos.

Las mediciones de poder rotatorio se realizaron en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141, en microceldas de 1 dm de longitud, a temperatura ambiente y utilizando una fuente a 254 nm.

Los espectros de absorción en el infrarrojo se efectuaron con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 710-B, en dispersión en nujol sobre pastillas de cloruro de sodio.

La gran mayoría de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C se realizaron a 100,1 y 25,2 MHz respectivamente, en un espectrómetro Varian XL-100-15, acoplado a una computadora Varian 620/L-100 y a una unidad de discos magnéticos Sykes-7000. Se utilizó cloroformo- d_1 como solvente salvo el caso en que se indica el uso de otro solvente. Los desplazamientos químicos se expresan en todos los casos en la escala δ , en ppm respecto de la resonancia del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz. Las señales se indican en cada caso como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), doble doblete (dd), multiplete (m) o banda ancha (ba). Los espectros de RMN- ^1H se determinaron en tubos de 5 mm de diámetro, aplicando pulsos de 90° con un tiempo de repetición de ca. 4,7 s (tiempo de adquisición de 2.66 s y tiempo de espera entre pulsos de 2,0 s), sobre un ancho espectral de 1500 Hz. Los espectros de NOE diferencia se determinaron con la muestra bajo atmósfera de nitrógeno en tubos de 5 mm de diámetro tapados con septum. Previamente a estas determinaciones, la muestra se desoxigenó mediante el siguiente procedimiento: 1) congelación de la solución a -78° (baño de hielo seco-acetona) 2) evacuación mediante bomba de vacío 3) inyección de nitrógeno seco y desoxigenado 4) repetición del ciclo 1-3 cuatro o cinco veces. Los espectros de RMN- ^{13}C se registraron en tubos de 5 mm, empleando 60-90 mg de muestra (en el caso de los compuestos marcados con ^{13}C se emplearon 2-10 mg de muestra) disuelta en 0,4 ml de solvente, utilizando pulsos de 45° con un tiempo de

repetición de 0,71 s, sobre un ancho espectral de 5700 Hz.

Los espectros de RMN-¹³C totalmente desacoplados de ¹H se obtuvieron por irradiación de los núcleos de ¹H a una frecuencia central correspondiente a 4 ppm, modulada por un barrido de onda cuadrada.

Unos pocos espectros de RMN de ¹H y de ¹³C se realizaron en un espectrómetro Bruker ACE-200.

Los espectros de masa por introducción directa se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masa Varian-MAT CH7-A, comandado por una computadora Varian-MAT Data System 166, con unidades de salida TRC Tektronix 4010 e impresora Tektronix 4631. Los análisis por CG-EM se realizaron por acoplamiento de dicho espectrómetro de masa a un cromatógrafo gas-líquido Varian 1440, utilizando una columna de vidrio (1,8 m x 2 mm) rellena con fase OV-17 (3% o 1%) y utilizando helio como gas portador.

Algunos análisis por CG-EM se realizaron en un espectrómetro de masa Trio-2/2000 VG Masslab acoplado a un cromatógrafo gas-líquido Hewlett-Packard 5890 Series II empleando una columna capilar DB-5 de 15 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno.

Las mediciones de radiactividad se hicieron en un espectrómetro de centelleo líquido RackBeta 1214.

Las cromatografías gaseosas se efectuaron en equipos Hewlett-Packard 5830A (columnas empacadas con fase OV-17 3% y 1%, OV-101 y SE-30), 5840A y 5890 (columnas capilares HP-5 (25 m), HP-101 (25 m) y SP-2330 (15 m)).

Las cromatografías analíticas en capa delgada se realizaron sobre sílica gel como fase fija (Silicagel 60 F₂₅₄, Merck). Como solvente de desarrollo se emplearon mezclas de hexano:acetato de etilo de composición variable. La detección se llevó a cabo pulverizando las placas con una solución de ácido sulfúrico 20% en etanol y posterior calentamiento a 100°.

Las cromatografías "flash" se realizaron según la referencia [Clark Still, 1978] utilizando sílica gel 60 (malla 230-400) y aplicando nitrógeno para acelerar el paso del solvente.

Las cromatografías líquidas de alta resolución se realizaron en un equipo Micromeritics 750 utilizando inyectores manuales Micromeritics 730 o Rheodyne, y un detector de índice de

refracción modelo 771; y en un equipo Knauer 64 con inyector Knauer Rheodyne utilizando un detector UV variable marca LKB, con celda de flujo de $11\mu\text{l}$ de volumen total. Las columnas empleadas fueron AllTech ODS-2 de $10\mu\text{m}$ de tamaño de partícula y 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, y Beckman Ultrasphere ODS-2 de $5\mu\text{m}$ de tamaño de partícula y 250 mm de longitud por 10 mm de diámetro interno.

Los solventes para cromatografía en columna o en capa delgada fueron purificados por destilación fraccionada. Los solventes para CLAR se bidestillaron y filtraron a través de membranas de teflón de $0,45\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Los solventes anhidros se prepararon según las siguientes técnicas:

Acetona: se reflujo sobre carbonato de potasio durante 3 hs, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 3 Å.

Benceno: se reflujo sobre sodio-benzofenona hasta coloración azul y se destiló antes de usar.

Butanona: se empleó la misma técnica que en el caso de la acetona.

Diclorometano: se reflujo sobre pentóxido de fósforo, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å.

Dimetilformamida: se agitó sobre BaO durante 24 hs, se destiló a presión reducida y se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å.

Dimetilsulfóxido: se trató y se guardó con CaH_2 .

Eter etílico: se pasó a través de una columna de alúmina básica y se reflujo sobre sodio-benzofenona hasta coloración azul. Se destiló antes de usar.

iso-Propanol: se reflujo sobre virutas de magnesio durante 5 hs, se destiló y se guardó bajo nitrógeno sobre tamices moleculares de 3 Å.

Metanol: se aplicó la misma técnica que para el iso-propanol.

Tetrahidrofurano: se aplicó la misma técnica que para el éter etílico.

Tolueno: se empleó el mismo procedimiento que en el caso del benceno.

Preparación de reactivos y sustratos.

Sulfato de cobre(II) adsorbido en sílica gel.

El reactivo se preparó por adición de sílica gel 60 (malla 230-400) a una solución acuosa de CuSO_4 (II) y posterior remoción del solvente a presión reducida. El residuo se activó a 250° durante 24 hs previamente a su uso. La relación de sílica gel a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ empleada fue de 3 a 1.

1-Bromo-4-metil-pentano.

En un balón de tres bocas provisto de una ampolla compensadora y un refrigerante se colocaron 17 ml (0,15 moles) de HBr (47%). Mediante la ampolla se agregaron, gota a gota, 4 ml de H_2SO_4 (98%), 15 ml (0,12 moles) de 4-metil-1-pentanol y 3,3 ml adicionales de H_2SO_4 . Se reflujo durante 4 hs hasta la formación de una capa oleosa sobre la superficie de la mezcla reaccionante. Se destiló hasta que las gotas del destilado pasaron limpias. Se separaron las fases formadas y la superior se extrajo con CH_2Cl_2 . Se secó el extracto (MgSO_4) y se evaporó para obtener un residuo que se juntó con la fase inferior. El bromuro crudo así obtenido se lavó con NaHCO_3 (5%) y con agua, se secó (CaCl_2) y se destiló con columna de fraccionamiento recogiendo la fracción de punto de ebullición $146-148^\circ$. Se recuperaron 8 ml (47%) del compuesto puro.

RMN ^1H (ppm): 0,91(6H,d,J=6 Hz,Me-5 y Me-6); 3,40(2H,t,J=6 Hz, CH_2Br).

Bromuro de trifenil-(4-metil)-1-pentil-fosfonio.

A una solución de trifenilfosfina (3,5 g; 13,3 mmol) en 9 ml de benceno anhidro se agregaron 2 ml (14,2 mmol) de 1-bromo-4-metil-pentano. La mezcla de reacción se reflujo durante 30 hs, se dejó enfriar y se filtró el precipitado formado. Este se lavó con varias porciones de éter etílico y se secó en desecador al vacío. Se obtuvieron 4,86 g (80%) de la sal de fosfonio pura.

t-Amilato de potasio.

Una suspensión de KH (20% en aceite) (20 g) se lavó bajo atmósfera de nitrógeno con éter de petróleo (2x40 ml) y

benceno(2x35 ml). Se agregaron luego 50 ml de benceno anhidro y, 13 ml de alcohol t-amílico, previamente destilado sobre sodio, gota a gota sobre la suspensión en agitación. La suspensión formada se guardó en heladera y se empleó como tal. Se valoró aproximadamente con HCl y fenolftaleína determinándose un contenido de 1,3 mmoles de base por gramo de suspensión.

3-β-Hidroxi-androst-5-en-17-ona (78)

A una solución de 530 mg (1,6 mmol) de acetato de androstenolona en 20 ml de metanol anhidro se agregaron 200 mg(8,7 mmol) de sodio metálico. La solución se reflujo durante 16 hs y se volcó luego sobre agua. Se extrajo con diclorometano (3x 30 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua y se secaron sobre MgSO₄. Se evaporó el solvente para obtener 430 mg del producto puro (94%).

IR (cm⁻¹): 3480(O-H); 1710(C=O).

RMN ¹H (ppm): 0,74*(3H,s,Me-19); 0,88*(3H,s,Me-18); 3,40(1H,ba,H-3); 5,24(1H,m,H-6).

RMN ¹³C: ver tabla 19.

EM (m/z, %): 288(M⁺,100); 270(M⁺-H₂O,68).

Androst-4-en-3,17-diona (21)

En un balón de dos bocas provisto de ampolla compensadora y cabezal de destilación se mezclaron 400 mg (1,39 mmol) de **78**, 10 ml de tolueno y 5 ml de ciclohexanona. Esta solución se concentró por destilación luego de lo cual se cambió rápidamente el cabezal de destilación por un refrigerante cerrado en su extremo superior con un globo. Recuperada la ebullición se agregó desde la ampolla compensadora una solución de 410 mg (2 mmol) de isopropóxido de aluminio en 5 ml de tolueno anhidro y se reflujo durante 45 minutos. Una vez enfriada la mezcla de reacción, se lavó con HCl(5%) y luego con agua hasta neutralidad. Se secó y evaporó obteniéndose 350 mg del producto crudo que fue purificado por cromatografía en columna de sílica eluida con hexano:AcOEt (60:40). Se recuperaron 239 mg (60%) de **21** idéntico cromatográfica y espectroscópicamente a una muestra auténtica.

Protección selectiva de la función 3-oxo-4-eno.*3-Cicloetiléndioxi-androst-5-en-17-ona (22)*

Una solución de **21** (460 mg, 1,6 mmol) y TSOH (cc) en 8,5 ml de 2-etil-2-metil-1,3-dioxolano se destiló lentamente con columna de fraccionamiento durante 5 hs recogiendo 5 ml de destilado. La mezcla de reacción se diluyó con benceno y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ (5%) y agua, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó para obtener 480 mg de un aceite. Este se purificó por cromatografía de sílica flash eluída con hexano:AcOEt (85:15) y luego con hexano-AcOEt (75:25) obteniéndose 204 mg (30%) de **23** (ver abajo) y 190 mg (36%) de **22**.

Pf: 194-196° (lit. 197-198 [Dauben, 1954]).

IR (cm⁻¹): 1720(C=O); 1100(C-O-C).

RMN ¹H (ppm): 0,89(3H,s,Me-18); 1,05(3H,s,Me-19); 3,96(4H,m,-OCH₂CH₂O-); 5,38(1H,m,H-6).

RMN ¹³C: ver tabla 19.

EM (m/z, %) : 330(M⁺, 75); 286(M⁺-C₂H₄O, 8); 99(C₂H₇O₂, 63); 55(100).

3,17-Bis-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (23)

Una suspensión de **21** (250 mg; 0,87 mmol) y TSOH (cc) en 4 ml de etilénglicol y 1,5 ml de ortoformiato de etilo se agitó durante 3 hs a 40°. Se agregó luego NaHCO₃ (ss) y se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua y se secaron (MgSO₄). Se evaporó el solvente para obtener 340 mg de un residuo que se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt 80:20. Se recuperaron 230 mg (71%) de **23** puro.

Pf: 153-156°.

IR (cm⁻¹): 1100(C-O-C).

RMN ¹H (ppm): 0,87(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 3,89(4H,m,-OCH₂CH₂O-C-17); 3,96(4H,ba,-OCH₂CH₂O-C-3); 5,36(1H,m,H-6).

RMN ¹³C: ver tabla 19.

EM (m/z, %): 374(M⁺, 23); 330(M⁺-C₂H₄O, 5); 99(C₅H₇O₂, 100).

17-Cicloetiléndioxi-androst-4-en-3-ona (24)

A una solución de **23** (180 mg, 0,48 mmol) en 10 ml de benceno:éter etílico (1:1) se agregaron 0,2 ml (1,6 mmol) de

trifluoruro de boro eterato y se agitó a temperatura ambiente durante 3 hs. Se agregaron luego 10 ml de NaHCO_3 (5%), se lavó con agua hasta neutralidad, se secó (MgSO_4) y se evaporó obteniéndose 140 mg del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica flash eluída con hexano:AcOEt (88:12) recuperándose 80 mg (50%) de **24** puro.

RMN ^1H (ppm): 0,89(3H,s,Me-18); 1,19(3H,s,Me-19); 3,89(4H,m, OCH_2CH_2); 5,73(1H,ba,H-4).

3-Cicloetiléndioxi-androst-5-en-17 β -ol (25)

Una solución de testosterona (1g, 3,47 mmol) en 60 ml de benceno y 10 ml de etilénglicol se reflujoó durante 18 hs aproximadamente hasta completa eliminación del agua (trampa de Dean-Stark). Se agregaron luego 50 mg de TsOH y se prosiguió el reflujo durante 24 hs adicionales. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO_3 (5%) y agua hasta neutralidad, se secó y evaporó para dar 1,15 g del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (70:30), recuperándose 950 mg (82%) de **25** puro.

Pf: 162-164° (lit. 183-184° (MeOH) [Dauben, 1954]).

IR (cm^{-1}): 3350(O-H); 1100(C-O-C).

RMN ^1H (ppm): 0,78(3H,s,Me-18); 1,05(3H,s,Me-19); 3,65(1H,t,H-17); 3,96(4H,ba, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 5,34(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C : ver tabla 19.

EM (m/z, %): 332(M^+ , 20); 99($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$, 100).

3-Cicloetilénditio-androst-4-en-17-ona (27)

Aplicando la técnica descripta para la preparación del compuesto **106** (ver página 218), con cantidades equivalentes de etanoditio y trifluoruro de boro eterato, se obtuvieron 245 mg (97%) de **27**.

Pf: 168-173° (lit. 171-172° [Evans, 1977]).

IR (cm^{-1}): 1730 (C=O).

RMN ^1H (ppm): 0,88(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 3,37(4H,m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$); 5,53(1H,ba,H-4).

RMN ^{13}C : ver tabla 19.

EM (m/z, %): 362(M^+ , 73); 302($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{S}$, 84); 144(98); 131(100).

3-Metoxi-androst-3,5-dien-17-ona (28)

A una solución de **21** (500 mg, 1,75 mmol) y TsOH (cc) en 2,5 ml de DMF, se añadieron 2,5 ml de 2,2-dimetoxipropano y 0,1 ml de metanol anhidro y se calentó a reflujo durante 4 hs. Se agregaron luego 100 ml de NaHCO₃(s.s.) y la suspensión resultante se extrajo con diclorometano (3x50 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron brindando un residuo de 450 mg. Este se recristalizó de acetona:metanol para obtener 180 mg de **28** puro. Las aguas madres de la recristalización se concentraron y el extracto resultante se purificó por cromatografía en columna de sílica flash eluida con hexano:AcOEt (89:11) brindando 110 mg adicionales de **28** puro. El rendimiento de la reacción fue, por lo tanto, del 55%.

IR (cm⁻¹): 1730(C=O).

RMN ¹H (ppm): 0,92(3H,s,Me-18); 1,00(3H,s,Me-19); 3,58(3H,s,CH₃O-); 5,14(1H,m,H-4); 5,26(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): 14,4(C-18); 19,7(C-19); 21,2(C-11); 22,6(C-15); 26,0(C-1); 31,5(C-12); 32,2(C-7 y C-8); 34,4(C-2); 36,0(C-16); 36,5(C-10); 48,3(C-13); 49,1(C-9); 52,6(C-14); 54,9(CH₃O-); 99,0(C-4); 117,9(C-6); 141,5(C-5); 155,9(C-3); 221,2(C-17).

Oxidación de 3-cicloetiléndioxi-androst-5-en-17β-ol (25).*Método A:*

A una suspensión de PCC (58 mg, 0,27 mmol) en 2 ml de diclorometano anhidro a 0° se agregó una solución de **25** (60 mg, 0,18 mmol) en 2 ml de diclorometano. Luego de 2 hs de reacción se pasó la mezcla por una columna seca de sílica H que fue eluida con éter etílico. Se evaporó el solvente y se obtuvieron 55 mg de un residuo crudo que resultó ser una mezcla de 70:30 del compuesto **22** y de androstenediona (CGL, OV-17 3%).

Método B:

Una solución de PDC (2,48 g; 7,2 mmol) en 30 ml de DMF anhidra se volcó sobre 1 g (3 mmol) de **25**. Se agitó a 0° durante 24 hs, se volcó sobre agua y se extrajo con diclorometano (3x100 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron y evaporaron para obtener 950 mg del producto crudo. Este fue pu-

rificado por cromatografía en columna de sílica flash eluida con hexano:AcOEt (75:25) brindando 790 mg (80%) de **22** puro.

Preparación y reacciones de 1,3-ditianos.

2-Metil-1,3-ditiociclohexano (30)

Método A:

Una solución de acetaldehído (2,4 g; 55 mmol) y propano-1,3-ditiool (5,2 g; 48 mmol) en cloroformo (30 ml) se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente. Se enfrió luego a 0°, se agregaron 0,5 ml de trifluoruro de boro eterato y se dejó durante 16 hs a 20°. La mezcla de reacción se volcó sobre NaHCO₃(s.s.), se extrajo con diclorometano y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad. Se secó (MgSO₄) y se evaporó para obtener 5,86 g de un residuo de 90% de pureza (CGL, OV-101 3%) (82% de rendimiento) el cual fue purificado por destilación obteniéndose 3,1 g de **30** puro.

IR (cm⁻¹): 1410(ditiano); 1350(CH₃).

RMN ¹H (ppm): 1,49(3H,d,CH₃); 1,98(2H,m,βCH₂); 2,90(4H,m,αCH₂); 4,14(1H,c,H-2).

RMN ¹³C (ppm): 21,2(CH₃); 25,1(C-5); 30,4(C-4 y C-6); 41,7(C-2).

Método B:

Se aplicó la misma técnica que en el caso A pero se usó ZnCl₂ (400 mg) como catalizador. Se obtuvieron 6,1 g de un crudo de 92% de pureza (CGL, OV-101 3%) (87% de rendimiento) que purificado por destilación rindió 3,5 g del compuesto **30** puro.

1-(2-metil-1,3-ditio-ciclohexanil)-ciclohexanol (32)

A una solución del compuesto **30** (270 mg, 2 mmol) en 3 ml de THF anhidro, mantenida bajo atmósfera de nitrógeno a -78°, se agregaron 1,9 ml de n-BuLi (1,2 M) en hexano. Después de 4 hs se agregó una solución de ciclohexanona (0,21 ml, 2 mmol) en 2 ml de THF anhidro. La reacción prosiguió durante 40 hs más a temperatura ambiente luego de lo cual se volcó en 50 ml de NH₄Cl (ss) y se extrajo con éter etílico (3x50 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron obteniéndose 460 mg del producto crudo. Este se purificó por

pasaje a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (92:8) recuperándose 390 mg (84%) de **32** puro en forma de un aceite.

IR (cm^{-1}): 3570 (O-H).

RMN ^1H (ppm): 1,92(3H,s,Me); 2,92(4H,m,CH₂S).

RMN ^{13}C (ppm): 21,8(C-3); 24,1(CH₃); 25,6(C-5'); 26,6(C-2); 30,5(C-4); 31,6(C-4'); 61,2(C-2'); 77,1(C-1).

EM (m/z,%): 232(M⁺,8); 133(M⁺-C₆H₁₁O,100); 99(M⁺-C₅H₈S₂,78).

2-Trimetilsilil-1,3-ditiociclohexano (33)

A una solución de 1,3-ditiociclohexano (830 mg, 6,9 mmol) en 7 ml de THF anhidro, a -78° y bajo atmósfera de nitrógeno, se agregaron 3,3 ml de n-BuLi (2,2 M) en hexanos. Se dejó subir la temperatura hasta 0° en un lapso de 3 hs, se enfrió nuevamente a -78° y se agregó trimetilclorosilano (1,6 ml, 12,8 mmol) en un período de 2 minutos. Se dejó durante 12 hs a temperatura ambiente y luego se volcó la mezcla de reacción en agua, se extrajo con hexano (3x20 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. Se obtuvo un residuo (1,27 g) que se purificó por cromatografía en columna de sílica flash eluída con hexano:tolueno (98:2) recuperándose 800 mg (61%) de **33** puro.

RMN ^{13}C (ppm): 0,8(Me₃Si); 26,2(C-5); 31,0(C-4); 34,2(C-2).

2-Ciclohexilidén-1,3-ditiociclohexano (36)

A una solución del compuesto **33** (440 mg, 2,3 mmol) en 5 ml de THF anhidro, mantenida a -78° y bajo atmósfera de N₂, se agregaron 1,5 ml de n-BuLi (1,55 M) en hexanos. Luego de 2 hs se agregó una solución de ciclohexanona (0,24 ml, 2,3 mmol) en 2 ml de THF. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara temperatura ambiente luego de lo cual se mantuvo la agitación durante 5 hs más. Se volcó sobre 30 ml de agua y se extrajo con hexano (3x30 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 350 mg del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica flash eluída con hexano:AcOEt (98,5:1,5) recuperándose 230 mg (50%) de **36** puro.

Pf: 90-92° (lit. 92-93° [Seebach, 1973]).

RMN ¹H (ppm): 1,56(6H,ba,H-3',H-4'); 2,13(2H,m,H-5); 2,47(4H,m,H-2'); 2,88(4H,m,H-4).

EM (m/z,%): 200(M⁺,100); 125(87).

Preparación de 17- α -halo-androstenos y de compuestos involucrados en las rutas conducentes a los mismos.

3-Cicloetilénditio-androst-4-en-17 β -ol (38)

Partiendo de testosterona (1 g, 3,47 mmol) y mediante el mismo procedimiento empleado en la preparación del compuesto 27 se obtuvieron 1,2 g (95%) de 38 puro.

Pf: 147-149°.

IR (cm⁻¹): 3340(O-H).

RMN ¹H (ppm): 0,76(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 3,36(4H,m,CH₂S); 3,63(1H,t,J=6 Hz,H-17); 5,49(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C: ver tabla 19.

EM (m/z,%): 364(M⁺,99); 336(77); 304(82); 144(100)

3-Cicloetilénditio-17 α -cloro-androst-4-eno (39)

Una solución de Ph₃P (4,8 g) en 15 ml de CCl₄ y 15 ml de MeCN se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregaron luego 800 mg (2,20 mmol) de 38 y se calentó a reflujo durante 3 hs. Se evaporó el solvente y el residuo resultante se purificó por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (75:25), recuperándose 650 mg (77%) del compuesto 39 puro.

Pf: 150-153°(d).

RMN ¹H (ppm): 0,80(3H,s,Me-18); 1,02(3H,s,Me-19); 3,34(4H,m,SCH₂); 4,04(1H,d,J=6Hz,H-17); 5,50(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 384(M+2,10); 382(M⁺,28); 356(M+2-C₂H₄,5); 354(M⁺-C₂H₄,15); 324(M+2-C₂H₄S,7); 322(M⁺-C₂H₄S,20); 183(100); 144(36).

3-Cicloetilénditio-17 α -bromo-androst-4-eno (40)

Una solución de CBr₄ (462 mg, 1,39 mmol) y Ph₃P (365 mg) en 15 ml de cloroformo se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron luego 100 mg (0,28 mmol) de 38 y se calentó a

reflujo durante 3 hs. Se evaporó el solvente y el crudo resultante se filtró a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (75:25) recuperándose 92 mg del compuesto **40** (79%).

Pf: 85-90° (d).

RMN ¹H (ppm): 0,85(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 3,36(4H,m,SCH₂); 4,23(1H,dd,J=7Hz y J=1Hz,H-17); 5,51(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C: ver tabla 19.

EM (m/z, %): 428(M+2,60); 426(M⁺,60); 400(M+2-C₂H₄,26); 398(M⁺-C₂H₄,26); 368(M+2-C₂H₄S,31); 366(M⁺-C₂H₄S,31); 347(100); 145(92).

17α-Cloro-androst-4-en-3-ona (43)

Una solución de Ph₃P (700 mg) en 6 ml de CCl₄ y 6 ml de MeCN se mantuvo a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se agregó luego testosterona (100 mg, 0,35 mmol) y se calentó a reflujo durante 8 hs luego de lo cual se evaporó el solvente y el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de sílica flash. Se eluyó primero con hexano:AcOEt (75:25) obteniéndose 15 mg del compuesto 3-17α-dicloro-androst-3,5-dieno **44** (13%), y luego con hexano:AcOEt (60:40) obteniéndose 86 mg (80%) del compuesto buscado **43**.

IR (cm⁻¹): 1690 (C=O).

RMN ¹H (ppm): 0,85(3H,s,Me-18); 1,20(3H,s,Me-19); 4,07(1H,dd,J=6Hz y J<1Hz,H-17); 5,77(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C: ver tabla 19.

EM (m/z, %): 270(M⁺-HCl,100); 91(85).

Datos del compuesto **44**:

IR (cm⁻¹): 1620 (C=C-C=C).

RMN ¹H (ppm): 0,84(3H,s,Me-18); 0,97(3H,s,Me-19); 4,07(1H,dd,J=5Hz y J<1Hz,H-17); 5,40(1H,m,H-6); 6,06(1H,m,H-4).

RMN ¹³C (ppm): 17,9(C-18); 18,9(C-19); 20,9(C-11); 24,6(C-15); 30,6(C-1); 31,9(C-7); 32,1(C-8); 33,5(C-16); 34,3(C-12); 34,5(C-2^a); 34,7(C-10^a); 46,0(C-13); 47,5(C-14); 48,7(C-9); 70,8(C-17); 123,7(C-4^b); 126,8(C-6^b); 130,1(C-5^c); 140,3(C-3^c).

EM (m/z, %): 328(M+4,2); 326(M+2,12); 324(M⁺,18); 290(M+2-HCl,12); 288(M⁺-HCl,33); 171(M+2-C₉H₁₂³⁵Cl y M+4-C₉H₁₂³⁷Cl,5); 169(M⁺-

$C_9H_{12}^{35}Cl, 12$); 133(169- $H^{35}Cl$ y 171- $H^{37}Cl, 48$); 91(100).

3-Cicloetiléndioxi-17 β -mesil-androst-5-eno (41)

A una solución del compuesto **25** (500 mg, 1,5 mmol) en 7 ml de piridina anhidra se agregó MsCl (1,3 ml; 16,8 mmol) a 0°. La mezcla de reacción se agitó durante 48 hs a temperatura ambiente luego de lo cual se volcó sobre 300 ml de HCl (2N), se extrajo con diclorometano (3x80 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron y evaporaron. Se obtuvo un crudo que se purificó por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluida con hexano:AcOEt (70:30) recuperándose 480 mg (78%) de **41** puro.

Pf: 161-163°.

RMN 1H (ppm): 0,85(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 3,00(3H,s,MeSO₃); 3,95(4H,ba,CH₂O); 4,49(1H,dd,J=8y6 Hz,H-17); 5,35(1H,ba,H-6).

RMN ^{13}C : ver tabla 19.

EM (m/z,%): 314(M⁺-MeSO₃H,100); 252(42); 99(C₅H₇O₂,59).

3-Cicloetilénditio-17 β -mesil-androst-4-eno (42)

Partiendo de 1 g (2,75 mmol) del compuesto **38** y aplicando la misma técnica que en el caso anterior, se obtuvieron 1,2 g de un crudo. Este se purificó por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluida con hexano:AcOEt (75:25) obteniéndose 1,05 g (86%) de **42** puro.

Pf: 170-174°.

RMN 1H (ppm): 0,85(3H,s,Me-18); 1,02(3H,s,Me-19); 2,99(3H,s,MeSO₃); 3,55(4H,m,SCH₂); 4,46(1H,dd,J=9y8 Hz,H-17); 5,50(1H,ba,H-4).

RMN ^{13}C : ver tabla 19.

EM (m/z,%): 346(M⁺-MeSO₃H,100); 286(48); 95(68).

Procedimientos fallidos para la introducción de un átomo de bromo en C-17 de androstanos.

Método A: tetrabromuro de carbono/trifenilfosfina.

A1: Acetonitrilo a temperatura ambiente y A2: Diclorometano a temperatura ambiente.

En A1 y A2 la técnica empleada fue la misma. Una solución de Ph_3P (230 mg) y CBr_4 (290 mg; 0,88 mmol) en 5 ml del solvente en cuestión se mantuvo a 20° durante 1 h. Se agregaron luego 110 mg (0,38 mmol) de testosterona y la mezcla se mantuvo a 20° durante 24 hs. Se observó por ccd que el sustrato no había sufrido ninguna transformación en ambos casos.

A3: Acetonitrilo a reflujo.

Una solución de 100 mg de Ph_3P y CBr_4 (126 mg, 0,38 mmol) en 5 ml de MeCN se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregaron luego 45 mg (0,14 mmol) del compuesto **25** y se calentó a reflujo durante 24 hs. Por ccd pudo observarse que el producto principal de la reacción era la testosterona.

Método B: bromuro de litio en solventes polares.

B1: LiBr en acetona.

Una mezcla del compuesto **41** (50 mg, 0,12 mmol) y LiBr (80 mg) en 2 ml de acetona se calentó a reflujo durante 3 hs. Se agregaron luego 10 ml de agua y se extrajo con diclorometano (3x10 ml) Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secó (MgSO_4) y evaporó obteniéndose 40 mg de un residuo viscoso. Mediante RMN ^1H se observó que el producto consistía en una mezcla de las sustancias 17- β -mesil-androst-4-en-3-ona y 17- α -bromo-androst-4-en-3-ona, en una relación 3,5 a 1. RMN ^1H de 17- β -mesil-androst-4-en-3-ona (ppm): 0,88(3H,s,Me-18); 1,19(3H,s,Me-19); 3,00(3H,s,MeSO₃); 4,49(1H,dd,J=8y7 Hz,H-17); 5,74(1H,ba,H-4).

B2: LiBr en butanona.

Una mezcla del compuesto **42** (100 mg, 0,23 mmol) y LiBr (200 mg) en 3 ml de butanona se calentó a reflujo durante 22 hs. Por ccd no se observó cambio alguno en el sustrato.

Método C: tribromuro de fósforo en piridina.

A una solución de testosterona (100 mg, 0,35 mmol) en 4 ml de piridina a 0° se agregaron 0,10 ml de PBr_3 . La mezcla de reacción se mantuvo a 0° durante 1 h y a temperatura ambiente

durante 24 hs más. Por ccd se observó la descomposición del sustrato en numerosos productos de mayor polaridad.

Procedimientos fallidos para la introducción de un átomo de cloro en C-17 de testosterona.

Método A: cloruro de tionilo en benceno.

A1: T=0°.

A una solución de 25 (50 mg, 0,15 mmol) en 4 ml de benceno a 0° se agregaron 0,20 ml de SOCl₂. La mezcla de reacción se mantuvo a 0° durante 7 hs luego de lo cual se observó, mediante ccd, la formación de testosterona y un producto muy polar que quedaba retenido en el origen de la placa.

A2: T=20°.

A una solución de testosterona (50 mg, 0,17 mmol) en 4 ml de benceno a 0° se agregaron 0,20 ml de SOCl₂. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 48 hs luego de lo cual se observó, mediante ccd, la descomposición del sustrato en numerosos productos.

Método B: trifenilfosfina/tetracloruro de carbono.

B1. Cosolvente: diclorometano, temperatura: 20°.

Una solución de Ph₃P (110 mg, 0,42 mmol) en 2 ml de CCl₄ y 2 ml de diclorometano se mantuvo a 20° durante 1 h. Se agregaron luego 50 mg (0,17 mmol) de testosterona y se mantuvo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 96 hs. Mediante ccd se observó la formación incipiente (<10%) del producto buscado.

B2. Cosolvente: acetonitrilo, temperatura: 80°.

Una solución de Ph₃P (110 mg, 0,42 mmol) en 2 ml de CCl₄ y 3 ml de MeCN se mantuvo a 20° durante 1 h. Se agregaron luego 50 mg (0,17 mmol) de testosterona y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 40 hs. Por ccd se observó la conversión del 50% aproximadamente del sustrato en un producto de menor polaridad.

Procedimientos fallidos para la introducción de un átomo de iodo en C-17 de 17 α -cloro-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno.

Una suspensión de **39** (100 mg; 0,26 mmol) y NaI (51 mg; 0,34 mmol) en 3 ml de butanona anhidra se calentó a reflujo durante 24 hs. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se evaporó. El análisis por RMN-¹H del residuo indicó que el sustrato no había sufrido ninguna modificación.

El mismo resultado se obtuvo tratando la mezcla de reacción a 150° durante 30 hs en tubo cerrado.

Preparación de cianhidrinas sobre C-17 del sistema esteroideal.

17 ξ -Ciano-17 ξ -hidroxi-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (48)

A una suspensión de **22** (500 mg; 1,52 mmol) y KCN (1,2 g; 18,5 mmol) en 20 ml de EtOH absoluto, enfriada a 0°, se agregaron 3,2 ml de ACOH en un lapso de 1 h. Se dejó agitando durante 48 hs a temperatura ambiente luego de lo cual se agregaron 100 ml de NaHCO₃ (ss). Se extrajo con diclorometano (3x50 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 510 mg del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluida con hexano:AcOEt (70:30) recuperándose 450 mg (83%) de la mezcla de epímeros **48** en una relación 17- α -CN:17- β -CN de 4,5 a 1 según RMN ¹H.

Pf: 185-191°

IR (cm⁻¹): 3300 (O-H); 2210 (C \equiv N)

RMN ¹H (ppm): 0,88 (3H, s, Me-18, 17- α -CN); 0,95 (s, Me-19, 17- β -CN);

1,04 (3H, s, Me-19); 3,12 (1H, ba, OH); 3,95 (4H, ba, -OCH₂CH₂O-);

5,34 (1H, m, H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 330 (M⁺-HCN, 100); 99 (C₅H₇O₂, 98).

17 ξ -Ciano-17 ξ -hidroxi-3-cicloetiléndioxi-androst-4-eno (49)

Método A:

A una suspensión de **27** (500 mg; 1,4 mmol) y KCN (1,4 g; 21,5 mmol) en 20 ml de EtOH absoluto se agregaron lentamente 3,0 ml de ACOH y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 48 hs. La mezcla de reacción se trató de igual modo que en caso anterior

obteniéndose 500 mg (91%) de la mezcla de epímeros en una relación 17- α -CN:17- β -CN de 6,6 a 1 según RMN ^1H .

Pf: 132-138°.

IR (cm^{-1}): 3300 (O-H); 2220 ($\text{C}\equiv\text{N}$).

RMN ^1H (ppm): 0,89(3H,s,Me-18,17- α -CN); 0,96(s,Me-18,17- β -CN); 1,04(3H,s,Me-19); 2,70(1H,s,OH); 3,36(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 5,52(1H,ba,H-4).

RMN ^{13}C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 362(M^+ -HCN,100); 302(362-C₂H₄S,92); 144(84).

Método B:

Partiendo de 240 mg (0,66 mmol) del compuesto 27 y 215 mg (3,3 mmol) de KCN, y empleando el mismo procedimiento que en el caso A pero con DMF como solvente, se obtuvieron 220 mg (80% de rendimiento) de la mezcla de epímeros 49.

17 β -Ciano-17 α -hidroxi-androst-4-en-3-ona (50)

A una suspensión de androstenediona (1g, 3,49 mmol) y KCN (960 mg; 14,7 mmol) en 10 ml de MeOH anhidro se agregaron 0,4 ml (7 mmol) de AcOH a 25°. La mezcla de reacción se disolvió completamente a los 10 min. de iniciado el agregado del AcOH y 45 min. después comenzó a precipitar el producto. Luego de 20 hs se cortó la reacción por agregado de 0,6 ml de AcOH y 50 ml de agua. Se extrajo con diclorometano (3x50 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO₃(5%) y con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 1,1 g de un producto (99% de rendimiento) cuyo espectro de RMN ^1H indicó una relación 17 β -ciano:17 α -ciano igual a 10:1.

IR (cm^{-1}): 3330 (O-H); 2200 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 1670 (C=O).

RMN ^1H (ppm): 0,92(s,Me-18,17 α CN); 0,99(3H,s,Me-18,17 β -CN)); 1,20(3H,s,Me-19); 5,76(1H,ba,H-4).

RMN ^{13}C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 286(M^+ -HCN,92); 244(286-CH₂CO,83); 124(100).

Preparación de nitrilos α,β -insaturados en C-17 del sistema esteroidal.

17-Ciano-androsta-4,16-dien-3-ona (51)

Método A:

Una solución de **48** (390 mg; 1,1 mmol) y POCl_3 (0,75 ml; 8,0 mmol) en 20 ml de piridina anhidra se calentó en tubo cerrado a 150° durante 90 min. La mezcla de reacción fue cuidadosamente volcada sobre HCl (50%) y extraída con diclorometano (3x50 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO_3 (5%) y agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO_4) y evaporaron para obtener 270 mg del producto crudo. Este se purificó por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (65:35) recuperándose 150 mg del producto **51** puro (46%).

Pf: $144-146^\circ$.

IR (cm^{-1}): 2210 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 1670 ($\text{C}=\text{O}$).

RMN ^1H (ppm): 0,98(3H,s,Me-18); 1,22(3H,s,Me-19); 5,75(1H,ba,H-4); 6,64(1H,dd,J=2 y 1Hz,H-16).

RMN ^{13}C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 295(M^+ ,98); 253($\text{M}^+-\text{CH}_2\text{CO}$,95); 124(100).

Método B:

Una solución de **50** (215 mg; 0,69 mmol) y POCl_3 (0,35 ml) en 5 ml de piridina anhidra se calentó en tubo cerrado a 150° durante 10 hs. La mezcla fue tratada del mismo modo que en el método A obteniéndose 110 mg (54%) **51** puro.

Método C:

A una suspensión de CuSO_4 (II) sobre sílica gel (3/1; 2,22 g) en 20 ml de benceno se agregó el compuesto **52** (410 mg; 1,11 mmol) y la mezcla resultante se reflujoó durante 15 hs. Se filtró el crudo y se evaporó el solvente obteniéndose 305 mg de un crudo que se purificó por cromatografía en columna de sílica gel eluída con hexano:AcOEt (65:35). Se obtuvieron 280 mg (86%) de **51** puro.

17-Ciano-3-cicloetilénditio-androsta-4,16-dieno (52)

Método A:

Una solución de **49** (300 mg; 0,77 mmol) y POCl_3 (0,53 ml; 5,7

mmol) en 20 ml de piridina anhidra se calentó en tubo cerrado a 150° durante 2 hs. La mezcla de reacción se trató de igual modo que en la preparación de **51** (caso A), aislándose 250 mg de un crudo que fue purificado por cromatografía en columna de sílica flash eluída con hexano:AcOEt (85:15). Se recuperaron 50 mg (18%) de **52** puro.

Pf: 181-185°.

IR (cm⁻¹): 2210 (C≡N).

RMN ¹H (ppm): 0,93(3H,s,Me-18); 1,05(3H,s,Me-19); 3,35(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 5,51(1H,ba,H-4); 6,60(1H,dd,J=3 y 2Hz,H-16).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 371(M⁺,100); 311(M⁺-C₂H₄S,92); 144(89).

Método B:

A una solución de **51** (500 mg; 1,7 mmol) en 15 ml de MeOH anhidro se agregaron 0,22 ml de etanoditiol y 0,26 ml de trifluoruro de boro eterato. Se dejó a temperatura ambiente durante 90 min. y luego se procedió de la manera usual aislándose 580 mg (93%) de **52** puro.

17-Ciano-3-cicloetiléndioxi-androsta-5,16-dieno (57)

Método A:

Una suspensión del compuesto **51** (0,71 g; 2,41 mmol) en ortoformiato de etilo (2,5 ml), etilénglicol (8 ml) y TSOH (cc) se mantuvo a 40° durante 24 hs con agitación vigorosa. La mezcla de reacción se trató con 50 ml de NaHCO₃ (5%), se extrajo con diclorometano (3x50 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 800 mg del producto crudo. Este se purificó por recristalización de MeOH-H₂O recuperándose 740 mg (91%) de **57** puro.

Pf: 192-195°.

IR (cm⁻¹): 2210 (C≡N); 1100 (C-O-C).

RMN ¹H (ppm): 0,96(3H,s,Me-18); 1,07(3H,s,Me-19); 3,96(4H,m,-OCH₂CH₂O-); 5,36(1H,m,H-6); 6,64(1H,dd,J=3 y 2Hz,H-16).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 339(M⁺,18); 99(C₅H₇O₂,100).

Método B:

Una suspensión de **51** (0,71 g; 2,41 mmol) en 14 ml de etilén-glicol, 70 ml de benceno y TsOH (cc) se calentó a reflujo en un equipo provisto de una trampa de Dean-Stark, hasta eliminación completa del agua de reacción (72 hs aproximadamente). La mezcla de reacción se lavó con NaHCO_3 (5%) y agua hasta neutralidad, se secó (MgSO_4) y evaporó para obtener el crudo que se purificó por pasaje a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (70:30). Se recuperaron 650 mg de **57**.

Métodos fallidos para la deshidratación de cianhidrinas en C-17Método A: P_2O_5 en piridina

Una suspensión de 47 mg del compuesto **49** y 130 mg de P_2O_5 en 4 ml de piridina se mantuvo a temperatura ambiente durante 48 hs. Se observó por ccd que el sustrato no había sufrido ninguna modificación.

Método B: SOCl_2 en piridina

A una solución de 40 mg **49** en 2 ml de piridina se agregaron 50 μl de cloruro de tionilo a 0°. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 hs observándose (ccd) la formación de una mezcla compleja de productos.

Método C: TsOH en benceno

Una solución de 60 mg del compuesto **49** y 1 mg de TsOH en 3 ml de benceno se calentó a reflujo durante 24 hs. No se observó (ccd) ninguna modificación del sustrato.

Método D: TsOH en tolueno

Una solución de 30 mg del compuesto **49** y 1 mg de TsOH en 3 ml de tolueno se calentó a reflujo durante 72 hs. Mediante ccd se observó que el crudo de la reacción consistía del sustrato como componente principal y de algunos productos minoritarios de menor polaridad.

Método E: ortoformiato de etilo/TsOH

Una solución de 50 mg del compuesto **49**, TsOH (cc) y 0,4 ml

de ortoformiato de etilo en 5 ml de benceno se reflujo durante 12 hs. Mediante ccd se observó que la mezcla de reacción estaba compuesta por el sustrato y otros compuestos de menor polaridad cuyos Rf no correspondían con el Rf del producto buscado.

Método F: cloruro de mesilo/trietilamina

A una solución de **49** (500 mg, 1,29 mmol) en 3 ml de THF anhidro y 1,5 ml de TEA, mantenida a 0°, se agregó una solución de MsCl (0,25 ml; 3,2 mmol) en 3 ml de THF anhidro. Inmediatamente precipitó un sólido cristalino blanco que fue resuspendido con 5 ml adicionales de THF anhidro. La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 65 hs luego de lo cual se volcó sobre HCl (5%). Se extrajo con diclorometano y las fases orgánicas reunidas se lavaron hasta neutralidad, se secaron y evaporaron para obtener 600 mg del producto crudo. Este se purificó por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluida con hexano:AcOEt (80:20) recuperándose 540 mg (90%) del compuesto 17-ciano-17-mesil-3-cicloetilénditio-androst-4-eno (53) como mezcla de epímeros en C-17 en relación 3 a 1 favorable al epímero β -ciano- α -mesilo (RMN ^1H).

RMN ^1H (ppm): 0,88(s, Me-18 del α -CN- β -OMs); 0,98(3H, s, Me-18 del β -CN- α -OMs); 1,03(3H, s, Me-19); 3,20(3H, s, MeSO₃-); 3,35(4H, m, CH₂S); 5,52(1H, ba, H-4).

EM (m/z, %): 371(M⁺-MeSO₃H, 80); 311(M⁺-MeSO₃H-C₂H₄S, 100); 144(88).

Método G: sulfato de cobre (II) sobre sílica gel

A una solución de 50 mg del compuesto **49** en 3 ml de tolueno se agregaron 120 mg de una mezcla de CuSO₄:sílica gel (1:3) y la suspensión resultante se reflujo durante 3 hs. Se filtró el reactivo y se evaporó el solvente para obtener 25 mg de un crudo cuyo analisis por CGL-Espectrometría de masa indicó una relación 3,2 a 1 de los compuestos 3-cicloetilénditio-androst-5-en-17-ona (27) y androst-5-en-3,17-diona (21).

Ensayos de la sustitución de sulfonatos en C-17

3-Cicloetilénditio-17 β -p-toluensulfonil-androst-4-eno (54)

Se agregaron 1,3 g de TsCl a una solución de **38** (500 mg, 1,37 mmol) en 10 ml de piridina anhidra. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 hs añadiéndose luego 100 ml de HCl (10%). Se extrajo con diclorometano (3x50 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 710 mg del producto crudo. Este se purificó por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluida con hexano:AcOEt (60:40) recuperándose 685 mg (96%) de **54** puro.

Pf: 84-86°.

RMN ¹H (ppm): 0,81(3H,s,Me-18); 1,00(3H,s,Me-19); 2,45(3H,s,Me-Ar); 3,34(4H,m,-SCH₂); 4,22(1H,dd,J=8 Hz y J<1Hz,H-17);

5,48(1H,ba,H-4); 7,31(2H,d,J=9Hz,H-3'); 7,78(2H,d,J=9Hz,H-2').

RMN ¹³C (ppm): 11,9(C-18); 18,7(C-19); 20,7(C-11); 21,8(CH₃-Ar);

23,4(C-15); 27,7(C-16); 31,9(C-7^a); 32,1(C-6^a); 35,6(C-8);

36,0(C-12); 36,6(C-1); 37,4 y 38,1(-SCH₂CH₂S-); 39,6(C-2^b);

40,1(C-10^b); 43,0(C-13); 49,7(C-14); 54,0(C-9); 65,7(C-3);

89,8(C-17); 124,4(C-4); 127,8(C-2'); 129,6(C-3'); 134,2(C-4');

144,3(C-1'); 145,8(C-5).

EM (m/z, %): 518(M⁺, 29); 490(M⁺-C₂H₄, 8); 458(M⁺-C₂H₄S₂, 18); 346(M⁺-C₇H₇SO₃H, 38); 91(C₇H₇⁺, 100).

A. Sustrato: compuesto 3-Cicloetiléndioxi-17 β -mesil-androst-5-eno (41)

A una solución de 90 mg (0,2 mmoles) del mesilato **41** en 2 ml de DMF (anh) se agregaron 46 mg (0,7 mmol) de KCN y la mezcla resultante se calentó a 50° durante 48 hs. Mediante ccd se observó que el sustrato no había sufrido ninguna modificación.

B. Sustrato: compuesto 54.

El mismo procedimiento se aplicó sobre 100 mg (0,19 mmol) del tosilato **54**. Luego de 48 hs se observó (ccd) que el sustrato permanecía inalterado.

Ensayos de la hidrogenación selectiva del doble enlace 16(17).
 17 β -Ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (58)

Una solución del compuesto **57** (0,73 g; 2,17 mmol) en 50 ml de AcOEt fue hidrogenada a presión atmosférica y temperatura ambiente sobre Pd/C 10% (100 mg/mmol) durante 20 hs. La mezcla de reacción se filtró y se evaporó para obtener 740 mg (100%) de **58** puro.

Pf: 84-86°.

IR (cm⁻¹): 2200 (C≡N); 1100 (C-O-C).

RMN ¹H (ppm): 0,94 (3H, s, Me-18); 1,05 (3H, s, Me-19); 3,96 (4H, m, -OCH₂CH₂O-); 5,36 (1H, m, H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 339 (M⁺, 50); 312 (M⁺-HCN, 1); 299 (M⁺-CH₂CN, 10); 99 (C₅H₇O₂, 100).

A. *Sustrato: 17-Ciano-androsta-4,16-dien-3-ona (51).*

Una solución de 50 mg de **51** en 4 ml de i-PrOH a la que se agregaron 15 mg de Pd/C (10%) se hidrogenó a presión atmosférica durante 36 hs. Se filtró el catalizador a través de un embudo de vidrio sinterizado y se evaporó el solvente para obtener 50 mg del compuesto 17 β -Ciano-5 ξ -androstan-3-ona (**56**).

RMN ¹H (ppm): 0,95 (3H, s, Me-18); 1,05 (3H, s, Me-19).

Otras condiciones ensayadas fueron las siguientes:

Método	Catalizador	t (hs)	Resultado
A.1	Pd/CaCO ₃ (2%)	2	no hubo reacción
A.2	Pd/C(5%)	48	"
A.3	Pd/C(10%)	20	55 (100%)
A.4	Pd/C(10%)	3	55:56 = 1:1

En todos los casos se emplearon 50 mg del sustrato en 4 ml de i-propanol y 15 mg del catalizador. La prueba **A.4** se hizo a 3 atmósferas de presión de hidrógeno.

B. Sustrato: 16-Dehidroprogesterona.

Una solución de 16-dehidroprogesterona (59) (180 mg; 0,58 mmol) en 10 ml de etanol absoluto se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente en presencia de 15 mg de Pd/C (10%). Luego de 1 hora de reacción se filtró el catalizador y se evaporó la solución obteniéndose 179 mg de una mezcla de los epímeros 5 α y 5 β -pregnan-3,20-diona (60 y 61 respectivamente) en una relación de aproximadamente 1 a 1.

RMN ^1H (ppm): 0,64(3H,s,Me-18); 1,15(3H,s,Me-19); 2,11(3H,s,Me21).
(para ambos epímeros).

RMN ^{13}C (ppm):

60:

11,3(C-19); 13,3(C-18); 21,1(C-11); 22,7(C-16); 24,3(C-15);
28,7(C-6); 31,3(C-21); 31,5(C-7); 35,2(C-8 *); 35,3(C-10 *);
38,4(C-2); 38,7(C-1); 38,9(C-12); 44,0(C-13); 44,4(C-4); 46,4(C-5);
53,5(C-9); 56,3(C-14); 63,4(C-17); 210,8(C-20); 212,0(C-3).

61:

13,3(C-18); 21,3(C-11); 22,5(C-19); 22,7(C-16); 24,3(C-15);
25,6(C-6); 26,4(C-7); 31,3(C-21); 34,7(C-10); 35,3(C-8); 36,9(C-1
y C-2); 38,9(C-12); 40,5(C-9); 42,0(C-4); 44,0(C-5); 44,4(C-13);
56,3(C-14); 63,4(C-17); 208,5(C-20); 212,0(C-3).

Otras condiciones ensayadas fueron:

Método	Catalizador	t (min)	Resultado
B.1	Pd/CaCO ₃ (10%)	30	idem B
B.2	Pd/CaCO ₃ (2%)	20	no hubo reacción
B.3	"	60	59:60+61 (1:1)

En todos los casos se emplearon 50 mg del sustrato disueltos en 4 ml de i-propanol y 15 mg del catalizador correspondiente. Todas las reacciones se realizaron a presión atmosférica.

C. Sustrato: 17-ciano-3-cicloetilénditio-androsta-4,16-dieno (52)

A una solución de 50 mg de **52** en 4 ml de i-propanol se agregaron 15 mg de Pd/CaCO₃ (2%) y la mezcla resultante se hidrogenó a presión atmosférica durante 3 horas. Se filtró la mezcla a través de un embudo de vidrio sinterizado y se evaporó la solución, obteniéndose 50 mg de un crudo cuyo espectro de RMN ¹H indicó que el sustrato no había sufrido ninguna modificación.

Apertura de Cicloetilénacetales por reacción con ioduro de metilmagnesio.

3-Cicloetilénditio-17-cicloetiléndioxi-androst-4-eno (63)

Método A

Una suspensión de 3-cicloetilénditio-androst-5-en-17-ona (**27**) (100 mg; 0,28 mmol) en 2 ml de etilenglicol y 10 ml de benceno se reflujo durante 24 hs hasta completa eliminación del agua (trampa de Dean-Stark). Se agregaron luego 5 mg de TsOH y se prosiguió el reflujo durante 24 hs más. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃(5%) y agua hasta neutralidad, se secó (MgSO₄) y evaporó para obtener 100 mg del producto crudo. Este se purificó por pasaje a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (85:15) recuperándose 75 mg (66%) de **63** puro.

Pf: 104-107°.

RMN ¹H (ppm): 0,86(3H,s,Me-18); 1,02(3H,s,Me-19); 3,74(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 3,87(4H,m,-OCH₂CH₂O-); 5,49(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C : ver tabla 19.

EM (m/z,%): 406(M⁺,35); 346(M⁺-C₂H₄S,45); 131(80); 99(C₅H₇O₂,100).

Método B

Partiendo de 440 mg (1,22 mmol) del compuesto **27** y aplicando la misma técnica que en la preparación del compuesto **23** (ver página 180) , se obtuvieron 490 mg de un crudo que se purificó de igual forma que en el método A para obtener 430 mg (87%) del compuesto **63** puro.

17-(2-Hidroxi-etoxi)-17-metil-3-cicloetilénditio-androst-4-eno
(65)

A una suspensión de Mg (180 mg) y yodo (cc) en Et₂O anhidro (3 ml) se agregó una solución de ioduro de metilo (0,46 ml; 7,38 mmol) en Et₂O anhidro (2 ml). Se calentó a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 30 min. luego de lo cual se agregó una solución del compuesto 63 (140 mg; 0,34 mmol) en 5 ml de benceno anhidro y se prosiguió el calentamiento durante 48 hs. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 10 ml de NH₄Cl (ss) agitándose durante 1 h adicional a temperatura ambiente. Se separó la fase orgánica y la acuosa se extrajo con benceno (3x10 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron (MgSO₄) y evaporaron para obtener 136 mg del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica flash eluída con hexano:AcOEt (85:15) para obtener 42 mg (29%) de 65 puro. Pf: 103-105°.

RMN ¹H (ppm): 0,89(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 1,20(3H,s,Me-C-17); 3,36(4H,m,SCH₂); 3,62(4H,m,-OCH₂CH₂OH); 5,50(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C (ppm): 13,9(C-18); 18,6(C-19); 20,9(C-11); 21,1(C-20); 23,2(C-15); 32,0(C-6); 32,4(C-7); 32,8(C-12^a); 36,0(C-16^a); 36,3(C-8); 36,6(C-1); 37,3 y 38,0(-SCH₂CH₂S-); 39,5(C-2^b); 39,9(C-10^b); 46,3(C-13); 50,4(C-14); 54,1(C-9); 62,4 y 64,0 (-OCH₂CH₂OH); 65,7(C-3); 85,5(C-17); 124,0(C-4); 146,2(C-5).

EM (m/z, %): 422(M⁺, 20); 392(M⁺-C₂H₄, 3); 360(M⁺-C₂H₆O₂, 16); 283(42); 161(100).

3-(2-Hidroxi-etoxi)-3-metil-androst-5-en-17-β-ol (64)

Se aplicó la misma técnica que para la preparación del compuesto 65 trabajando con 150 mg de Mg, 0,37 ml de ioduro de metilo y 100 mg (0,30 mmol) de 25. Se obtuvo 110 mg de un crudo que, purificado por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (1:1), brindó 85 mg (81%) de 64 puro.

Pf: 95-97°.

IR (cm⁻¹): 3400 (O-H).

RMN ¹H (ppm): 0,79(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 1,09(3H,s,Me-C-3); 3,65(4H,m,-OCH₂CH₂OH); 5,32(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): 11,5(C-18); 19,8(C-19); 21,3(Me-C3 y C-11);

23,9(C-15); 30,4(C-16); 32,1(C-7); 32,6(C-8); 33,6(C-2^a); 37,1(C-10 y C-1^a); 37,5(C-12); 43,2(C-4); 44,5(C-13); 51,2(C-14^b); 51,9(C-9^b); 62,5 y 62,6(-OCH₂CH₂OH); 77,1(C-3); 81,9(C-17); 122,2(C-6); 141,3(C-5).

EM (m/z, %): 348(M⁺, 4); 286(M⁺-C₂H₆O₂, 23); 115(100).

3-(2-Hidroxi-etoxi)-3-metil-pregn-5-en-20-ona (62)

El compuesto 17β-ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (58) (50 mg; 0,15 mmol) fue tratado con ioduro de metilmagnesio como se describió para la preparación del compuesto 65. Luego de la purificación cromatográfica (sílica flash, hexano:AcOEt 80:20) se obtuvieron 32 mg (60%) de 62 puro.

Pf: 98-101°

IR: 3400 (O-H); 1700 (C=O)

RMN ¹H (ppm): 0,63(3H, s, Me-18); 1,01(3H, s, Me-19); 1,09(3H, s, Me-C3); 2,12(3H, s, Me-21); 3,62(4H, m, HOCH₂CH₂O-); 5,35(1H, m, H-6).

RMN ¹³C (ppm): 13,2(C-18); 19,3(C-19); 20,9(Me-C3); 21,0(C-11); 22,8(C-16); 24,4(C-15); 31,5(C-8); 31,8(C-21 y C-7); 33,1(C-2^a); 36,4(C-1^a); 36,9(C-10); 38,8(C-12); 43,9(C-4^b); 44,0(C-13^b); 50,3(C-9); 56,8(C-14); 61,7 y 62,2(-OCH₂CH₂OH); 63,6(C-17); 76,2(C-3); 121,6(C-6); 140,7(C-5); 209,2(C-20).

EM (m/z, %): 374(M⁺, 29); 312(M⁺-HOCH₂CH₂OH, 71); 115(100); 43(18).

Ensayos de la preparación de pregnanos a partir del nitrilo α,β-insaturado (52).

3-Cicloetilénditio-pregna-4,16-dien-20-ona (66)

Utilizando un procedimiento similar al descrito en la preparación de 65, partiendo de 100 mg de 17-ciano-3-cicloetilénditio-androsta-4,16-dieno (52) y empleando una relación 100 a 1 de reactivo de Grignard a nitrilo se recuperaron 30 mg (29%) del compuesto 66.

RMN ¹H (ppm): 0,98(3H, s, Me-18); 1,05(3H, s, Me-19); 2,25(3H, s, Me-21); 3,35(4H, m, CH₂S-); 5,50(1H, ba, H-4); 6,69(1H, m, H-16).

Método B: Metillitio en THF.

Se preparó una solución 1,35 M de MeLi en THF agregando 3,2 ml de n-BuLi (0,84 M en hexano) a una solución de 0,17 ml (2,7

mmol) de MeI en 2 ml de hexano, centrifugando el precipitado resultante en un tubo provisto de un septum, extrayendo el hexano con una jeringa y redisolviendo el precipitado en 2 ml de THF anhidro. Esta solución se agregó a -78° a una solución de **52** (100 mg; 0,27 mmol) en 2 ml de THF anhidro. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs, observándose por ccd que el sustrato no había sufrido ninguna modificación.

Cuando la reacción se realizó a reflujo durante 24 hs se observó por ccd una mezcla compleja de productos.

Método C: Metilítio en tolueno.

La solución de MeLi preparada como en el caso B se agregó a la solución de **52** en tolueno a -78° , se dejó llegar a temperatura ambiente, se destiló el THF y se reflujo la mezcla de reacción durante 3 hs. Mediante ccd se observó una mezcla compleja de productos de reacción.

Cambio del grupo protector del compuesto 17 β -ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (**55**) y síntesis de progesterona.

*17 β -Ciano-androst-4-en-3-ona (**67**)*

A una solución de **55** (730 mg; 2,15 mmol) en 15 ml de THF se agregaron 8 ml de HCl (10%) y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 8 hs. Se eliminó el solvente orgánico y se agregaron 50 ml de NaHCO₃ (ss). La suspensión resultante se extrajo con diclorometano (3x50 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener el producto crudo. Este se recristalizó de EtOH recuperándose 570 mg (89%) de **67** puro.

Pf: 174-175°

IR (cm⁻¹): 2200 (C≡N); 1670 (C=O); 1580 (C=C).

RMN ¹H (ppm): 0,96(3H,s,Me-18); 1,20(3H,s,Me-19); 5,72(1H,ba, H-4).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 297(M⁺, 42); 280(M⁺-HCN, 2); 255(M⁺-CH₂CO, 86); 124(100).

17β-Ciano-3-cicloetilénditio-androst-4-eno (68)

A una solución del compuesto **67** (570 mg; 1,92 mmol) en 20 ml de MeOH anhidro se agregaron etanoditiol (0,24 ml) y trifluoruro de boro eterato (0,30 ml). Luego de 1 h a temperatura ambiente se eliminó el solvente y se tomó el residuo con AcOEt (100 ml), se lavó con NaHCO₃(5%) y agua hasta neutralidad, se secó (MgSO₄) y se evaporó. Se obtuvieron 680 mg (95%) de **68** puro.

Pf: 141-145°

IR (cm⁻¹): 2200 (C≡N).

RMN ¹H (ppm): 0,94(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 3,36(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 5,51(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 373(M⁺,55); 346(M⁺-HCN,7); 345(M⁺-C₂H₄,30); 313(M⁺-C₂H₄S₂,98); 144(100).

*3-Cicloetilénditio-pregn-4-en-20-ona (69)*Método A:

A una solución de ioduro de metilmagnesio, preparada a partir de Mg (530 mg) y ioduro de metilo (1,35 ml; 21,6 mmol), en 5 ml de Et₂O anhidro se agregó una solución del compuesto **68** (400 mg; 1,07 mmol) en 20 ml de benceno anhidro. La mezcla se reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 40 hs., se enfrió a 0°, se trató con NH₄Cl (ss) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 hs. Se separó la fase orgánica y la acuosa se extrajo con benceno. Los extractos organicos reunidos se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 410 mg del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica flash eluida con hexano:AcOEt (98:2) brindando 220 mg (53%) de **69** puro.

Pf: 174-176° (lit. 177-181° [Evans, 1977]).

IR (cm⁻¹): 1700 (C=O).

RMN ¹H (ppm): 0,64(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 2,13(3H,s,Me-21); 3,36(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 5,50(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 390(M⁺,99); 362(M⁺-C₂H₄,49); 330(M⁺-C₂H₄S,72); 144(75); 43(CH₃CO,100).

Método B:

A una solución de progesterona (500 mg; 1,66 mmol) en 15 ml de MeOH anhidro se agregaron etanoditiol (0,15 ml) y trifluoruro de boro eterato (0,20 ml). Se agitó durante 1 h. a temperatura ambiente, luego de lo cual se evaporó el solvente. El residuo se tomó en AcOEt, se lavó con NaHCO₃ (5%) y con agua hasta neutralidad, se secó (MgSO₄) y se evaporó para obtener 620 mg del crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (90:10) recuperándose 575 mg (89%) de **69** puro.

Progesterona

A una solución del compuesto **69** (100 mg; 0,26 mmol) en 10 ml de cloroformo se agregó CuSO₄ (II) adsorbido sobre sílica gel (1/3; 540 mg). La mezcla se reflujoó durante 5 hs. luego de lo cual se filtró el reactivo y se evaporó la solución. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (80:20) recuperándose 66 mg (80%) de un compuesto puro e idéntico cromatográfica y espectroscópicamente a una muestra auténtica de progesterona.

Síntesis de [20,21-¹³C₂]-Progesterona

[20-¹³C]-17β-Ciano-17α-hidroxi-androst-4-en-3-ona (70)

Partiendo de androstenediona (750 mg; 2,62 mmol) y K¹³CN (99% de pureza isotópica, 720 mg) y aplicando la misma técnica que en la preparación de **50** (ver página 192) se obtuvieron 820 mg (99,5%) de una mezcla de epímeros en C-17. La muestra analítica del componente principal (**70**; >95%) se obtuvo por CLAR (RP-18; 10 μm; MeOH-H₂O 8:2).

IR (cm⁻¹): 3300 (O-H); 2180 (C≡N); 1670 (C=O); 1580 (C=C).

RMN ¹H (ppm): 1,00(3H, s, Me-18); 1,21(3H, s, Me-19); 5,76(1H, ba, H-4).

RMN ¹³C (ppm): 120,7 (s, ¹³C-20).

EM (m/z, %): 314[(M+1)⁺, 82]; 286[(M+1)-H¹³CN, 100]; 244[(M+1)-CH₂CO-H¹³CN, 79].

[20-¹³C]-17-Ciano-androsta-4,16-dien-3-ona (71)

Se aplicó la misma técnica que para la preparación del

compuesto **51** (método B) (ver página 193) partiendo de 800 mg de **70** crudo. Se obtuvieron, luego de la purificación correspondiente, 360 mg (48%) de **71**.

IR (cm^{-1}): 2170 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 1670 ($\text{C}=\text{O}$); 1580 ($\text{C}=\text{C}$).

RMN ^1H (ppm): 0,98(3H,s,Me-18); 1,22(3H,s,Me-19); 5,76(1H,m,H-4); 6,64(1H,m,H-16).

RMN ^{13}C (ppm): 115,4 (s, ^{13}C -20).

EM (m/z, %): 296[(M+1) $^+$, 72]; 254[(M+1)- CH_2CO , 74]; 124(100).

[20- ^{13}C]-17-Ciano-3-cicloetiléndioxi-androsta-5,16-dieno (72)

Aplicando el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **57** (ver página 194), a partir de 350 mg (1,18 mmol) de **71** se obtuvieron 370 mg (92%) de **72** puro.

IR (cm^{-1}): 2170 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 1100 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

RMN ^1H (ppm): 0,96(3H,s,Me-18); 1,06(3H,s,Me-19); 3,95(4H,m,- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -); 5,36(1H,m,H-6); 6,64(1H,m,H-16).

RMN ^{13}C (ppm): 115,6 (s, ^{13}C -20).

EM (m/z, %): 340[(M+1) $^+$, 4]; 99($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$, 100).

[20- ^{13}C]-17 β -Ciano-3-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (73)

Utilizando la técnica descripta para la preparación del compuesto **58** (ver página 198), partiendo de 360 mg (1,06 mmol) de **72** se obtuvieron 365 mg (100%) de **73** puro.

IR (cm^{-1}): 2180 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 1100 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

RMN ^1H (ppm): 0,94(3H,s,Me-18); 1,05(3H,s,Me-19); 3,95(4H,m,- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -); 5,36(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 121,1 (s, ^{13}C -20).

EM (m/z, %): 342[(M+1) $^+$, 11]; 314[(M+1)- H^{13}CN , 4]; 99($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$, 100).

[20- ^{13}C]-17 β -Ciano-androst-4-en-3-ona (74)

Partiendo de **73** (350 mg; 1,02 mmol) y empleando el mismo procedimiento que en la preparación de **67** (ver página 203) se obtuvieron 274 mg (90%) de **74**.

IR (cm^{-1}): 2180 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 1670 ($\text{C}=\text{O}$).

RMN ^1H (ppm): 0,98(3H,s,Me-18); 1,21(3H,s,Me-19); 5,75(1H,ba,H-4).

RMN ^{13}C (ppm): 120,8 (s, ^{13}C -20).

EM (m/z, %): 298[(M+1)⁺, 76]; 256[(M+1)-CH₂CO, 100]; 124(100).

[20-¹³C]-17β-Ciano-3-cicloetilénditio-androst-4-eno (75)

Partiendo del compuesto 74 (270 mg; 0,91 mmol) y mediante la técnica habitual se obtuvieron 323 mg (95%) de 75.

IR (cm⁻¹): 2180 (C≡N).

RMN ¹H (ppm): 0,95(3H, s, Me-18); 1,02(3H, s, Me-19); 3,36 (4H, m, -SCH₂CH₂S-); 5,50 (1H, ba, H-4).

RMN ¹³C (ppm): 121,0 (s, ¹³C-20).

EM (m/z, %): 374[(M+1)⁺, 49]; 346[(M+1)-C₂H₄, 35]; 314[(M+1)-C₂H₄S, 100]; 144(C₆H₈S₂, 95).

[20,21-¹³C₂]-3-Cicloetilénditio-pregn-4-en-20-ona (76)

A una solución de ioduro de [¹³C]-metilmagnesio, preparada a partir de Mg (270 mg) y ioduro de metilo-[¹³C] de 99% de pureza isotópica (0,7 ml; 10,8 mmol) en 2 ml de Et₂O anhidro, se agregó una solución de 75 (200 mg; 0,53 mmol) en 10 ml de benceno anhidro. La mezcla se reflujo durante 40 hs. y luego se procedió como en la preparación del compuesto 69 (método A) (ver página 203) aislándose 106 mg (51%) de 76 puro.

IR (cm⁻¹): 1706 (¹²C=O, débil); 1650(¹³C=O, fuerte).

RMN ¹H (ppm): 0,63(3H, s, Me-18); 1,02(3H, s, Me-19); 2,12(3H, dd, J ¹³C-H=126,7 Hz, J ¹³C-¹³C-H=5,7 Hz, Me-21); 3,36(4H, m, -SCH₂CH₂S-); 5,50(1H, m, H-4).

RMN ¹³C (ppm): 31,3(d, J ¹³C-¹³C=39,2 Hz, ¹³C-21); 208,9(d, J ¹³C-¹³C=39,2 Hz, ¹³C-20).

EM (m/z, %): 392[(M+2)⁺, 2]; 332[(M+2)-C₂H₄S, 27]; 45[¹³C₂H₃O, 100].

[20,21-¹³C₂]-Progesterona (77)

Aplicando la misma técnica empleada en la preparación de progesterona "fria", partiendo de 100 mg del compuesto 76 se obtuvieron 66 mg (80%) de 77 puro.

RMN ¹H (ppm): 0,67(3H, s, Me-18); 1,19(3H, s, Me-19); 2,13(3H, dd, J ¹³C-H=126,9 Hz, J ¹³C-¹³C-H=5,6 Hz, Me-21); 5,74(1H, m, H-4).

RMN ¹³C (ppm): 31,3(d, J ¹³C-¹³C=39,2 Hz, ¹³C-21); 208,7(d, J ¹³C-¹³C=39,2 Hz, ¹³C-20).

EM (m/z, %): 316[(M+2)⁺, 66]; 274[(M+2)-CH₂CO, 54]; 124(100);

45 ($^{13}\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$, 98).

Síntesis de Colesterol.

17 α -Ciano-17 β -hidroxi-androst-5-en-3 β -ol (79)

A una solución de androst-5-en-3 β -ol-17-ona (1g; 3,47 mmol) en 15 ml de EtOH absoluto se agregaron KCN (950 mg; 14,6 mmol) y 0,7 ml de AcOH gota a gota en un lapso de 1 h. Luego de 18 hs a temperatura ambiente se agregaron 0,7 ml adicionales de AcOH y 50 ml de agua. Se filtró el precipitado formado, se lavó con agua hasta neutralidad y se secó en desecador. Se obtuvieron 1,09 g (100%) del compuesto **79** puro.

Pf: 140-141°.

IR (cm^{-1}): 3400(O-H); 2200(C \equiv N).

RMN ^1H (ppm): 0,94*(3H,s,Me-18); 0,96*(3H,s,Me-19),
3,70(1H,m,H-3); 5,30(1H,m,H-6) (en Py- d_5).

RMN ^{13}C (ppm): 12,3(C-18); 19,6(C-19); 21,2(C-11); 23,7(C-15);
31,7(C-2^a); 32,7(C-7^a); 32,8(C-8); 34,1(C-12); 37,0(C-16);
37,9(C-10^b); 38,0(C-1^b); 43,5(C-4); 47,4(C-13); 50,0(C-9);
51,6(C-14); 71,3(C-3); 80,8(C-17); 120,7(C-6); 121,6(C-20);
141,9(C-5) (en Py- d_5).

EM (m/z, %): 315(M⁺, 62); 297(M⁺-H₂O, 51); 288(M⁺-HCN, 93); 270(288-H₂O ó 297-HCN, 46); 107(100).

3 β -O-(t-Butildimetilsilil)-17 α -ciano-17 β -hidroxi-androst-5-eno (80)

A una solución del compuesto **79** (500 mg; 1,59 mmol) en 15 ml de DMF anhidra se agregaron 0,88 g de t-butildimetilclorosilano y 1,10 g de imidazol. La mezcla de reacción se mantuvo durante 2 hs a temperatura ambiente luego de lo cual se agregaron 50 ml de diclorometano y se lavó con NaCl (ss) (5x50 ml). Se secó (MgSO₄) y se evaporó para obtener 680 mg (100%) de **80** puro.

Pf: 187-189°.

RMN ^1H (ppm): 0,06(6H,s,Me₂Si); 0,90(9H,s,Me₃CSi); 0,96(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 3,50(1H,m,H-3); 5,32(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 414(M⁺-CH₃, 1); 402(M⁺-HCN, 1); 372(M⁺-Me₃C, 39); 345(M⁺-HCN-Me₃C, 100).

3β-O-(t-Butildimetilsilil)-17-ciano-androsta-5,16-dieno (81)

A una solución del compuesto **80** (500 mg; 1,17 mmol) en 15 ml de piridina anhidra mantenida a 0° se agregaron 2,5 ml de oxiclورو de fósforo. La mezcla de reacción se agitó durante 60 hs a temperatura ambiente luego de lo cual se volcó cuidadosamente sobre HCl (30%) y se extrajo con diclorometano (3x50 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO₃ (5%) y agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 330 mg del crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (90:10) para recuperar 280 mg (58%) de **81** puro.

Pf: 142-145°.

RMN ¹H (ppm): 0,06(6H,s,Me₂Si); 0,90(9H,s,Me₃CSi); 0,95(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 3,48(1H,m,H-3); 5,32(1H,m,H-6); 6,64(1H,m,H-16).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 396(M⁺-CH₃, 3); 354(M⁺-Me₃C, 100); 280(354-Me₂SiO, 4).

3β-O-(t-Butildimetilsilil)-17β-ciano-androst-5-eno (82)

Una solución del compuesto **81** (260 mg; 0,63 mmol) en 15 ml de AcOEt se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente sobre 70 mg de Pd/C (10%) durante 7 hs. El catalizador se filtró y se lavó con AcOEt. La evaporación del solvente brindó 260 mg (99%) de **82** puro.

Pf: 146-148°.

RMN ¹H (ppm): 0,06(6H,s,Me₂Si); 0,90(9H,s,Me₃CSi); 0,93(3H,s,Me-18); 1,02(3H,s,Me-19); 3,48(1H,m,H-3); 5,32(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 413(M⁺, 1); 398(M⁺-CH₃, 2); 356(M⁺-Me₃C, 100); 282(356-Me₃SiO, 4).

3β-o-(t-butildimetilsilil)-Pregn-5-en-20-ona (83)

Se siguió la misma técnica descrita en la preparación del compuesto **69** (ver página 204) partiendo de 180 mg (0,44 mmol) de **82** y trabajando con 110 mg de Mg y 0,27 ml (4,4 mmol) de MeI. Se obtuvieron 160 mg de un crudo que se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (90:10)

recuperándose 130 mg (70%) del producto **83** puro.

Pf: 164-165°.

IR (cm⁻¹): 1700 (C=O).

RMN ¹H (ppm): 0,06(3H,s,Me₂Si); 0,64(3H,s,Me-18); 0,88
(9H,s,Me₃CSi); 0,99(3H,s,Me-19); 2,11(3H,s,Me-21); 3,49
(1H,m,H-3); 5,34(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): 13,3(C-18); 18,3(Me₃CSi); 19,5(C-19);
26,0((CH₃)₃CSi); 72,5(C-3); 120,8(C-6); 141,4(C-5) y 209,0(C-20)
entre otras señales.

EM (m/z, %): 430(M⁺, 1); 415(M⁺-CH₃, 2); 373(M⁺-Me₃C, 89);
75(Me₃SiOH, 100).

Pregnenolona (84)

Una solución de **83** (100 mg; 0,23 mmol) y 250 mg de TBAF en 2 ml de THF anhidro se agitó durante 20 hs a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con 20 ml AcOEt, se lavó con agua, se secó (MgSO₄) y se evaporó para obtener 72 mg de un producto puro, idéntico cromatográfica y espectroscópicamente a una muestra auténtica de pregnenolona.

(20E)-Colesta-5,20(22)-dien-3β-ol (85)

Método A.

La solución del iluro se hizo de igual manera que en la preparación del compuesto **92** (ver página 214), empleando 1,9 g (4,4 mmol) de la sal de fosfonio y 3,4 g de la suspensión de t-amilato de potasio en benceno en 4 ml de benceno. Esta solución se agregó a una solución de **84** (200 mg; 0,63 mmol) en 6 ml de tolueno y se calentó a reflujo durante 24 hs. El tratamiento de la mezcla de reacción fue similar al empleado en el caso de **92**, y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (90:10) y (75:25) para obtener 52 mg (21%) del feniléter 3β-fenoxi-pregn-5-en-20-ona (**91**) y 50 mg (23%) del compuesto **85**.

85:

RMN ¹H (ppm): 0,55(3H,s,Me-18); 0,89(6H,d,J=6Hz,Me-26,Me-27);
1,01(3H,s,Me-19); 1,62(3H,s,Me-21); 3,52(1H,m,H-3);
5,18(1H,t,J=7Hz,H-22); 5,36(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 13,0(C-18); 17,9(C-21); 19,5(C-19); 22,7(C-26 y C-27); 24,9(C-23); 27,8(C-25); 38,8(C-24); 59,0(C-17); 71,8(C-3); 121,6(C-6); 125,7(C-22); 133,9(C-20); 140,8(C-5) entre otras señales.

91:

RMN ^1H (ppm): 0,65(3H,s,Me-18); 1,07(3H,s,Me-19); 2,13(3H,s,Me-21); 4,10(1H,m,H-3); 5,40(1H,m,H-6); 7,08(5H,m,H-Ph).

RMN ^{13}C (ppm): 13,4(C-18); 19,6(C-19); 31,6(C-21); 63,8(C-17); 77,0(C-3); 116,0(C-2'); 120,7(C-4'); 121,9(C-6); 129,5(C-3'); 140,3(C-5); 157,6(C-1') y 209,2(C-20) entre otras señales.

EM (m/z, %): 392(M^+ , 6); 299(M^+ - $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$, 100); 93($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$, 12); 43(CH_3CO , 42).

Método B.

La solución del iluro preparada de la manera habitual usando 1,9 g (4,4 mmol) de la sal de fosfonio suspendida en 4 ml de dioxano y 2,3 ml de n-BuLi (1,5M en hexano), se agregó a 180 mg de **84** en 4 ml de dioxano. Se reflujo durante 20 hs, y la mezcla de reacción se trató como en el caso **A** obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluida con hexano:AcOEt (75:25). Se obtuvieron 80 mg (37%) de **85**.

Colesterol (86)

Una solución del compuesto **85** (130 mg; 0,34 mmol) en 10 ml de dioxano:AcOH (50:1) se hidrogenó a 1 atmósfera de presión de hidrógeno sobre 35 mg de PtO_2 durante 4 horas. Se agregaron luego 35 mg adicionales del catalizador y se prosiguió la hidrogenación durante 6 hs más. Se filtró la mezcla a través de un embudo de vidrio sinterizado y la solución resultante se evaporó para obtener 111 mg (85%) de la mezcla de epímeros en C-20 del colesterol que se separó por CLAR empleando una columna Beckman Ultrasphere ODS-2 de 5 μm de tamaño de partícula y 250 mm de longitud por 10 mm de diámetro interno eluida con metanol. Se recuperaron 75 mg de una muestra idéntica espectroscópicamente a una muestra auténtica de colesterol, y 31 mg de 20-isocolesterol.

20-Isocolesterol:

RMN ^1H : 0,68(3H,s,Me-18); 0,82(3H,d,J=6,5 Hz,Me-21);
0,87(6H,d,J=6,5 Hz,Me-26 y Me-27); 1,01(3H,s,Me-19); 3,52(1H,m,H-3); 5,35(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 12,2(C-18); 18,8(C-21); 28,1(C-16); 35,3(C-20);
35,7(C-22); 55,8(C-17) (sólo las señales diferentes a las del
colesterol).

Preparación de compuestos involucrados en los estudios previos a
la síntesis de colesterol.

3 β -O-(Tetrahidropiranyl)-androst-5-en-17-ona (87)

A una solución de 430 mg (1,49 mmol) de androst-5-en-3 β -ol-17-ona (78) en 10 ml de diclorometano anhidro se agregaron 0,27 ml (3,00 mmol) de dihidropirano y 70 mg de PPTS. Se dejó agitando a temperatura ambiente durante 20 hs y se agregaron luego 10 ml más de diclorometano. Se lavó con NaCl (ss) y se secó sobre MgSO₄. Se evaporó el solvente obteniéndose 530 mg (96%) de **87** como una mezcla de epímeros en C-1'.

Pf: 170-173° (MeOH) (lit. 174-176° [van Boom, 1973]).

RMN ^1H (ppm): 0,88(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 3,51(2H,ba,H-5'); 3,91(1H,m,H-3); 4,72(1H,ba,H-1'); 5,39(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 13,5(C-18); 19,3(C-19); 19,8(C-4'); 20,3(C-11);
21,8(C-15); 25,4(C-3'); 27,9 y 29,6(C-2'); 30,7(C-7); 31,2(C-2 y
C-12); 31,4(C-8); 35,6(C-16); 36,8(C-1); 37,3(C-10); 38,7(C-1);
40,1(C-4); 47,3(C-13); 50,2(C-9); 51,7(C-14); 62,5(C-5'); 75,7(C-3);
96,7(C-1'); 120,5(C-6); 140,9(C-5); 220,2(C-17).

EM (m/z, %): 372(M⁺, 1); 270(M⁺-C₅H₁₀O₂, 83); 85(100).

3- β -O-(t-Butildimetilsilil)-androst-5-en-17-ona (88)

A una solución de androstenolona (400 mg; 1,39 mmol) en 10 ml de DMF anhidra se agregaron 740 mg de t-BuMe₂SiCl y 940 mg de imidazol. Se agitó durante 1 h a 20° luego de lo cual se diluyó la mezcla de reacción con 50 ml de Et₂O y se lavó con NaCl (ss) (5x50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó para obtener 550 mg (98%) del compuesto **88** puro.

Pf: 145-147° (lit. 146-147° (MeOH) [Hosoda, 1973]).

RMN ^1H (ppm): 0,06(6H,s,Me₂Si); 0,88(3H,s,Me-18);

0,90(9H,s,Me₃CSi); 1,03(3H,s,Me-19); 3,50(1H,m,H-3);
5,32(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 402(M⁺,1); 345(M⁺-Me₃C,92); 75(100).

3-β-O-(Tetrahidropiranyl)-17β-ciano-17α-hidroxi-androst-5-eno
(89)

A una suspensión del compuesto **87** (1g; 2,7 mmol) y KCN (0,74 g; 11,4 mmol) en 10 ml de MeOH anhidro se agregaron gota a gota en un lapso de 30 min., 0,25 ml(4,4 mmol) de AcOH. La agitación se mantuvo durante 16 hs comprobándose, por ccd, que la reacción no se había completado. Se agregaron entonces 0,3 ml más de AcOH y se prosiguió la agitación durante 3 hs más. Luego se agregaron 1 ml de AcOH y 50 ml de agua, se extrajo con diclorometano (3x50 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO₃ (5%) y agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 995 mg (92%) de **89** puro.

Pf: 206-208°.

RMN ¹H (ppm): 0,95(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 3,52(2H,ba,H-5'); 3,82(1H,ba,OH); 3,92(1H,m,H-3); 4,78(1H,ba,H-1'); 5,36(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 399(M⁺,1); 297(M⁺-C₅H₁₀O₂,17); 270(297-HCN,76); 85(100).

Deshidratación del compuesto (89).

A una solución de 50 mg de **89** en 1 ml de piridina anhidra se agregaron 70 μl de POCl₃. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se observó, por ccd, la desaparición completa del sustrato. Ello ocurrió recién a los 5 días de reacción. Se cortó y se purificó la reacción de la manera habitual recuperándose 30 mg de producto. El espectro de RMN de ¹³C del mismo indicó que se trataba de una mezcla del nitrilo α,β-insaturado buscado y de 17-ciano-androsta-5,16-dien-3β-ol. RMN ¹³C (ppm): 75,7(C-3 de THPOR) y 71,3(C-3 de HOR) entre otras señales.

3β-O-(t-Butildimetilsilil)-(20E)-colest-5,20(22)-dieno (92)

A una suspensión de bromuro de trifenil-(4-metil)-1-pentilfosfonio (1,85 g; 4,3 mmol) en 3 ml de tolueno, contenida en un tubo de centrifuga tapado con un septum, se agregaron 2,0 ml de una solución de n-BuLi (2,16 M), gota a gota y bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión resultante se centrifugó durante 5 min. y se tomo el sobrenadante con una jeringa. La solución así obtenida, de intenso color rojo, se agregó a una solución a reflujo del compuesto *3β-O-(t-butildimetilsilil)-Pregn-5-en-20-ona (83)* (250 mg; 0,58 mmol) en 3 ml de tolueno. Se prosiguió el reflujo durante 24 hs, se dejó que la solución alcanzara temperatura ambiente y se agregaron luego 50 ml de NH₄Cl (ss). Se extrajo con diclorometano (3x50 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:CH₂Cl₂ (95:5) recuperándose 80 mg (28%) del compuesto **92** puro.

Pf: 210-215° (d).

RMN ¹H (ppm): 0,06(6H,s,Me₂Si); 0,56(3H,s,Me-18); 0,89(9H,s,Me₃CSi); 1,00(3H,s,Me-19); 1,62(3H,s,Me-21); 3,48(1H,m,H-3); 5,19(1H,t, J=7 Hz,H-22); 5,32(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): 0,5(Me₂Si); 13,0(C-18); 17,9(C-21); 18,3(Me₃CSiO); 19,6(C-19); 21,2(C-11); 22,7(C-26 y C-27); 24,5(C-15); 24,9(C-23); 26,0(Me₃CSiO y C-16); 27,8(C-25); 32,0(C-2*); 32,2(C-7*); 32,4(C-8); 36,8(C-10); 37,5(C-1); 38,9(C-24); 39,3(C-12); 43,0(C-4); 43,5(C-13); 50,6(C-9); 56,5(C-14); 59,0(C-17); 72,7(C-3); 121,1(C-6); 125,7(C-22); 134,3(C-20); 141,6(C-5).

EM (m/z,%): 498(M⁺,5); 483(M⁺-CH₃,5); 441(M⁺-Me₃C,100); 75 (Me₃SiOH,67).

3β-O-(t-Butildimetilsilil)-colest-5-eno (93)

Una solución del compuesto **92** (210 mg; 0,42 mmol) en 10 ml de dioxano:AcOH (50:1) se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente sobre 30 mg de PtO₂ durante 4 hs. Se agregaron luego 30 mg adicionales de PtO₂ y se prosiguió la hidrogenación durante 24 hs más. Se filtró el catalizador y se evaporó el solvente para obtener 210 mg (99%) del compuesto **93** como mezcla

de epímeros en C-20 en relación 3,5 a 1 favorable al epímero 20-R según se observó por RMN de ^{13}C .

RMN ^1H (ppm): 0,06(6H,s,Me₂Si); 0,68(3H,s,Me-18); 0,87 (6H,d,J=6Hz,Me-26 y Me-27); 0,90(9H,s,Me³CSi); 1,00(3H,s,Me-19), 3,48(1H,m,H-3).

RMN ^{13}C (ppm): 0,5(Me₂Si); 12,0(C-18); 12,2(18 del 20S); 18,3 (Me₃CSiO); 18,8(C-21); 19,5(C-19); 21,2(C-11); 22,7(C-26); 22,9 (C-27); 24,0 (C-23); 24,4(C-15); 26,0(Me₃CSiO); 28,1(C-25); 28,3 (C-16); 32,1(C-2*); 32,2(C-7*); 35,3(C-20S); 35,9(C-20); 36,3 (C-22); 36,7(C-10); 37,5(C-1); 39,6(C-24); 40,0(C-12); 42,4 (C-13); 42,9(C-4); 50,4(C-9); 55,9(C-17 del 20S); 56,3(C-17); 56,9(C-14); 72,7(C-3); 121,1(C-6); 141,5(C-5).

EM (m/z;%): 500(M⁺,1); 485(M⁺-CH₃,4); 443(M⁺-Me₃C, 100); 75(Me₂SiOH,94).

Hidrogenación del doble enlace C-20,C-22.

Método A: Ni Raney/etanol.

A una solución de (20E)-Colesta-5,20(22)-dien-3 β -ol (85) (35 mg; 0,09 mmol) en 8 ml de EtOH anhidro se agregó 1 ml de una suspensión de Ni Raney en EtOH (0,6 g de Ni/ml). La mezcla se agitó a 50° durante 15 hs sin observarse modificación alguna del sustrato (CGL, SP-2330, T=220°).

Método B: Pd/C /AcOEt.

Una solución de 50 mg (0,13 mmol) de 85 en 4 ml de AcOEt a la que se agregaron 15 mg de Pd/C (10%) se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 24 hs. Se filtró el catalizador y la solución remanente se evaporó para rendir 50,5 mg (100%) del compuesto 5 α -Colestan-3 β -ol (94) como mezcla de epímeros en C-20 en relación 2,5 a 1 favorable al epímero 20-R según se observó por RMN de ^{13}C .

RMN ^1H (ppm): 0,66(3H,s,Me-18); 0,81(3H,s,Me-19); 0,87(6H,d,J=6 Hz,Me-26 y Me-27); 3,59(1H,ba,H-3 α); 3,68(1H,ba,OH).

RMN ^{13}C (ppm): 12,5(C-18 y C-19); 18,8(C-21); 21,4(C-11); 22,8 (C-26 y C-27); 24,1(C-23); 24,3(C-15); 28,2(C-25); 28,4(C-16); 28,9(C-6); 31,6(C-2); 32,2(C-7); 35,3(C-20 S); 35,6(C-8 y C-10); 35,7(C-20 R); 35,9(C-22 del 20 S); 36,3(C-22); 37,1(C-1); 38,3

(C-4); 39,5(C-24); 40,1(C-12); 42,8(C-13); 45,0(C-5); 54,5(C-9); 56,0(C-17 del 20 S); 56,4(C-17); 56,6(C-14); 71,4(C-3).

EM (m/z, %): 388(M⁺, 13); 370(M⁺-H₂O, 1); 45(100).

Síntesis de [20,21-¹³C₂]-pregnenolona

[20-¹³C]-17ξ-Ciano-17ξ-hidroxi-androst-5-en-3β-ol (95)

Partiendo de 1,04 g de androstenolona y de 1 g de K¹³CN (99% de pureza isotópica) y aplicando la misma técnica que en la preparación del compuesto 79 (ver página 208) se obtuvieron 1,13 g (99%) de 95.

RMN ¹H (ppm): 0,97(3H, s, Me-18^{*}); 0,99(3H, s, Me-19^{*}); 3,70(1H, m, H-3); 5,30(1H, m, H-6) (en Py-d₅).

RMN ¹³C (ppm): 122,3(s, ¹³C-20) (en Py-d₅).

EM (m/z, %): 316(M+1, 18); 298(M+1 - H₂O, 16); 288(M+1 - H¹³CN, 100); 270(288-H₂O, 49).

[20-¹³C]-3β-O-(t-Butildimetilsilil)-17-ciano-17-hidroxi-androst-5-eno (96)

A partir de 1,1 g de 95 se empleó el mismo procedimiento que en la preparación de 80 (ver página 208) para obtener 1,49 g (100%) del compuesto 96.

RMN ¹H (ppm): 0,06(6H, s, Me₂Si); 0,90(9H, s, Me₃CSi); 0,96(3H, s, Me-18); 1,03(3H, s, Me-19); 3,50(1H, m, H-3); 5,32(1H, m, H-6).

RMN ¹³C (ppm): 120,7(s, ¹³C-20).

EM (m/z, %): 402(M+1 - H¹³CN, 1); 373(M+1 - Me₃C, 8); 345(M+1 - H¹³CN - Me₃C, 100); 271(345-Me₃SiO, 4).

[20-¹³C]-3β-O-(t-Butildimetilsilil)-17-ciano-androsta-5,16-dieno (97)

Se aplicó el procedimiento descrito en la preparación del compuesto 81 (ver página 209), prolongando el tiempo de reacción a 72 hs, para obtener 430 mg (45%) de 97 partiendo de 1 g de 96.

RMN ¹H (ppm): 0,06(6H, s, Me₂Si); 0,90(9H, s, Me₃CSi); 0,95(3H, s, Me-18); 1,04(3H, s, Me-19); 3,48(1H, m, H-3); 5,32(1H, m, H-6);

6,64(1H, m, H-16).

RMN ¹³C (ppm): 115,9(s, ¹³C-20).

EM (m/z, %): 397(M+1 - CH₃, 1); 355(M+1 - Me₃C, 96); 281(M+1 -

$\text{Me}_3\text{CSiMe}_2\text{O}, 2$; 279(4); 75($\text{Me}_2\text{SiOH}, 100$).

[20- ^{13}C]-3 β -O-(*t*-Butildimetilsilil)-17 β -ciano-androst-5-eno (98)

A partir de 400 mg de 97 y mediante la misma técnica usada en la preparación de 82 (ver página 209) se obtuvieron 402 mg (100%) del compuesto 98.

RMN ^1H (ppm): 0,06(6H, s, Me_2Si); 0,90(9H, s, Me_3CSi); 0,93(3H, s, Me-18); 1,02(3H, s, Me-19); 3,48(1H, m, H-3); 5,32(1H, m, H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 121,4(s, ^{13}C -20).

EM (m/z, %): 357(M+1 - $\text{Me}_3\text{C}, 43$); 283(M+1 - $\text{Me}_3\text{CSiMe}_2\text{O}, 1$); 281(5); 75($\text{Me}_2\text{SiOH}, 100$).

[20,21- $^{13}\text{C}_2$]-3 β -O-(*t*-Butildimetilsilil)-pregn-5-en-20-ona (99)

A una solución de ioduro de [^{13}C]-metilmagnesio, preparada a partir de Mg y ioduro de metilo- ^{13}C de 99% de pureza isotópica (0,6 ml; 9,3 mmol) en 2 ml de Et_2O anhidro, se agregó una solución del compuesto 98 (390 mg) en 15 ml de benceno anhidro. Luego se procedió como en la preparación de 69 (ver página 204) lográndose 285 mg (70%) del compuesto 99.

RMN ^1H (ppm): ver figura 13 (página 101).

RMN ^{13}C (ppm): 31,5(d, $J^{13}\text{C}-^{13}\text{C}=39,4$ Hz, ^{13}C -21); 209,6(d, $J^{13}\text{C}-^{13}\text{C}=39,4$ Hz, ^{13}C -20).

EM (m/z, %): 375(M+2 - $\text{Me}_3\text{C}, 74$); 301(M+2 - $\text{Me}_3\text{CSiMe}_2\text{O}, 2$); 299(4); 75($\text{Me}_2\text{SiOH}, 100$); 45($^{13}\text{CH}_3^{13}\text{CO}, 85$).

[20,21- $^{13}\text{C}_2$]-Pregnenolona (100)

Utilizando idéntico procedimiento al aplicado en la preparación de pregnenolona (84) se obtuvieron, partiendo de 270 mg de 99, 200 mg (95%) del compuesto 100.

RMN ^1H : ver figura 14 (página 102).

RMN ^{13}C : ver figura 15 (página 103).

EM: ver figura 16 (página 103).

Síntesis de [21- ^{13}C]-colesterol

[21- ^{13}C]-3 β -O-(*t*-Butildimetilsilil)-pregn-5-en-20-ona (101)

Partiendo de una solución de ioduro de [^{13}C]-metilmagnesio, preparada a partir de Mg y ioduro de metilo- ^{13}C de 99% de

pureza isotópica (0,3 ml; 4,8 mmol) y de 200 mg (0,48 mmol) del compuesto 3 β -O-(*t*-Butildimetilsilil)-17 β -ciano-androst-5-eno (82), se obtuvieron 134 mg (65%) del compuesto **101** por aplicación de la técnica descrita en la preparación de **69** (ver página 203).

RMN ^1H (ppm): 0,06(6H,s,Me₂Si); 0,64(3H,s,Me-18); 0,90(9H,s,Me₃C); 1,01(3H,s,Me-19); 2,13(3H,d,J¹³C-H=127,0 Hz), 3,55(1H,m,H-3); 5,35(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 31,6(s,¹³C-21).

EM (m/z,%): 431(M+1,1); 416(M+1 - CH₃,4); 374(M+1 - Me₃C,100); 300(M+1 - Me₃CSiMe₂O,3); 298(7); 75(Me₂SiOH,99); 44(¹³CH₃CO,40)

[21-¹³C]-Pregnenolona (102)

El empleo de la técnica usada para la preparación de **84** (ver página 210) permitió obtener 90 mg (95%) del compuesto **102**, a partir de 130 mg de **101**.

RMN ^1H (ppm): 0,64(3H,s,Me-18); 1,01(3H,s,Me-19); 2,13(3H,dd,J¹³C-H=127,0 Hz,Me-21); 3,55(1H,m,H-3); 5,35(1H,m,H-6)

RMN ^{13}C (ppm): 31,6(s,¹³C-21).

EM (m/z,%): 317(M+1,49); 301(M+1 - ¹³CH₃,4); 299(M+1 - H₂O,40); 284(301-OH,35); 273(M+1 - ¹³CH₃CO,5); 105(99); 67(100); 44(¹³CH₃CO,87).

[21-¹³C]-(20E)-Colecta-5,20(22)-dien-3 β -ol (103)

La aplicación del método **B** empleado en la preparación del colesteno **85** (ver página 210) a 85 mg de **102**, produjo 26 mg (25%) del compuesto **103**.

RMN ^1H : ver figura 17 (página 105).

RMN ^{13}C : 17,8(s,¹³C-21).

[21-¹³C]-Colesterol (104)

El colesteno **103** (25 mg) sometido a hidrogenación durante 36 hs, en condiciones similares a las empleadas en la preparación de colesterol, rindió 21 mg de la mezcla de epímeros en C-20 de [21-¹³C]-colesterol. Esta se separó por CLAR al igual que en el caso de **86** para dar 10 mg del compuesto **104** y 3 mg de [21-¹³C]-20-isocolesterol (105).

104:

RMN ^1H : ver figura 20 (página 108).

RMN ^{13}C : ver figura 22 (página 110).

EM: ver figura 23 (página 110).

105:

RMN ^1H : ver figura 21 (página 109).

RMN ^{13}C (ppm): 18,7(s, ^{13}C -21).

EM (m/z, %): 387(M+1, 100); 372(M+1 - CH_3 , 32); 369(M+1 - H_2O , 53).

Preparación de ditianos y ditiolanos.*3,17-Bis-cicloetilénditio-androst-4-eno (106)*

A una solución de 200 mg (0,7 mmol) de androstenediona (21) en 10 ml de metanol anhidro se agregaron 0,12 ml (1,45 mmol) de etanoditiol y 0,19 ml (1,61 mmol) de trifluoruro de boroeterato. Luego de agitar por 1 h a temperatura ambiente se evaporó el solvente, se disolvió el residuo en AcOEt y se lavó con bicarbonato de sodio (5%). Se secó (Mg_2SO_4) y se evaporó obteniéndose 290 mg de **106** puro (95%).

Pf: 171-173° (lit. 170-174° [Evans, 1977]).

RMN ^1H (ppm): 0,94(3H, s, Me-18); 1,03(3H, s, Me-19); 3,20(4H, m, - $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -17); 3,34(4H, m, - $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -3); 5,50(1H, ba, H-4).

RMN ^{13}C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 438(M^+ , 1); 302(74); 144(100).

3,20-Bis-cicloetilénditio-pregn-4-eno (107)

Partiendo de progesterona (300 mg; 0,96 mmol) se aplicó la misma técnica empleada en la preparación de **106** obteniéndose 440 mg (98%) del compuesto **107** puro.

Pf: 173-175° (lit. 175-179° [Evans, 1977]).

RMN ^1H : 0,83(3H, s, Me-18); 1,02(3H, s, Me-19); 1,87(3H, s, Me-21); 3,24(4H, m, - $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ - C-20); 3,36(4H, m, - $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ - C-3); 5,49(1H, ba, H-4).

RMN ^{13}C (ppm): 13,4(C-18); 18,7(C-19); 21,3(C-11); 24,1(C-15); 27,1(C-16); 32,2(C-7); 32,6(C-6); 35,6(C-8 y C-21); 36,7(C-1); 37,4 y 38,1(- $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ - en C-3); 37,5(C-12); 39,6(C-2^a); 40,0(C-10^a); 40,1 y 41,4(- $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ - en C-20); 44,3(C-13); 54,0(C-9^b);

56,0(C-14^b); 60,8(C-17); 65,9(C-3); 71,3(C-20); 124,1(C-4);
146,3(C-5).

EM (m/z; %): 466(M⁺,6); 438(M⁺-C₂H₄,6); 119(100).

3β-Acetoxi-17-cicloetilénditio-androst-5-eno (108)

A una solución de acetato de androstenolona (360 mg; 1,09 mmol) en 10 ml de MeOH se le aplicó el mismo tratamiento descrito en la preparación de **106** durante 20 hs. Se obtuvieron 420 mg de un crudo compuesto por dos sustancias en relación 9 a 1 aproximadamente (ccd). Estos se aislaron por cromatografía en columna de sílica 60 eluída primero con hexano:AcOEt (80:20) y luego con los mismos solventes en relación 65:35. Se obtuvieron 40 mg (9%) de **108** y 300 mg (72%) del compuesto 3β-hidroxi-17-cicloetilénditio-androst-5-eno (109).

108:

Pf: 184-187°.

RMN ¹H (ppm): 0,94(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19);
2,04(3H,s,CH₃CO₂-); 3,22(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 4,60(1H,m,H-3);
5,39(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 406(M⁺,5); 378(M⁺-C₂H₄,3); 346(M⁺-CH₃CO₂H,100);
286(346-C₂H₄S,6); 252(286-SH₂,46).

109:

Pf: 167-168°.

IR (cm⁻¹): 3400 (O-H).

RMN ¹H (ppm): 0,94(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 1,69(1H,ba,OH);
3,22(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 3,50(1H,m,H-3); 5,36(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 364(M⁺,97); 336(M⁺-C₂H₄,43); 304(M⁺-C₂H₄S,7); 270(304-SH₂,34); 118(100).

3β-Acetoxi-17-cicloetilénoxitio-androst-5-eno (110)

A una solución de acetato de androstenolona (1 g; 3,0 mmol) en 5 ml de dioxano se agregaron 1g de mercaptoetanol, 1,25 g de ZnCl₂ recientemente fundido y 1,25 g de Na₂SO₄ (anh.), enfriando a

0° durante el agregado del ZnCl_2 . La mezcla se mantuvo a 20° durante 20 hs, luego de lo cual se agregó agua y se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron para obtener 990 mg del compuesto 110 (82%) prácticamente puro (ccd). La muestra analítica se obtuvo por recristalización de cloroformo-metanol.

Pf: 173-175° (lit. 174-176° [Romo, 1951]).

RMN ^1H (ppm): 0,85(3H, s, Me-18); 1,04(3H, s, Me-19); 2,05(3H, s, MeCO_2^-); 2,92(2H, m, $-\text{SCH}_2$); 4,05(2H, m, $-\text{OCH}_2$); 4,62(1H, m, H-3); 5,39(1H, m, H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 17,2(C-18); 19,3(C-19); 20,3(C-11); 21,3(CH_3CO_2^-); 24,2(C-15); 27,7(C-2); 29,3(C-12); 31,6(C-7); 32,7(C-8); 32,9(C-16); 36,6(C-10); 37,0(C-1); 38,0(C-4); 39,8($-\text{SCH}_2-$); 47,8(C-13); 49,7(C-9); 50,6(C-14); 70,1($-\text{OCH}_2-$); 73,7(C-3); 105,3(C-17), 122,2(C-6); 139,4(C-5); 170,1(MeCO_2^-).

EM (m/z, %): 390(M^+ , 0,5); 330($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, 99); 270($330 - \text{C}_2\text{H}_4\text{S}$, 97); 252($270 - \text{H}_2\text{O}$, 100).

2-Cicloetilénditio-alcanfor (111)

Método A:

A una solución de alcanfor (1 g, 6,57 mmol) en 10 ml de MeOH anhidro se agregaron etanoditioal (0,94 ml, 11,2 mmol) y trifluoruro de boro eterato (0,93 ml, 7,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs a temperatura ambiente, luego de lo cual se evaporó el solvente de la reacción. Se disolvió el residuo resultante en diclorometano (50 ml), se lavó con NaHCO_3 (ss) y luego con agua, se secó (MgSO_4) y se evaporó para obtener 1,28 g del producto crudo. Este fue purificado por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (80:20) obteniéndose 1,15 g (77%) de 111 puro.

RMN ^1H (ppm): 0,86(3H, s, Me-10); 0,98(6H, s, Me-8 y Me-9); 3,12(4H, m, CH_2-S).

RMN ^{13}C (ppm): 12,5(C-10); 21,0(C-8^a); 21,4(C-9^a); 26,8(C-5); 35,3(C-6); 37,4 y 41,4($-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$); 46,6(C-4); 49,2(C-3^b); 54,7(C-7^b); 55,1(C-1); 77,2(C-2).

EM (m/z, %): 228(M^+ , 23); 200(37); 118(100).

Método B:

A una solución de alcanfor (1,06 g, 6,57 mmol) y etanoditiol (0,94 ml, 11,2 mmol) en 10 ml de cloroformo se agregaron 2 ml del complejo trifluoruro de boro.metanol (50% de BF_3). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs, luego de lo cual se agregaron 40 ml de diclorometano y se lavó con NaHCO_3 (ss) y agua hasta neutralidad. Se secó (MgSO_4) y se evaporó para obtener 1,29 g de un líquido viscoso ligeramente amarillento de 80% de pureza (CGL, OV-101 2%). El rendimiento de la reacción fue, por lo tanto, del 69%.

*2-Ciclopropilénditio-alcanfor (112)*Método A:

A una solución de alcanfor (1g, 6,57 mmol) en 10 ml de MeOH anhidro se agregaron propanoditiol (1,15 ml, 11,2 mmol) y trifluoruro de boro eterato (0,93 ml, 7,6 mmol). La mezcla de reacción se trató de igual modo que en la preparación del compuesto **111** recuperándose 1,07 g (67%) de **112** puro en forma de un líquido viscoso.

RMN ^1H (ppm): 0,86(3H,s,Me-10); 1,05(3H,s,Me-8); 1,12(3H,s,Me-9); 2,82(6H,m,- $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -).

RMN ^{13}C (ppm): 12,8(C-10); 21,9(C-8^a); 22,5(C-9^a); 25,1 (- $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -); 26,8(C-5); 27,6(C-6); 29,2 y 32,2(- $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -); 46,2(C-4); 48,6(C-3^b); 50,2(C-7^b); 55,0(C-1); 61,5(C-2).

EM (m/z,%): 242(M^+ ,100); 168(M^+ - $\text{C}_3\text{H}_6\text{S}$,39); 108(96).

Método B:

A una solución de alcanfor (1,07 g, 6,57 mmol) y propanoditiol (1,15 ml, 11,2 mmol) en 10 ml de cloroformo se agregó ZnCl_2 anhidro (700 mg, 5,1 mmol). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs luego de lo cual se agregaron 40 ml de diclorometano. Se lavó con agua (3x50 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó para obtener 1,06 g de **112** como un líquido amarillento de 53% de pureza (CGL, OV-101 2%). El rendimiento de la reacción fue, por lo tanto, del 35%.

1-Cicloetilénditio-carvona (113)

Una solución de carvona (2 g; 13,3 mmol), etanoditio (1,5 ml; 17,9 mmol) y 1,5 ml de trifluoruro de boro eterato en 10 ml de MeOH anhidro se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs. La mezcla de reacción se trató del modo usual obteniéndose 2,9 g de un líquido amarillento de 79% de pureza (CGL, OV-101 2%) lo que significó un rendimiento del 76% en **113**. La muestra analítica se obtuvo purificando el crudo por filtración a través de una columna seca de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (70:30).

RMN ^1H (ppm): 1,75(3H,s,Me-10); 1,97(3H,s,Me-7); 3,34(4H,m,-SCH₂); 4,75(2H,ba,H-9); 5,55(1H,ba,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 19,8(C-7); 20,9(C-10); 30,8(C-5); 40,2 y 41,2(-SCH₂CH₂S-); 41,4(C-4); 48,4(C-3); 70,1(C-2); 109,1(C-9); 126,1(C-6); 135,1(C-1); 148,5(C-8).

EM (m/z, %): 226(M⁺,100); 198(M⁺-C₂H₄,11); 166(M⁺-C₂H₄S₂,58).

1-Ciclopropilénditio-carvona (114)

A una solución de carvona (1g, 6,7 mmol) en 10 ml de MeOH anhidro se agregaron propanoditio (1,0 ml, 10,0 mmol) y 1,0 ml de trifluoruro de boro eterato. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs y luego se procesó del modo habitual. Se obtuvieron 1,5 g de un líquido amarillento de 98% de pureza (CGL, OV-101 2%) lo que indicó un rendimiento en **114** del 91%.

RMN ^1H (ppm): 1,76(3H,s,Me-10); 2,02(3H,s,Me-7); 2,85(6H,m,-S(CH₂)₃S-); 4,76(2H,ba,H-9), 5,60(1H,ba,H-6).

EM (m/z, %): 242(M⁺,100); 168(M⁺-C₃H₆S,29).

1-Cicloetilénditio-2-metil-ciclohexanona (115)

Una solución de 2-metil-ciclohexanona (2 g, 17,8 mmol), etanoditio (2,5 ml, 23,6 mmol) y trifluoruro de boro eterato (2,5 ml, 20,3 mmol) en 10 ml de metanol anhidro se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 hs. La mezcla de reacción se procesó de la manera habitual para obtener 2,87 g de **115** como un líquido viscoso incoloro de 100% de pureza (CGL, OV-101 2%). Por lo tanto el rendimiento de la reacción fue del 86%.

RMN ^1H (ppm): 1,13(3H,d,J=6Hz,Me-7); 3,24(4H,ba,-SCH₂).

RMN ^{13}C (ppm): 18,3(C-7); 24,9(C-5^a); 26,1(C-4^a); 34,2(C-3); 38,8 y 39,4(-SCH₂CH₂S-); 43,0(C-2); 44,8(C-6); 74,6(C-1).

EM (m/z, %): 188(M⁺, 100); 160(98); 145(98); 95(87).

1-Ciclopropilén-2-metil-ciclohexanona (116)

Una solución de 2-metil-ciclohexanona (2g, 17,8 mmol), propanoditiol (2,7 ml, 26,9 mmol) y trifluoruro de boro eterato (2,6 ml, 21,1 mmol) en 10 ml de MeOH anhidro se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 hs. La mezcla de reacción se procesó del modo usual obteniéndose 3,5 g de **116** como un líquido viscoso incoloro de 100% de pureza (CGL, OV-101 2%), siendo entonces 97% el rendimiento de la reacción.

RMN ^1H (ppm): 1,19(3H, d, J=6Hz, Me-7); 2,90(6H, m, -SCH₂CH₂CH₂S-).

RMN ^{13}C (ppm): 17,2(C-7); 22,6(C-5); 24,8(C-3^a); 24,9(-SCH₂CH₂^a-); 25,7(C-4^a); 29,7(C-6^b); 36,6(-SCH₂^b); 41,4(C-2); 56,2(C-1).

EM (m/z, %): 202(M⁺, 100); 145(99); 95(99).

Preparación de tetrahidropiraniéteres y de acetales

2-Cicloetiléndioxi-alcanfor (123)

A una suspensión de alcanfor (600 mg; 3,95 mmol) en 8 ml de etilénglicol y 2 ml de ortoformiato de etilo se agregaron 30 mg de TsOH. La mezcla se mantuvo a 40° durante 24 hs y luego se trató de la manera habitual para obtener 750 mg de un aceite. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (90:10) recuperándose 680 mg (88%) del compuesto **123** como un líquido viscoso puro (CGL, HP-101).

RMN ^1H (ppm): 0,79(3H, s, Me-10); 0,83(3H, s, Me-8); 1,01(3H, s, Me-9); 3,84(4H, m, -OCH₂CH₂O-).

RMN ^{13}C (ppm): 9,7(C-10); 20,3(C-8 y C-9); 26,8(C-5); 29,3(C-6); 44,5(C-7^{*}); 44,8(C-4); 47,9(C-3^{*}); 52,0(C-1); 63,5 y 64,7(-OCH₂); 116,8(C-2).

3β-Acetoxi-17-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (125)

Partiendo de acetato de androstenolona (350 mg; 1,06 mmol) y aplicando el mismo procedimiento que el empleado en la preparación del compuesto **23** se obtuvieron 420 mg del producto crudo.

Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (83:17) recuperándose 305 mg (77%) de **125** puro.

Pf: 116-119°.

IR (cm^{-1}): 1730 (C=O).

RMN ^1H (ppm): 0,87(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 2,03(3H,s,CH₃CO₂-); 3,88(4H,m,-OCH₂CH₂O-); 4,60(1H,m,H-3); 5,38(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z, %): 374(M⁺, 0,5); 314(M⁺-CH₃CO₂H, 81); 270(314-C₂H₄O, 100); 252(270-H₂O, 75); 99(C₅H₇O₂, 99).

3-Cicloetiléndioxi-pregn-5-en-20-ona (126)

A una suspensión de progesterona (460 mg; 1,46 mmol) en 4 ml de etilénglicol se agregaron 3 ml de ortoformiato de etilo y 15 mg de TSOH. La mezcla de reacción se mantuvo a 40° durante 6 hs luego de lo cual se procedió como en el caso anterior. Se obtuvieron 550 mg de un crudo que se purificó por cromatografía en columna de sílica gel eluída 60 con hexano:AcOEt (85:15) recuperándose 400 mg (77%) de **126**.

Pf: 159-161° (lit. 173-176° (MeOH) [Maier, 1985]).

RMN ^1H (ppm): 0,64(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 2,13(3H,s,Me-21); 3,96(4H,m,-OCH₂CH₂O-); 5,36(1H,m,H-6).

RMN ^{13}C (ppm): 13,1(C-18); 18,8(C-19); 64,1 y 64,3(-OCH₂CH₂O-); 109,2(C-3); 121,6(C-6) y 139,9(C-5) entre otras señales.

EM (m/z, %): 358(M⁺, 45); 343(M⁺-CH₃, 1); 314(M⁺-C₂H₄O, 4); 99(C₅H₇O₂, 100); 43(CH₃CO, 28).

3-Cicloetiléndioxi-6-metil-17 α -acetoxi-pregn-5-en-20-ona (128)

A una suspensión de 300 mg (0,78 mmol) de 6 α -metil-17 α -acetoxi-pregn-4-en-3,20-diona (127) en 3 ml de etilénglicol se agregaron 2 ml de ortoformiato de etilo y 15 mg de TSOH. La mezcla se mantuvo a 40° durante 72 hs luego de lo cual se volcó sobre NaHCO₃ (5%) y se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para obtener 250 mg del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (80:20) obteniéndose 155 mg (46%) de **128**

puro.

Pf: 143-145°.

RMN ¹H (ppm): 0,60(3H,s,Me-18); 0,97(3H,s,Me-19); 1,58(3H,s,Me-C-6); 1,99(3H,s,MeCO₂-); 2,06(3H,s,Me-21); 3,91(4H,m,-OCH₂CH₂O-).

RMN ¹³C (ppm): 14,2(C-18); 19,0(C-19); 19,5(Me-C6); 64,1 y 64,3(-OCH₂CH₂O-); 109,6(C-3); 125,7(C-6) y 132,2(C-5) entre otras señales.

EM (m/z,%): 430(M⁺,4); 283(19);99(C₅H₇O₂,100).

17-Cicloetiléndioxi-3β-hidroxi-androst-5-eno (134)

A una solución de **125** (140 mg; 0,37 mmol) en 10 ml de THF anhidro se agregaron, bajo atmósfera de nitrógeno, 50 mg de LiAlH₄. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h luego de lo cual se agregaron cuidadosamente 50 ml de AcOEt. Se lavó con solución saturada de tartrato de sodio y potasio (3x50 ml) y con agua, se secó (MgSO₄) y se evaporó para obtener 130 mg del producto crudo. Este se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (55:45) recuperándose 100 mg (80%) de **134** puro.

Pf: 132-134°.

IR (cm⁻¹): 3400 (O-H).

RMN ¹H (ppm): 0,88(3H,s,Me-18); 1,03(3H,s,Me-19); 1,58(1H,ba,OH); 3,54(1H,m,H-3); 3,90(4H,m,-OCH₂CH₂O-); 5,38(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 332(M⁺,86); 314(M⁺-H₂O,4); 288(M⁺-C₂H₄O,5); 272(M⁺-C₂H₄O₂,11); 270(288-H₂O,79); 99(C₅H₇O₂,100).

3β-O-(Tetrahidropiranyl)-17-cicloetiléndioxi-androst-5-eno (132)

A una solución de **134** (150 mg; 0,45 mmol) en 5 ml de diclorometano se agregaron 0,1 ml de dihidropirano y 25 mg de PPTS. Se agitó durante 20 hs a 20° luego de lo cual se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó (MgSO₄) y evaporó para obtener 210 mg de un crudo que se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (90:10). Se recuperaron 145 mg (77%) de **132** puro.

Pf: 96-99°.

RMN ¹H (ppm): 0,88(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 3,54(2H,m,H-

5'); 3,90(5H,m,H-3 y -OCH₂CH₂O-); 4,72(1H,m,H-1');
5,38(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 416(M⁺,1); 356(M⁺-C₂H₄O₂,2); 332(M⁺-C₅H₈O,1); 314(M⁺-C₅H₁₀O₂,59); 270(314-C₂H₄O,12); 252(270-H₂O,20); 99(C₅H₇O₂,38); 57(100).

Reacción del compuesto 3β-O-(Tetrahidropiranyl)-androst-5-en-17-ona (87) con etilénglicol/ortoformiato de etilo

A una suspensión de **87** (194 mg; 0,52 mmol) en 1 ml de etilénglicol se agregaron 0,5 ml de ortoformiato de etilo y 10 mg de TsOH. La mezcla de reacción se mantuvo a 50° durante 6 hs luego de lo cual se procedió de la manera habitual. El crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (65:35) recuperándose 145 mg (84%) del compuesto **134** puro.

3-Cicloetiléndioxi-17β-O-(tetrahidropiranyl)-androst-5-eno (133)

Partiendo del compuesto 3-cicloetiléndioxi-androst-5-en-17β-ol (25) (160 mg; 0,48 mmol) y aplicando el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **132** se obtuvieron 210 mg de un crudo que consistía en una mezcla 1 a 1 de dos compuestos (ccd) que se aislaron mediante cromatografía en columna de sílica 60 eluída con hexano:AcOEt (85:15). Se recuperaron los compuestos **133** (75 mg; 38%) y 17β-O-(tetrahidropiranyl)-androst-4-en-3-ona (135) (55 mg; 31%), ambos como mezcla de epímeros en C-1'.

133:

RMN ¹H (ppm): 0,81(3H,s,Me-18); 1,04(3H,s,Me-19); 3,56(2H,m,H-5'); 3,94(5H,m,H-17 y -OCH₂CH₂O-); 4,62(1H,m,H-1'); 5,35(1H,m,H-6).

RMN ¹³C (ppm): 11,5(C-18); 18,8(C-19); 19,2 y 19,8(C-4'); 20,5(C-11); 23,3(C-15); 25,4(C-3'); 27,0 y 28,6(C-2'); 30,9(C-16 y C-8); 31,2(C-1); 31,6(C-7); 36,2(C-2); 36,5(C-10); 37,5(C-12); 41,6(C-4); 42,6(C-13); 49,6(C-9*); 51,2(C-14*); 61,6 y 62,5(C-5'); 64,0 y 64,2(-OCH₂CH₂O-); 83,9 y 86,3(C-17); 96,4 y 99,1(C-1'); 109,1(C-3); 121,6(C-6); 139,9(C-5).

EM (m/z;%): 416(M⁺,1); 356(M⁺-C₂H₄O₂,1); 314(M⁺-C₅H₁₀O₂,70); 270(314-C₂H₄O,10); 252(270-H₂O,15); 99(C₅H₇O₂,100).

135:

IR (cm⁻¹): 1650 (C=O).

RMN ¹H (ppm): 0,82(3H,s,Me-18); 1,20(3H,s,Me-19); 3,55(2H,m,H-5'); 3,88(1H,m,H-17); 4,63(1H,m,H-1'); 5,73(1H,m,H-4).

RMN ¹³C (ppm): 11,7(C-18); 17,4(C-19); 19,4 y 19,8(C-4'); 20,6 (C-11); 23,3(C-15); 25,5(C-3'); 27,1 y 28,7(C-2'); 31,0(C-16); 31,5(C-7); 32,7(C-6); 33,9(C-2); 35,4(C-8); 35,7(C-1); 36,6 y 37,4(C-12); 38,5(C-10); 42,7(C-13); 50,3(C-9*); 53,8(C-14*); 61,8 y 62,6(C-5'); 83,9 y 86,3(C-17); 96,5 y 99,3(C-1'); 123,6(C-4); 171,0(C-5); 199,2(C-3).

EM (m/z;%): 372(M⁺,1); 288(M⁺-C₅H₈O,100); 270(288-H₂O ó M⁺-C₅H₁₀O₂,10); 246(288-CH₂CO,90).

Remoción de tioacetales promovida por CuSO₄ (II) adsorbido en sílica gel

Método general

En un experimento típico, el sustrato (1 mmol) se trató con el reactivo CuSO₄-SiO₂ (para su preparación ver página 179) (2,0 g; 2,2 mmol CuSO₄) en cloroformo (20 ml) a reflujo. El progreso de la reacción se siguió mediante ccd o CGL y una vez completada el producto se aisló por filtración a través de una columna corta de sílica gel eluída con mezclas de hexano: AcOEt de composición variable según cada caso. Los rendimientos se calcularon por CGL (OV-101 2%, HP-101 ó HP-5), CLAR (RP-18, 10 μm, MeOH:H₂O=70:30 - 80:20) y por simple pesada de los productos que se obtuvieron libres de productos secundarios.

17-Cicloetilénditio-androst-4-en-3-ona (117)

Una suspensión de 55 mg (0,13 mmol) del compuesto 106 en 5 ml de cloroformo y 190 mg de CuSO₄ (II)/sílica gel se reflujo durante 3 hs. La mezcla de reacción se llevó a sequedad y el residuo resultante se purificó a través de una columna de sílica gel eluída con hexano:AcOEt (75:25). Se recuperaron 43 mg (91%) del compuesto 117 puro.

Pf: 156-160° (d).

IR (cm⁻¹): 1650 (C=O).

RMN ¹H (ppm): 0,97(3H,s,Me-18); 1,20(3H,s,Me-19); 3,21(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 5,74(1H,ba,H-4).

RMN ¹³C (ppm): ver tabla 19.

EM (m/z,%): 362(M⁺,64); 334(M⁺-C₂H₄,36); 269(59); 131(100).

Androsta-3,5-dien-17-ona (118)

Una suspensión del compuesto 3β-Acetoxi-17-cicloetilénditio-androst-5-eno (108) (25 mg, 0,06 mmol) y 120 mg del reactivo CuSO₄-SiO₂ (sílica Riedel-de Haën) en 2 ml de benceno se reflujo durante 48 hs. La mezcla se llevó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílica 60 eluida con hexano:AcOEt (80:20) recuperándose 7 mg de **118** (42%).

EM (m/z,%): 270(M⁺,100); 255(M⁺-CH₃,47); 242(M⁺-CO,23).

17-Cicloetilénditio-androsta-3,5-dieno (119)

Una suspensión de 50 mg (0,14 mmol) del compuesto **109** en 4 ml de cloroformo con el añadido de 340 mg de CuSO₄ (II)/sílica gel (sílica Riedel-de Haën) se reflujo durante 30 hs. La mezcla de reacción se llevó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel eluida con hexano:AcOEt (90:10). Se recuperaron 15 mg (31%) de **119**.

RMN ¹H (ppm): 0,95(3H,s,Me-18^{*}); 0,96(3H,s,Me-19^{*}); 3,22(4H,m,-SCH₂CH₂S-); 5,60(1H,m,H-4); 5,93(2H,m,H-3 y H-4).

RMN ¹³C (ppm): 17,2(C-18); 18,8(C-19); 20,6(C-11); 23,0(C-2); 23,9(C-15); 32,0(C-7 y C-8); 33,3(C-12); 34,1(C-1); 35,2(C-10); 39,2 y 39,5(-SCH₂CH₂S-); 42,9(C-16); 47,9(C-9); 48,8(C-13); 52,9(C-14); 80,4(C-17); 122,6(C-6); 125,1(C-4^{*}); 128,9(C-3^{*}); 141,4(C-5).

EM (m/z,%): 346(M⁺,100); 318(M⁺-C₂H₄,39); 286(M⁺-C₂H₄S,10); 284(318-SH₂,4); 252(286-SH₂,69).

Acido ciclohexanocarboxílico (120)

A una solución del compuesto 2-Ciclohexilidén-1,3-ditiociclohexano (36) (50 mg; 0,25 mmol) en 5 ml de benceno se agregaron 500 mg del reactivo, y la suspensión resultante se

calentó a reflujo durante 12 hs. Se evaporó el solvente y el residuo se filtró a través de una columna seca de sílica gel eluída con acetato de etilo. Se recuperaron 29 mg (91%) de 120 como un aceite.

RMN ^1H (ppm): 2,36(1H,m,H-2); 10,0(1H,ba,HOOC-).

EM (m/z,%): 128(M^+ ,75); 110($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$,54); 41(100).

Remoción de acetales y tetrahidropiranyléteres promovida por CuSO_4 (II) adsorbido en sílica gel

Método general

A una solución de 0,3 mmol del sustrato en 10 ml del solvente adecuado se agregaron 0,7-1,0 g de CuSO_4 (II) sobre sílica gel preparado según se describió (ver página 179). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente o a reflujo según el caso durante períodos variables de tiempo. Una vez concluída la reacción se filtra la mezcla y se evapora el solvente a sequedad para aislar el producto puro o el crudo según el caso.

Ensayos tendientes a la obtención de cultivos de tejido de bulbo de *Scilla maritima*

Se trabajó con ejemplares de *Scilla maritima* de tamaño medio existentes en el vivero de Ciudad Universitaria. Estos fueron tratados con una solución del fungicida Bayleton (de laboratorios Bayer) de 500 mg/l 20 días antes de ser cosechados.

El procedimiento empleado para la esterilización del material vegetal comprendió las siguientes etapas:

- 1) El bulbo, perfectamente lavado, se colocó bajo agua corriente durante 1 hora.
- 2) Se sumergió en una solución de EtOH 70% durante 5 minutos.
- 3) Se trató con NaClO (20%) y Tritón X (0,05%) durante 30 minutos.

Trabajando en campana de flujo laminar, se enjuagó el bulbo con agua esterilizada y se tomó su porción interna con un sacabocados. De esta manera se prepararon cortes cilíndricos de aproximadamente 5 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Estos cortes se colocaron en cajas de Petri, conteniendo distintos medios de cultivo semisólido (agaroso), a razón de 10 cortes por caja en disposición circular.

Como medio de cultivo se empleó el de Murashige-Skoog suplementado con las siguientes hormonas de crecimiento: ácido α -nftalenacético (NAA), 6-bencil-aminopurina (BAP), ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y kinetina (KIN). Los medios preparados fueron:

- a. 2,4-D (1 ppm).
- b. 2,4-D (0,5 ppm) y KIN (0,1 ppm).
- c. NAA (2 ppm).
- d. 2,4-D (0,5 ppm).
- e. NAA (0,5 ppm) y BAP (0,4 ppm).
- f. NAA (1,6 ppm) y BAP (1,3 ppm).

Las cajas de Petri cargadas se dejaron en estufa a 24° por períodos de 2 a 3 semanas. Únicamente en las experiencias realizadas con el medio de cultivo b se observó crecimiento de callos.

Ensayos extractivos con hojas de *Scilla maritima*.

Se trabajó con los ejemplares del vivero de Ciudad Universitaria. Se tomaron 100 g de hojas verdes las que se lavaron con agua, se secaron y se liofilizaron recuperándose 12 g. Este residuo se extrajo con etanol 70% (3x150 ml) en caliente. El extracto se centrifugó y el sobrenadante se evaporó a presión reducida. La fase acuosa resultante se extrajo con diclorometano (2x100 ml) y diclorometano:etanol (70:30) (1x100 ml). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se evaporaron a presión reducida para brindar 300 mg de extracto.

El análisis del extracto mediante ccd (solvente de desarrollo AcOEt:MeOH 90:10) mostró la ausencia de scillirósido y la presencia de una sustancia cuyo Rf era similar al de proscillaridina A testigo. Mediante cromatografía en columna de sílica gel 60 (malla 230-400), eluída con AcOEt:MeOH 95:5, se aislaron 20 mg de esta sustancia cuyo espectro de RMN- ^1H indicó que se trataba de un galactosil diglicérido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Ensayos extractivos con hojas de *Digitalis purpurea*.

Se trabajó con ejemplares de *Digitalis purpurea* de tamaño medio recolectados durante el mes de enero en las lagunas de Yala (provincia de Jujuy) y transplantados al vivero de Ciudad Universitaria. Allí fueron mantenidos a la sombra y regados diariamente durante el período de desarrollo del trabajo.

Aplicando la técnica descripta en la sección anterior, partiendo de 35 g de hojas frescas, se obtuvieron 320 mg de extracto. Este, mediante ccd, mostró un componente de Rf próximo a los de digoxina, gitoxina y digitoxina. La purificación del extracto por cromatografía en columna de sílica gel 60 (malla 230-400) brindó 5 mg de una fracción cuyo espectro de RMN ^1H indicó que se trataba de una mezcla de un galactosil diglicérido de ácidos grasos poliinsaturados y un cardenólido que no se trató de identificar.

Ensayos con homogenatos de hojas de *Digitalis purpurea*.

Como norma general se tomaron, aproximadamente, 7 g de hojas que se ablandaron durante 1h en 100 ml de buffer a 5°, previamente al proceso de homogeneizado. Las soluciones buffer empleadas fueron las siguientes:

1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M de pH=6,0; 6,6; 7,2 y 7,8.
2. $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M de pH=7,2 enriquecido con sacarosa (0,25M), MgCl_2 (0,005 M), clorhidrato de L-cisteína (0,003 M) y albúmina bovina (1 mg/ml).
3. Tris 0,05 M de pH=7,4 enriquecido de igual modo que el caso 2.

Se ensayaron tres métodos de homogeneización, trabajando en todos los casos a temperatura menor o igual a 5°. En las primeras pruebas se empleó un potter de vidrio esmerilado, posteriormente se añadió a la homogeneización inicial con potter un tratamiento con punta ultrasónica y finalmente se probó con licuadora a máxima velocidad. En todos los casos se tomaron 3 alícuotas de 10 ml del homogenato correspondiente las que se incubaron con 1 μCi de una solución de $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H}_4]$ -progesterona en DMSO (1 mCi/ml) a 25° y 28° durante 2, 6 y 24 hs respectivamente.

Terminada la incubación se liofilizaron las alícuotas y se agregaron 5 mg de digitoxina y 4 mg de digitoxigenina "frías". El residuo sólido resultante se extrajo con CH_2Cl_2 y luego con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10). Las fracciones orgánicas reunidas se secaron (MgSO_4) y se evaporaron a sequedad. Los extractos así obtenidos se purificaron por ccd empleando cromatofolios de base plástica eluidos con $\text{Cl}_2\text{CH}_2:\text{MeOH}$ (95:5). Para cada alícuota se separaron de los cromatofolios las zonas correspondientes a la digitoxina y a la digitoxigenina de las que se separó la sílica. Esta fue extraída con acetona y la solución resultante se llevó a sequedad. Los extractos se disolvieron en volúmenes exactamente medidos de CH_2Cl_2 y de estas soluciones se tomaron alícuotas apropiadas que se disolvieron en 15 ml de solución centelleadora (4,0 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 0,4 g de 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno (dimetil-POPOP) por litro de tolueno) las que fueron contadas durante 1 minuto en el contador de centelleo. Luego de esto los extractos fueron nuevamente llevados a sequedad y se les agregaron 15 a 20 mg de digitoxina y 5 a 10

mg de digitoxigenina según el caso. Cada fracción se recrystalizó de etanol acuoso y del producto recrystalizado se tomó una pequeña porción que se empleó para medir la actividad absoluta de la alícuota y calcular su actividad específica. Se realizaron tres recrystalizaciones sucesivas observándose luego de la última que los valores de actividad específica se hacían comparables a los de soluciones blanco de digitoxina y de digitoxigenina. Esto claramente indicaba que no había ocurrido la incorporación esperada de la progesterona tritiada en los cardenólidos, en ninguna de las condiciones de trabajo descriptas.

RESUMEN

El objetivo original del presente trabajo fue estudiar la biosíntesis de bufadienólidos en cultivos de tejido de la planta *Scilla maritima* siguiendo la evolución, en ese medio y mediante espectroscopía de RMN ^{13}C , de pregnanos isotópicamente marcados con carbono 13 en la cadena lateral .

En la introducción se describen las características estructurales de los glicósidos cardiotónicos bufadienólidos y cardenólidos, presentes en plantas de los géneros *Scilla* y *Digitalis* respectivamente; y se reseñan los antecedentes sobre usos medicinales de plantas de ambos géneros. Se resumen, también, los conocimientos adquiridos hasta el presente sobre los procesos de biosíntesis de cardenólidos en vegetales y de bufadienólidos en vegetales y en animales del género *Bufo*, poniendo mayor énfasis en los antecedentes sobre la construcción biológica del anillo lactónico unido a C-17; y las ventajas, y limitaciones, del empleo de isótopos estables y cultivos de tejido vegetal en estudios de biosíntesis.

En el capítulo I se presentan las síntesis de $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -progesterona, $[20,21-^{13}\text{C}_2]$ -pregnenolona y $[21-^{13}\text{C}]$ -colesterol junto con los estudios sintéticos previos que llevaron a establecer las mejores condiciones para estos procesos. En estos estudios previos se refuta la supuesta preparación, por otros autores, del compuesto 3-Cicloetiléndioxi-androst-5-en-17 α -ditianil-17 β -ol, y se describe la realización, entre otras, de las siguientes experiencias: i) preparación de androstenos 17 α -halogenados y el análisis efectuado para establecer su configuración en C-17; ii) preparación de cianhidrinas en C-17, con funcionalidad en C-3 del anillo A del sistema esteroidal variadamente protegida; iii) asignación de su configuración; iv) los métodos ensayados para la conversión de la cianhidrina en derivados 17-ciano- α,β -insaturados; v) estudios sobre la reducción selectiva de un doble enlace 16(17) en presencia de un doble enlace Δ^4 o Δ^5 ; vi) reacción de Grignard sobre cicloetilén-acetales en C-3 y C-17 del sistema esteroidal y la discusión de su mecanismo; vii) reacción de Grignard sobre diversos nitrilos esteroidales; viii) reacción de Wittig sobre el carbonilo en C-20 de pregnanos y las numerosas pruebas realizadas para mejorar su rendimiento; ix) hidrogenación

regio y estereoselectiva del doble enlace E-20(22) de colestenos con una extensa discusión sobre el origen de la estereoselectividad de la misma donde se redarguyen las explicaciones de otros autores.

En el capítulo de II se reseñan los estudios tendientes a la preparación del material biológico adecuado para los estudios biosintéticos.

En el capítulo III se realiza una breve recopilación de los métodos de remoción de tioacetales aparecidos desde el año 1975 hasta la actualidad; se describe la experiencia que permitió descubrir la utilidad del reactivo sulfato de cobre (II) adsorbido sobre sílica gel como agente promotor de la remoción de tioacetales, y la preparación de diversos tioacetales esteroidales y cicloalquílicos. Se presentan los resultados obtenidos en las reacciones de remoción de tioacetales promovidas por el reactivo nombrado, y en base a esto se discuten los alcances y limitaciones del método. Los resultados encontrados indican que el método de desprotección de tioacetales promovido por el reactivo CuSO_4 (II)- SiO_2 brinda rendimientos de buenos a muy buenos en la generalidad de los casos, es compatible con una variedad de grupos funcionales, excepto hidroxilos, elimina selectivamente la función tioacetálica en C-17 del anillo esteroideal en presencia de un tioacetal en C-3 y presenta ventajas sobre los métodos usuales en lo que se refiere al tratamiento posterior de la mezcla de reacción. Se propone, también, un mecanismo tentativo para la reacción en cuestión.

Como una extensión a lo anterior se desarrolló el método de remoción de cicloacetales y tetrahidropiranyléteres esteroidales (muchos de ellos preparados a la sazón) promovida por el reactivo sulfato de cobre (II) adsorbido sobre sílica gel; presentándose en el mismo capítulo los resultados obtenidos. Se discuten, a su vez, las ventajas y desventajas del método en comparación con los métodos tradicionales.

Finalmente, en el capítulo IV se presentan los espectros de RMN ^{13}C de numerosos androstanos variadamente sustituidos, preparados durante el desarrollo del trabajo sintético, los que permitieron evaluar los efectos producidos por cambios

funcionales en C-17 como, entre otros, la conversión de la funcionalidad 17-oxo en un ditiolano, la sustitución en 17 β -ciano derivados del H-17 α por un hidroxilo con inversión de la configuración de C-17 y la introducción de un doble enlace 16(17) en derivados 17 β -ciano. Datos adicionales tomados de literatura posibilitaron el análisis del efecto como sustituyente en C-17 del grupo ciano en β y de cloro y bromo en α .

En la sección experimental se describen en detalle los procedimientos seguidos para la preparación de los productos presentados amén de las experiencias intentadas que condujeron a resultados fallidos. Asimismo, se detallan las experiencias llevadas a cabo con material vegetal para la preparación de los medios biológicos en los que se proyectaba utilizar los esteroides isotópicamente marcados.

Parte de este trabajo dió origen a las siguientes publicaciones:

Cleavage of Thioacetals promoted by Copper(II) Sulphate adsorbed on Silica gel.

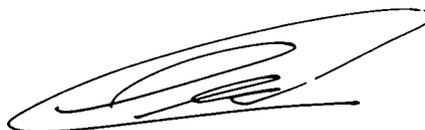
Gerardo M. Caballero y Eduardo G. Gros.

J. Chem. Res., 320 (1989).

Synthesis of [20,21-¹³C₂]-Progesterone.

Gerardo M. Caballero y Eduardo G. Gros.

J. Lab. Compds. Radiopharm., 29, 805 (1991).



BIBLIOGRAFIA

- Abell A.D. y Massy-Westropp R.A., *Aust. J. Chem.*, **1985**, *38*, 1031.
- Abraham R.J. y Loftus P., "Proton and Carbon-13 NMR Spectroscopy", Heyden & Son Inc., Philadelphia, **1981**, p. 72.
- Affleck J.G. y Dougherty G., *J. Org. Chem.*, **1950**, *15*, 865.
- Austin D.J. y Brown S.H., *Phytochemistry*, **1973**, *12*, 1657.
- Avnir D., Farin D. y Pfeifer P., *J. Chem. Phys.*, **1983**, *79*, 3566.
- Avnir D., Farin D. y Pfeifer P., *Nature*, **1984**, *308*, 261.
- Baldwin J.E., Lever Jr. O.W. y Tzodikov N.R., *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 2312.
- Balogh M., Cornelis A. y Laszlo P., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 3313.
- Barkley L.B., Knowles W.S., Raffelson H. y Thompson Q.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 4111.
- Barton D.H.R., Magnus P.D., Smith G. y Zurr D., *Chem. Comm.*, **1971**, 861.
- Barton D.H.R. y Ollis W.D., "Comprehensive Organic Chemistry", Pergamon Press, Oxford, **1979**, vol. 1, p. 718.
- Bauduin G., Bondon D., Pietrasanta Y. y Pucci B., *Tetrahedron*, **1978**, *34*, 3269.
- Bigler P., *J. Magn. Res.*, **1983**, *55*, 468.
- Blunt J.W. y Stothers J.B., *Org. Magn. Reson.*, **1977**, *9*, 439.
- Bowers A., Cuéllar Ibañez L. y Ringold H.J., *Tetrahedron*, **1959**, *7*, 138.

- Bowers A., Denot E., Sánchez M.B., Neumann F. y Djerassi C., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 1859.
- Breitmaier E. y Voelter W., "Carbon-13 NMR Spectroscopy", VCH, Weinheim-New York, **1987**.
- Bulman Page P.C., van Niel M.B. y Prodger J.C., *Tetrahedron*, **1989**, 45, 7643.
- Burkert U. y Allinger N.L., "Molecular Mechanics. A.C.S. Monograph 177", American Chemical Society, Washington, **1982**.
- Buschmann E., *Arch. Pharm.*, **1919**, 257, 79.
- Butcher D.N. y Connolly J.D., *J. Exp. Botany*, **1971**, 22, 314.
- Butcher D.N., "Plant Cell Tissue and Organ Culture", Reinert J. y Bajaj Y. eds., Springer, Nueva York, **1977**, p. 668.
- Cane D.E. y Levin R.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 1183.
- Carceller M., Davey M.R., Fowler M.W. y Street H.E., *Protoplasma*, **1971**, 73, 367.
- Carre M.C., Ndebeka G., Riondel A., Bourgasser P. y Caubere P., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 1551.
- Caserio F.F. y Roberts J.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 5837.
- Caspi E. y Lewis D.O., *Science*, **1967**, 156, 519.
- Clark Still W., Kahn M. y Mitra A., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2923.
- Corey E.J. y Seebach D., *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.*, **1965**, 4, 1075.

- Corey E.J. y Erickson B.W., *J. Org. Chem.*, **1971**, *36*, 3553.
- Corey E.J. y Venkateswarlu A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6190.
- Corey E.J. y Suggs J.W., *Tetrahedron Lett.*, **1975 a**, *16*, 2647.
- Corey E.J. y Ulrich P., *Tetrahedron Lett.*, **1975 b**, *16*, 3685.
- Corey E.J., Niwa H. y Knolle J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 1942.
- Corey E.J. y Schmidt G., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *20*, 399.
- Cornelis A. y Laszlo P., *Synthesis*, **1985**, 909.
- Chen C. y Osuch M.V., *Biochem. Pharmacol.*, **1969**, *18*, 1797.
- Cheung H.T.A. y Watson T.R., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **1980**, 2162.
- Chitty D., "Red Squill Control of Rat and Mice", Oxford University, London, **1954**, pp. 62-100.
- Chiu S.H.L., Fiala R., Kennett R., Wozniak L. y Bullock M.W., *J. Antibiot.*, **1984**, *37*, 1000.
- Dahl T., Stevenson R. y Bhacca N.S., *J. Org. Chem.*, **1971**, *36*, 3243.
- Dauben Jr. J., Löken B. y Ringold H.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*, 1359.
- Degani I., Fochi R. y Regondi V., *Synthesis*, **1981**, 51.

- Deluca M.E., *Uso de ácidos biliares como precursores sintéticos de pregnanos con aplicación en el estudio del mecanismo de hidroxilación biológica en carbono 14 de cardenólidos*, Tesis, Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA, 1985.
- Deluca M.E., Seldes A.M. y Gros E.G., *Phytochemistry*, 1989, 28, 109.
- Djerassi C. y Fishman J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 4291.
- Djerassi C. y Gutzwiller J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 4537.
- Doddrell D.M., Reid D.G. y Williams D.H., *J. Magn. Reson.*, 1984, 56, 279.
- Domínguez X.A., "Métodos de investigación fitoquímica", Limusa, México, 1973, cap.14.
- DuBois, G.E., *J. Org. Chem.*, 1982, 47, 5035.
- Duffey S.S., *Science*, 1970, 169, 78.
- Duffey S.S. y Scudder G.G.E., *J. Insect. Physiol.*, 1972, 18, 63.
- Eggert H., Van Antwerp C.L., Bhacca N.S. y Djerassi C., *J. Org. Chem.*, 1976, 41, 71.
- Eggert H. y Djerassi C., *J. Org. Chem.*, 1981, 46, 5399.
- El Grari R. y Backhaus R.A., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1987, 10, 65.
- Eliel E.L., Allinger N.L., Angyal S.J. y Morrison G.A., "Conformational Analysis", Interscience, Nueva York, 1965, p.28.
- El-Wassimy M.T.M., Jorgensen K.A. y Lawesson S.O., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1983, 2201.

Evans F.J. y Cowley P.S., *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 2971.

Evans D.A., Truesdale L.K., Grimm K.G. y Nesbitt S.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 5009.

Eyles C.T. y Trippett S., *J. Chem. Soc. C*, **1966**, 67.

Farwaha R., de Mayo P., Herman Schauble J. y Toong Y.C., *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 245.

Fenselau C., *J. Nat. Prod.*, **1984**, *47*, 215.

Fieser L.F. y Fieser M., "Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons Inc., **1967**, *1*, 386.

Fieser L.F. y Fieser M., "Steroids", Reinhold Pub. Co., Nueva York, **1959**, cap.20.

Ford-Moore A.H., *Org. Syn.*, **1963**, *IV*, 84.

Fraenkel G.S., *Science*, **1959**, *129*, 1466.

Fried J. y Edwards J.A., "Organic Reactions in Steroids Chemistry", Van Nostrand Reinhold Co., **1972**, vol II, 133.

Fuji K., Ichikawa K. y Fujita E., *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *19*, 3561.

Fujita E., Nagao Y. y Kanero K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, *26*, 3743.

Furuya T., Kojima H. y Katsuka T., *Phytochemistry*, **1973**, *12*, 1621.

Galagovsky L.R., *Estudios acerca de la biosíntesis de bufadienólidos en la planta Scilla maritima*, Tesis, Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA, **1983**.

Galagovsky L.R., Porto A.M., Burton G. y Gros E.G.,
Z.Naturforsch., 1984, 39c, 38.

Garraffo H.M., Burton G., Porto A.M. y Gros E.G., *An. Asoc. Quim. Argent.*, 1982 a, 70, 743.

Garraffo H.M. y Gros E.G., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, 1982 b, 19, 149.

Garraffo H.M., *Síntesis de derivados esteroideos marcados isotópicamente y su ensayo como precursores biosintéticos de bufadienólidos de sapo*, Tesis, Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA, 1985.

Garson M. J. y Stauton J., *Chem. Soc. Rev.*, 1979, 539.

Gautheret R.J., *Compt. Rend.*, 1939, 208, 118.

Gentry H.S., Verbiscar A.J. y Banigan T.F., *Economic Botany*, 1987, 41, 267.

Geuns J.M.C., *Phytochemistry*, 1978, 17, 1.

Ghringhelli D., *Synthesis*, 1982, 580.

Grant D.M. y Cheney V.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 5315.

Green T.W., "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, Nueva York, 1981.

Grieco P.A., Nishizawa M., Oguri T., Burke S.D. y Marinovic N., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 5773.

Gröbel B.T. y Seebach D., *Synthesis*, 1977, 357.

Gros E.G., *Anal. Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Nat.*, 1986, 38, 17.

Haasnoot C.A.G., De Leeuw F.A.A. y Altona C., *Tetrahedron*, **1980**, 36, 2783.

Hammond G.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 334.

Hampel V.B. y Kraemer J.M., *Tetrahedron*, **1966**, 22, 1601.

Hauranek R.E., Brooke Hoey G. y Baeder D.H., *J. Med. Chem.*, **1966**, 9, 326.

Heftmann E., *Phytochemistry*, **1975**, 14, 891.

Hershberg, E.B., Oliveto E.P., Gerold C. y Johnson L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 5073.

Heuser H., Roth M., Rohr O. y Anliker R., *Helv. Chim. Acta*, **1955**, 38, 1178.

Hoffman J.F. y Forbush B.III, eds., "Structure and Function of the Na/K Pump", Academic Press, Nueva York, **1983**, vol.19.

Hollander J.A. y Shulman R.G., *Tetrahedron*, **1983**, 39, 3529.

Hosoda H., Fukushima D.K. y Fishman J., *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 4209.

Howden M.E.H., Maercker A., Burdon J. y Roberts J.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 1732.

Ibrahim R.K., Thakur M.L. y Permanand B., *Lloydia*, **1971**, 34, 175.

Inoue K., Ueda S., Nayeshiro H., Moritome N. e Inouye H., *Phytochemistry*, **1984**, 23, 313.

Jankowski K. y Berse C., *Can. J. Chem.*, **1968**, 46, 1835.

- Johnson W.S., Rogier E.R. y Ackerman J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 6322.
- Jones J.B. y Grayshan R., *Can. J. Chem.*, **1972**, *50*, 1414.
- Jung M.E., Andrus W.A. y Ornstein P.L., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *18*, 4175.
- Kadin S.B., *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 620.
- Kamitori Y., Hojo M., Masuda R., Kimura T. y Yoshida T., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 1427.
- Kanamori K. y Roberts J.D., *Acc. Chem. Res.*, **1983**, *16*, 35.
- Kaye I.A. y Kogon I.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 4893.
- Kim K.S., Song Y.H., Lee B.H. y Hanh C.S., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 404.
- Kintzinger J.P., "NMR of Newly Accesible Nuclei", P. Laszlo ed., Academic Pres, Nueva York, **1983**, vol. 2, p. 79.
- Kirchner H., Jurenitsch J. y Kubelka W., *Sci. Pharm.*, **1981**, *49*, 281.
- Kopaczewski W., *Compt. Rend.*, **1914**, *158*, 1520.
- Kopp B. y Leeb R., *Sci. Pharm.*, **1983**, *51*, 248.
- Kreuzaler F. y Hahlbrock K., *Phytochemistry*, **1973**, *12*, 1149.
- Kyler K.S., Bashir-Hashemi A. y Watt D.S., *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 1084.
- Laszlo P., *Acc. Chem. Res.*, **1986**, *19*, 121.

Leete E., *Rev. Latinoamer. Quim.*, **1980**, *11*, 8.

Levy G.C. y Lichter R.L., "Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Wiley, Nueva York, **1979**.

Lichti H., Nicklaus P. y von Wartburg A., *Helv. Chim. Acta*, **1973**, *56*, 2083 y 2088.

Loewenthal H.J.E., *Tetrahedron*, **1959**, *6*, 269.

Maier M.S., *Estudio sobre rutas biosintéticas alternativas del anillo butenólido de cardenólidos en la planta D. purpurea*, Tesis, Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA, **1985**.

Mandelbrot B.B., "Fractals, Form, Chance and Dimension", W.H. Freeman, San Francisco, **1977**.

March J., "Advanced Organic Chemistry", Wiley Interscience, Nueva York, **1985**.

Meyer K., *Helv. Chim. Acta*, **1946**, *29*, 1580.

Miyashita M., Yoshikoshi A. y Grieco P.A., *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 3772.

Moersch G.W. y Neuklis W.A., *Can. J. Chem.*, **1963**, *41*, 1627.

Mothes K., Schütte H.R. y Luckner M., eds., "Biochemistry of Alkaloids", VCH, Berlin, **1985**.

Movitt E.R., "Digitalis and other Cardiotonic Drugs", Oxford University Press, Nueva York, **1949**.

Mukaiyama T., Narasaka K. y Hokonok H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 4315.

- Mukaiyama T., Maekawa K. y Narasaka K., *Tetrahedron Lett.*, **1970**, *11*, 4669.
- Mukaiyama T., Narasaka K. y Furusato M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 8641.
- Murashige T. y Skoog F., *Physiol. Plantarum*, **1962**, *15*, 473.
- Murov S.L., "Handbook of Photochemistry", Marcel Dekker Inc., Nueva York, **1973**.
- Narwid T.A., Cooney K.E. y Uskokovic M.R., *Helv. Chim. Acta*, **1974**, *57*, 771.
- Nes W.R., Varkey T.E., Crump D.R. y Gut M., *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 3429.
- Nes W.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 999.
- Neuhaus D. y Williamson M., "The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis", VCH Publishers Inc., Nueva York, **1989**.
- Newman M.S. y Otsuka S., *J. Org. Chem.*, **1958**, *23*, 797.
- Nishiguchi T., Machina N. y Yamamoto E., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 4565.
- Nishiguchi T. y Asano F., *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 1531.
- Nitta I., Fujimori S. y Ueno H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, *58*, 978.
- Nussbaum A.L., Yuan E., Dincer D. y Oliveto E.P., *J. Org. Chem.*, **1961**, *26*, 3925.

Oishi T., Kamemoto K. y Ban Y., *Tetrahedron Lett.*, **1972**, *13*, 1085.

Overton K.H. y Picken D.J., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, Viena-Nueva York, **1977**, *34*, 249.

Peterson D.J., *J. Org. Chem.*, **1968**, *33*, 780.

Popjak G., Edmond J., Anet F.A.L. y Easton N.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 931.

Porto A.M. y Gros E.G., *Experientia*, **1970**, *26*, 11.

Porto A.M. y Gros E.G., *Experientia*, **1971**, *27*, 506.

Porto A.M., Baralle F.E. y Gros E.G., *J. Steroid Biochem.*, **1972**, *3*, 11.

Posner G.H., Frye L.L. y Hulce M., *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 1401.

Puar M.S., Munayyer H., Hedge V., Lee B.K. y Waitz J.A., *J. Antibiot.*, **1985**, *38*, 530.

Ralls J.W. y Riegel B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*, 4479.

Rieke R.D., *Acc. Chem. Res.*, **1977**, *10*, 301.

Rinehart K.L., *Biotechnology*, **1983**, 495.

Robien W., Kopp B., Schabl D. y Schwarz H., *Progress in NMR Spectroscopy*, **1987**, *19*, 131.

Rodriguez J.B., *Síntesis de análogos de hormonas juveniles de insectos*, Tesis, Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA, 1990.

Rogic M.M., Van Peppen J.F., Klein K.P. y Demmin T.R., *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 3424.

- Rohrer, D.C., Kihara M., Deffo T., Rathore H., Ahmed K., From A.H.L. y Fullerton D.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 8269.
- Romo J., Rosenkranz G. y Djerassi C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 4961.
- Ross J.A. y Martz M.D., *J. Org. Chem.*, **1964**, *29*, 2784.
- Santa Coloma T.A., Garraffo H.M., Pignataro O.P., Charreau E.H. y Gros E.G., *Steroids*, **1984**, *44*, 11.
- Satchell D.P.N. y Satchell R.S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1987**, 513.
- Schöllkopf U. y Hänssle P., *Liebigs Ann.*, **1972**, *763*, 208.
- Schow S.R. y McMorris T.C., *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 3760.
- Seebach D., Kolb M. y Gröbel B.T., *Ber.*, **1973**, *106*, 2277.
- Seebach D., Kolb M. y Gröbel B.T., *Tetrahedron Lett.*, **1974**, *36*, 3171.
- Seto H., Sato T. y Yonehara H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 8461.
- Sharp G., *Pharm. J.*, **1910**, *84*, 136 y 170.
- Shimada K., Kyuno T., Nambara T. y Uchida I., *Heterocycles*, **1981**, *15*, 355.
- Shoppee C.W., Bellas T.E. y Lack R., *J. Chem. Soc.*, **1965**, 6450.
- Smith L.H., *Org. Syn.*, **1955**, *III*, 793.
- Snyder C.H. y Soto A.R., *J. Org. Chem.*, **1964**, *29*, 742.

Stahl I., *Synthesis*, **1981**, 135.

Steck W., Bailey B.K., Shyluk J.P. y Gamborg O.L.,
Phytochemistry, **1971**, 10, 191.

Sterzycki R., *Synthesis*, **1979**, 724.

Stickland R.G. y Sunderland N., *Ann. Botany*, **1972**, 36, 671.

Stohs S.J. y El-Olemy M.M., *Phytochemistry*, **1971**, 10, 2987.

Stoll A. y Renz J., *Helv. Chim. Acta*, **1942**, 25, 43 y 377.

Stoll A. y Renz J., *Helv. Chim. Acta*, **1950**, 33, 286.

Stoll A. y Renz J., *Helv. Chim. Acta*, **1951 a**, 34, 782.

Stoll A., Angliker E., Barfuss F., Kressmaul W. y Renz J., *Helv. Chim. Acta*, **1951 b**, 34, 1420 y 2301.

Stork G. y Kraus G.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 2351.

Stothers J.B., "Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy", G.C. Levy ed., Wiley, Nueva York, **1974**, p. 230.

Stütz P. y Stadler P.A., *Org. Synth.*, **1988**, Coll. Vol.6, 109.

Takahashi T.T., Nakamura C.Y. y Satoti J.Y., *Chem. Comm.*, **1977**, 680.

Tanabe M., Seto H. y Johnson L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 2157.

Tanabe M., "Biosynthesis" (Specialist Periodic Report), T.A. Geissman ed., The Chemical Society, London, **1973**, vol. 2, p. 241.

Tittel G. y Wagner H., *Planta Medica*, **1980**, 39, 125.

- Tschesche R., *Planta Med.*, **1971**, Supl. 4, 34.
- Turro N.J., *Tetrahedron*, **1987**, 43, 1589.
- van Boom J.H. y Herschied J.D.M., *Synthesis*, **1973**, 169.
- Vederas J.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 374.
- Vederas J. C., *Nat. Prod. Reports*, **1987**, 277.
- Verbiscar A.J., Patel J., Banigan T.F. y Schatz R.A., *J. Agric. Food Chem.*, **1986**, 34, 973.
- von Wartburg A. y Renz J., *Helv. Chim. Acta*, **1964**, 47, 1228.
- von Wartburg A., *Helv. Chim. Acta*, **1966**, 49, 31.
- von Wartburg A., Kuhor M. y Huber K., *Helv. Chim. Acta*, **1968**, 51, 1317.
- Weiss R.G. y Snyder E.I., *J. Org. Chem.*, **1970**, 35, 1627.
- Weiss R.G. y Snyder E.I., *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 403.
- Westera G., Blomberg C. y Bickelhaupt F., *J. Organometal. Chem.*, **1978**, 144, 285.
- White P.R., *Amer. J. Botany*, **1939**, 26, 59.
- White P.R., "The Cultivation of Animal and Plant Cells", The Ronald Press, Nueva York, **1963**.
- Wieland H. y Alles R., *Ber.*, **1922**, 55, 1789.
- Williams J.R. y Sarkisian G.M., *Synthesis*, **1974**, 32.
- Winton F.R., *J. Pharmacol.*, **1927**, 31, 126 y 137.

Wolter K.E., Harkin J.M. y Kirk T.K., *Physiol. Plantarum*, **1974**, 31, 140.

Zaretskii, Z. V., "Mass Spectrometry of Steroids", John Wiley & Sons, Nueva York, **1976**.

Zderic J.A., Limon D.C., Ringold H.J. y Djerassi C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 3120.

