

Tesis de Posgrado

Síntesis del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico-24- ^{14}C y su aplicación al estudio de la biosíntesis de bufadienólidos en sapos

Burton, Gerardo

1977

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:

Burton, Gerardo. (1977). Síntesis del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico-24- ^{14}C y su aplicación al estudio de la biosíntesis de bufadienólidos en sapos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1525_Burton.pdf

Cita tipo Chicago:

Burton, Gerardo. "Síntesis del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico-24- ^{14}C y su aplicación al estudio de la biosíntesis de bufadienólidos en sapos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1525_Burton.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Síntesis del Acido 3β -hidroxi-col-5-énico-24- ^{14}C

y su Aplicación

al Estudio de la Biosíntesis de Bufadienólidos en Sapos

GERARDO BURTON

1525
Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Ciencias Químicas

1977

A mi esposa e hija

A mis padres

También deseo expresar mi agradecimiento

Al Ing. Juan A. Retamar (Universidad de Tucumán), por los animales suministrados.

Al Dr. Pedro Cattaneo por la realización de las cromatografías gas-líquido.

A los Sros. J. J. Ferrer y C. G. Arabehty por la realización de los espectros de masa.

A la Srta. S. Melo, a la Lic. M. Marcote, a la Dra. A. M. Seldes y al Sr. A. Russo por los espectros infrarrojos de alta resolución y de resonancia magnética protónica realizados.

A la Dra. B. B. de Deferrari por los microanálisis realizados.

A mis compañeros del Departamento de Química Orgánica por su cordialidad y apoyo permanente.

I N D I C E G E N E R A L

pag.

CAPITULO 1.

Introducción..... 1

CAPITULO 2.

Biosíntesis de cardenólidos y bufadienólidos..... 15

 Biosíntesis de cardenólidos..... 18

 Biosíntesis de bufadienólidos..... 42

CAPITULO 3.

Descripción de las reacciones realizadas e interpretación
de los resultados obtenidos..... 58

 Datos complementarios..... 75

 Reacciones con sustancias marcadas..... 79

 Interpretación de las propiedades espectroscópi-
cas de los compuestos sintetizados..... 81

 Espectros de resonancia magnética protónica..... 81

 Espectros de masa..... 93

 Discusión de los resultados obtenidos en la ino-
culación del trazador radiactivo a sapos Bufo

Paracnomia.....123

CAPITULO 4.

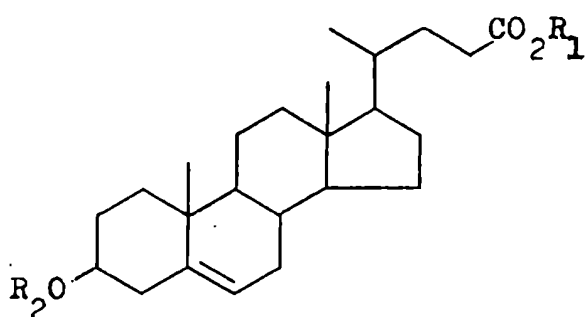
Parte experimental.....130

Resumen.....158

Bibliografía.....161

C A P I T U L O 1.Introducción.

El ácido 3β -hidroxi-col-5-énico (Ia) fue aislado en 1935 por Ruzicka y Wettstein⁽¹⁾ y por Wallis y Fernholz⁽²⁾, como un subproducto de la transformación de colesterol (IIa) en 3β -hidroxi-androst-5-en-17-ona (III), una hormona que había sido aislada de la orina de hombres⁽³⁾. Dicha transformación se llevaba a cabo por oxidación del 3β -acetoxi- $5\alpha,6\beta$ -dibromo-colestano (IV) (obtenido por acetilación del colesterol y posterior adición de bromo al doble enlace en la posición 5(6)) con trióxido de cromo en ácido acético, tratamiento del producto obtenido con zinc y saponificación (Figura 1). De este modo se obtenían dos fracciones, una cetónica de donde se aislaba la 3β -hidroxi-androst-5-en-17-ona (III) y una ácida de la cual se

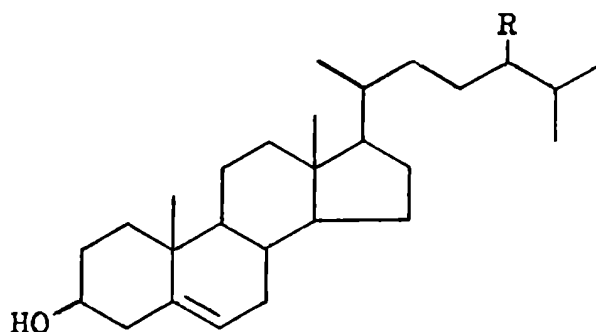


(Ia), $R_1: H; R_2: H$

(Ib), $R_1: H; R_2: CH_3CO$

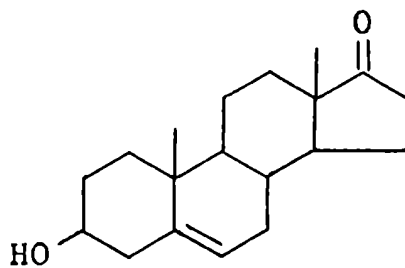
(Ic), $R_1: CH_3; R_2: H$

(Id), $R_1: CH_3; R_2: CH_3CO$



(IIa), $R: H$

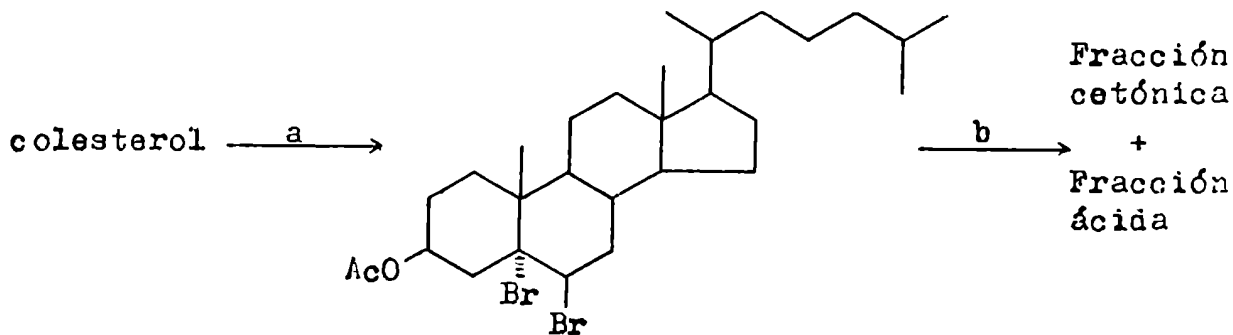
(IIb), $R: C_2H_5$



(III)

obtenía el ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia). Recientemente se lo ha obtenido aplicando la misma secuencia de reacciones al sitosterol (IIb)⁽⁴⁾.

Además, el ácido 3β-hidroxi-col-5-énico ha sido encontrado entre los productos de autooxidación del colesterol (IIa)⁽⁵⁾, y como producto natural, en la orina de niños afectados de atresia biliar^(6,7).



(IV)

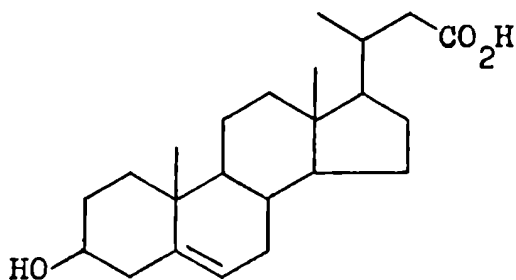
a: 1) anhídrido acético 2) bromo/ácido acético; b: 1) trióxido de cromo/ácido acético 2) zinc/ácido acético 3) hidróxido de potasio/metanol.

Figura 1. Esquema de oxidación de colesterol (IIa).

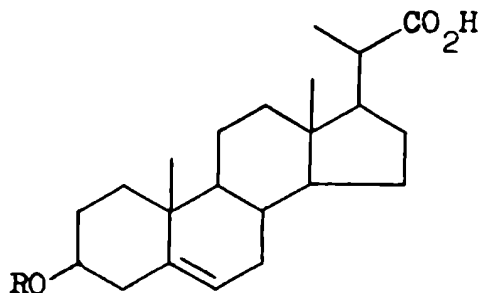
Con el transcurso de los años, el ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia) ha demostrado ser un producto de partida muy útil para la síntesis de distintos esteroides y hormonas esteroideas (8-10) y esto motivó que varios investigadores buscaran nuevas formas de obtención de dicho producto, como así también el mejorar las ya existentes.

Se realizaron estudios de las condiciones de oxidación que permitían incrementar la cantidad de fracción ácida⁽¹¹⁾ como así también respecto de la identidad de los otros productos que integraban dicha fracción; entre éstos se encontró ácido 3 β -hidroxi-23-norcol-5-énico (V), ácido 3 β -hidroxi-22,23-bis-norcol-5-énico (VIa), ácido 3 β -hidroxi-eti-5-énico (VII), ácido 3 β -hidroxi-colest-5-en-26-oico (VIII)^(12,13) y ácido 3 β ,17-dihidroxi-col-5-énico (δ -lactona) (IX)⁽¹⁴⁾.

Kiprianov y Veitsman⁽¹⁵⁾ realizaron la oxidación del 3 β -acetoxi-26-nor-26-fenil-colesta-5,24-dieno (X) (obtenido por

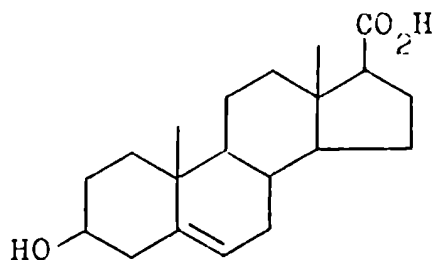


(V)

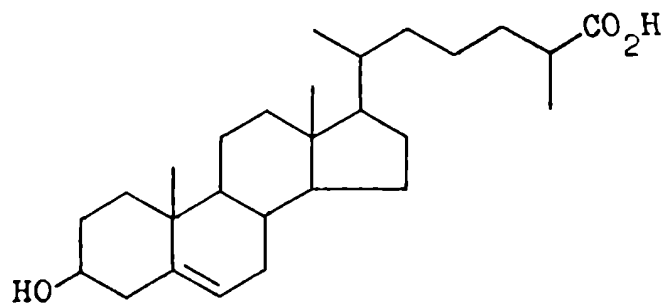


(VIa), R: H

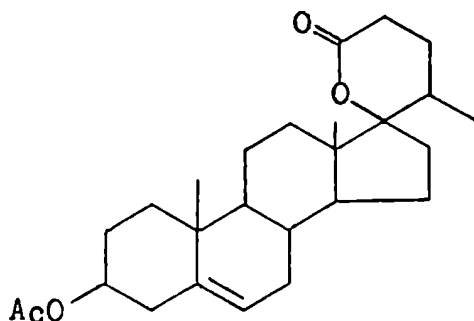
(VIb), R: CH₃CO



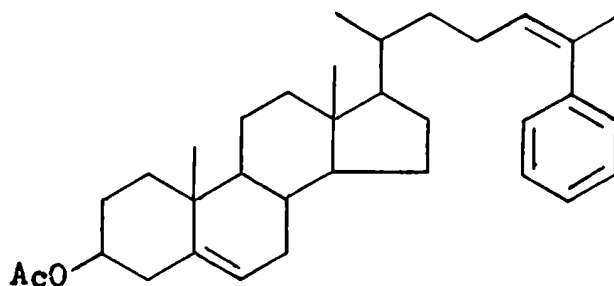
(VII)



(VIII)



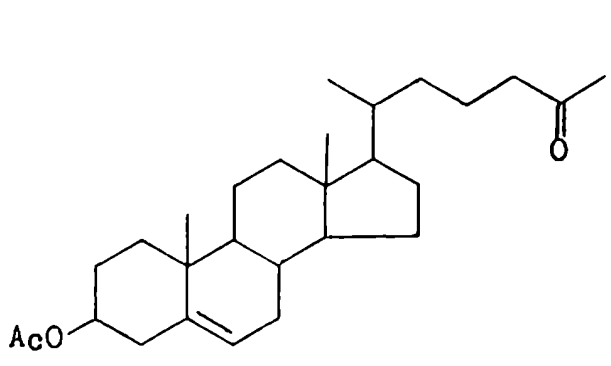
(IX)



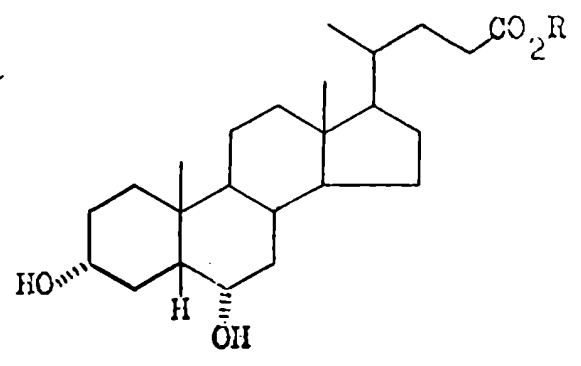
(X)

reacción del 3 β -acetoxi-26-norcolest-5-en-25-ona (XI) con bromuro de fenilmagnesio y luego ácido acético) con trióxido de cromo en una mezcla de cloroformo y ácido acético, obteniendo el ácido 3 β -acetoxi-col-5-énico (Ib).

Se buscaron además otros productos de partida que pudieran ser transformados fácil y eficientemente en el ácido Ia. En 1952, Yamasaki⁽¹⁶⁾ descubrió que el éster metílico del ácido hydesoxicólico (XIIb) (preparado por esterificación del ácido hydesoxicólico (XIIa), un ácido biliar presente en la bilis del cerdo) se transformaba en el éster metílico del ácido 3 β -cloro-col-5-énico (XIIIb) por acción del oxiclorigo de fósforo;

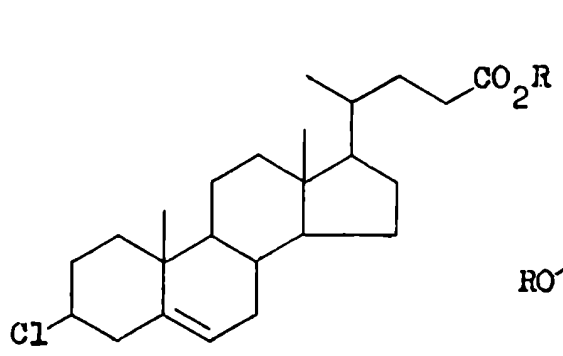


(XI)



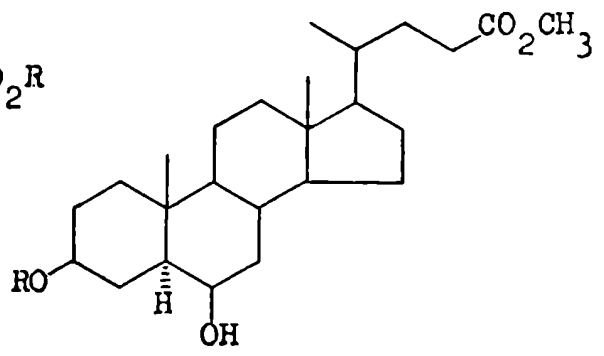
(XIIa), R: H

(XIIb), R: CH₃



(XIIIa), R: H

(XIIIb), R: CH₃



(XIVa), R: H

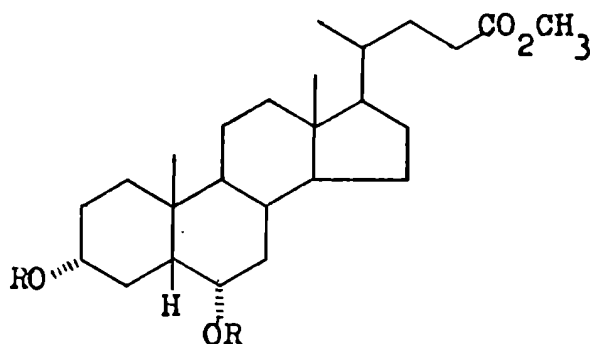
(XIVb), R: CH₃CO

el tratamiento de este producto con acetato de potasio en ácido acético, seguido de saponificación daba lugar al ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia). Una variante consistía en saponificar el éster XIIIb al ácido 3β-cloro-col-5-énico (XIIIa), la acetólisis del cual producía el ácido 3β-acetoxi-col-5-énico (Ib).

Shimizu⁽¹⁷⁾, utilizó el éster metílico del ácido 3β,6β-dihidroxi-5α-colánico (XIVa) como producto de partida y realizó la deshidratación con oxiclórico de fósforo en piridina, previa protección del hidroxilo en posición 3β por succinoilación. La

saponificación del producto obtenido daba el ácido Ia.

Más adelante se comenzó a estudiar la posibilidad de transformar directamente el sistema $3\alpha,6\alpha$ -dihidroxi- 5β -H en el sistema 3β -hidroxi-5-eno. Se encontró que la acetólisis del dimetilato del éster metílico del ácido hyodesoxicólico (XVa) con acetato de potasio en anhídrido acético producía el éster metílico del ácido 3β -acetoxi-col-5-énico (Id)⁽¹⁸⁾.



(XVa), R: $-\text{SO}_2\text{CH}_3$

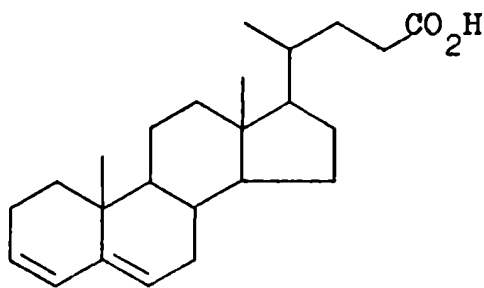
(XVb), R: $-\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ (p)

Esta reacción fue estudiada por numerosos investigadores encontrando que también tenía lugar con el ditosilato correspondiente XVb⁽¹⁹⁻²¹⁾, y además que era general para los $3\alpha,6\alpha$ -ditosiloxi- 5β -esteroides⁽²⁰⁾ permitiendo su transformación en 3β -hidroxi-5-en-esteroides. Para realizar esta transformación se han utilizado diversos reactivos, como ser acetato de potasio en ácido acético⁽²²⁾, N,N-dimetilformamida acuosa^(20,23), N,N-dimetilacetamida acuosa, N-metilpirrolidina acuosa o acetona acuosa⁽²³⁾, acetato de plata en ácido acético, anhi-

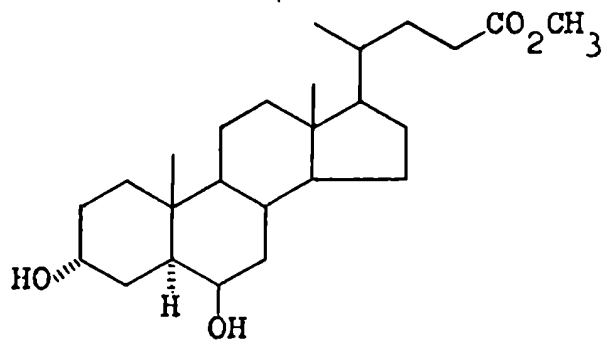
drido acético y ácido acético o N-metilpirrolidina y ácido acético⁽²⁴⁾, oscilando los rendimientos entre 30 y 70%. Los mejores rendimientos se obtuvieron al utilizar solventes polares y un medio de reacción básico^(20,23).

El mecanismo de la reacción involucra una sustitución nucleofílica bimolecular (SN2) en el carbono 3, para dar el 3β-acetoxi-compuesto, seguida de una eliminación unimolecular (E1) de ácido p-toluensulfónico o metilsulfónico (según que la reacción se lleve a cabo sobre el ditosilato o el dimesilato respectivamente) que daría origen al doble enlace en la posición 5(6). El hecho que tanto el hidrógeno del carbono 5 como el grupo en el carbono 6 sean ecuatoriales (respecto al anillo B), hace desfavorable la eliminación facilitando que tengan lugar reacciones secundarias⁽¹⁹⁾. Un producto secundario que acompaña al ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia) obtenido por este método es el ácido cola-3,5-diénico (XVI)⁽²⁰⁾.

Posteriormente la reacción fue aplicada a otros ácidos



(XVI)

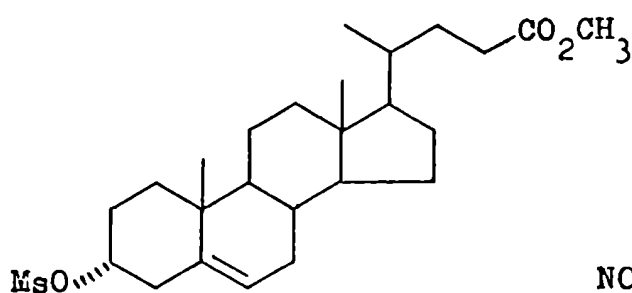


(XVII)

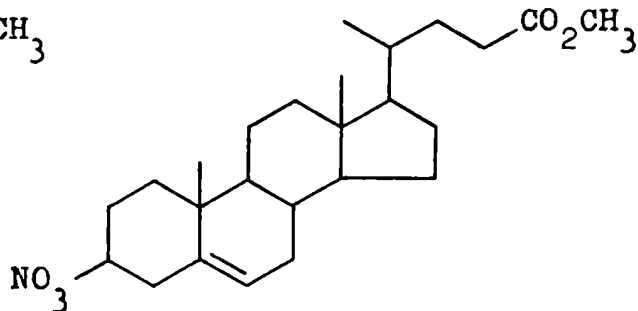
3,6-dihidroxi-colánicos⁽²⁵⁻²⁷⁾, con idénticos resultados que los obtenidos para el ácido hydesoxicólico (XIIa), salvo en el caso del éster metílico del ácido 3 α ,6 β -dihidroxi-5 α -colánico (XVII) con el cual no se obtuvo el dimesilato correspondiente al tratarlo con cloruro de mesilo en piridina sino directamente el producto de eliminación, o sea el éster metílico del ácido 3 α -mesiloxi-col-5-énico (XVIII). Al hacer reaccionar este producto con acetato de potasio en ácido acético se obtenía, luego de saponificar, el dieno XVI como producto principal⁽²⁵⁾.

Sin embargo, el éster XVII por tratamiento con oxicluro de fósforo en piridina, producía el éster metílico del ácido 3 β -cloro-col-5-énico (XIIIb)^(28,29) que podía transformarse en el ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia) según se ha indicado (16) (página 5).

El éster metílico del ácido 3 β -cloro-col-5-énico (XIIIb) también fue preparado por reacción del ditosilato del éster metílico del ácido hydesoxicólico (XVb) con clorhidrato de colii-



(XVIII)



(XIX)

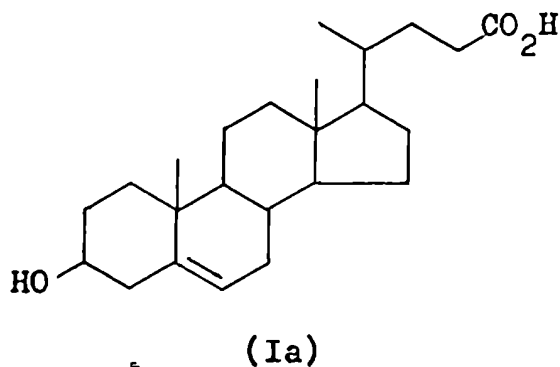
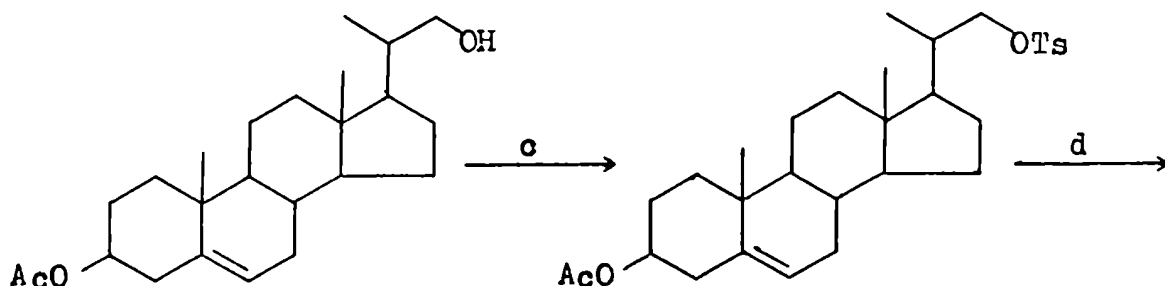
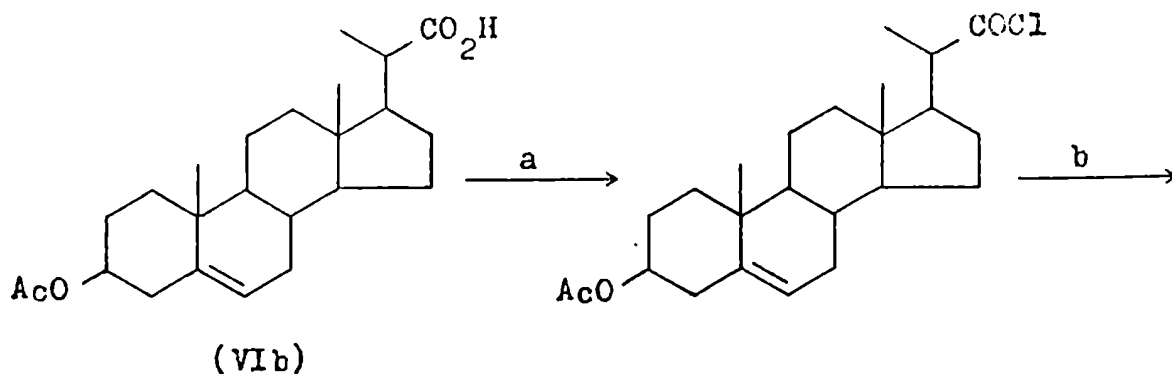
dina en *N,N*-dimetilformamida o con clorhidrato de piridina en piridina⁽³⁰⁾.

Una última transformación de XVb en el ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia) fue realizada por Hodosan y colaboradores⁽³¹⁾ quienes trataron el ditosilato del éster metílico del ácido hydosesoxicólico (XVb) con nitrato de piridonio en piridina; el éster metílico del ácido 3 β -nitroxi-col-5-énico (XIX) obtenido, por calentamiento con zinc en ácido acético y posterior saponificación, daba lugar al ácido Ia.

El éster metílico del ácido 3 β ,6 β -dihidroxi-5 α -colánico (XIVa) puede acetilarse selectivamente en el hidroxilo de carbono 3; por tratamiento del 3 β -acetoxi-derivado (XIVb) con oxicloriguro de fósforo en piridina se obtuvo el éster metílico del ácido 3 β -acetoxi-col-5-énico (Id)⁽³²⁾.

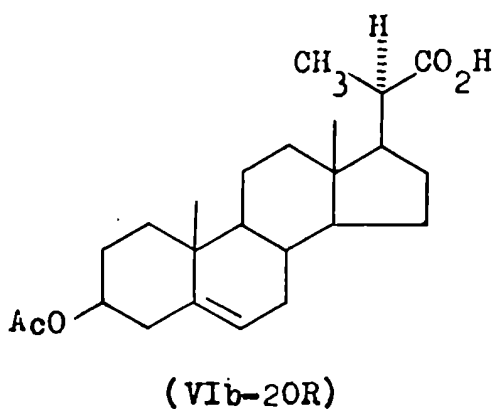
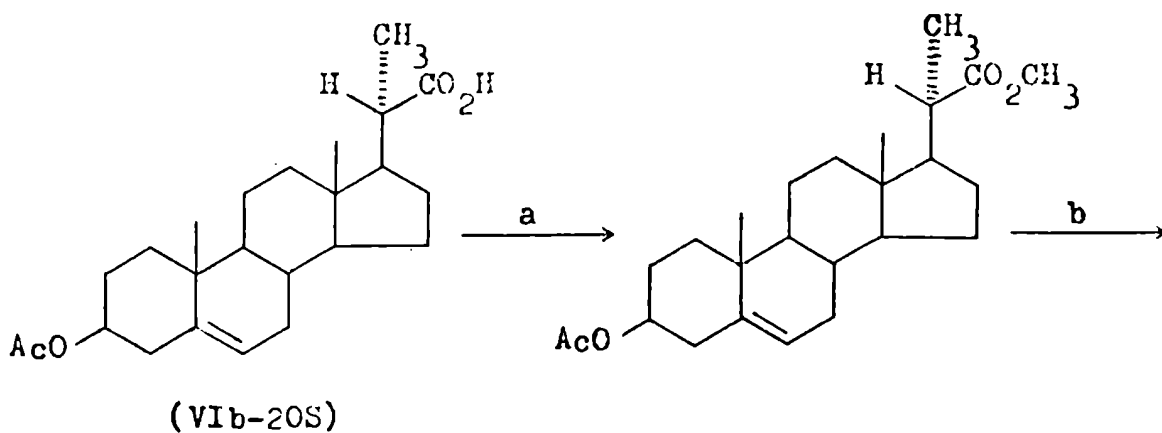
En lo que respecta a otras síntesis del ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia), Hayatsu⁽³³⁾ lo obtuvo a partir de un compuesto con menor número de carbonos, el ácido 3 β -acetoxi-22,23-bisnorcol-5-énico (VIb). El esquema seguido se presenta en la Figura 2.

El mismo autor aplica este método para sintetizar el epímero 20S del ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia-20S) partiendo del epímero 20R del ácido VIb que puede ser obtenido a partir del isómero natural 20S según el esquema de la Figura 3.



a: cloruro de tionilo; b: borohidruro de sodio; c: cloruro de tosilato; d: 1) sal sódica del malonato de etilo 2) hidróxido de potasio/metanol 3) calentamiento en medio ácido.

Figura 2. Síntesis del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia) a partir del ácido 3β-acetoxi-22,23-bisnorcol-5-énico (VIb).



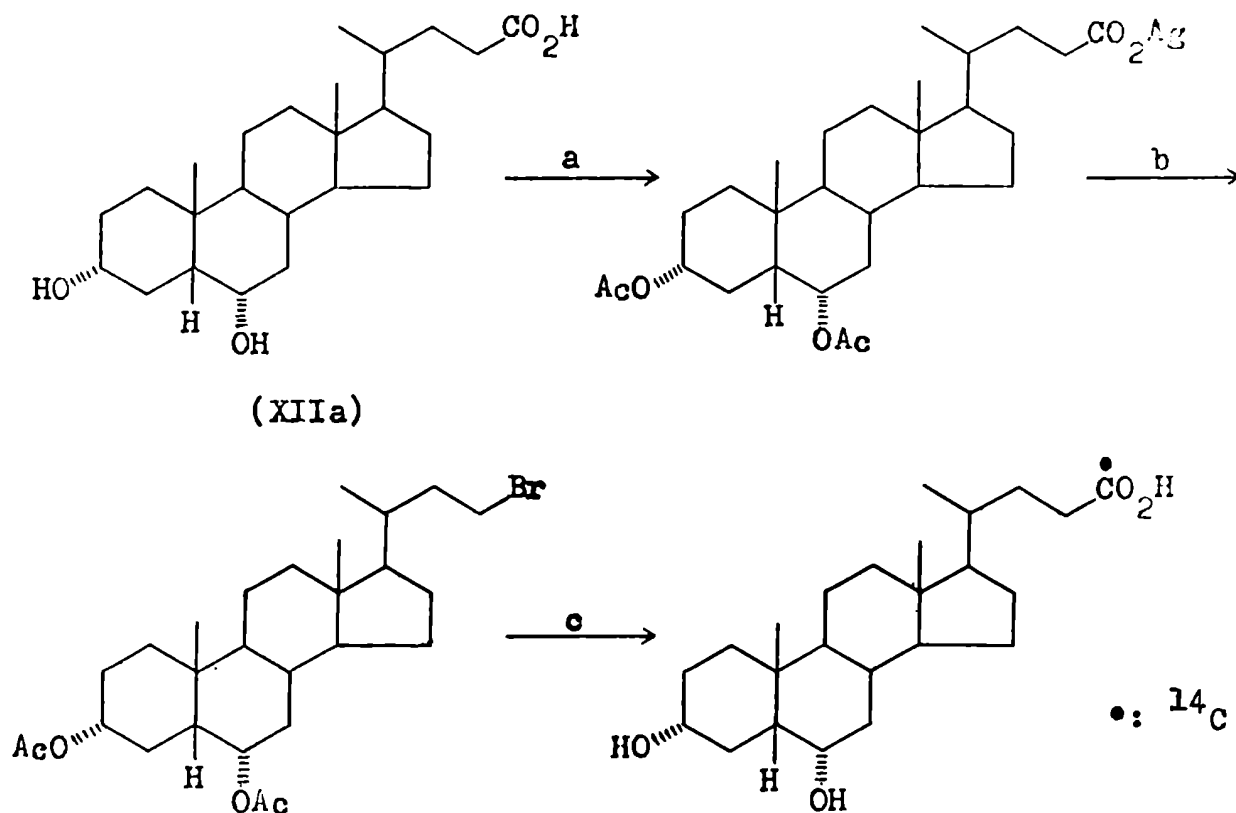
a: 1) nitrito de plata 2) ioduro de metilo; b: 1) hidróxido de potasio/dietilenglicol 2) anhídrido acético.

Figura 3. Epimerización del carbono 20 del ácido 3 β -acetoxi-22, 23-bisnorcol-5-énico (VIb-20S).

En 1955, Bergström y Pääbo⁽³⁴⁾ sintetizaron el éster metílico del ácido 3 β -acetoxi-col-5-énico-24-¹⁴C (Id) a partir del éster metílico del ácido hyodesoxicólico-24-¹⁴C (XIIb), por tratamiento del dimesilato de este último con acetato de plata en ácido acético.

El método general para marcar ácidos biliares en el

carbono 24⁽³⁵⁾, consiste en transformar el ácido en el halogenuro con un átomo de carbono menos mediante una reacción de Hunsdiecker, el cual se hace reaccionar con cianuro de potasio marcado con carbono-14. Por hidrólisis del nitrilo formado se obtiene el ácido de partida con la marcación radiactiva en el carbono del carboxilo. Este procedimiento se ejemplifica para



a: 1) anhídrido acético/piridina 2) nitrito de plata; b: bromo/bromuro de etilo/acetato de plata; c: 1) cianuro de potasio-¹⁴C/hidróxido de potasio/etanol 2) hidróxido de potasio/etanol 80% 3) acidificación.

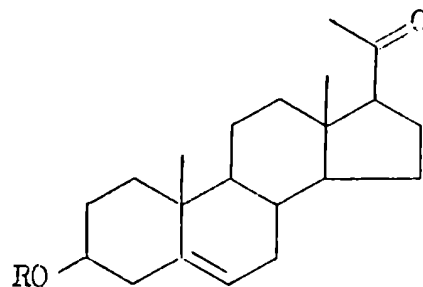
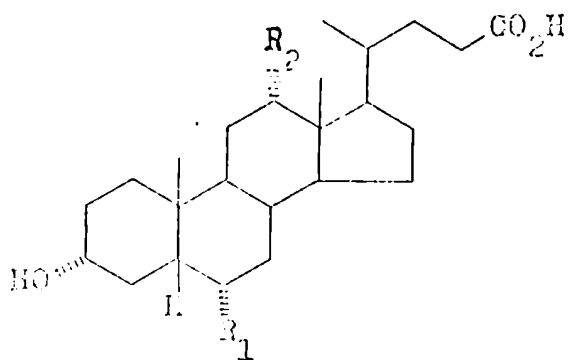
Figura 4. Síntesis del ácido hydesoxicólico-24-¹⁴C a partir de ácido hydesoxicólico (XIIa).

el ácido hyodesoxicólico (XIIa) en la Figura 4.

Cuando este método clásico se aplicó directamente al ácido 3β -hidroxi-col-5-énico (Ia) se obtuvieron principalmente productos secundarios, aun cuando se protege el doble enlace por bromación⁽³⁴⁾.

Posteriormente el método general fue mejorado y se lo utilizó para preparar ácidos biliares marcados con carbono-13 en el carbono carboxílico (carbono 24)⁽³⁶⁾. La secuencia llevada a cabo era similar a la indicada anteriormente (Figura 4) utilizando una modificación de la reacción de Hunsdiecker con tetraacetato de plomo y cloruro de litio⁽³⁷⁾ (que evita las dificultades técnicas de preparar sales de plata anhidras) para la degradación del ácido carboxílico y realizando la cianuración del cloruro obtenido con cianuro de sodio marcado con carbono-13 en dimetilsulfóxido^(38,39). De esta forma se sintetizaron ácido cólico (XXa), ácido desoxicólico (XXb), ácido litocólico (XXc) y ácido quenodesoxicólico (XXd) marcados con carbono-13 en la posición 24.

En esta tesis se presenta una síntesis del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico (Ia) y de algunos derivados de éste, a partir de acetato de pregnenolona (XXIb)⁽⁴⁰⁾ y la aplicación de éste método a la síntesis de dicho ácido marcado con carbono-14 en la posición 24⁽⁴¹⁾.



(XXI), R₁: OH; R₂: OH

(XXIa), R: H

(XXIb), R₁: H; R₂: OH

(XXIb), R: CH₃CO

(XXIc), R₁: H; R₂: H

(XXId), R₁: OH; R₂: H

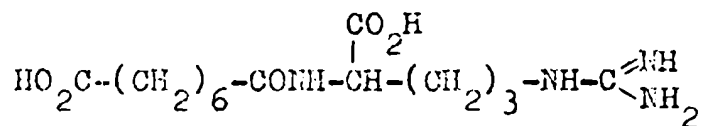
=====

Biofísica de los glicósidos y infundinósidos.

Los principios cardiotónicos o cardioactivos, son esteroides que poseen la capacidad de ejercer una acción poderosa y específica sobre el músculo cardíaco en el hombre y los animales.

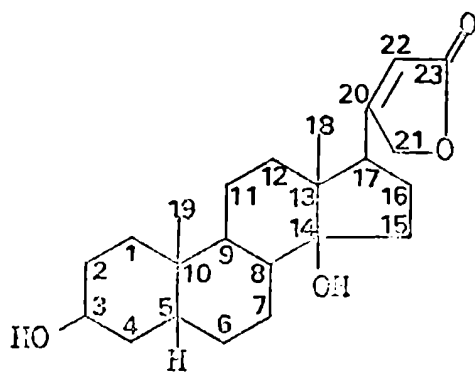
La gran mayoría de estos principios son glicósidos de origen vegetal⁽⁴²⁾, aunque los venenos de sapos contienen principios cardiotónicos que no son glicósidos sino geninas esteroidales estructuralmente relacionadas con las agliconas de los principios vegetales. También se han encontrado en ciertos insectos aunque se presume que éstos no los elaboran sino que los obtienen en su alimentación.

Se supone que la actividad cardíaca reside en la aglicona y que los hidratos de carbono le confieren una solubilidad favorable, siendo los glicósidos mas efectivos que la aglicona correspondiente. Esto no ocurre en los venenos de sapos, donde las geninas esteroidales son mas potentes que cuando se encuentran como ésteres de la suberilarginina (XXII)

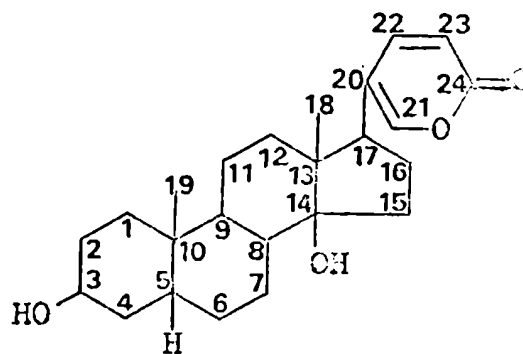


(XXII)

Estructuralmente, los principios cardiotónicos esteroi-
 dales son de dos tipos llamados cardenólidos y bufadienólidos
 (Figura 5). Los cardenólidos son esteroides de veintitres áto-
 mos de carbono, con un anillo lactónico de cinco miembros α,β -
 no saturado (grupo butenólido), y poseen un hidroxilo en posi-
 ción 14 con configuración β . Los bufadienólidos poseen veinti-
 cuatro átomos de carbono, un anillo lactónico de seis miembros
 doblemente no saturado y un hidroxilo en posición 14 o un epó-
 xido en 14,15 teniendo en todos los casos configuración β .



Digitoxigenina
 (Cardenólido)



Bufalina
 (Bufadienólido)

Figura 5. Ejemplos de los distintos tipos de principios cardio-
 tónicos.

La estereoquímica de estos compuestos corresponde al de
 un esteroil o un ácido biliar en los carbonos 8, 9, 10, 13 y 17
 pero la configuración en el carbono 14 es β , o sea que los ani-
 llos C y D se encuentran fusionados en cis. La configuración en

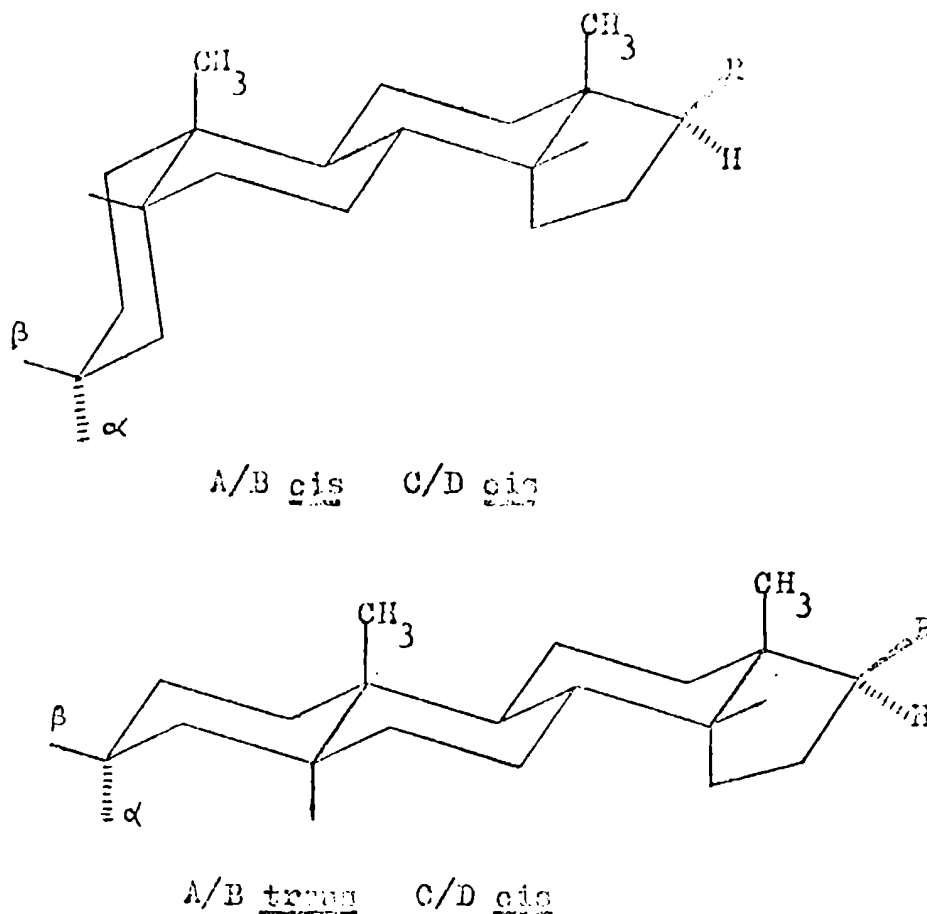


Figura 6. Estereoquímica de los cardenólidos y bufadienólidos.

el carbono 5 es β en los bufadienólidos (anillos A y B cis), mientras que en los cardenólidos puede ser α o β (Figura 6) o poseer un doble enlace en la posición 5(6).

Las variaciones estructurales en ambas series consisten en diferentes configuraciones en los carbonos 3 y 5 y en la presencia de funciones oxigenadas en distintas posiciones del sistema polinuclear.

Todos los cardenólidos existen como glicósidos vegetales, pero los bufadienólidos son productos que se encuentran

tanto en vegetales como en animales. Del Chan'su, producto comercial que se supone veneno del sapo Bufo gargarizans Cantor (43) o una mezcla del veneno de distintos sapos chinos (44), seco y molido, se han aislado cardenólidos (45,46) pero este hecho no puede ser considerado como prueba que en el veneno de sapo existan cardenólidos dado los diferentes orígenes del Chan'su y su distinta composición según la fuente en la que se adquiere.

En este capítulo se hará referencia a los estudios realizados para esclarecer la biosíntesis de ambos tipos de sustancias.

Biosíntesis de cardenólidos.

El grupo de los cardenólidos es el que ha sido mas ampliamente investigado; la biosíntesis de los mismos fue estudiada utilizando precursores marcados en plantas del género Digitalis, principalmente en Digitalis lanata y Digitalis purpurea. Se realizaron además algunos estudios complementarios en Strophanthus kombe.

Dado que la diferencia esencial entre cardenólidos y esteroides radica en que la cadena lateral alifática de estos últimos ha sido reemplazada por un grupo butenólido, es de esperar que su biogénesis esté intimamente relacionada. Teniendo en cuenta que el ácido mevalónico (XXIII) es precursor conocido del colesterol (IIa), el primer paso fue establecer si los car-

denólidos también derivaban de dicho compuesto.

En 1960 Amstutz y Beal^(47,48) encontraron que suministrando ácido mevalónico-2-¹⁴C a una planta D. lanata, aislaban un glicósido radiactivo que por hidrólisis producía digitoxigenina (XXIV) y los hidratos de carbono glucosa y digitoxosa, comprobando que toda la actividad permanecía en la aglicona. Para aclarar el origen del anillo butenólido, Isete y colaboradores^(49,50) utilizaron el mismo precursor en plantas D. purpurea obteniendo la digitoxigenina radiactiva. Si la digitoxige-

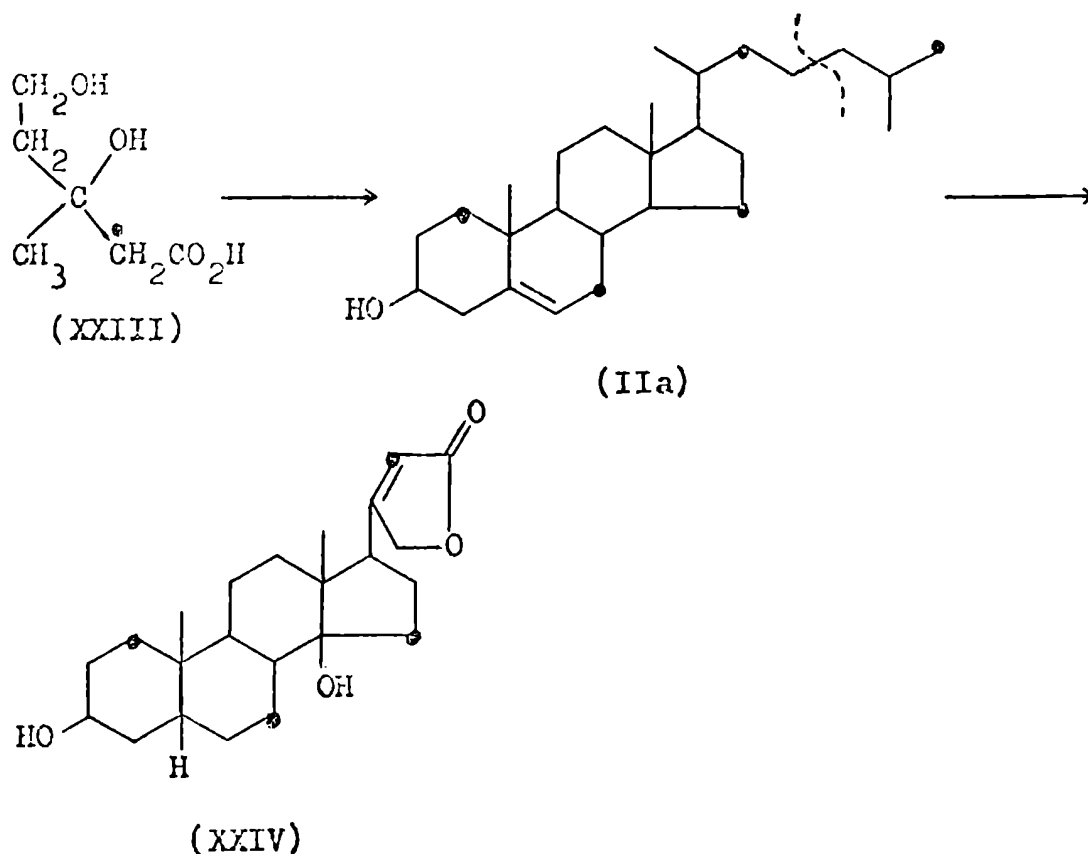


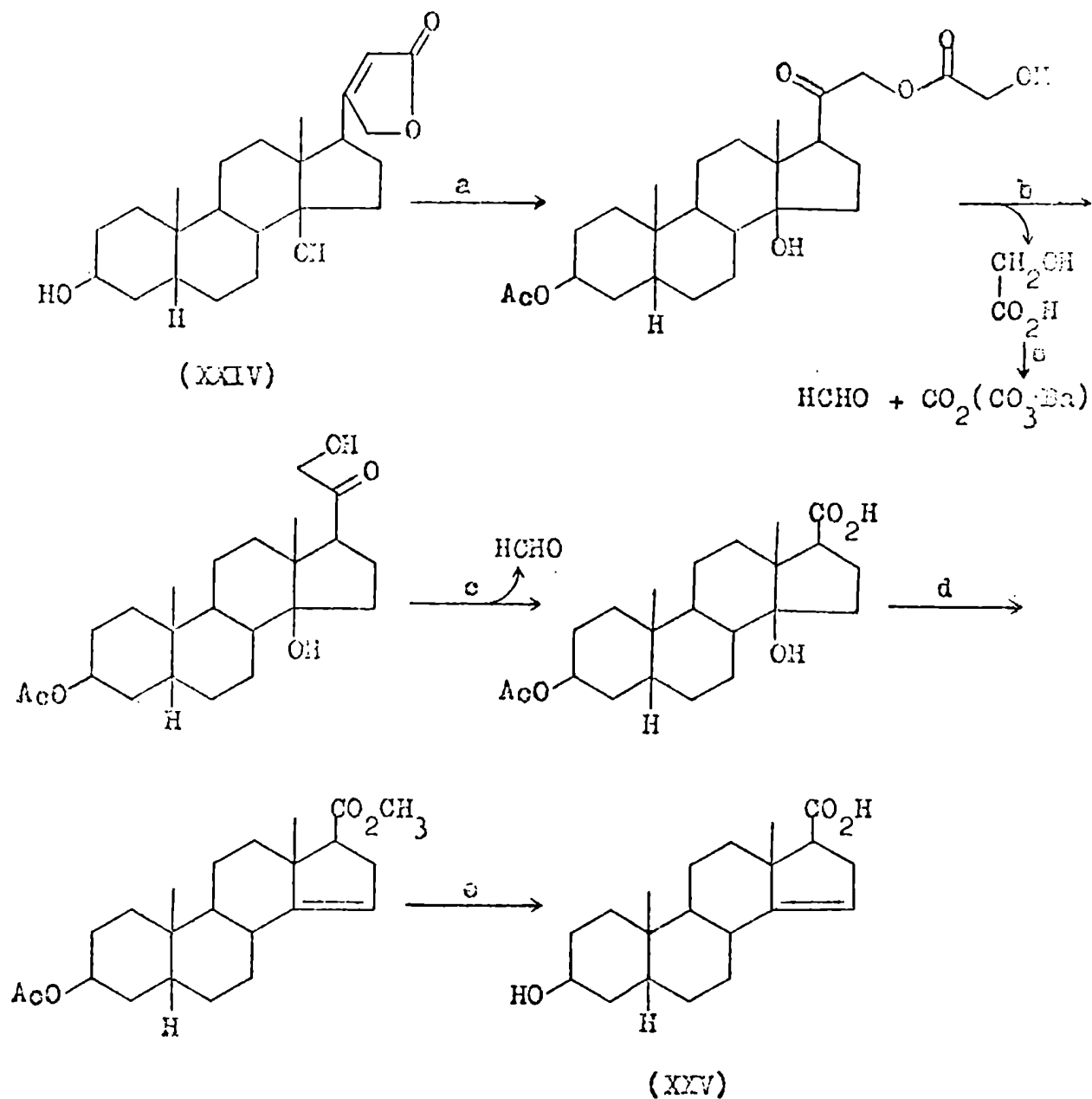
Figura 7. Hipótesis sobre la distribución de la marcación en digitoxigenina a partir de ácido mevalónico-2-¹⁴C.

nina (XXIV) se formaba a través del colesterol (IIa) o algún triterpeno muy relacionado por ruptura entre los carbonos 23 y 24, la distribución de la marcación sería la indicada en la Figura 7.

Por degradación de la digitoxigenina radiactiva al ácido etiánico (XXV) según el esquema de la Figura 8 y análisis de los otros productos de degradación que contenían los carbonos 21, 22 y 23, determinaron que el carbono 22 no estaba marcado y que el ácido etiánico (XXV) tenía la misma actividad específica que la digitoxigenina (XXIV) original. La reacción de Schmidt realizada sobre dicho ácido daba dióxido de carbono inactivo, proveniente del carbono 20.

Además la degradación total de la digitoxigenina indicó que toda la radiactividad se encontraba en los carbonos 1, 7 y 15⁽⁵¹⁾.

En consecuencia el anillo butenólido no provenía de la cadena lateral del colesterol (IIa) ni directamente a partir del ácido mevalónico (XXIII) ya que ninguno de sus átomos de carbono poseía radiactividad. Quedaban por lo tanto dos hipótesis posibles: a) una ruptura de la cadena lateral del colesterol entre los carbonos 20 y 22 para dar un 20-ceto-derivado del pregnano, el cual reaccionaría con una molécula de ácido acético (como acetyl Coenzima A) dando un β -hidroxiácido, que por



a: 1) anhídrido acético/piridina 2) ozonólisis 3) zinc/ácido acético; b: bicarbonato de potasio; c: periodato de sodio; d: 1) diazometano 2) oxiclóruo de fósforo/piridina; e: 1) hidróxido de potasio/etanol 2) acidificación.

Figura 8. Esquema de degradación del anillo butenólido de la digitoxigenina (XXIV).

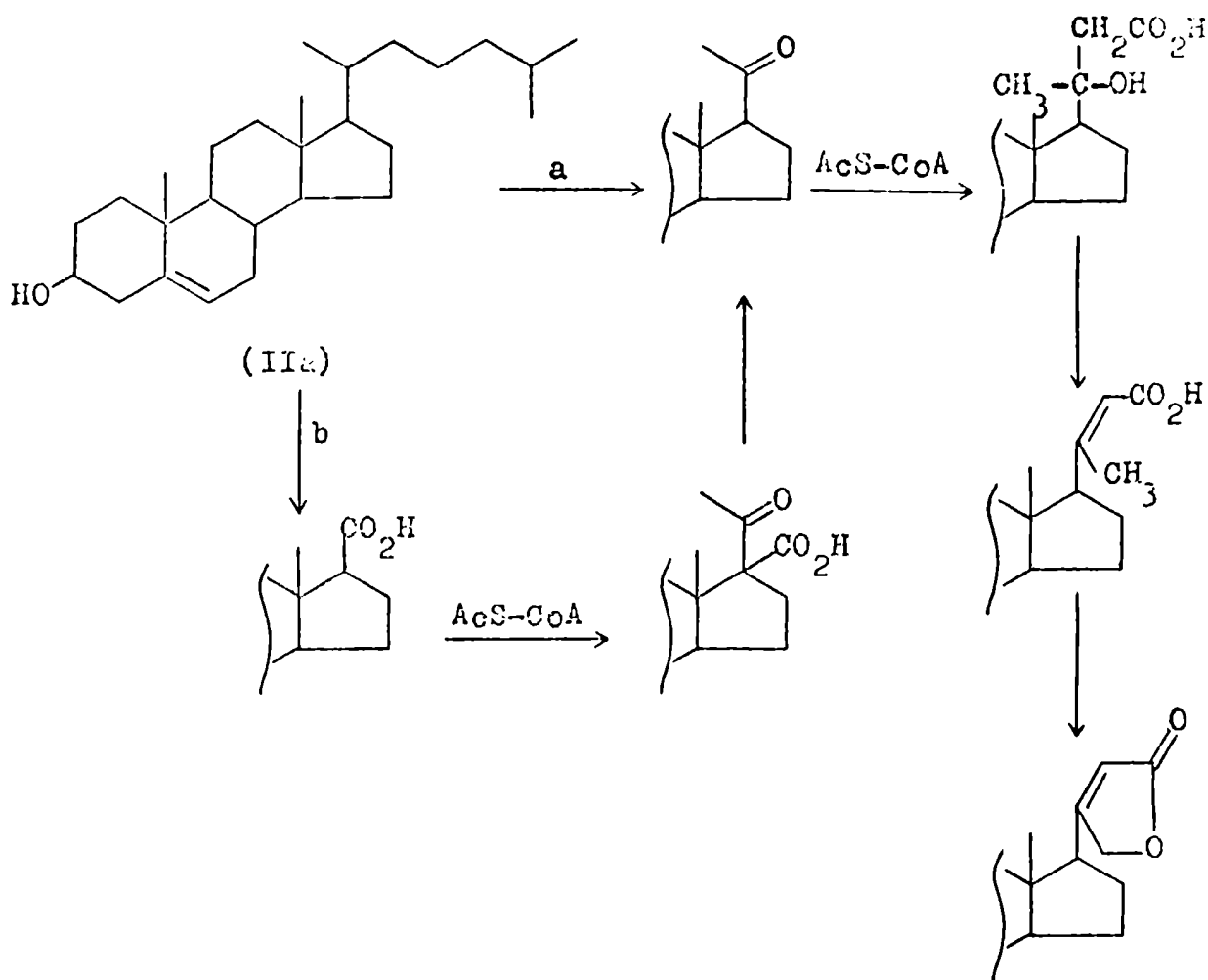


Figura 9. Hipótesis sobre la formación del anillo butenólido.

deshidratación, oxidación del carbono 21 y lactonización daría lugar al anillo butenólido y b) a partir de un ácido etiánico el que reaccionaría con una molécula de ácido acético dando un β -cetoácido que por descarboxilación daría lugar a un 20-ceto-derivado del pregnano que reaccionaría como se indicó anteriormente en a (Figura 9).

Para decidir cual era la hipótesis correcta, Leite y colaboradores hicieron experimentos suministrando a plantas D.

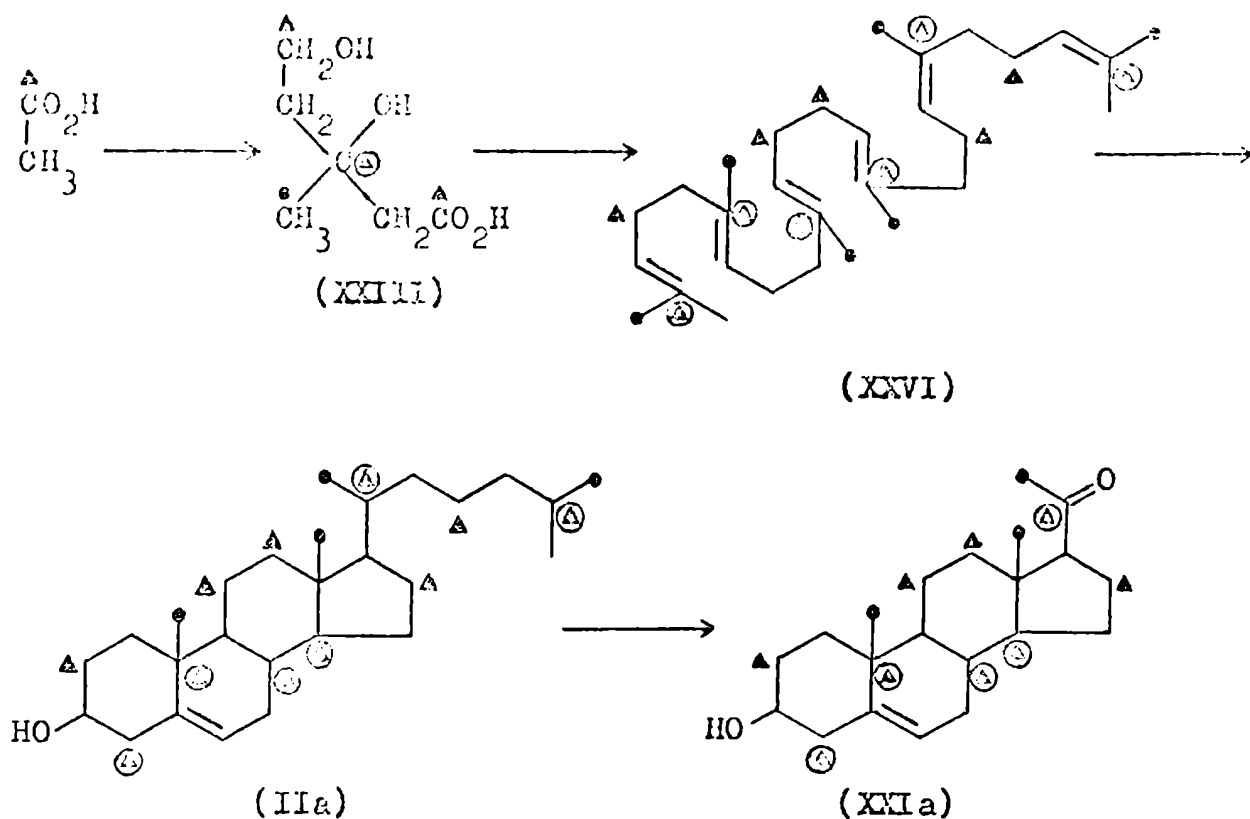


Figura 10. Distribución de la marcación en escualeno (XXVI), colesterol (IIa) y pregnenolona (XXIa) a partir de ácido mevalónico-3- ^{14}C (círculo O), -3'- ^{14}C (punto ●) (XXIII) y acetato de sodio-1- ^{14}C (triángulo Δ).

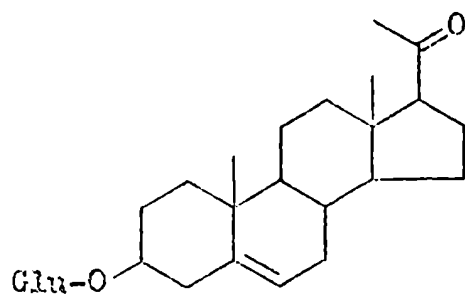
purpurae, acetato de sodio-1- ^{14}C (49,50) y ácido mevalónico-3'- ^{14}C (50) y Reichstein y colaboradores (52) suministraron ácido mevalónico-3- ^{14}C a D. lanata. Las distribuciones de la marcación en escualeno (XXVI), colesterol (IIa) y pregnenolona (XXIa) pueden observarse en la Figura 10.

La digitoxigenina (XXIV) aislada en todos los casos resultó activa, y por degradación según el esquema de la Figura 8

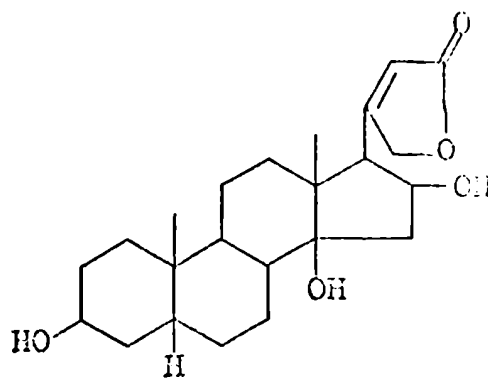
se determinó que el acetato de sodio-1- ^{14}C había dado lugar a digitoxigenina marcada en el sistema esterooidal y en los carbonos 20 y 23 del anillo butenólido, pero no en los carbonos 21 y 22, lo cual estaría de acuerdo con cualquiera de las dos hipótesis enunciadas anteriormente. El ácido mevalónico-3- ^{14}C había producido digitoxigenina marcada en el carbono 20 además del sistema esterooidal, y finalmente el ácido mevalónico-3'- ^{14}C produjo el cardenólido marcado en los carbonos 18, 19 y 21, estando la tercera parte de la actividad total presente en este último. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de un intermediario de tipo pregnano y no con un ácido etiánico, debido a que en ese caso se obtendría digitoxigenina (XXIV) sin marcación en el carbono 21 ya que éste provendría de una molécula de ácido acético (Figura 10). Además la hipótesis del ácido etiánico no sería acorde con el resultado obtenido con ácido mevalónico-3- ^{14}C , ya que en dicha hipótesis se supone que el carbono 20 proviene de una molécula de ácido acético.

En 1964 Tschesche y Lilienweiss⁽⁵³⁾ administraron el 3 β -glucósido de la pregnenolona-21- ^{14}C (XXVII) a plantas D. lanata encontrando el 6% de la actividad suministrada en los cardenólidos digitoxigenina (XXIV), gitoxigenina (XXVIII), digoxigenina (XXIX) y xysmalogenina (XXX).

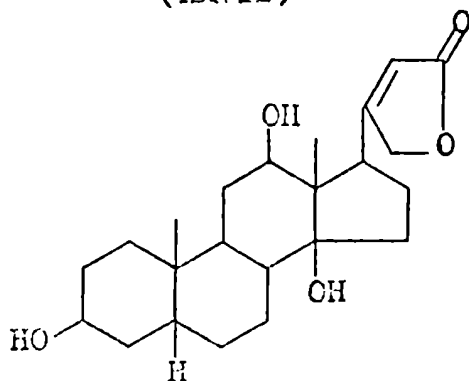
En consecuencia quedaba demostrado el camino:



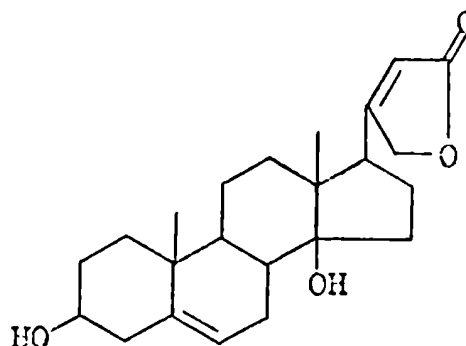
(XXVII)



(XXVIII)



(XXIX)



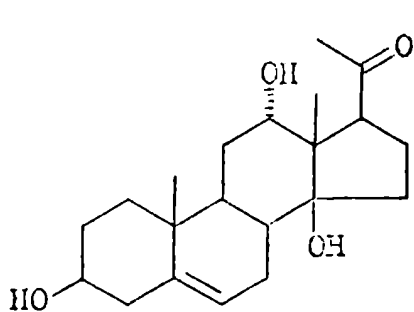
(XXX)

ácido mevalónico \longrightarrow colesterol \longrightarrow pregnenolona \longrightarrow
 1 ácido acético cardenólidos.

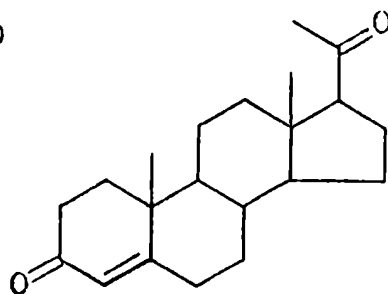
Varios trabajos posteriores, intentaron aclarar algunos pasos del esquema biosintético trazado.

Tschesche y Brassat⁽⁵⁴⁾ encontraron que administrando pregnenolona-21-¹⁴C, no ya como glucósido sino con el hidroxilo en la posición 3 β libre (XXIIa), a D. purpurea se obtenía digitoxigenina (XXIV) y el derivado del digitanol, digipurpurogenina (XXXI) radiactivos.

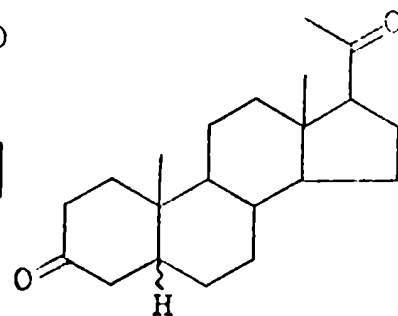
La capacidad de la planta D. lanata de metabolizar colesterol (IIa) fue demostrada por Caspi⁽⁵⁵⁾ al encontrar preg-



(XXXI)



(XXXII)

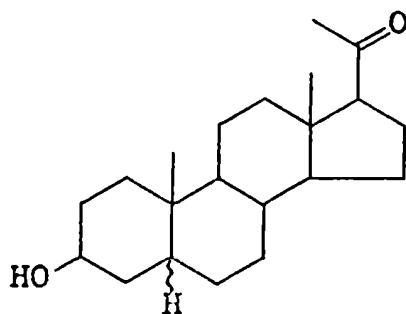
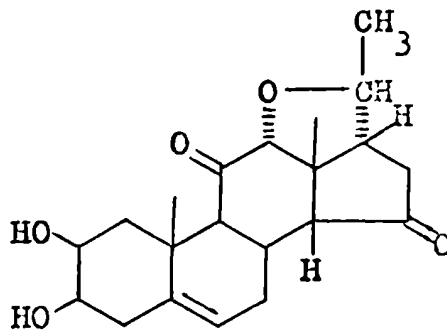
(XXXIIIa): 5 β -H(XXXIIIb): 5 α -H

nenolona (XXIa) radiactiva entre los metabolitos del colesterol -4-¹⁴C en dicha planta. Esto apoya la suposición que el colesterol (o un triterpeno muy relacionado) es el esteroide básico formado en la planta y que la pregnenolona (o un 20-ceto-derivado del pregnano) juega un papel muy importante en la biosíntesis de los cardenólidos.

Establecidos entonces los lineamientos generales del esquema biosintético, quedaba por estudiar el mecanismo de saturación del doble enlace en posición 5(6) y la hidroxilación en carbono 14.

En lo que respecta al primero de estos puntos, Heftmann y colaboradores^(56,57) realizaron un estudio de los metabolitos de la pregnenolona (XXIa), suministrando pregnenolona-4-¹⁴C a plantas D. lanata, en un intento de hallar posibles precursores de los cardenólidos e identificaron progesterona (XXXII) y 5 β -pregnán-3,20-diona (XXXIIIa) radiactivas. Se suministró enton-

ces progesterona-4- ^{14}C (58) a las mismas plantas, encontrando una muy buena incorporación a los cardenólidos (diez veces mayor que en el caso de la pregnenolona-4- ^{14}C) y una incorporación sumamente pequeña a pregnenolona (XXIIa), lo cual demostraría que la progesterona (XXXII) está mas adelante en el camino biosintético. Entre los metabolitos de la progesterona se encontraron 5β -pregnán-3,20-diona (XXXIIIa), 5α -pregnán-3,20-diona (XXXIIIb) y 5α -pregnán-3 β -ol-20-ona (XXXIVb) radiactivos; estos dos últimos no estarían involucrados en la biosíntesis de los cardenólidos saturados en la posición 5(6) presentes en D. lanata ya que éstos poseen el hidrógeno en el carbono 5 con configuración β . Por otra parte se aisló digifologenina (XXXV) y se determinó que no era activa; siendo éste un digitenol que posee un doble enlace en posición 5(6) y teniendo en cuenta que la pregnenolona-4- ^{14}C da lugar a dicho compuesto radiactivo (55, 57), se puede suponer que la progesterona (XXXII) es el inter-

(XXXIVa): 5β -H(XXXIVb): 5α -H

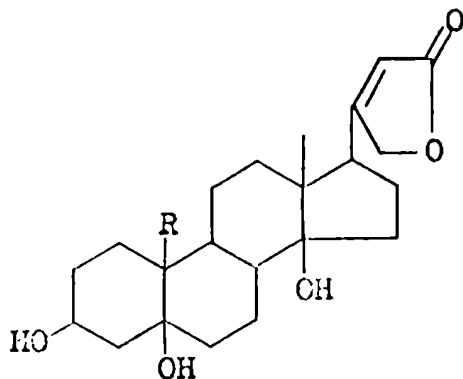
(XXXV)

mediario utilizado por la planta para reducir el doble enlace originalmente presente en la posición 5(6). Análogamente a lo que ocurre en los animales⁽⁵⁹⁾, la pregnenolona (XXIa) se transformaría en progesterona (XXXII) y en este momento se saturaría el doble enlace. Esto fue confirmado por Caspi y Hornby⁽⁶⁰⁾ quienes suministraron una mezcla de pregnenolona-3 α -T (T: tritio) y pregnenolona-4-¹⁴C a plantas D. lanata, encontrando que la digitoxigenina (XXIV) radiactiva aislada no contenía tritio en la posición 3 α .

Tschesche y colaboradores⁽⁶¹⁾ demostraron que la 5 β -pregnán-3 β -ol-20-ona (XXXIVA) y la 5 β -pregnán-3,20-diona (XXXIIIa) marcadas con tritio en las posiciones 16 y 17, son interconvertibles al ser administradas a plantas D. lanata y que son precursores de digitoxigenina (XXIV), gitoxigenina (XXVIII) y digoxigenina (XXIX).

Paralelamente a estas experiencias Heftmann y colaboradores realizaron estudios en plantas Strophantus kombé. Los cardenólidos del Strophantus difieren de los de plantas Digitalis, por tener funciones oxigenadas en las posiciones 5 y 19.

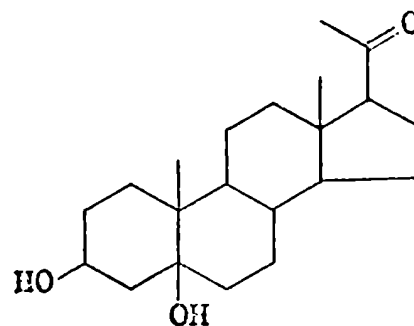
Suministrando progesterona-4-¹⁴C a plantas S. kombé, aislaron periplogenina (XXXVIa), strophantidina (XXXVIb) y strophantidol (XXXVIc) radiactivos⁽⁶²⁾ y en un estudio posterior encontraron además 5 β -pregnán-3,20-diona (XXXIIIa), 5 α -



(XXXVIa), R: CH₃

(XXXVIb), R: CHO

(XXXVIc), R: CH₂OH

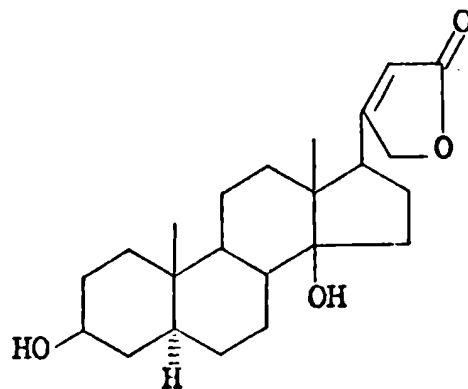


(XXXVII)

pregnán-3β-ol-20-ona (XXXIVb) (también halladas en D. lanata (56)), pregnán-3β,5β-diol-20-ona (XXXVII) y 5β-pregnán-3β-ol-20-ona (XXXIVa) radiactivas⁽⁶³⁾.

La pregnán-3β,5β-diol-20-ona estaría asociada directamente a la biosíntesis de los cardenólidos de Strophantus que poseen un hidroxilo en posición 5β, sin embargo al suministrar 5β-pregnán-3β-ol-20-ona-4-¹⁴C (XXXIVa) y pregnán-3β,5β-diol-20-ona-4-¹⁴C (XXXVII) a S. kombé se obtuvieron pequeñas incorporaciones en los cardenólidos, por lo que no pudieron sacarse conclusiones definitivas sobre la intervención de los compuestos administrados en el camino biosintético⁽⁶⁴⁾. Análogamente, al suministrar periplogenina-4-¹⁴C (XXXVIa) a S. kombé, no se encontró incorporación a los restantes cardenólidos.

Por otra parte, hasta ese momento no se habían detectado cardenólidos con un hidrógeno en posición 5α en S. kombé⁽⁶³⁾



(XXXVIII)

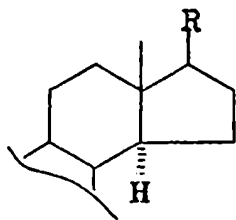
(solamente se había detectado uzarigenina (XXXVIII) en otras especies de Strophantus^(65,66)), por lo cual no se sabía la función de la 5 α -pregnán-3 β -ol-20-ona (XXXIVb) que había sido encontrada como un metabolito de la progesterona (XXXII)⁽⁶³⁾. Suministrando 5 α -pregnán-3 β -ol-20-ona-4-¹⁴C a plantas S. kombé, se aisló uzarigenina (XXXVIII) radiactiva⁽⁶⁴⁾; previamente Tschesche y Snatzke⁽⁶⁷⁾ habían encontrado 5 α -pregnán-3 β -ol-20-ona (XXXIVb) y uzarigenina (XXXVIII) en plantas Xysmalobium undulatum, sugiriendo que podía existir una relación biogénica entre ambos productos pero sin demostrarlo experimentalmente.

Ya se había señalado que una de las características de los cardenólidos es la de poseer un hidroxilo en posición 14 con configuración β . Esto es de especial interés, ya que la hidroxilación de esteroides en átomos que no son vinílogos ocurre por desplazamiento directo de un hidrógeno con retención de configuración, o sea, que el hidroxilo entrante asume la estereoquímica del protón saliente⁽⁶⁸⁾. Dado que el colesterol

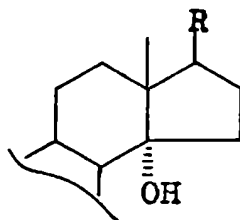
(IIa)⁽⁵⁴⁾, pregnenolona (XXIa)^(53, 54, 59) y progesterona (XXXII)⁽⁵⁹⁾, los cuales poseen el hidrógeno en posición 14 con configuración α , se incorporan a los cardenólidos, sería de esperar que si la hidroxilación ocurriera por el mecanismo conocido se obtuvieran productos que tuvieran un hidroxilo 14 α en vez de 14 β .

Para justificar este hecho Caspi y Lewis⁽⁶⁹⁾, plantearon dos hipótesis partiendo de la suposición que un precursor esteroideal con el hidrógeno en posición 14 α , sufriera una hidroxilación normal dando un 14 α -hidroxi-derivado el cual se invertiría al compuesto 14 β -hidroxilado.

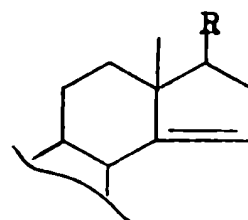
La primera hipótesis supone que la secuencia se inicia por el desplazamiento del hidrógeno 14 α en XXXIX, formando el 14 α -hidroxi-intermediario XL. Esto se ve apoyado por el aislamiento de esteroides 14 α -hidroxilados de plantas^(70, 71). El alcohol terciario XL, por deshidratación, podría dar la 14(15) olefina XLI, que por oxidación en β daría lugar al 14 β ,15 β -epóxido XLII. Nuevamente la presencia de 14 β ,15 β -epóxidos en los



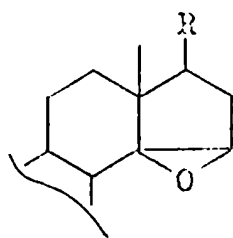
(XXXIX)



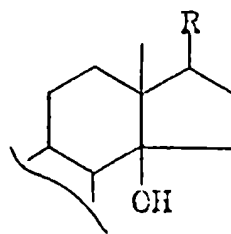
(XL)



(XLI)



(XIII)

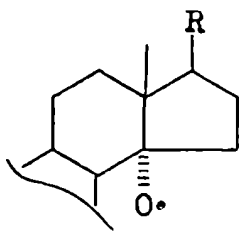


(XLIII)

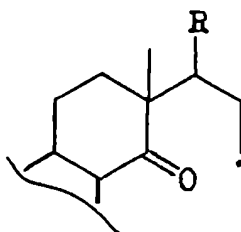
bufadienólidos apoya esta suposición. Finalmente la apertura reductiva del epóxido XIII por ataque en el carbono 15 daría lugar al 14 β alcohol XLIII.

Una variante alternativa, podría ser que el producto XL se deshidratara a una olefina 8(14) que por oxidación daría un 8 β ,14 β -epóxido el cual por ataque reductivo en el carbono 8 rendiría el 14 β alcohol XLIII.

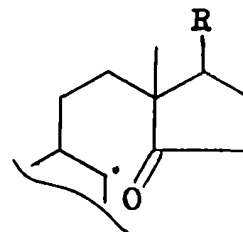
La segunda hipótesis de Caspi⁽⁶⁹⁾ supone que el proceso puede ser por radicales libres y no iónico, teniendo en cuenta que la biosíntesis de cardenólidos ocurre en las hojas^(53,54,59). Por influencia de la luz solar, el 14 α -hidroxi-derivado XL podría dar origen al radical oxi XLIV. Este tipo de radicales se reordenan a radicales ceto⁽⁷²⁾ como XLV, XLVI y XLVII. El



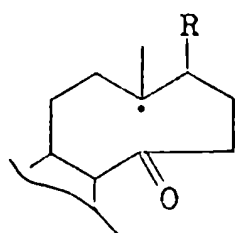
(XLIV)



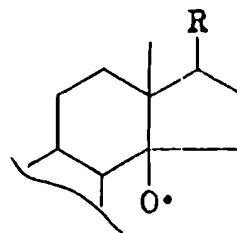
(XLV)



(XLVI)



(XLVII)



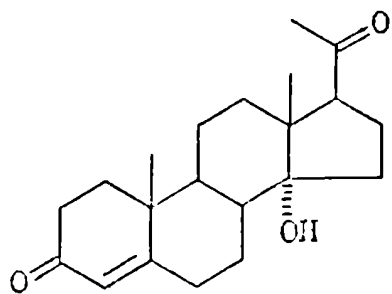
(XLVIII)

cierre del anillo podría ocurrir con inversión de la configuración en el carbono 14, dando el radical 14 β -oxi XLVIII y finalmente el 14 β alcohol XLIII.

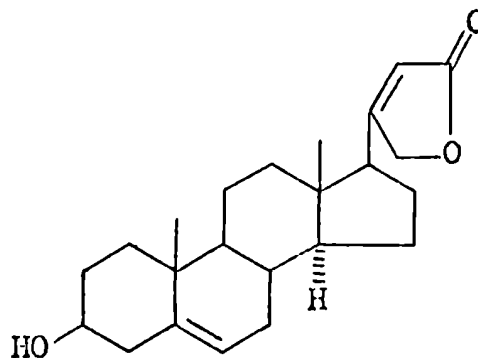
Por otra parte en ninguna de las dos hipótesis la hidroxilación inicial está limitada al carbono 14, sino que puede ocurrir en los carbonos 8 ó 15; esos hidroxicompuestos podrían transformarse en un 14 β alcohol por mecanismos similares a los propuestos.

Para probar estas posibilidades se suministró a D. lanata⁽⁶⁹⁾ una mezcla de 14 α -hidroxi-progesterona-1-T (XLIX) y progesterona-4-¹⁴C (XXXII), ya que esta última serviría como control. La digitoxigenina (XXIV) obtenida, contenía carbono-14 pero no tritio, de donde se deduce que la 14 α -hidroxi-progesterona (XLIX) no es precursora de cardenólidos.

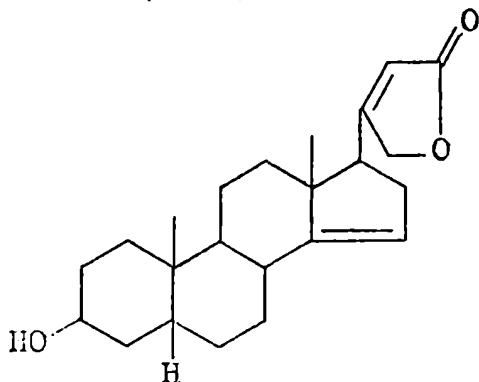
Por otra parte, Tschesche y colaboradores suministraron 5,6-dehidro-14-desoxi-14 α -digitoxigenina-22-¹⁴C (I), 14 β -anhidro-digitoxigenina-22-¹⁴C (II)⁽⁷³⁾ y 5 β -preg-14-en-3 β -ol-20-ona-16 α -T (LII)⁽⁶¹⁾ a plantas D. lanata, encontrando que en ningún



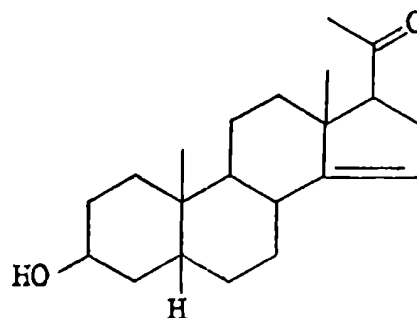
(XLIX)



(L)



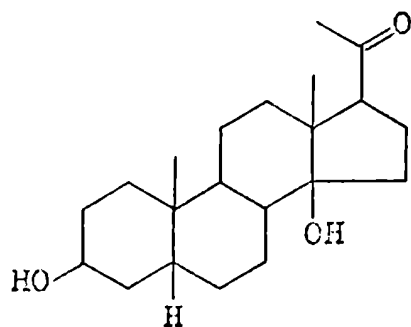
(LI)



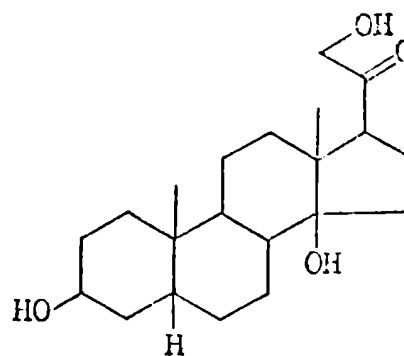
(LII)

caso la digitoxigenina (XXIV) resultó radiactiva. Si bien esto complementa el trabajo realizado por Caspi⁽⁶⁹⁾, nada puede decirse acerca de otros 14 α -hidroxi ó 14,15-dehidro-intermedios ya que éstos podrían formarse en otra etapa del proceso biosintético.

Para tratar de aclarar esta cuestión, se administró 5 β -pregnán-3 β ,14 β -diol-20-ona-15,16-T₂ (LIII)⁽⁷³⁾ y 5 β -pregnán-3 β ,14 β ,21-triol-20-ona-3 α -T (LIV)⁽⁷⁴⁾ a plantas D. lanata obteniéndose cardenólidos radiactivos, lo cual indicaría que la hidroxilación en el carbono 14 ocurre con anterioridad a la formación del anillo butenólido y que posiblemente no pasaría por un



(LIII)



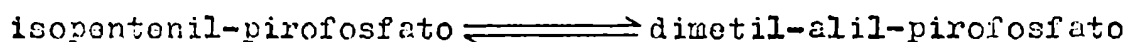
(LIV)

intermediario insaturado en posición 14(15).

Canonica y colaboradores⁽⁷⁵⁾ realizaron un trabajo muy aclaratorio respecto de la función del carbono 15 en la biosíntesis de los cardenólidos durante el proceso de hidroxilación en carbono 14. En primer lugar se administró ácido mevalónico 3R(2R-2-T-2-¹⁴C) con una relación T/¹⁴C de 8,04, a plantas D. lanata; este compuesto debía originar en la planta un intermediario 15 α -T⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾ según el esquema de la Figura 11.

La digitoxigenina (XXIV) obtenida tenía una relación T/¹⁴C de 6,34; por transformación en la 3 β -acetoxi-15-oxo-digitoxigenina (LV) dicha relación disminuyó a 4,18 (Figura 12).

Teniendo en cuenta que el colesterol biosintetizado por la planta también tenía una relación T/¹⁴C de 6,64, se puede atribuir la disminución observada en dicha relación en la digitoxigenina a la isomerización enzimática reversible:



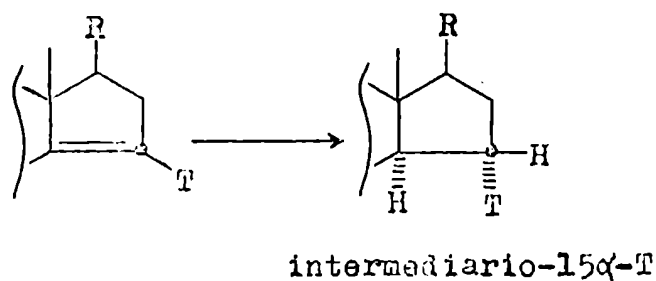
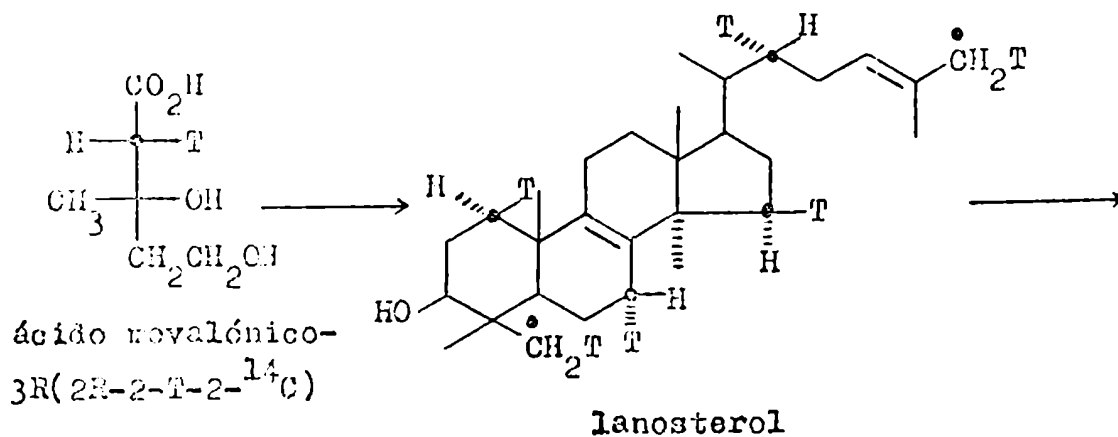
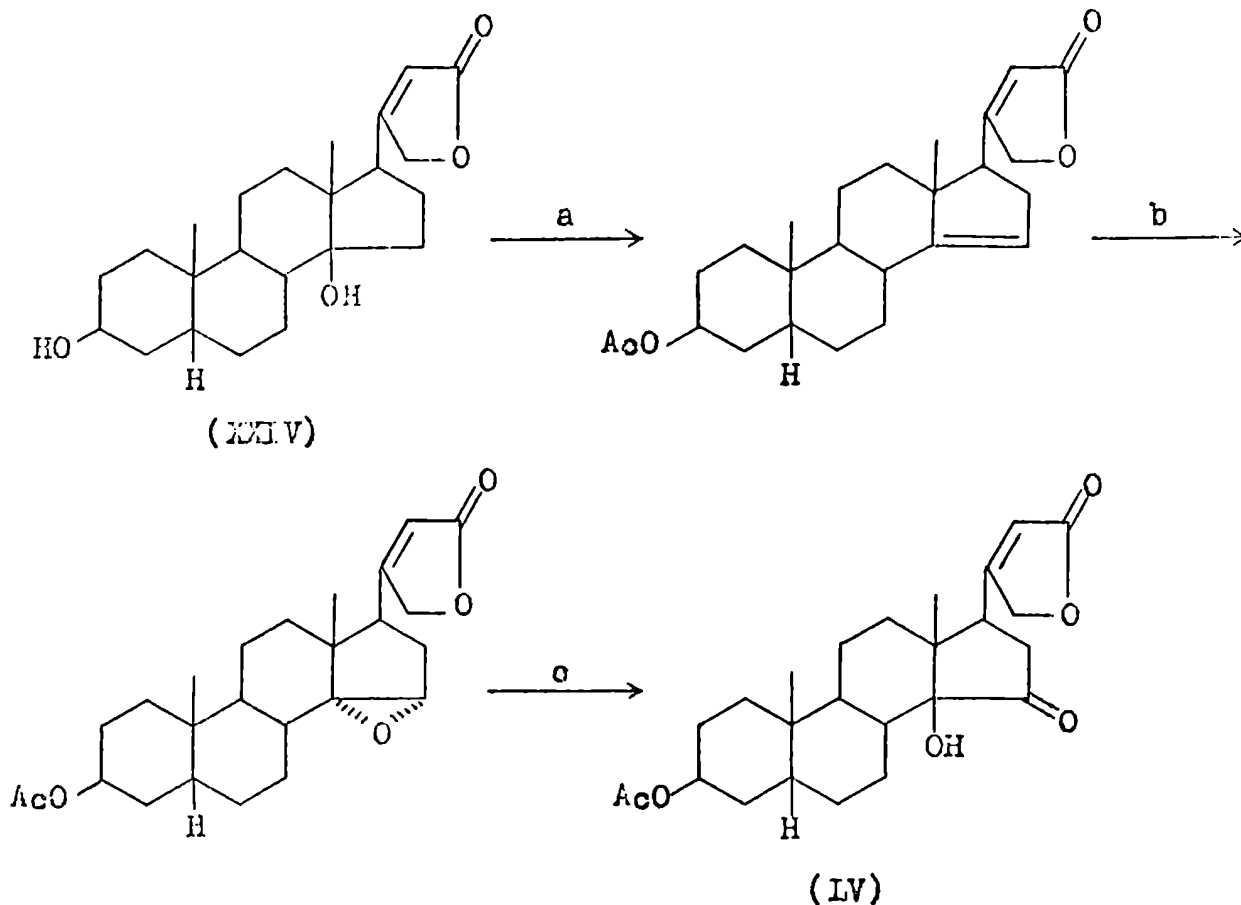


Figura 11. Formación del intermediario 15 α -T en organismos vivos.

y se puede concluir que el tritio en la posición 15 α no interviene en la conversión del precursor a los cardenólidos.

Se probó entonces con una mezcla de progesterona-15 β -T y progesterona-4- ^{14}C (XXXII) en plantas D. lanata, encontrándose que la digitoxigenina (XXIV) mantenía la relación entre los dos isótopos y que por transformación a 3 β -acetoxi-15-oxo-digitoxigenina (LV) según el esquema de la Figura 12, se perdía la casi totalidad del tritio. Esto indicaba que el tritio en la posición 15 β tampoco intervenía en la conversión de la progesterona (XXXII) a cardenólidos.



a: 1) anhídrido acético/piridina 2) cloruro de tionilo/piridina;
b: ácido metacloroperbenzoico; c: trióxido de cromo.

Figura 12. Transformación de digitoxigenina (XXIV) en 3β-acetoxy-15-oxo-digitoxigenina (LV).

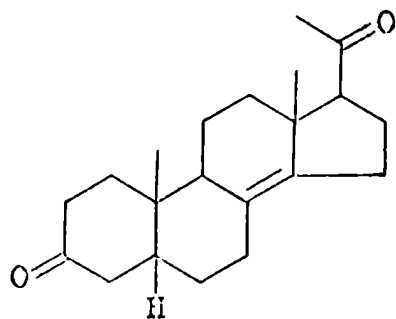
Por último, para confirmar estos resultados, se suministró a D. lanata una mezcla de pregnenolona-15 α ,15 β ,21,21,21- T_5 y pregnenolona-4- ^{14}C (XXIa) aislándose la digitoxigenina (XXIV) que fue sometida a degradación según el esquema de la Figura 8, para dar el ácido etiánico correspondiente el cual tenía una relación $T/^{14}C$ de 9,52. Por otra parte el precursor administrado se equilibró con hidróxido de sodio en metanol-

agua para eliminar el tritio de carbono 21 y el producto obtenido tenía una relación T/¹⁴C de 9,49, debido exclusivamente al tritio presente en el carbono 15.

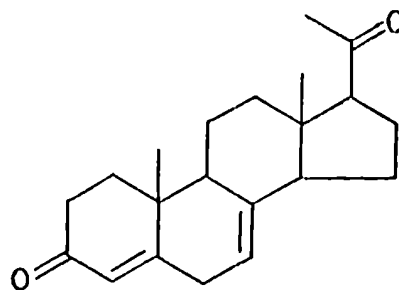
En consecuencia se puede concluir que los hidrógenos de carbono 15 no intervienen en el mecanismo de la hidroxilación en el carbono 14, lo cual descarta todos los posibles intermediarios con un doble enlace en la posición 14(15).

Para determinar si había intervención del hidrógeno en carbono 8, Caspi y colaboradores⁽⁷⁹⁾ administraron una mezcla de colesterol-8β-T y colesterol-4-¹⁴C (IIa) a plantas D. lanata encontrando que la relación de isótopos se mantenía en los cardenólidos aislados, digitoxigenina (XXIV) y digoxigenina (XXIX). Este resultado indicaba que el hidroxilo en la posición 14β, se introdujo sin intervención del hidrógeno en 8β; quedarían pues eliminados los intermediarios con dobles enlaces en las posiciones 7(8), 8(9) y 8(14).

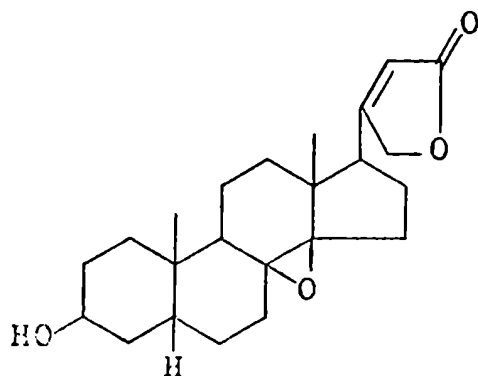
Sin embargo, paralelamente Tschesche y Kleff⁽⁸⁰⁾ administraron 5β-preg-8(14)-en-3,20-diona-7-T (LVI), pregnenolona-7α-T (XXIa) y 7,8-dehidro-progesterona-6-T (LVII) a plantas D. lanata, encontrando que los dos primeros son precursores de digitoxigenina (XXIV) pero no el último. En base a estos resultados los autores proponen que la hidroxilación en el carbono 14 podría ocurrir por formación del epóxido 8β,14β y apertura re-



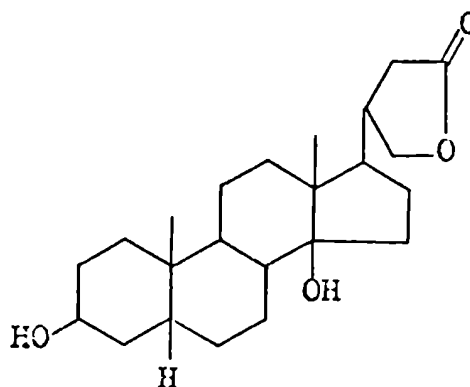
(LVI)



(LVII)



(LVIII)



(LIX)

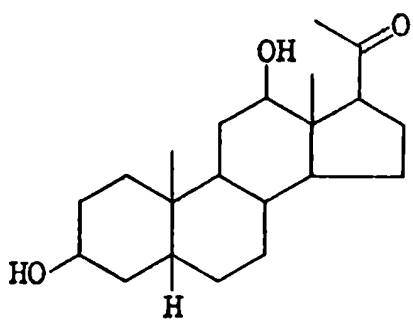
ductiva del mismo. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho que entre los productos de hidrogenación catalítica de la adinigerigenina (LVIII) figure la dihidrodigitoxigenina (LIX), con lo cual el $8\beta,14\beta$ -epóxido sería capaz de transformarse reductivamente en un 14β alcohol.

Los resultados anteriores señalan que sigue siendo problemática la introducción del doble enlace en la posición $8(14)$. Dado que tanto el 5β -derivado del pregnano, como el que posee un doble enlace en la posición $5(6)$, son precursores de los cardenólidos puede suponerse que ocurra una deshidrogenación en el carbono 5 y posterior trasposición del doble enlace dentro del anillo B. Teniendo en cuenta que el derivado con un doble

enlace en la posición 7(8) (LVII) no se incorporó, Tschesche (80) prefiere suponer que hay una deshidrogenación directa por eliminación de los hidrógenos axiales 8 y 14, o mejor aun una primera deshidrogenación con pérdida de los hidrógenos axiales 8 y 9 y migración posterior del doble enlace a la posición 8(14). La incorporación del precursor LVI, descarta posibles hidroxilaciones en la posición 7 que pudieran dar lugar a un 7-ceto-derivado.

En consecuencia con los datos existentes hasta el momento no es posible aclarar el mecanismo biosintético de la hidroxilación β en la posición 14.

Por último con respecto a las hidroxilaciones en otras posiciones del sistema esterooidal los datos son muy limitados. Tanto la digitoxigenina (XXIV)^(61,74) como la 5 β -pregnán-3 β ,12 β -diol-20-ona (LX)⁽⁶¹⁾ son precursores de digoxigenina (XXIX) con lo cual la hidroxilación en la posición 12 β podría tener lugar indistintamente antes o después de la formación del ani-



(LX)

llo butenólido. Sin embargo, la digitoxigenina (XXIV) no es precursora de gitoxigenina (XXVIII)⁽⁷⁴⁾ lo cual indicaría que la hidroxilación en la posición 16 β , tendría lugar antes de la formación del anillo lactónico.

Las posibles rutas biosintéticas de los cardenólidos en plantas D. lanata⁽⁸¹⁻⁸³⁾ y S. kombé⁽⁶²⁻⁶⁴⁾ pueden apreciarse en el esquema de la Figura 13.

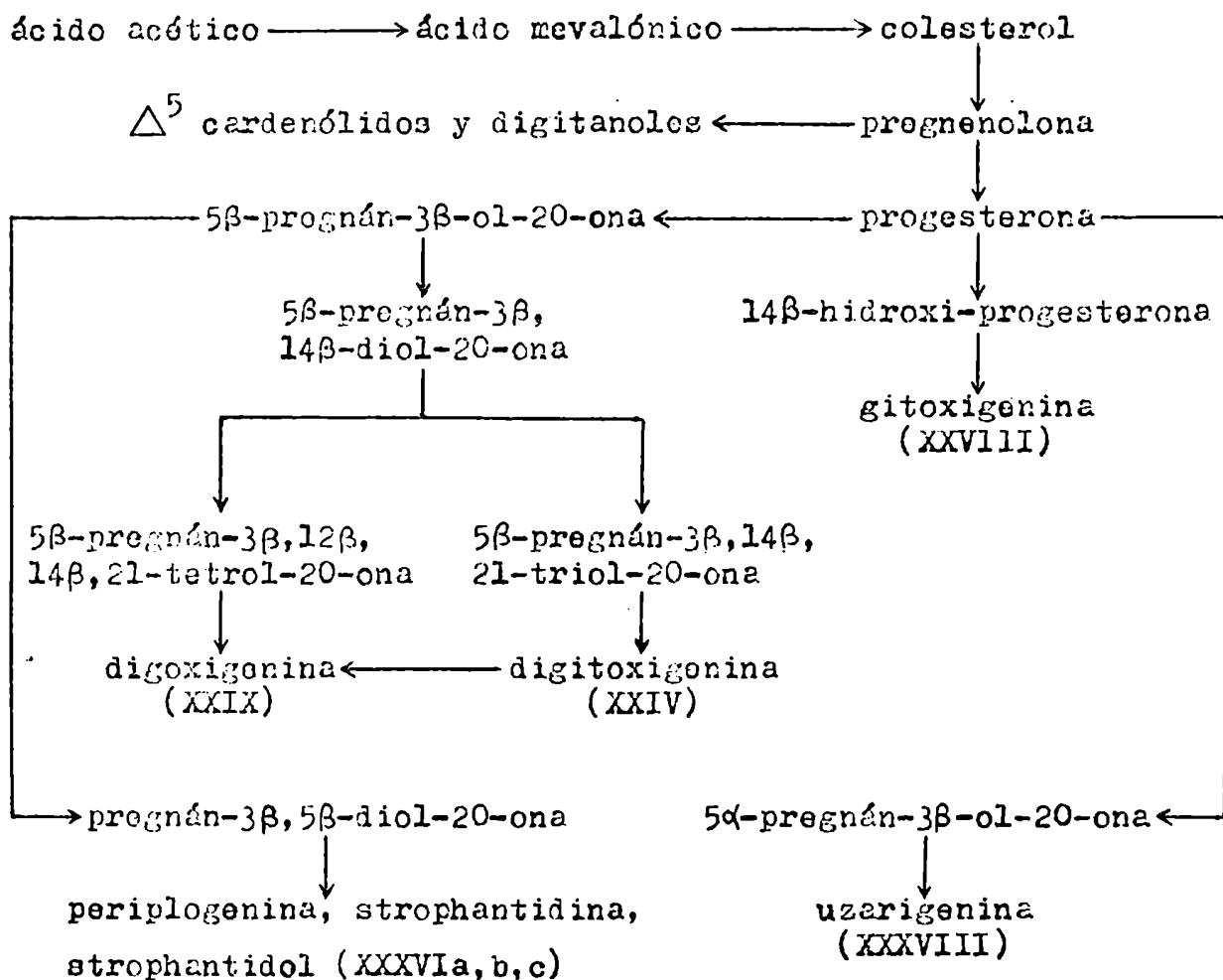


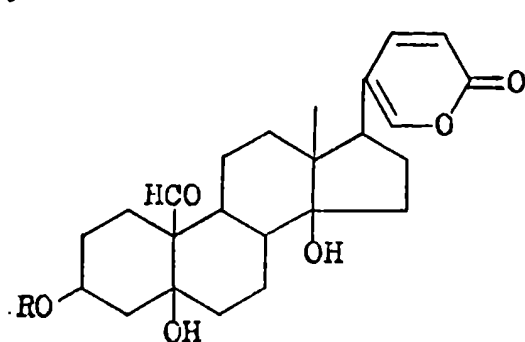
Figura 13. Rutas biosintéticas posibles de formación de cardenólidos en plantas D. lanata y S. kombé.

Biofisiología de bufadienólidos.

Como se indicó, los bufadienólidos son estructuralmente similares a los cardenólidos presentando en la cadena lateral un anillo lactónico de seis miembros doblemente insaturado.

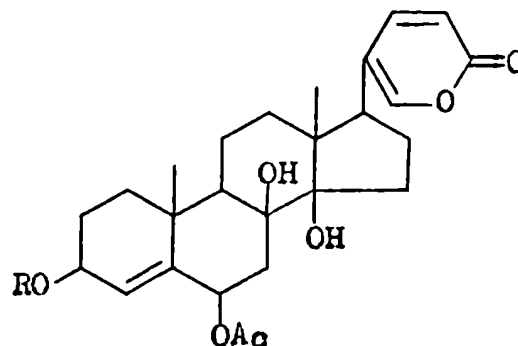
Es interesante el hecho que los bufadienólidos son de los pocos compuestos orgánicos que se encuentran tanto en el reino vegetal como en el reino animal.

En plantas, los bufadienólidos se encuentran como glicósidos; como ejemplos se pueden citar la hellebrina (LXIa) que se encuentra en el Helleborus atropurpureus, el scillirósido (LXIIa) presente en la variedad roja de la Scilla maritima y la scillaren A (LXIIIa) en la variedad blanca de esta misma planta. Todos estos glicósidos son muy resistentes a las hidrólisis por métodos químicos y para obtener las agliconas correspondientes (hellebrigenina (LXIb), scillirosidina (LXIIb), scillarenina (LXIIIb)) se debe recurrir a hidrólisis enzimáticas (84-87).



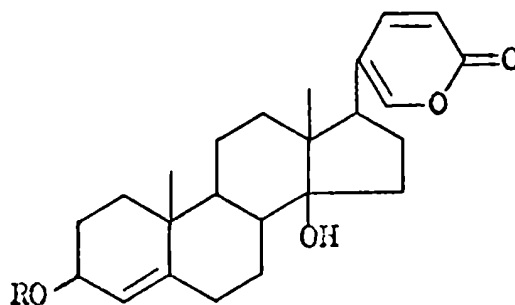
(LXIa), R: glucosa-ramnosa

(LXIb), R: H



(LXIIa), R: glucosa

(LXIIb), R: H



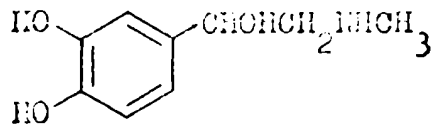
(LXIIIa), R: glucosa-ramnosa

(LXIIIb), R: H

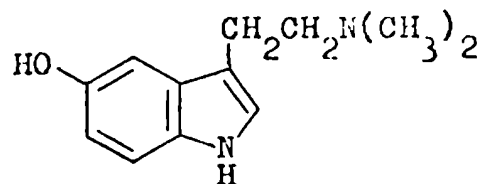
En animales, los bufadienólidos se encuentran como las geninas libres o como ésteres de la suberilarginina (XXII) (bufotoxinas), en la secreción de las glándulas presentes en la piel del sapo (orden: Anura, familia: Bufonidae), principalmente en las parótidas situadas detrás de los ojos, y en algunas especies también en las glándulas tibiales, ubicadas en las patas traseras. Dicha secreción, contiene una mezcla de productos cuya acción sobre el corazón es semejante a la de los compuestos digitálicos.

Los estudios fueron efectuados inicialmente por Chen⁽⁸⁸⁾ y más recientemente por Okada y colaboradores⁽⁸⁹⁾, encontrando que además de su acción digitálica la mezcla presenta un marcado efecto como anestésico local, que en algunos casos resulta superior al de la cocaína^(89,90).

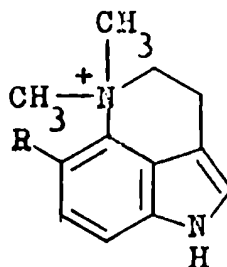
La secreción de las glándulas del sapo es una mezcla compleja de sustancias que pueden ser divididas en dos grupos:



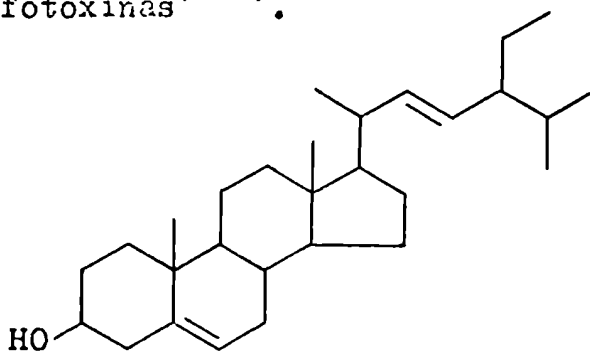
(LXIV)



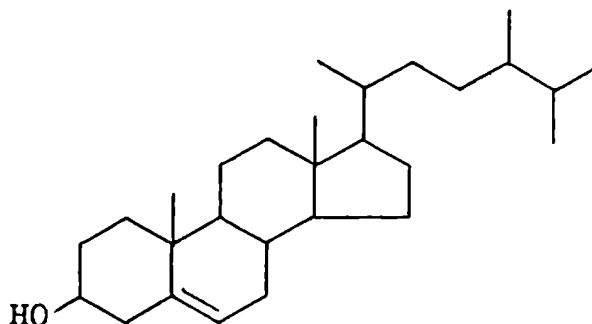
(LXV)

(LXVIa), R: ^-O (LXVIb), R: ^-O_3SO

compuestos básicos y esteroides. Entre los primeros se ha encontrado adrenalina (LXIV)^(91,92), bufotenina (LXV)^(92,93), dehidrobufotenina (LXVIa)^(94,95) y bufotonia (LXVIb)⁽⁹⁶⁾; entre los segundos se ha encontrado colesterol (IIa)⁽⁹⁰⁾, γ -sitosterol^(97,98) (mezcla de sitosterol (IIb), stigmasterol (LXVII), colesterol y campesterol (LXVIII)⁽⁹⁹⁾), bufogeninas⁽¹⁰⁰⁾ y bufotoxinas⁽¹⁰¹⁾.



(LXVII)



(LXVIII)

Los estudios biosintéticos de los bufadienólidos en el reino vegetal han sido realizados en Helleborus atrorubens y en la variedad roja de la Scilla maritima; en el reino animal dichos estudios se han llevado a cabo en sapos Bufo marinus, Bufo paracnemis y Bufo europeus.

Dada la similitud estructural entre cardenólidos y bufadienólidos, se pensó que la biogénesis de éstos estaría muy relacionada. En 1965, Tschesche y Brassat⁽¹⁰²⁾ suministraron el glucósido de pregnenolona-21-¹⁴C (XXVII) a Helleborus atrorubens, determinando que la hellebrina (LXIa) aislada al cabo de 16 días era radiactiva. Por ozonólisis de este producto, previa acetilación, se obtuvo una sustancia inactiva, lo cual demostraba que la radiactividad presente en la hellebrina (LXIa) se encontraba en el anillo lactónico y que por tanto no había ocurrido una ruptura de la pregnenolona dando acetato radiactivo y posterior síntesis del bufadienólido.

Posteriormente, se suministró pregnenolona-4-¹⁴C y pregnenolona-3 α -T (XXIa)⁽¹⁰³⁾ con el fin de estudiar el mecanismo de hidroxilación en la posición 5. La hellebrina aislada contenía tritio aunque la relación T/¹⁴C había disminuido. Por otra parte, la 5 β -pregnán-3 β -ol-20-ona-16,17-T₂ (XXXIVa) y la 5 α -pregnán-3 β -ol-20-ona-16,17-T₂ (XXXIVb)⁽¹⁰³⁾, no fueron incorporadas. Esto permite suponer que la hidroxilación en el

carbono 5 no ocurre por sustitución directa del hidrógeno en esa posición sino por adición de agua al doble enlace 5(6). Además el hecho que haya una retención parcial del tritio en la posición 3 α , implica que no es necesaria la formación de un 3-ceto-derivado; sin embargo la pérdida de tritio encontrada puede deberse a que la pregnenolona (XXIa) (o un derivado relacionado) esté en equilibrio con un 3-ceto-derivado que no intervendría directamente en la biosíntesis de la hellebrina (LXIa).

Paralelamente a estos ensayos en Helleborus atrorubens, Gros y colaboradores realizaron experiencias en la variedad roja de la Scilla maritima encontrando que el ácido mevalónico-2-¹⁴C (XXIII)^(104,105) y la pregnenolona-20-¹⁴C (XXIa)⁽¹⁰⁶⁾ se incorporaban a la scillirosidina (LXIIb) lo cual confirma los resultados anteriores.

De acuerdo con estos datos se puede postular el esquema biosintético básico de la Figura 14 para la formación de los bufadienólidos en plantas. No es conocida hasta el momento la unidad X que reacciona con el intermediario tipo pregnano para formar el anillo lactónico. Tampoco es sabido si el aporte de los tres átomos de carbono requeridos provendrían de un solo compuesto o mediante dos adiciones sucesivas.

Un camino posible de formación del anillo lactónico de 2-pirona, es la condensación del ácido oxalacético (LXIX) con

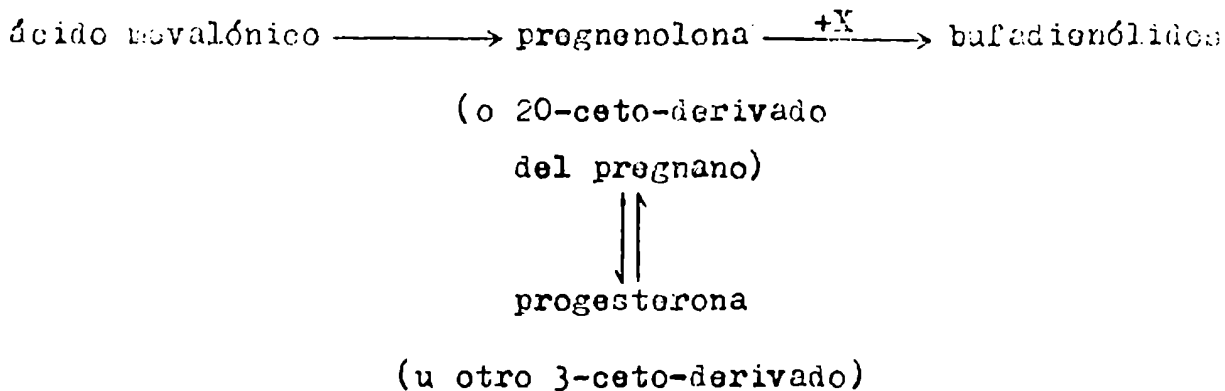


Figura 14. Esquema biosintético de formación de los bufadienólidos en plantas.

un derivado de la pregnenolona (XXIa), con posterior pérdida de dióxido de carbono y lactonización. La reducción del grupo carbonilo presente en el anillo y la pérdida de dos moléculas de agua produciría el anillo lactónico hexaatómico doblemente insaturado (Figura 15).

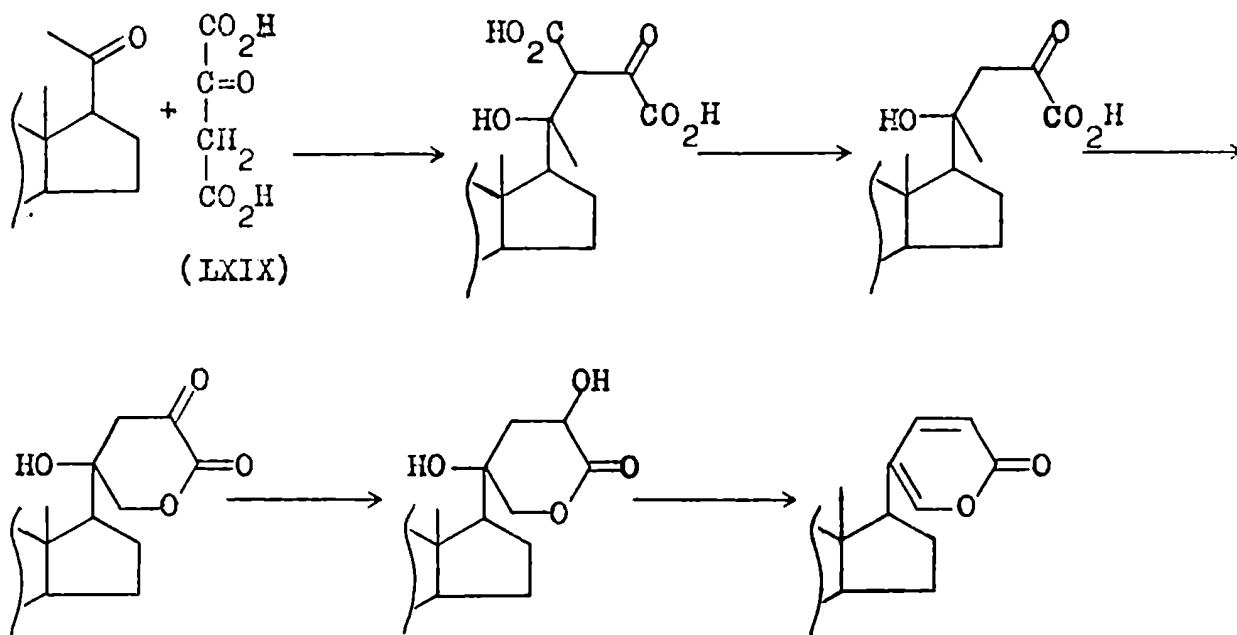
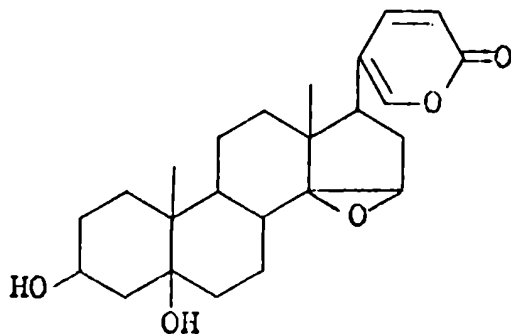


Figura 15. Hipótesis sobre la formación del anillo 2-pirona.

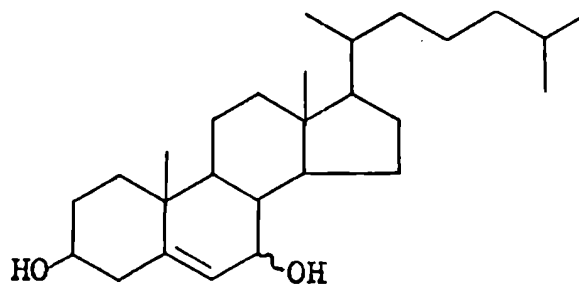
Los estudios biosintéticos realizados en animales, fueron comenzados en 1951 por Doull y colaboradores⁽¹⁰⁷⁾ quienes encontraron bufadienólidos radiactivos en el veneno de sapos alimentados con algas que habían sido cultivadas en atmósfera de dióxido de carbono radiactivo. Este resultado tiene un valor relativo en lo que se refiere a la biosíntesis de los bufadienólidos, ya que no se conocían con certeza los precursores utilizados dado que las algas podrían haber elaborado una mezcla de compuestos radiactivos.

En 1957, Siperstein y colaboradores⁽¹⁰⁸⁾ inyectaron colesterol-4-¹⁴C (IIa) a sapos Bufo marinus, encontrando que la marinobufagina (LXX) aislada al cabo de 75 días era radiactiva; los mismos autores encontraron que dicho bufadienólido no era radiactivo cuando se suministró acetato de sodio-1-¹⁴C en las mismas condiciones e indican que el colesterol es precursor de los bufadienólidos en sapos pero que el ácido acético no lo es. Este razonamiento no tiene en cuenta el resultado experimental que el ácido acético es precursor del colesterol (IIa) en los organismos animales⁽¹⁰⁹⁾ y en consecuencia la no incorporación del acetato de sodio radiactivo en los bufadienólidos es difícil de explicar.

Posteriormente otros investigadores^(110,111) repitieron las experiencias con colesterol-4-¹⁴C en sapos Bufo marinus,



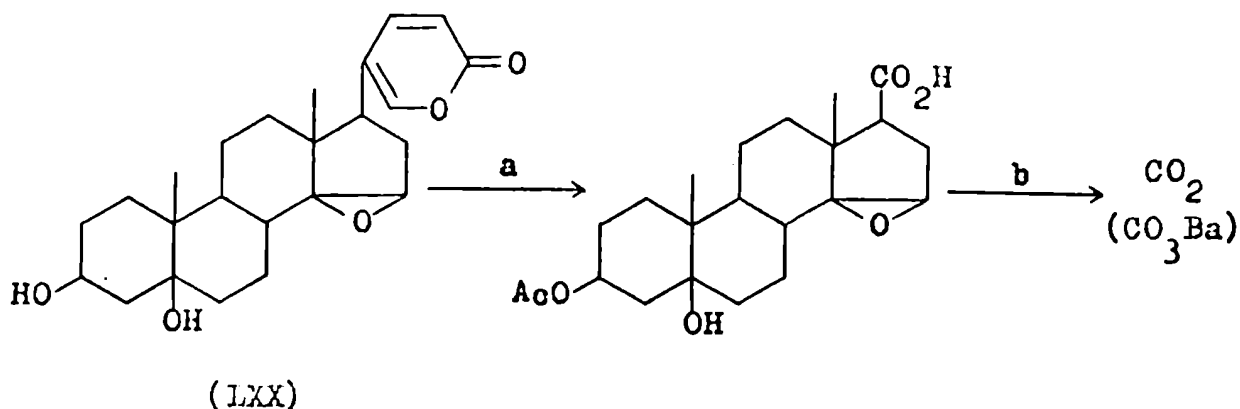
(LXX)

(LXXIa): 7 α -OH(LXXIb): 7 β -OH

encontrando incorporaciones mucho menores en los bufadienólidos que las obtenidas por Siperstein⁽¹⁰⁸⁾.

Buscando una analogía en el origen de bufadienólidos de plantas y de animales se inyectó pregnenolona-4-¹⁴C a sapos Bufo marinus⁽¹¹⁰⁾ y pregnenolona-20-¹⁴C a sapos Bufo Paracnemis^(106,112) encontrándose que en ambos casos la marinobufagina (LXX) aislada no era radiactiva. Se puede postular entonces que en el caso de los sapos, el colesterol (IIa) sería inicialmente transformado a un intermediario con estructura de ácido biliar (113), que luego sería convertido en los bufadienólidos. El hecho de haberse aislado 7 α -hidroxi-colesterol (LXXIa) y 7 β -hidroxi-colesterol (LXXIb) del veneno de sapo⁽¹⁰⁰⁾, que son intermediarios importantes en la biosíntesis de los ácidos biliares^(114,115), apoya esta hipótesis a pesar que hasta el momento no se han encontrado 7-hidroxi-bufadienólidos en dicho veneno.

Los resultados anteriores fueron confirmados por inyec-



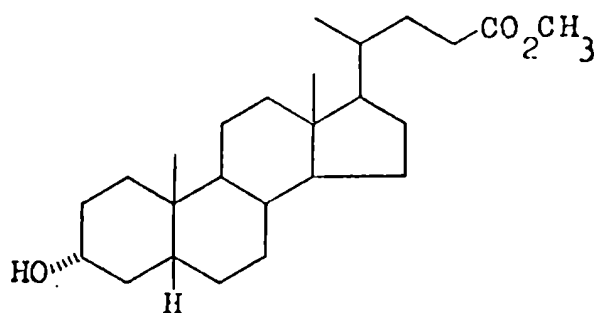
a: 1) anhídrido acético/piridina 2) permanganato de potasio; b: azida de sodio/ácido sulfúrico concentrado.

Figura 16. Esquema de degradación de la marinobufagina (LXX).

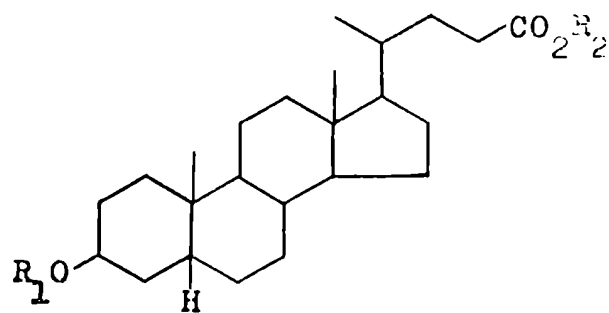
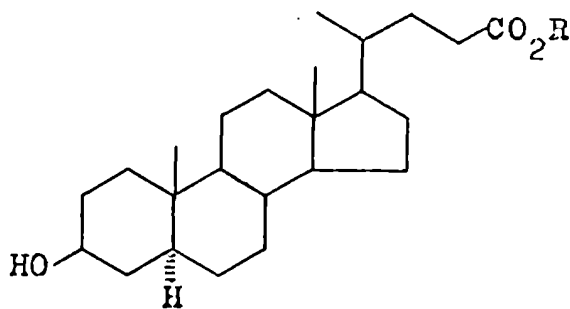
ción de colesterol-20-¹⁴C a sapos Bufo Paraenemis (112,118). La marinobufagina (LXX) aislada al cabo de 78 y 107 días resultó radiactiva; por oxidación al ácido etiánico correspondiente, previa acetilación, y degradación de Schmidt de dicho ácido se determinó que toda la actividad del bufadienólido residía en el carbono 20 (Figura 16).

Por otra parte el ácido mevalónico (XXIII) es incorporado en los bufadienólidos y en el colesterol (IIa) en sapos Bufo paraenemis (105,112).

Teniendo en cuenta que los ácidos biliares podrían ser posibles precursores de los bufadienólidos en sapos, se inyectó a ejemplares de Bufo marinus el éster metílico del ácido 3 α -hidroxi-5 β -colánico-24-¹⁴C (LXXII), el ácido 3 α -hidroxi-5 β -colánico-24-¹⁴C (XXc), el éster metílico del ácido 3 β -formoxi-5 β -



(LXXII)

(LXXIIIa), R_1 : HCO; R_2 : CH_3 (LXXIIIb), R_1 : H; R_2 : Na(LXXIIIc), R_1 : H; R_2 : H(LXXIVa), R: CH_3

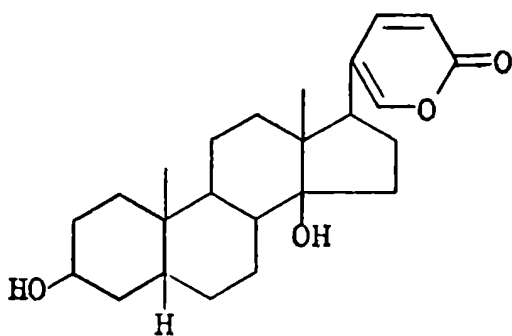
(LXXIVb), R: H

colánico (LXXIIIa) marcado con tritio, la sal de sodio del ácido 3β -hidroxi- 5β -colánico- 24 - ^{14}C (LXXIIIb) y los ésteres metílicos de los ácidos 3β -hidroxi- 5α -colánico (LXXIVa) y 3β -acetoxi-col- 5 -énico (Id) marcados con tritio⁽¹¹⁰⁾, encontrándose que los 3α -hidroxi-compuestos no fueron incorporados en los bufadienólidos pero si los 3β -isómeros. Dado que con estos últimos se obtuvo una buena incorporación en los bufadienólidos es poco probable que haya ocurrido una degradación de los compuestos

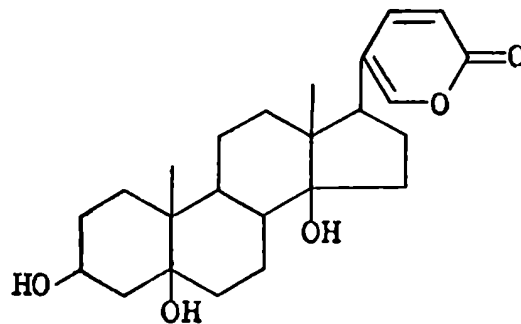
inyectados a unidades de dos o tres carbonos que luego se hayan introducido en el metabolismo dando origen a los bufadienólidos. Una prueba definitiva requeriría verificar en el caso de los precursores marcados con carbono-14 que el carbono 24 de los bufadienólidos esté marcado, experiencia ésta que no fue realizada.

Por otra parte los bufadienólidos fueron purificados por cromatografía en placa preparativa, e identificados solamente por cromatografía en capa delgada con lo cual los resultados obtenidos no son totalmente seguros.

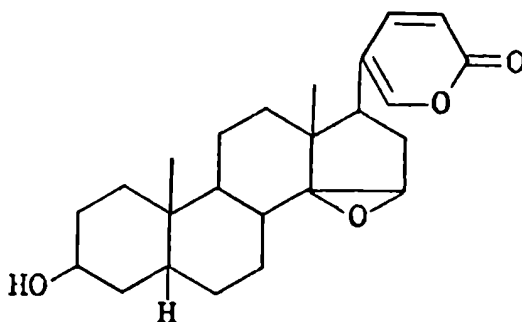
La conversión del colesterol (IIa) en bufadienólidos, involucra una serie de transformaciones bioquímicas interesantes, como ser la degradación de la cadena lateral a un anillo lactónico de seis miembros doblemente insaturado, la incorporación de un hidroxilo terciario en la posición 14 β . (bufalina (LXXV), telocinobufagina (LXXVI)) o de un epóxido en posición 14 β ,15 β (marinobufagina (LXX), resinobufagina (LXXVII)) y la



(LXXV)



(LXXVI)



(LXXVII)

incorporación de hidroxilos secundarios en otras posiciones (100). Ninguna de estas transformaciones ha sido estudiada hasta el presente en lo que se refiere al orden en que tienen lugar o al mecanismo bioquímico interviniente.

Los resultados anteriores indican que el colesterol (IIa) es precursor directo de los bufadienólidos de origen animal y que el camino colesterol \longrightarrow pregnerolona \longrightarrow bufadienólidos, a diferencia de lo que ocurre en las plantas (página 46), no tiene lugar en los animales.

No está aclarado el camino metabólico de colesterol a bufadienólidos aunque puede suponerse que, como se ha demostrado para el caso de los ácidos biliares⁽¹¹⁴⁾, la introducción de funciones oxigenadas ocurre con anterioridad a la formación del anillo lactónico.

Teniendo en cuenta la lentitud con que se forman los bufadienólidos, en los sapos, comparados con la formación del colesterol (IIa), y el hecho que en los venenos de sapo no se

han detectado compuestos con una cadena lateral del tipo de ácido colánico, puede suponerse que el paso lento en la conversión del colesterol a los bufadienólidos sería la degradación de la cadena lateral⁽¹¹⁷⁾ y el ácido colánico formado se transformaría rápidamente en los bufadienólidos.

Para la transformación biológica del colesterol en los bufadienólidos pueden postularse varios caminos⁽¹¹²⁾ que se presentan en la Figura 17.

Puede suponerse que se inicia con la ruptura de la cadena lateral del colesterol (o de un producto relacionado) para dar una estructura tipo ácido colónico o colánico o un derivado de éstos. En el caso de un intermediario como el ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia), la secuencia podría continuar por hidroxilación en el carbono 14 (LXXVIII) o transformación al derivado con un doble enlace en la posición 14(15) (LXXIX), por deshidratación de un 14 α -hidroxi-intermediario; la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 14 β , ha sido discutida al tratar la biosíntesis de los cardenólidos en plantas (página 30) pero el mecanismo aun no está aclarado.

La epoxidación de la olefina 14(15) (LXXIX) daría lugar al intermediario LXXX, que alternativamente podría provenir del 14 β -hidroxi-compuesto LXXVIII. La transformación de LXXVIII y LXXIX a los derivados saturados daría lugar a los 5 β -H-bufadie-

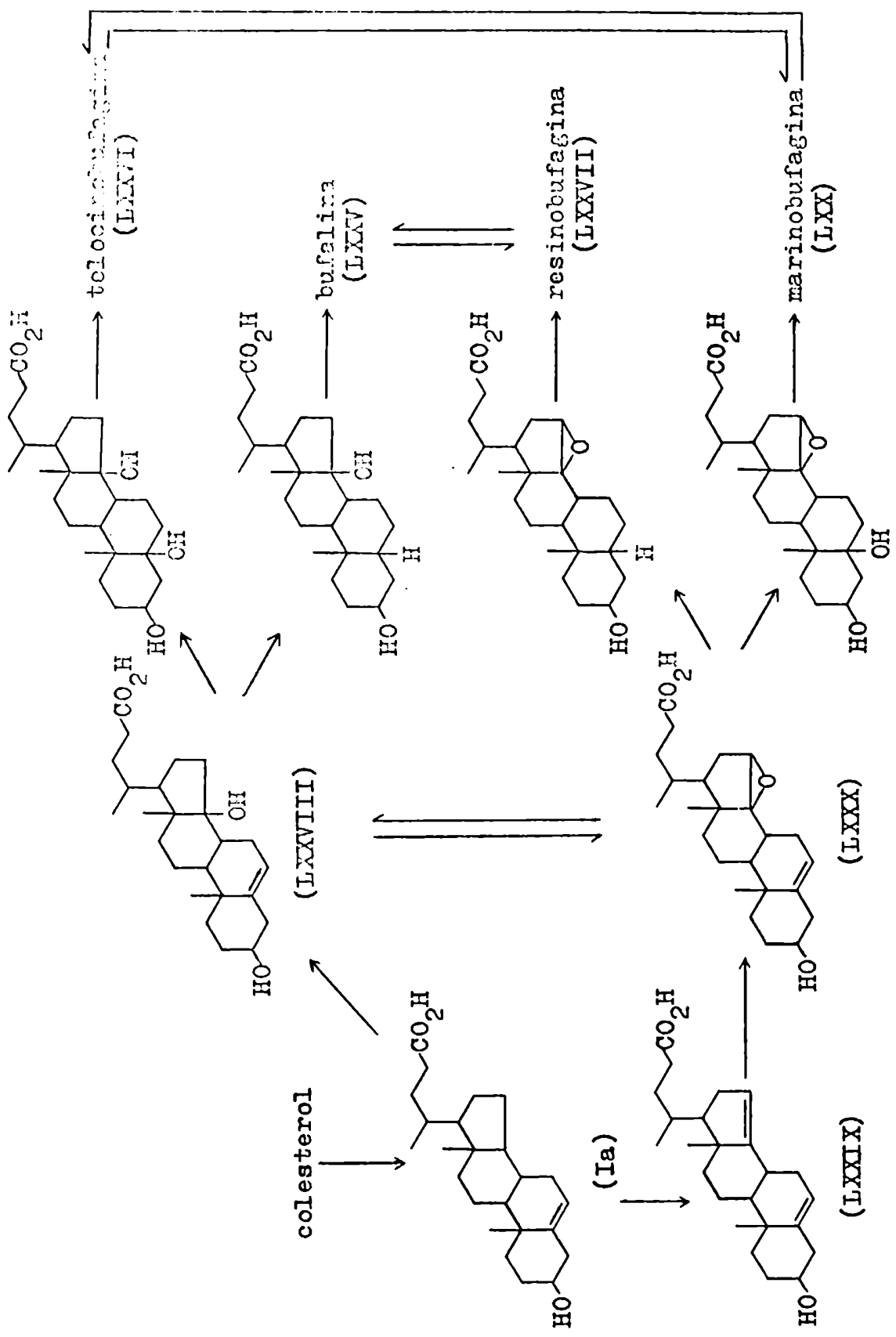


Figura 17. Posibles rutas biosintéticas de colesterol a bufadienólidos en sapos.

nólidos (bufalina (LXXV), resinobufagina (LXXVII)); la adición de agua al doble enlace en posición 5(6) por otra parte daría lugar a los 5 β -hidroxi-bufadienólidos (marinobufagina (LXX), telocinobufagina (LXXVI)). Esta última suposición está apoyada por el hecho que ha sido demostrada la adición de agua al doble enlace 5(6) en la biosíntesis de los bufadienólidos en plantas (103) para dar los 5 β -hidroxi-derivados según se indicó anteriormente (página 45).

Una alternativa a este camino consiste en que las hidroxilaciones en el sistema esteroidal ocurran con anterioridad a la ruptura de la cadena lateral del colesterol (IIa).

Con respecto a los pasos finales para dar los bufadienólidos se puede suponer que la hidroxilación en el carbono 21 y la ciclación a la δ -lactona ocurre con anterioridad a la formación de los dobles enlaces en el anillo lactónico.

Por otra parte es posible una interconversión entre los bufadienólidos, lo cual está apoyado por el hecho que al inyectar marinobufagina (LXX) marcada con tritio a sapos Bufo marinus se encontró una pequeña incorporación en la telocinobufagina (LXXVI)⁽¹¹¹⁾.

La saturación del doble enlace en posición 5(6) de los intermediarios para dar los 5 β -H-derivados podría transcurrir a través de un 3-ceto-intermediario con un doble enlace en posi-

ción 4(5), como se ha demostrado para la biosíntesis de los cardenólidos en plantas (página 26).

Los estudios biosintéticos en sapos se ven dificultados por el lento metabolismo del animal, y por el hecho que los bufadienólidos se encuentran distribuidos en distintas partes del mismo; así al suministrar marinobufagina (LXX) marcada con tritio a sapos Bufo marinus hembra, se encontró que al cabo de 90 días la mayor parte del bufadienólido radiactivo se encontraba inalterado en los tejidos ováricos y en cantidades menores en el tracto gastrointestinal⁽¹¹¹⁾ mientras que en el veneno extraído de las glándulas se encontró muy poca marinobufagina radiactiva, siendo la telocinobufagina (LXXVI) el producto principal de conversión aunque ésta no pudo ser correctamente identificada.

=====

C A P I T U L O 3

Descripción de las reacciones realizadas e interpretación de los resultados obtenidos.

Para la síntesis del ácido 3β -hidroxi-cól-5-énico (Ia) se eligió como producto de partida el acetato de pregnenolona (XXIb) que posee el esqueleto esteroidal requerido y un grupo cetónico en la posición 20, que permitiría la introducción de una cadena lateral en esa posición por reacciones de tipo nucleofílico sobre el carbono carbonílico. Además el camino de síntesis elegido debía ser tal que permitiera colocar un carbono radiactivo en la posición 24 del ácido 3β -hidroxi-cól-5-énico (Ia), con el máximo aprovechamiento de la materia prima marcada para lo cual la marcación debía realizarse en los pasos finales de la síntesis.

Una reacción adecuada para este propósito, sería la sustitución de un halógeno en la posición 23 por un grupo ciano proveniente de cianuro de potasio marcado con carbono-14; una posterior hidrólisis del nitrilo formado produciría el ácido carboxílico buscado. Otra posibilidad sintética sería efectuar sobre el producto halogenado un reactivo de Grignard y luego carbonatarlo utilizando dióxido de carbono marcado (Figura 18). De lo anterior se deduce que el compuesto halogenado, que podría ser el cloruro de 3β -acetoxi-24-norcól-5-enilo (LXXXI), se

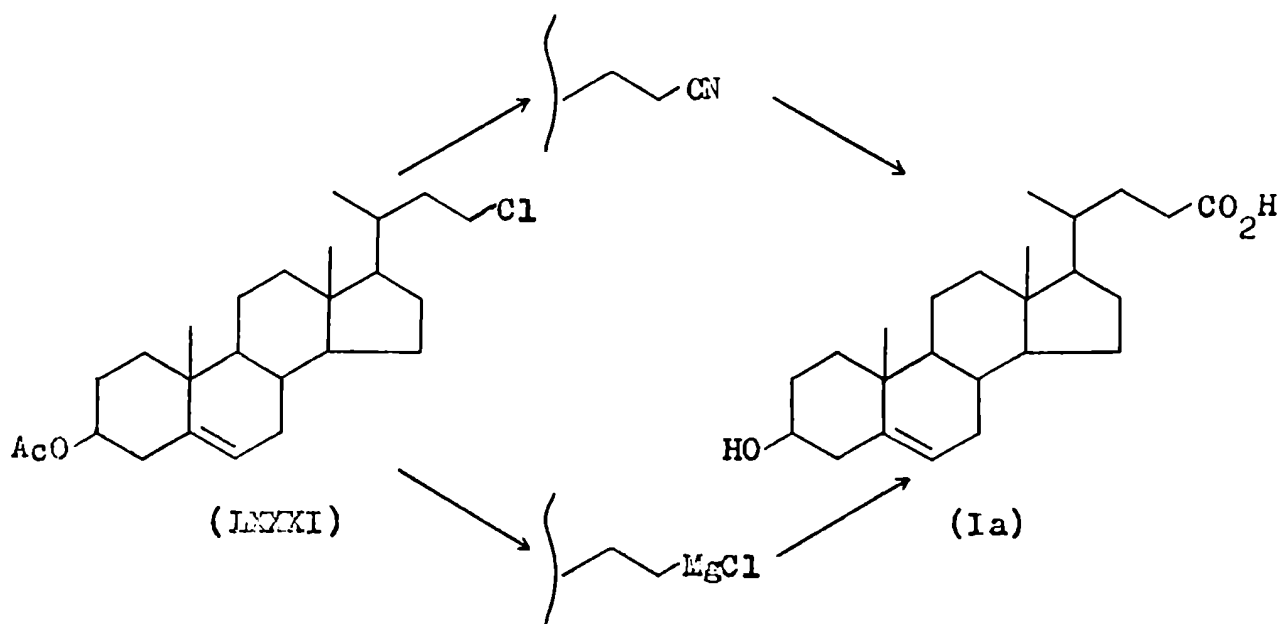
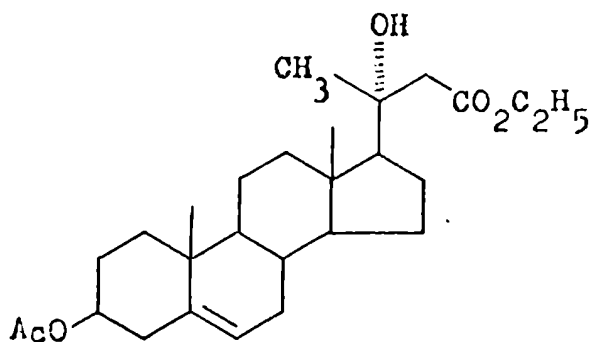


Figura 18. Posibles transformaciones del cloruro de 3β-acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXI) en el ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia).

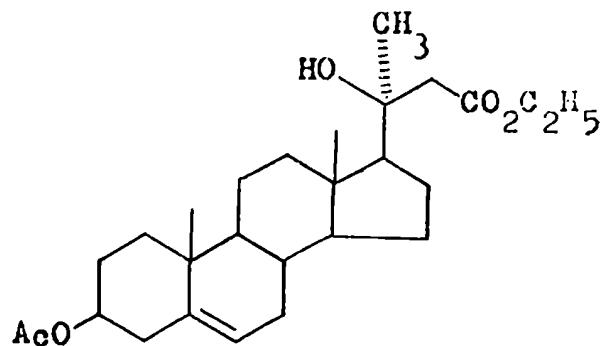
se transformaría en el intermediario clave de la síntesis.

Por lo tanto el problema se reduciría a una homologación de dos carbonos sobre la posición 20 del acetato de pregnenolona (XXIb) con la característica indispensable que la cadena lateral agregada debería poseer en su extremo (carbono 23 del sistema esteroideal) un grupo funcional susceptible de ser transformado en un halogenuro. Con vistas a desarrollar ese esquema, se eligieron dos reacciones de homologación: la reacción de Reformatsky y la reacción de Wittig.

La reacción de Reformatsky con bromoacetato de etilo y zinc en éter etílico-benceno realizada sobre acetato de pregne-



(LXXXII-20R)



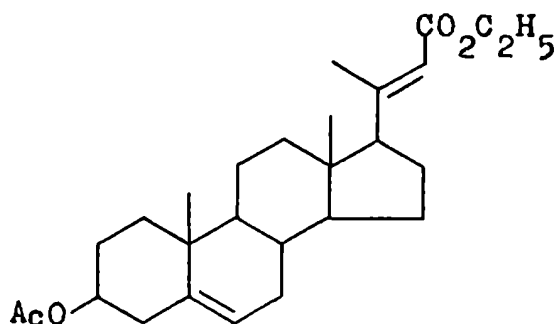
(LXXXII-20S)

nolona (XXIb) produjo, luego de acetilar el producto de reacción con anhídrido acético en piridina, el éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20-hidroxi-23-norcol-5-énico (LXXXII)⁽¹¹⁸⁾ que resultó una mezcla de los diasterómeros 20R y 20S, siendo este último el natural.

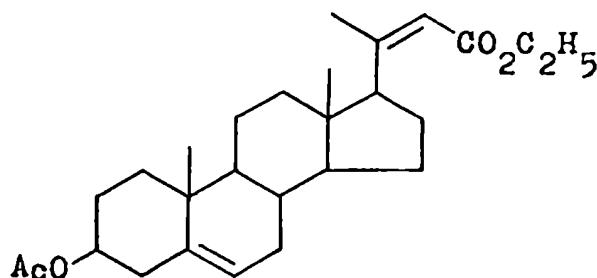
La presencia de ambos epímeros pudo ser determinada mediante espectrometría de resonancia magnética protónica, observando el diferente valor de campo donde resuenan los protones del carbono 21⁽¹¹⁹⁾; según se comenta mas adelante (página 90), en el epímero 20R dichos protones resuenan a δ 1,21 mientras que en el caso del 20S este valor es 1,36. En el caso presente el diasterómero 20S se encuentra en mayor proporción, según puede discernirse de la integración de las respectivas señales (Figura 23); no se intentó separarlos sino que se continuó trabajando con la mezcla.

Para eliminar el hidroxilo de la posición 20, se eligió la secuencia deshidratación-hidrogenación. La reacción del com-

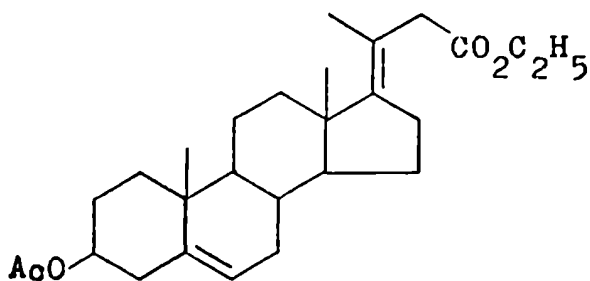
puesto LXXXII con oxiclóruo de fósforo en piridina⁽¹²⁰⁾ dió lugar a una mezcla de isómeros según pudo determinarse por cromatografía gas-líquido; de esta mezcla pudo separarse por recristalización de etanol 95% un isómero puro que fue identificado como el éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5, (E)20(22)-diénico (LXXXIIIa); la configuración del doble enlace en posición 20(22) fue determinada por análisis de su espectro de resonancia magnética protónica⁽¹²¹⁾ (Figura 24). Por concentración de las aguas madres de la recristalización se obtuvo una mezcla cuya composición se determinó por espectrometría de resonancia magnética protónica; los componentes de la mezcla fueron tentativamente identificados como los ésteres etílicos de los ácidos 3 β -acetoxi-23-norcola-5, (E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) (25%), 3 β -acetoxi-23-norcola-5, (Z)20(22)-diénico (LXXXIIIb) (25%), 3 β -acetoxi-23-norcola-5, 17(20)-diénico (LXXXIIIc) (35%) y 3 β -acetoxi-23-norcola-5, 20(21)-diénico (LXXXIIId) (15%), mediante el estudio de las señales provenien-



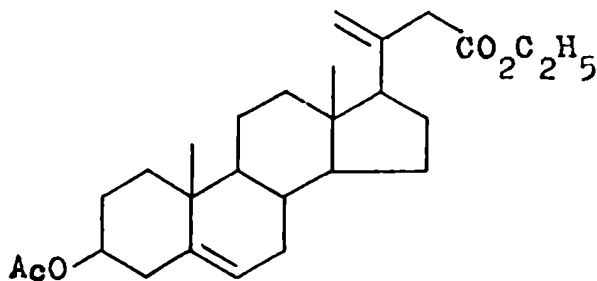
(LXXXIIIa)



(LXXXIIIb)

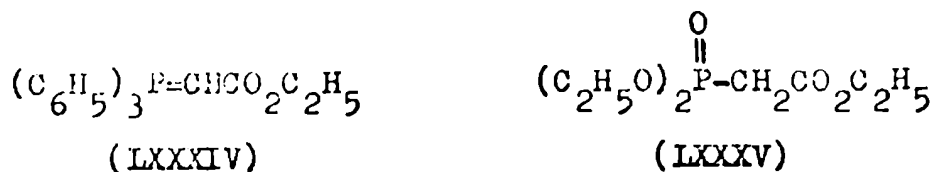


(LXXXIIIc)



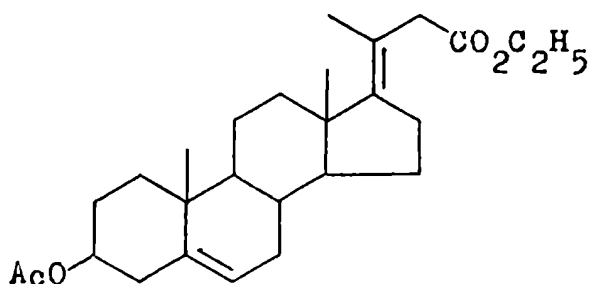
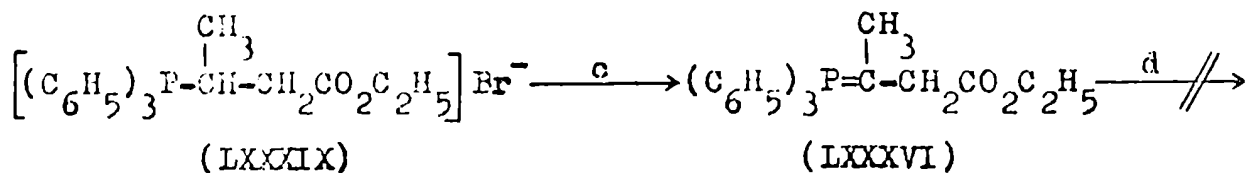
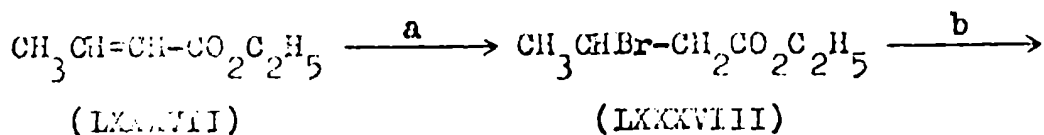
(LXXXIIIId)

tes de los protones de los carbonos 21 y 22 (Figura 25), lo cual se discute detalladamente en una sección posterior (página 91). Esta mezcla presentaba tres bandas al ser analizada por cromatografía gas-líquido y su espectro de masa era similar al del isómero LXXXIIIa puro. (páginas 106 y 107). Los porcentajes obtenidos de cada isómero fueron poco variables en distintos ensayos realizados en las mismas condiciones experimentales, y los datos anteriores (que aparecen entre paréntesis) corresponden a un experimento tipo. Dichos valores fueron calculados a partir del espectro de resonancia magnética protónica de la mezcla en base a la integración de las señales de los protones de los carbonos 21 y 22, tomando como unidad la integración de la señal correspondiente al hidrógeno de carbono 6, que se encuentra presente en los tres isómeros al mismo valor de campo. Una mezcla de isómeros de composición similar a la anterior se obtuvo por tratamiento del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20-hidroxi-23-norcol-5-énico (LXXXII) con tribromuro de fósforo en éter etílico.



Para efectuar la reacción de Wittig entre el acetato de pregnenolona (XXIb) y el carbetoximetilentrifenilfosforano (LXXXIV)⁽¹²²⁾ se necesitaron condiciones sumamente drásticas (24 horas a 175° en ausencia de solvente) obteniéndose el éster etílico del ácido 3β-acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) como único producto. En la reacción análoga con el reactivo de Wadsworth y Emmons⁽¹²³⁾ (fosfonoacetato de etilo (LXXXV)) en 1,2-dimetoxietano se recuperó el producto de partida, confirmándose los resultados de literatura⁽¹²⁴⁾.

Por otro lado se intentó la síntesis del éster etílico del ácido 3β-acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (LXXXIIIc). Para esto se decidió utilizar la reacción de Wittig entre el (carbetoximetil)etil-trifenilfosforano (LXXXVI) y la 3β-hidroxi-androst-5-en-17-ona (III). Para la síntesis del iluro se partió de 2-butenato de etilo (LXXXVII) que fue tratado con ácido bromhídrico anhidro en solución etérea obteniéndose el 3-bromo-butanoato de etilo (LXXXVIII) el cual se mezcló con una cantidad equimolecular de trifenilfosfina y se calentó a 110-115°; el bromuro de (carbetoximetil)etil-trifenilfosfonio (LXXXIX) obtenido se transformó en el iluro LXXXVI por trata-



(LXXXIIIc)

a: ácido bromhídrico anhidro/éter; b: trifenilfosfina; c: hidruro de sodio/dimetilsulfóxido; d: 1) 3β-hidroxi-androst-5-en-17-ona (III)/tetrahidrofurano-dimetilsulfóxido 2) anhídrido acético/piridina.

Figura 19. Esquema tentativo de síntesis del éster etílico del ácido 3β-acetoxi-23-norcola-5,17(20)diénico.

miento con el anión dimetilsulfinilo en dimetilsulfóxido⁽¹²⁵⁾, pero la reacción posterior de este iluro con la cetona III no dió lugar al producto esperado LXXXIIIc, sino que se recuperó la cetona de partida y trifenilfosfina proveniente de la descomposición del iluro (Figura 19). Existen ejemplos en la literatura de productos similares que sufren descomposiciones de

este tipo como por ejemplo el (carbotoximetileno)metil-trifenilfosforano⁽¹²⁶⁾.

Continuando con nuestro proyectado esquema sintético, uno de los posibles caminos a seguir consistía en la hidrogenación del doble enlace en la posición 20(22) del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) para dar el éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcol-5-énico (V). Se efectuaron varios ensayos de hidrogenación en distintas condiciones que se presentan en la Tabla 1, pero no se encontraron las condiciones adecuadas para efectuar una hidrogenación selectiva, de manera tal que el doble enlace en la posición 5(6) no reaccionara. Para variar la reactividad de este doble enlace, se realizó una desacetilación del producto LXXXIIIa mediante una transesterificación en solución etanólica con cantidades catalíticas de ácido sulfúrico⁽¹²⁷⁾, obteniéndose el éster etílico del ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (XC); la hidrogenación de este compuesto condujo al producto totalmente hidrogenado, o sea al éster etílico del ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 α -colánico (XCIIb). Estos resultados poco útiles para lograr el producto requerido condujeron a que se dejara la eliminación del doble enlace en posición 20(22) para una etapa posterior donde el sustrato no tuviera dicho enlace conjugado con un grupo éster.

T A B L A 1

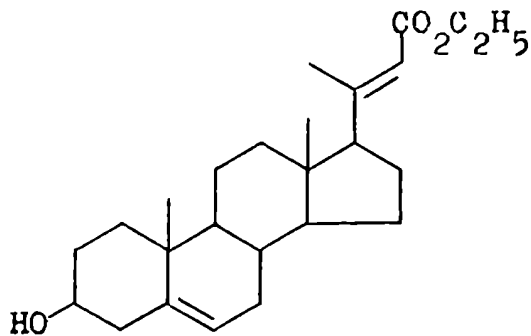
Hidrogenaciones catalíticas del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5, (E)20 (22)-diénico (LXXXIIIa).

Exp.	Solvente	Catalizador	Presión	Tiempo	Producto
1	dioxano-acético 30:1	Pd/C 10%	1 atm.	24 hs.	LXXXIIIa
2	dioxano-acético 30:1	Platino	1 atm.	72 hs.	LXXXIIIa
3	dioxano-acético 30:1	Platino	3 atm.	26 hs.	LXXXIIIa
4	dioxano-acético 30:1	Ni/Ra W-2	1 atm.	24 hs.	LXXXIIIa
5	dioxano-acético 4:1	Platino	1 atm.	17 hs.	60% LXXXIIIa + 40% V ^a , b
6	dioxano-acético 4:1	Platino	1 atm.	80 hs.	60% LXXXIIIa + 40% V ^a , b
7	dioxano-acético 1:1	Platino	1 atm.	43 hs.	40% LXXXIIIa + 60% V ^a , b
8	ácido acético	Platino	1 atm.	6 hs.	XCIIa
9	ácido acético	Platino	1 atm.	2 hs.	80% XCIIa + 20% V ^a , b
10	hidróxido de potasio en etanol 95%	Ni/Ra W-2	1 atm.	44 hs.	XCIII

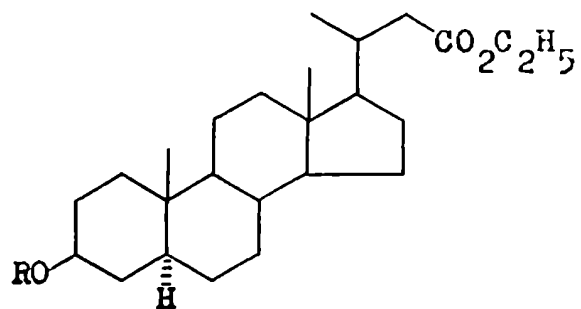
a: composición determinada mediante el espectro de resonancia magnética protónica de la mezcla, en base a la integración de las señales de los hidrógenos en carbono 6 y carbono 22.

b: estas mezclas no pudieron ser separadas en sus componentes.

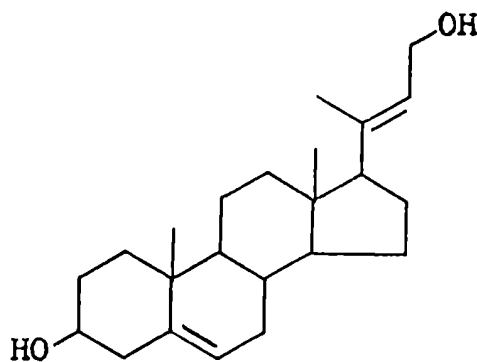
Nota: todas las hidrogenaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.



(XC)

(XCIa), R: CH₃CO

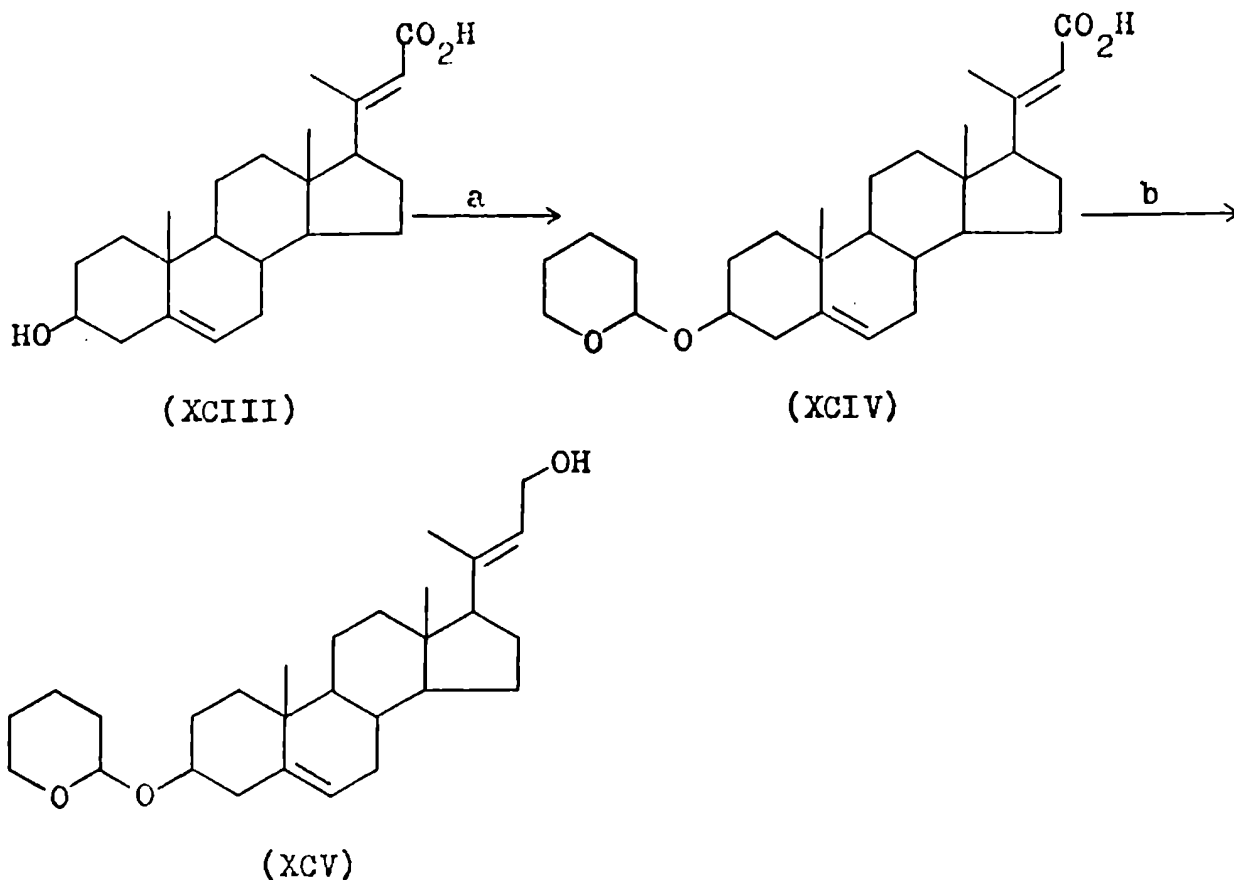
(XCIb), R: H



(XCII)

Una transformación posible es la reducción del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) al 3 β ,23-dihidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dieno (XCII)⁽¹¹⁸⁾, con hidruro de aluminio y litio. Dado que este producto posee dos grupos hidroxilos (un alcohol secundario en carbono 3 y un alcohol primario alílico en posición 23) de los cuales solo uno (el primario) debería reaccionar mientras que el restante (en carbono 3) no debería intervenir en reacciones que modifiquen su funcionalidad, fue necesario estudiar reacciones selectivas que cumplieran con el propósito prefijado.

Se intentó entonces proteger el hidroxilo en la posición 3β mediante la formación de un tetrahidropiranyl éster previamente a la reducción con hidruro de aluminio y litio; con este propósito se saponificó el éster etílico del ácido 3β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXIIIa) al ácido 3β -hidroxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (XCIII), el cual fue tratado con dihidropirano en solución de 1,2-dimetoxietano y cantidades catalíticas de trifluoruro de boro eterato⁽¹²⁸⁾. El tetrahidropiranyl derivado XCIV que se esperaba obtener resultó sumamente inestable y no pudo ser aislado. Dado ese resultado se trató de realizar la reducción del producto "in situ" por agregado de hidruro de aluminio y litio a la mezcla de reacción. Procediendo de esa manera y estudiando el avance de la reacción por cromatografía en capa delgada, fue detectado un producto que podría tratarse del tetrahidropiranyl derivado XCV, pero que se hidrolizaba parcialmente al dihidroxicoompuesto XCII durante el proceso de aislamiento. Cuidando las condiciones en lo que respecta a neutralidad del medio y control de temperatura, se logró aislar un producto cuyo espectro de resonancia magnética protónica presentaba las señales típicas del grupo tetrahidropiranylloxi (multipletes a δ 3,60 y δ 4,72), y al cual se le asignó tentativamente la estructura XCVI que no pudo ser confirmada por otros métodos debido a la inestabilidad del pro-



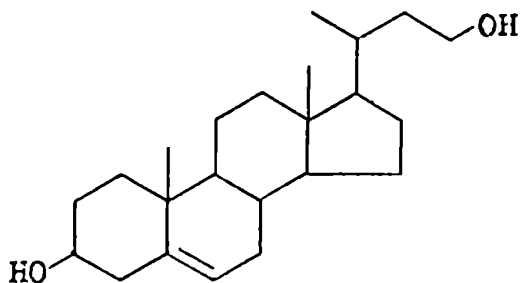
a: dihidropirano-trifluoruro de boro eterato/1,2-dimetoxietano;
b: hidruro de aluminio y litio/1,2-dimetoxietano.

Figura 20. Esquema tentativo de síntesis del 3 β -tetrahidropirani-
 niloxi-23-hidroxi-24-norcol-5,(E)20(22)-dieno (XCV).

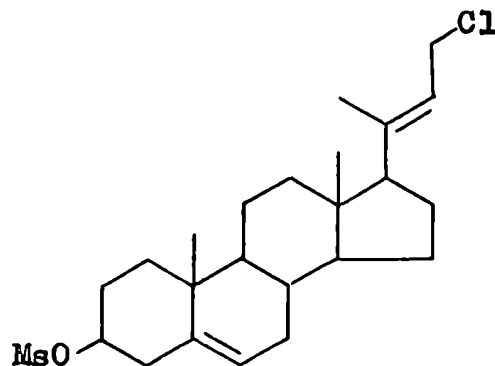
ducto (Figura 20).

Por otra parte se estudió la posibilidad de reducir el
 doble enlace en posición 20(22) del 3 β ,23-dihidroxi-24-norcola-
 5,(E)20(22)-dieno (XCII) sin obtener resultados satisfactorios
 en la preparación del compuesto XCVI.

Teniendo en cuenta estos resultados, el único camino
 con posibilidades de éxito consistía en aprovechar la diferente



(XCVI)

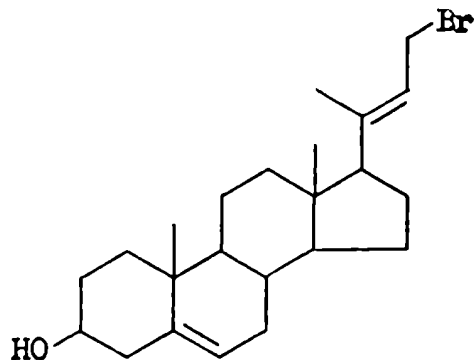


(XCVII)

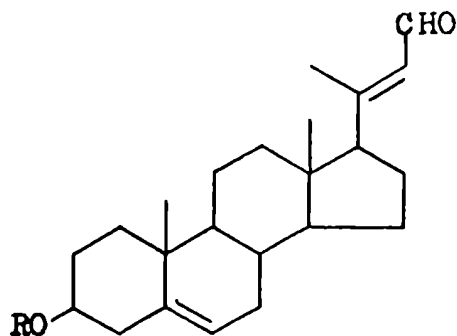
reactividad entre el hidroxilo alílico en posición 23 y el hidroxilo homoalílico en posición 3, en el 3 β ,23-dihidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dieno (XCII). Con este fin se estudiaron las reacciones de halogenación y oxidación selectivas para alcoholes alílicos.

En lo que respecta a las reacciones de halogenación, se intentó la cloración con cloruro de mesilo y cloruro de litio en N,N-dimetilformamida, en presencia de s-colidina⁽¹²⁹⁾; esta reacción se basa en el hecho que los mesilatos alílicos son susceptibles de ser desplazados nucleofílicamente sin reordenamiento por el anión cloruro proveniente de cloruro de litio, para dar el halogenuro correspondiente, lo cual no ocurre con los mesilatos homoalílicos que no reaccionan en esas condiciones. Sin embargo los ensayos realizados fueron infructuosos, ya que no fue posible aislar el cloruro de 3 β -mesiloxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dienilo (XCVII) que se esperaba obtener.

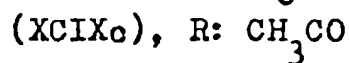
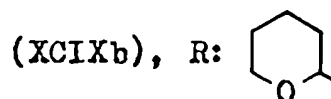
Otra reacción de halogenación realizada sobre el 3 β ,23-



(XCVIII)



(XCIXa), R: H



dihidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dieno (XCII) fue la bromación con el complejo N-bromosuccinimida-sulfuro de metilo⁽¹³⁰⁾ en diclorometano anhidro; en este caso el producto esperado, o sea el bromuro de 3 β -hidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dienilo (XCVIII) resultó sumamente inestable, descomponiéndose por exposición a la luz o al aire o aun por permanecer unas horas en solución. Esa inestabilidad típica de halogenuros alílicos⁽¹³¹⁾ sería la causa del fracaso encontrado en los intentos de preparar estos compuestos.

La oxidación selectiva del 3 β ,23-dihidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dieno (XCII) con dióxido de manganeso activado⁽¹³²⁾ en solución de benceno cloroformo 4:1 dió con excelente rendimiento el 3 β -hidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dien-23-al (XCIXa).

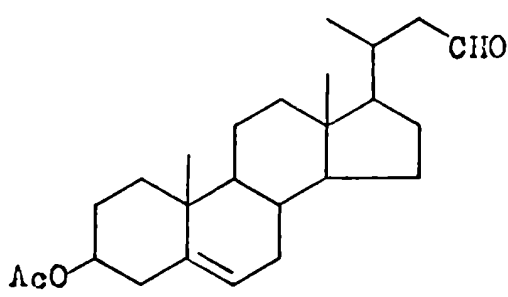
Con este producto se presentaban dos caminos a seguir:

a) reducción, con sodio en un alcohol, del sistema conjugado

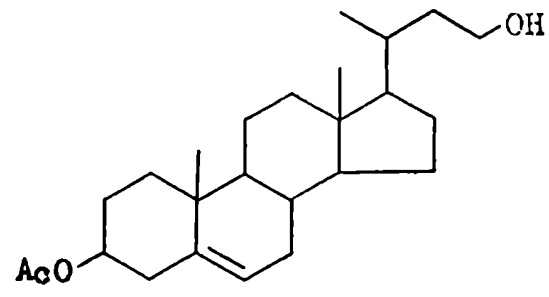
del aldehído α,β -no saturado al alcohol saturado; b) hidrogenación del doble enlace en posición 20(22) en condiciones suficientemente suaves de manera que el doble enlace en 5(6) no reaccionara. El primer camino implicaba proteger previamente al hidroxilo en posición 3 con un grupo que resistiera las condiciones de la reacción, como por ejemplo un tetrahidropiranyl éter. Sin embargo el 3β -tetrahidropiranyloxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dien-23-al (XCIXb) obtenido por reacción del compuesto XCIXa con dihidropirano y oxiclóruo de fósforo en diclorometano⁽¹³³⁾, se formaba con muy bajos rendimientos y resultaba de difícil purificación por lo que esa ruta se dejó de lado.

Paralelamente se buscaron las condiciones de hidrogenación adecuadas para el 3β -acetoxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dien-23-al (XCIXc) obtenido por acetilación del compuesto XCIXa, encontrándose que en medio etanólico a presión atmosférica y temperatura ambiente utilizando 10% paladio sobre carbón como catalizador, se obtenía en pocos minutos el 3β -acetoxi-24-norcola-5-en-23-al (C), o sea se producía la hidrogenación selectiva del doble enlace en la cadena lateral. Este producto se oxidaba rápidamente en contacto con el aire, por lo que debía ser utilizado inmediatamente después de preparado.

El paso siguiente consistía en la reducción selectiva del aldehído en la posición 23 al alcohol primario sin alterar



(C)



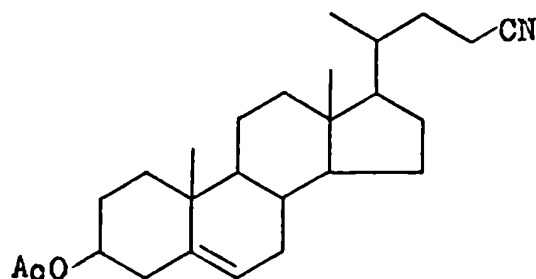
(CI)

la agrupación O-acetilo existente en la posición 3 β . Esta reacción se logró con dos reactivos, el borohidruro de sodio y el triterbutoxihidruro de aluminio y litio; el primero fue utilizado en metanol a 0°⁽¹³⁴⁾ y en etanol 95% a 25°⁽¹³⁵⁾, siendo la reacción en este último solvente sumamente rápida (50 minutos) y dando cuantitativamente el 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-ol (CI); en cambio en metanol a bajas temperaturas, el tiempo de reacción era de 5 horas y se obtenían además del producto deseado (CI) subproductos provenientes de la saponificación del acetato en la posición 3 β . El triterbutoxihidruro de aluminio y litio en tetrahidrofurano⁽¹³⁶⁾ también dió lugar al producto esperado pero con menores rendimientos.

El 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-ol (CI) fue halogenado con el sistema trifenilfosfina y tetracloruro de carbono⁽¹³⁷⁾; esta reacción aplicada a alcoholes sencillos da muy altos rendimientos de los cloruros correspondientes, pero para realizar la reacción sobre el compuesto CI se debieron modificar las condiciones experimentales, llegándose a obtener el cloruro de

3β-acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXI) con rendimientos superiores al 70%.

Llegado a esta etapa, el próximo paso consistía en introducir en la molécula la marcación radiactiva mediante una sustitución del cloro en la posición 23 del compuesto LXXXI, por un grupo ciano proveniente de cianuro de potasio-¹⁴C. Para ese propósito se debía elegir un método que permitiera el máximo aprovechamiento de la sustancia marcada. La cianuración de halogenuros primarios sencillos con cianuro de sodio en dimetilsulfóxido da excelentes rendimientos del nitrilo correspondiente (38,39) y suele ser sumamente rápida y exotérmica. El hecho de usar cianuro de potasio (cinco veces menos soluble que el cianuro de sodio en dimetilsulfóxido) no alteró esos rendimientos pero exigió un tiempo mayor y calentamiento de la mezcla de reacción. Así, el tratamiento del cloruro de 3β-acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXI) con cianuro de potasio en exceso en dimetilsulfóxido durante 5 horas a 100° dió lugar al 3β-acetoxi-col-5-enonitrilo (CII) con un rendimiento superior al 90% respecto del cloruro LXXXI. En ensayos posteriores se encontró que utilizando un 10% de exceso del cloruro, el rendimiento de la formación del nitrilo CII respecto al cianuro de potasio era del 90%; estos resultados indicaban que el procedimiento era apto para ser aplicado en la síntesis del producto radiactivo.



(CII)

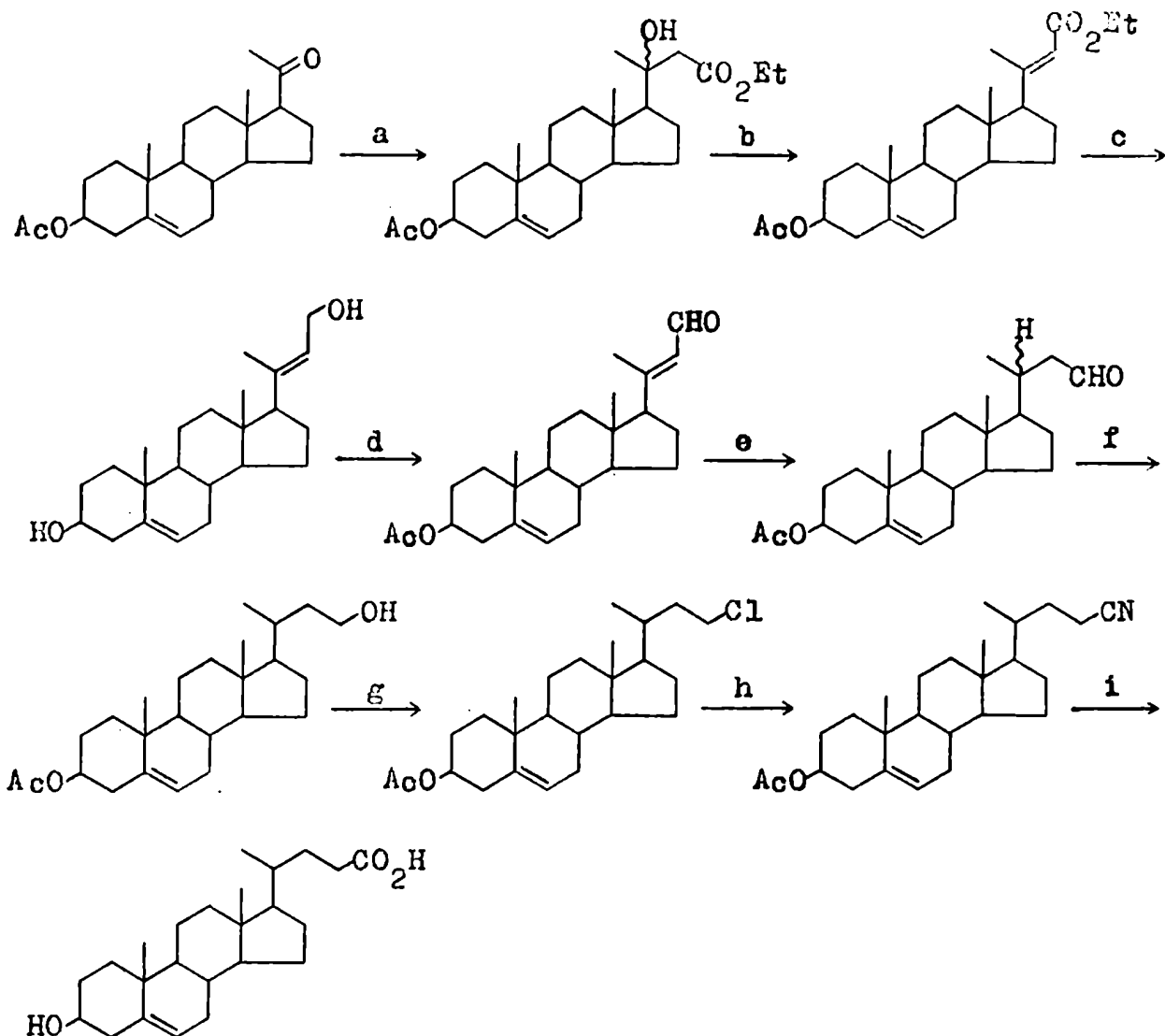
El 3β -acetoxi-col-5-enonitrilo (CII) fue hidrolizado con hidróxido de sodio en etanol 90%⁽³⁶⁾ al ácido 3β -hidroxicol-5-énico (Ia).

En la Figura 21 se resume el esquema definitivo seguido para la síntesis del ácido 3β -hidroxicol-5-énico a partir de acetato de pregnenolona (XXIb).

Datos complementarios.

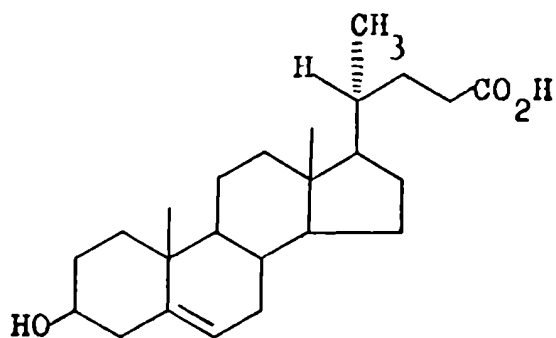
Se debe destacar que en la hidrogenación del 3β -acetoxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dion-23-al (XCIXo) al 3β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-al (C) se crea un nuevo centro asimétrico en la posición 20, y el producto de hidrogenación C es una mezcla de los diasterómeros 20R y 20S. Esto puede verificarse a partir de los espectros de resonancia magnética protónica de los compuestos C, CI, LXXXI, CII y Ia teniendo en cuenta los valores de campo donde resuenan los protones del metilo 21 según se discute mas adelante (página 90).

Por otra parte los diasterómeros 20R y 20S del ácido 3β -hidroxicol-5-énico (Ia-20R y Ia-20S) tienen distinto valor

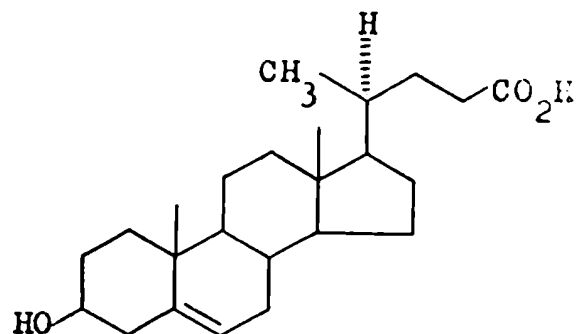


a: 1) bromoacetato de etilo-zinc/éter-benceno 2) anhídrido acético/piridina; b: oxicloriguro de fósforo/piridina; c: hidruo de aluminio y litio/éter; d: 1) dióxido de manganeso/benceno-cloroformo 2) anhídrido acético/piridina; e: hidrógeno-Pd/C 10%/etanol 95%; f: borohidruo de sodio/etanol 95%; g: trifenilfosfina/tetracloriguro de carbono; h: cianuro de potasio/dimetilsulfóxido; i: 1) hidróxido de sodio/etanol 90% 2) acidificación.

Figura 21. Esquema de síntesis del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico.



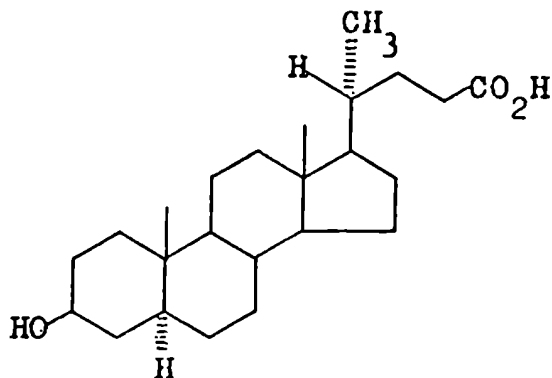
(Ia-20R)



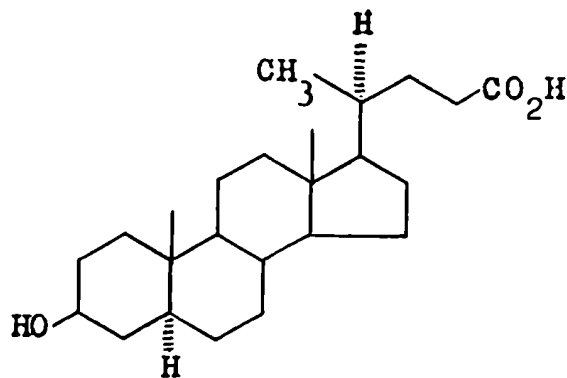
(Ia-20S)

de Rf en cromatografía en capa delgada en silicagel, eluyendo con el sistema acetato de etilo-metanol 98:2, pero la elevada polaridad que poseen hace sumamente difícil la elución de estos productos de una columna cromatográfica o de una placa preparativa; a pesar de estos inconvenientes pudo aislarse cromatográficamente una pequeña cantidad del diasterómero menos polar de Ia, al que se le asignó tentativamente la configuración 20S teniendo en cuenta que el otro diasterómero tenía idéntico Rf que el ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico comercial, que posee configuración 20R.

Por hidrogenación a presión atmosférica y temperatura ambiente del ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia-20R y Ia-20S) en ácido acético glacial utilizando platino como catalizador, se obtuvo la mezcla de epímeros 20R y 20S del ácido 3 β -hidroxi-5 α -colánico (LXXIVb-20R y LXXIVb-20S) que en este caso pudo ser separada por recristalización fraccionada de acetato de etilo. La configuración del carbono 20 de estos productos se determinó



(LXXIVb-20R)

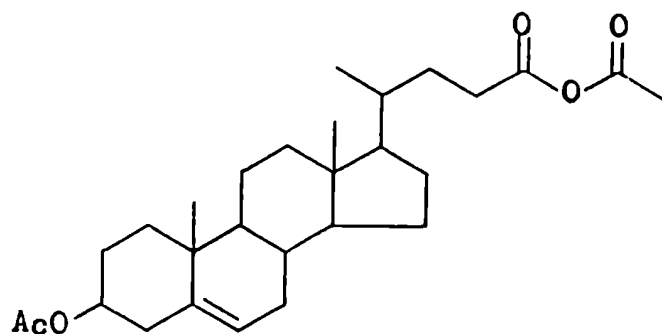


(LXXIVb-20S)

mediante los respectivos espectros de resonancia magnética protónica en base al valor de campo donde resuenan los hidrógenos de los carbonos 18 y 21 cuando se utiliza como solvente piridina deuterada según se discute mas adelante (página 85) (Figuras 27-29); en otros solventes no se observaron diferencias en el desplazamiento químico de los hidrógenos de carbono 18 de los epímeros.

Además se sintetizó el ácido 3β-acetoxi-col-5-énico (Ib) por tratamiento del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia) con anhídrido acético en piridina. En dicha preparación se obtuvo además un producto intermediario que fue identificado como el anhídrido mixto CIII, del ácido 3β-acetoxi-col-5-énico y del ácido acético, el cual fue hidrolizado al ácido Ib con piridina y agua. La estructura de este intermediario fue determinada en base a sus espectros infrarrojo, de resonancia magnética protónica y de masa que se discuten en una sección posterior.

Por tratamiento del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia)



(CIII)

con diazometano en una mezcla de éter etílico y metanol⁽¹³⁸⁾, se obtuvo el éster metílico correspondiente Ic en forma cuantitativa.

Reacciones con sustancias marcadas.

Las reacciones de cianuración e hidrólisis fueron repetidas para sintetizar el ácido Ia marcado con carbono-14; el cloruro de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXI) fue tratado con cianuro de potasio-¹⁴C en dimetilsulfóxido en las condiciones indicadas anteriormente (página 74) obteniéndose el 3 β -acetoxicol-5-enonitrilo-24-¹⁴C (CII-¹⁴C) que tenía una actividad específica de $6,88 \times 10^8$ dpm/mM; éste fue hidrolizado en la forma ya indicada (página 75) dando lugar al ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico-24-¹⁴C (Ia-¹⁴C) que fue recristalizado hasta actividad constante; este producto tenía una actividad específica de $7,3 \times 10^8$ dpm/mM, y resultó idéntico a la mezcla de epímeros Ia-20R y Ia-20S sintetizada anteriormente, al ser comparada por cromatografía en capa delgada (Figura 22).

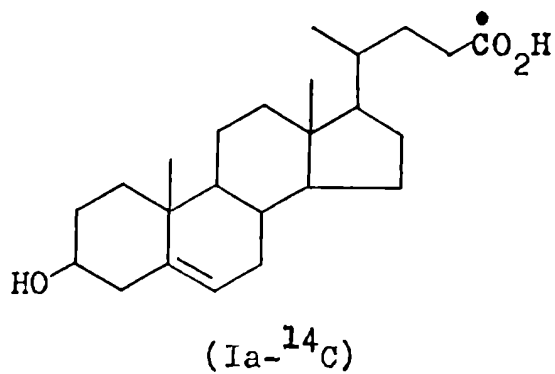
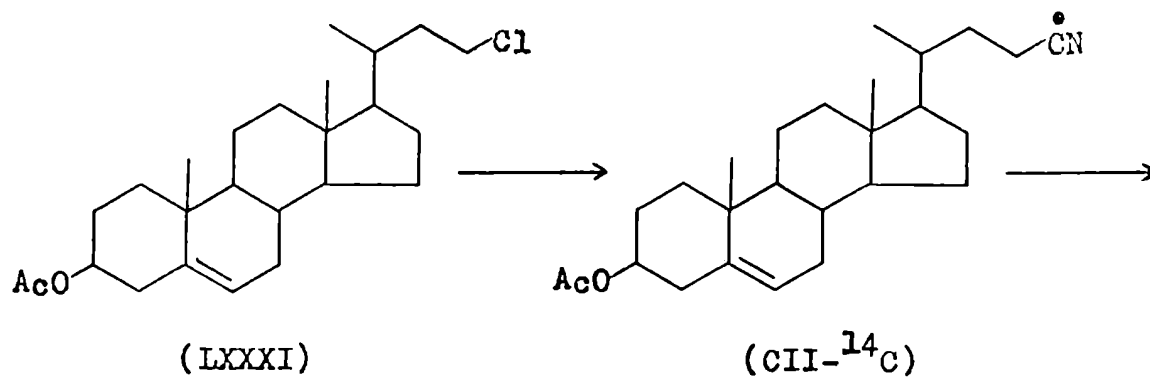


Figura 22. Síntesis del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico-24-¹⁴C (Ia-¹⁴C).

Interpretación de las propiedades espectroscópicas de los compuestos sintetizados.

En la presente sección se hará referencia a las propiedades espectroscópicas, principalmente a los espectros de resonancia magnética protónica y de masa, de los distintos compuestos sintetizados y a las conclusiones que de ellos pueden extractarse. Para una mejor discusión e interrelación entre los diferentes compuestos, los valores de desplazamiento químico (δ) de las señales mas importantes de los espectros de resonancia magnética protónica han sido tabulados y se presentan en la Tabla 2.

Idéntico criterio se ha adoptado en el caso de los espectros de masa, haciéndose notar que en las tabulaciones de los mismos figuran todas las señales asignadas que corresponden a una relación masa/carga (m/e) superior a 200.

Espectros de resonancia magnética protónica.

En la Tabla 2 pueden apreciarse las señales características de los distintos compuestos, correspondientes a los hidrógenos de los carbonos 3, 6, 18, 19, 21, 22, 23, del grupo alquilo (metilo o etilo) presente en aquellos productos que se encuentran como ésteres, y del grupo metilo del acetato en posición 3 para aquellos productos que se encuentran acetilados en dicha posición.

T A B L A 2

Valores de desplazamiento químico (δ) de las señales mas importantes de los espectros de resonancia magnética protónica (R.M.P.).

Productos	H-3	H-6	H-18	H-19	H-21	H-22	H-23	H-a	H-b	H-c	Fig.
Ia^P											26
2OR	3,83	5,43	0,66	1,05	1,06	-	-	-	-	-	
2OS	3,83	5,43	0,71	1,05	0,89	-	-	-	-	-	
Ib											---
2OR	4,62	5,40	0,69	1,02	0,94	-	-	-	-	2,03	
2OS	4,62	5,40	0,69	1,02	0,83	-	-	-	-	2,03	
Ic											---
2OR	3,58	5,40	0,70	1,01	0,94	-	-	3,68	-	-	
2OS	3,58	5,40	0,70	1,01	0,85	-	-	3,68	-	-	
LXXIVb-20S ^P	3,83	-	0,68	0,81	0,87	-	-	-	-	-	28
LXXIVb-20R ^P	3,83	-	0,63	0,81	1,05	-	-	-	-	-	29
LXXXI											---
2OR	4,58	5,42	0,72	1,03	0,98	-	3,55	-	-	2,03	
2OS	4,58	5,42	0,72	1,03	0,93	-	3,55	-	-	2,03	

Tabla 2 continuación.

Productos	H-3	H-6	H-18	H-19	H-21	H-22	H-23	H-a	H-b	H-c	Fig.
LXXXII											23
20R	4,58	5,40	0,87	1,03	1,25	-	-	4,19	1,28	2,03	
20S	4,58	5,40	0,87	1,03	1,36	-	-	4,19	1,28	2,03	
LXXXIIa	4,58	5,40	0,61	1,03	2,18	5,72	-	4,18	1,28	2,03	24
LXXXIIb	4,58	5,40	0,61	1,03	1,91	5,77	-	4,18	1,28	2,03	25
LXXXIIc	4,58	5,40	0,68	1,03	-	2,93	-	4,15	1,25	2,03	25
LXXXIIId	4,58	5,40	0,68	1,03	5,05	3,08	-	4,15	1,27	2,03	25
XC	3,50	5,40	0,61	1,03	2,18	5,72	-	4,18	1,28	-	-
XCIa											-
20R	4,67	-	0,68	0,82	0,98	-	-	4,13	1,25	2,01	
20S	4,67	-	0,68	0,82	0,92	-	-	4,13	1,25	2,01	
XCIb											-
20R	3,58	-	0,69	0,80	0,98	-	-	4,14	1,25	-	
20S	3,58	-	0,69	0,80	0,92	-	-	4,14	1,25	-	
XCII	3,55	5,40	0,58	1,02	1,70	5,53	4,23	-	-	-	-
XCIII ^P	3,83	5,40	0,62	1,03	2,42	6,15	-	-	-	-	-

Tabla 2 continuación.

Productos	H-3	H-6	H-18	H-19	H-21	H-22	H-23	H-a	H-b	H-c	Fig.
XCIXc	4,58	5,42	0,63	1,03	2,22	5,97	10,10	-	-	2,03	-
C											-
2OR	4,58	5,42	0,75	1,03	0,92	-	9,77	-	-	2,03	
2OS	4,58	5,42	0,75	1,03	?	-	9,77	-	-	2,03	
CI											-
2OR	4,63	5,40	0,72	1,03	0,97	-	3,70	-	-	2,03	
2OS	4,63	5,40	0,72	1,03	0,88	-	3,70	-	-	2,03	
CII											-
2OR	4,58	5,40	0,72	1,03	0,97	-	2,30	-	-	2,03	
2OS	4,58	5,40	0,72	1,03	0,87	-	2,30	-	-	2,03	
CIII											-
2OR	4,67	5,40	0,70	1,02	0,97	-	2,40	-	-	2,03	
2OS	4,67	5,40	0,70	1,02	0,87	-	2,40	-	-	2,03	

El solvente utilizado en todos los casos es cloroformo deuterado, salvo cuando se indica lo contrario (p: piridina deuterada).

H-a: CO_2CH ; H-b: $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}$; H-c: CH_3CO_2 en posición 3β .

En lo que se refiere al hidrógeno en carbono 3, se observa que la posición de la señal se desplaza de δ 3,50-3,58 a δ 4,58 al acetilar el grupo hidroxilo ubicado en la posición 3β (139). En los casos con hidróxilo libre en carbono 3, el desplazamiento químico del hidrógeno en ese carbono cambia a δ 3,83 cuando el espectro se realiza en piridina deuterada en vez de cloroformo deuterado.

La señal correspondiente al hidrógeno vinflico del carbono 6, no es sensible a variaciones en el grupo sustituyente en carbono 3, ni a las modificaciones realizadas sobre la cadena lateral del esteroide⁽¹³⁹⁾, estando su valor promedio a δ 5,40 para aquellos compuestos que poseen un doble enlace en la posición 5(6) independientemente del solvente utilizado en la determinación.

Por el contrario, la señal de los hidrógenos del metilo 18 es muy sensible a las modificaciones en la cadena lateral (140), principalmente a la presencia de dobles enlaces y a la posición de éstos (Figuras 24,25). Además en el caso del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico (Ia) y del ácido 3β -hidroxi-5 α -colánico (LXXIVb), dicha señal presenta un desplazamiento de 0,05 Hz hacia campos menores en el epímero 20S respecto del epímero 20R cuando se utiliza piridina deuterada como solvente (Figuras 26-29) pero no al usar cloroformo deuterado.

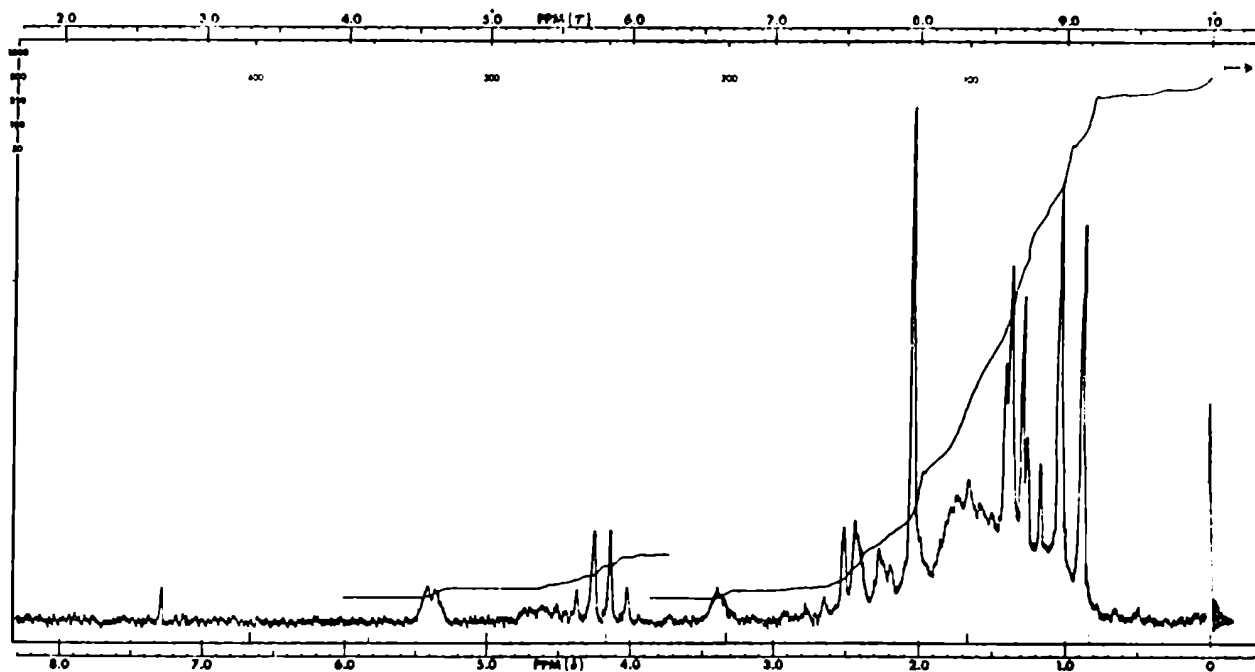


Figura 23. Espectro de R.M.P. del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20-hidroxi-23-norcol-5-énico (LXXXII).

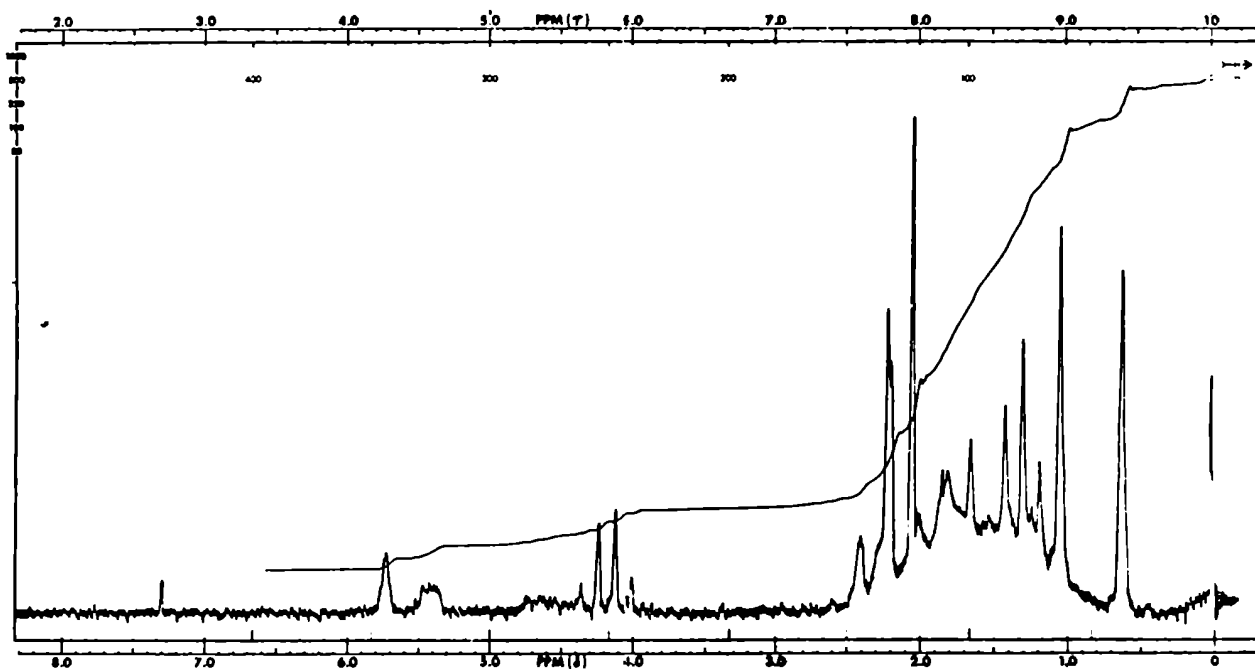


Figura 24. Espectro de R.M.P. del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa).

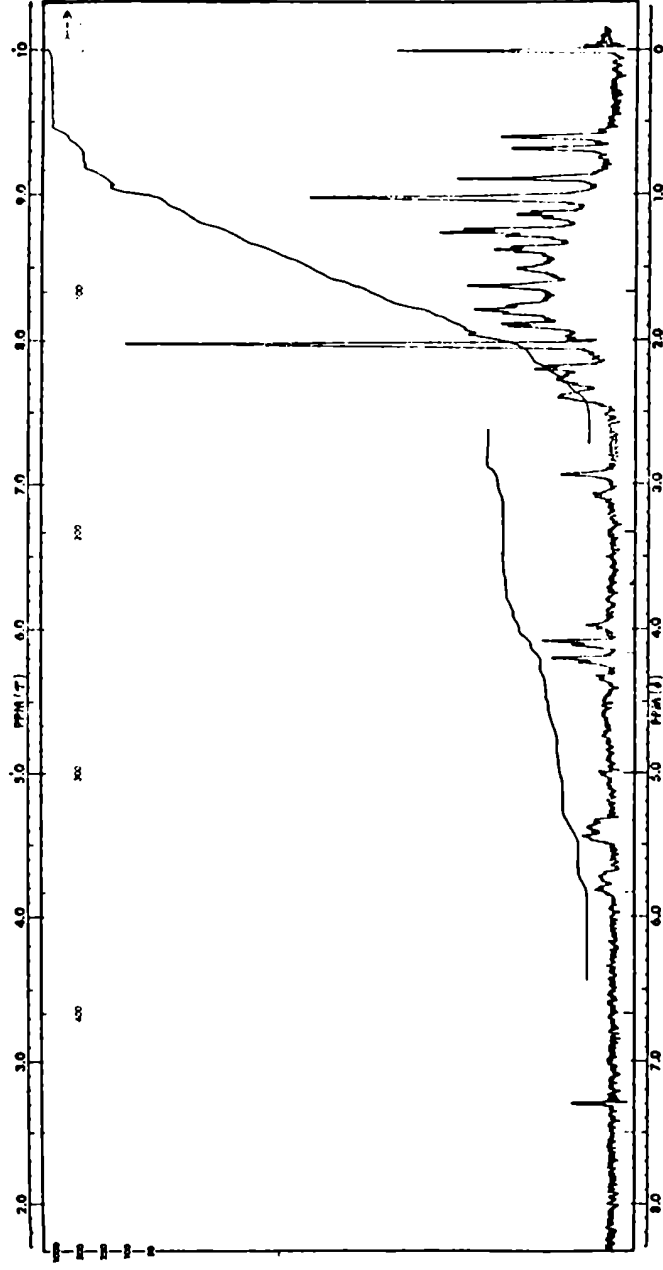


Figura 25. Espectro de R.M.P. de la mezcla de los ésteres etílicos de los ácidos 3 β -acetoxi-23-norcola-5, (E)20(22)-diénico (LXXXIIIa), 3 β -acetoxi-23-norcola-5, (Z)20(22)-diénico (LXXXIIIb), 3 β -acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (LXXXIIIc) y 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20(21)-diénico (LXXXIIId).

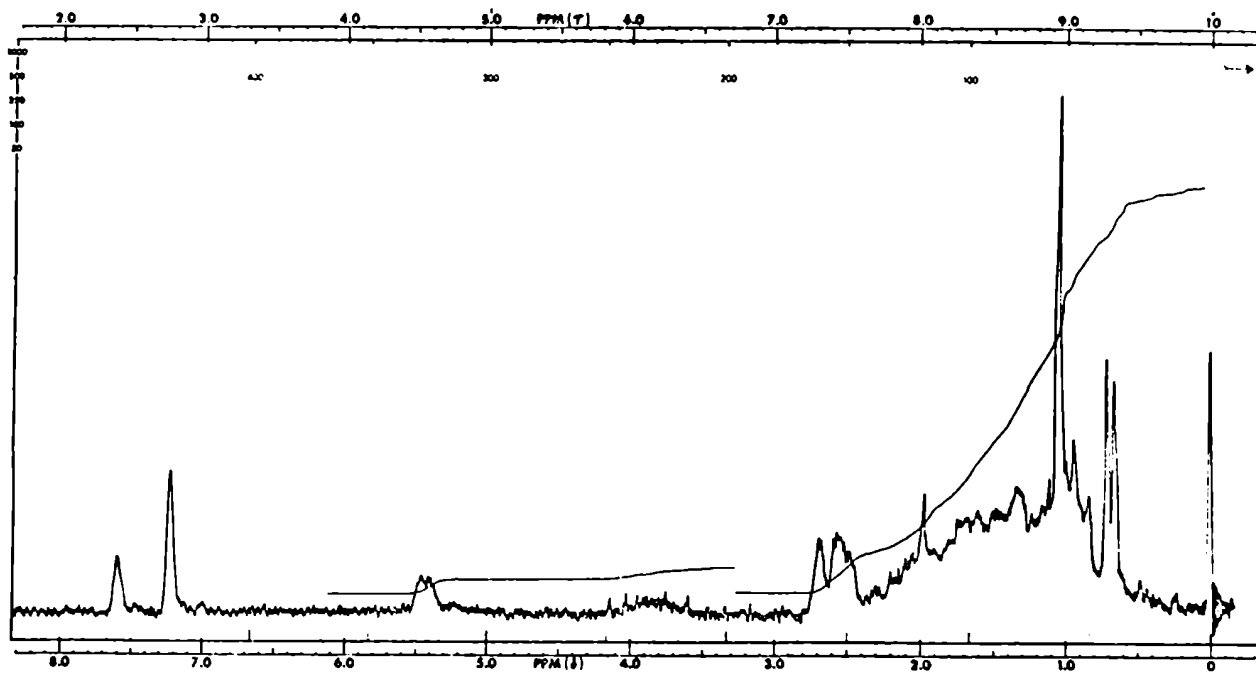


Figura 26. Espectro de R.M.P. del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico
(mezcla 20R-20S) (Ia).

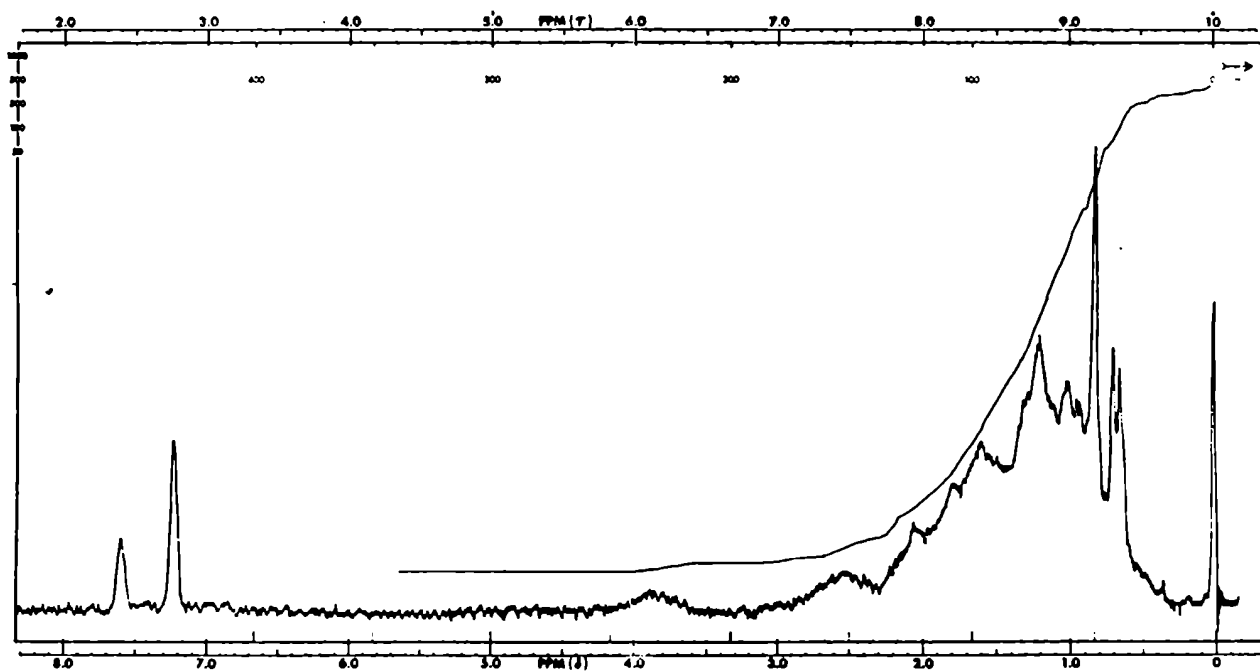


Figura 27. Espectro de R.M.P. del ácido 3β -hidroxi-5 α -colánico
(mezcla 20R-20S) (LXXIVb).

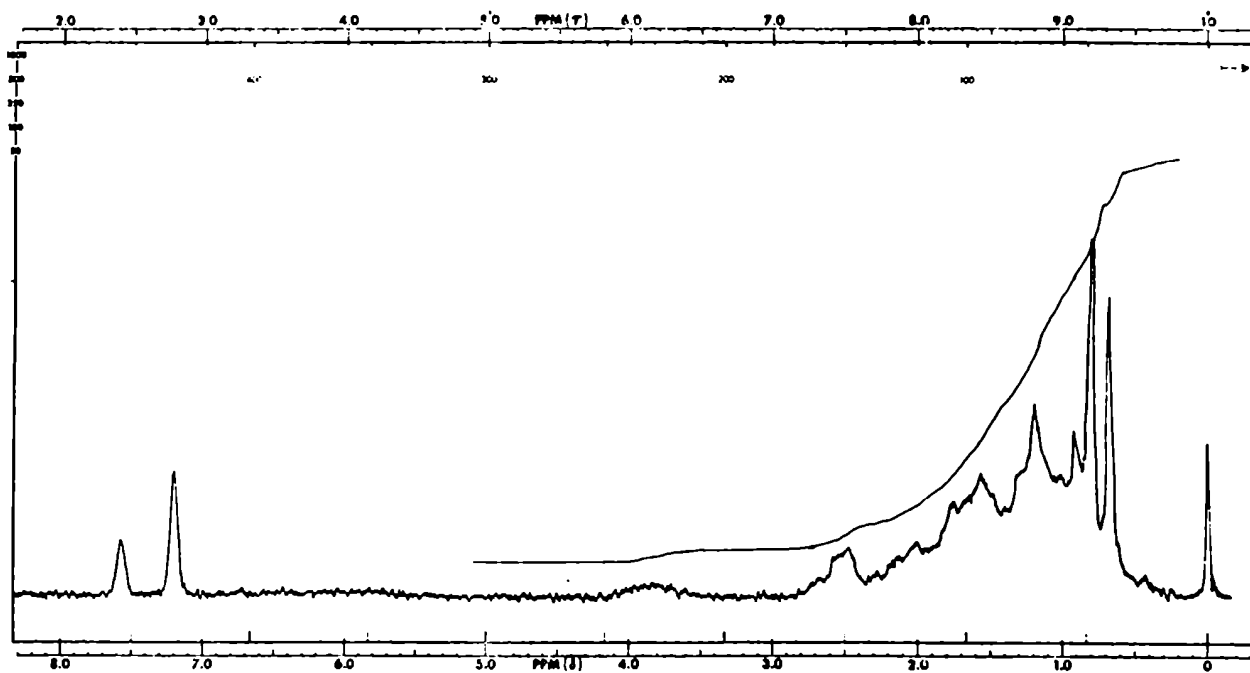


Figura 28. Espectro de R.M.P. del ácido 3β -hidroxi- 5α -colánico (epímero 20S) (LXXIVb-20S).

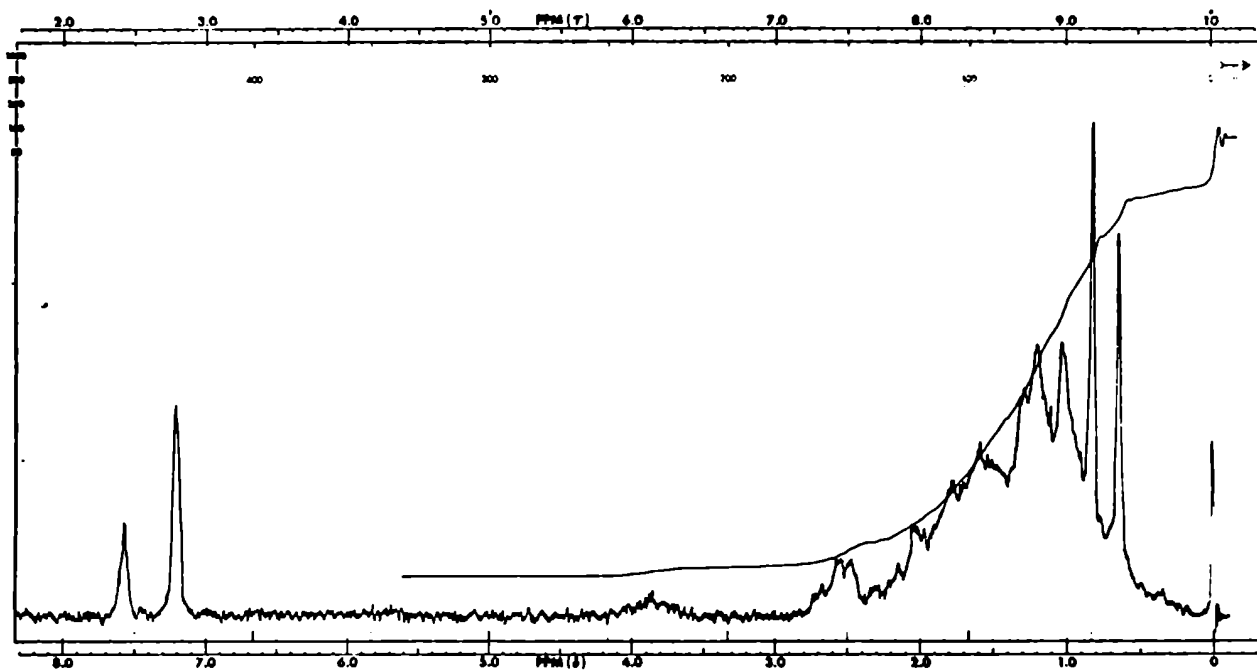


Figura 29. Espectro de R.M.P. del ácido 3β -hidroxi- 5α -colánico (epímero 20R) (LXXIVb-20R).

Los valores de resonancia de los hidrógenos del metilo 19, son un reflejo de la hibridación y la configuración del carbono 5 así como de los sustituyentes en el anillo A; en aquellos compuestos con un doble enlace en la posición 5(6), se observa que el valor promedio del desplazamiento químico es δ 1,03 para los 3 β -hidroxi-compuestos y 1,04 para los 3 β -acetoxi-compuestos; para aquellos que poseen un hidrógeno en posición 5 α (anillos A y B trans), dichos valores son δ 0,83 y δ 0,84, mientras que en los que tienen un hidrógeno en posición 5 β (anillos A y B cis), el valor es δ 0,98⁽¹⁴⁰⁾. En todos los productos sintetizados en este trabajo, en los cuales no existe la insaturación en la posición 5(6), la configuración es siempre 5 α -H (anillos A y B trans).

Es sumamente interesante el análisis del valor de resonancia de los hidrógenos del carbono 21, ya que éste es dependiente de la configuración del carbono 20⁽¹¹⁹⁾. Se observa un desplazamiento a campos mayores en el epímero 20S para aquellos compuestos cuyos sustituyentes en el carbono 20 son además del metilo 21, un hidrógeno, el carbono 22 y el carbono 17. En el caso del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20-hidroxi-23-norcol-5-énico (LXXXII) en que el hidrógeno del carbono 20 se ha reemplazado por un hidroxilo, el desplazamiento a campos mayores lo sufre el metilo 21 del epímero 20R, que posee la misma

distribución espacial relativa de sustituyentes que el epímero 20S en los casos anteriores (según la regla de nomenclatura a cambiado de S a R solo porque se ha reemplazado un hidrógeno por un hidroxilo) (Figura 23).

Por otra parte en aquellos compuestos con un doble enlace en posición 20(22), el valor de resonancia de los hidrógenos del metilo 21 permite conocer la estereoquímica del doble enlace⁽¹²¹⁾. Como ejemplo, se puede observar que en el caso del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)-diénico el valor de resonancia para el isómero E (LXXXIIIa) es δ 2,18 y para el isómero Z (LXXXIIIb) es δ 1,91 (Figuras 24,25).

La señal correspondiente al hidrógeno (o hidrógenos) del carbono 22 puede asignarse en aquellos compuestos con un doble enlace en posición 20(22), 20(21) ó 17(20); esa señal permite diferenciar los ésteres etílicos de los ácidos 3 β -acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (LXXXIIIc) y 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20(21)-diénico (LXXXIIId) ya que los valores de desplazamiento químico son δ 2,93 y δ 3,08 respectivamente. Como se indicó anteriormente, en base a la integración relativa de estas señales respecto de la señal del hidrógeno del carbono 6, se pudieron determinar las proporciones relativas de estos productos en la mezcla de ésteres insaturados obtenida (LXXXIIIa, b,c,d) (Figura 25).

En los valores de resonancia del hidrógeno (o los hidrógenos) de carbono 23 en los distintos compuestos de la serie que lo poseen, se observa a partir del 3 β -acetoxi-24-norcola-5, (E)20(22)-dien-23-al (XCIXc) un desplazamiento de la señal hacia campos mayores a medida que se avanza en el esquema sintético, por transformación del aldehído α,β -no saturado XCIXc al aldehído saturado C, de éste al alcohol CI y a partir de este último la secuencia cloruro (LXXXI), nitrilo (CII); en el caso del ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (Ia), la señal de los hidrógenos de carbono 23 se encuentra encubierta por las señales de otros hidrógenos de la molécula.

Por último, es interesante destacar en el caso de los ésteres etílicos de los ácidos norcoladiénicos (LXXXIIa,b,c,d y XC) y de los ácidos norcolánicos (XCIIa,b) la influencia existente sobre los protones del metileno y del metilo del grupo etilo, debida a la presencia de dobles enlaces en la cadena lateral y a la posición de éstos.

Se puede observar que en el caso de los ésteres con dobles enlaces en posición 20(22) (α,β -no saturado) (LXXXIIa,b y XC), las señales correspondientes al grupo etilo se observan a δ 4,18 y δ 1,28 para el metileno y el metilo respectivamente; en los ésteres con un doble enlace en posición 20(21) (LXXXIIId) y 17(20) (LXXXIIc) (β,γ -no saturado) estos valores son δ 4,15

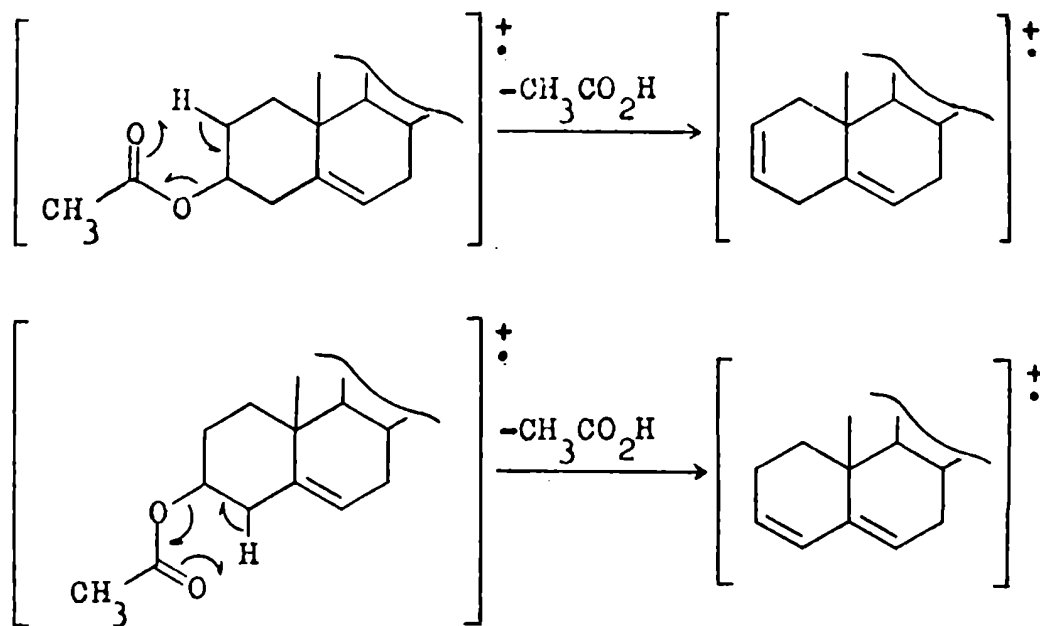


Figura 30. Posibles mecanismos de eliminación de ácido acético en 3β-acetoxi-compuestos.

posición 5(6). Esto no ocurre en el caso del éster etílico del ácido 3β-acetoxi-23-nor-5α-colánico (XC1a) en que dicho doble enlace ha sido hidrogenado, observándose la señal correspondiente a la pérdida de butadieno (m/e 318), aunque el pico base continúa siendo m/e M-60 (Figura 31).

Algo similar se observa en el caso de los 3β-hidroxi-

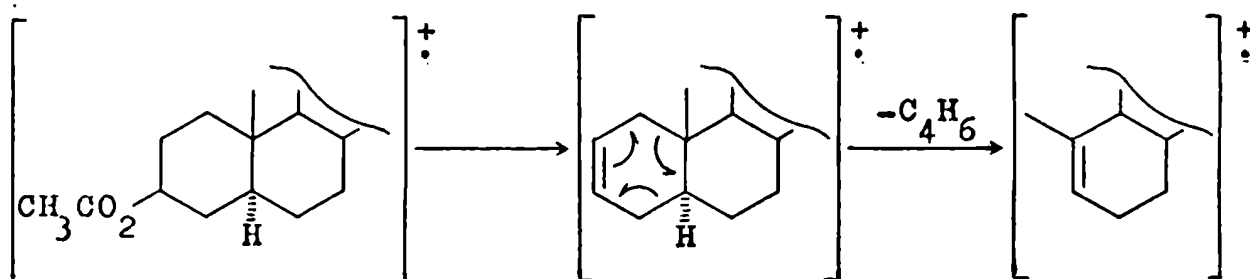


Figura 31. Retroreacción de Diels-Alder (RDA).

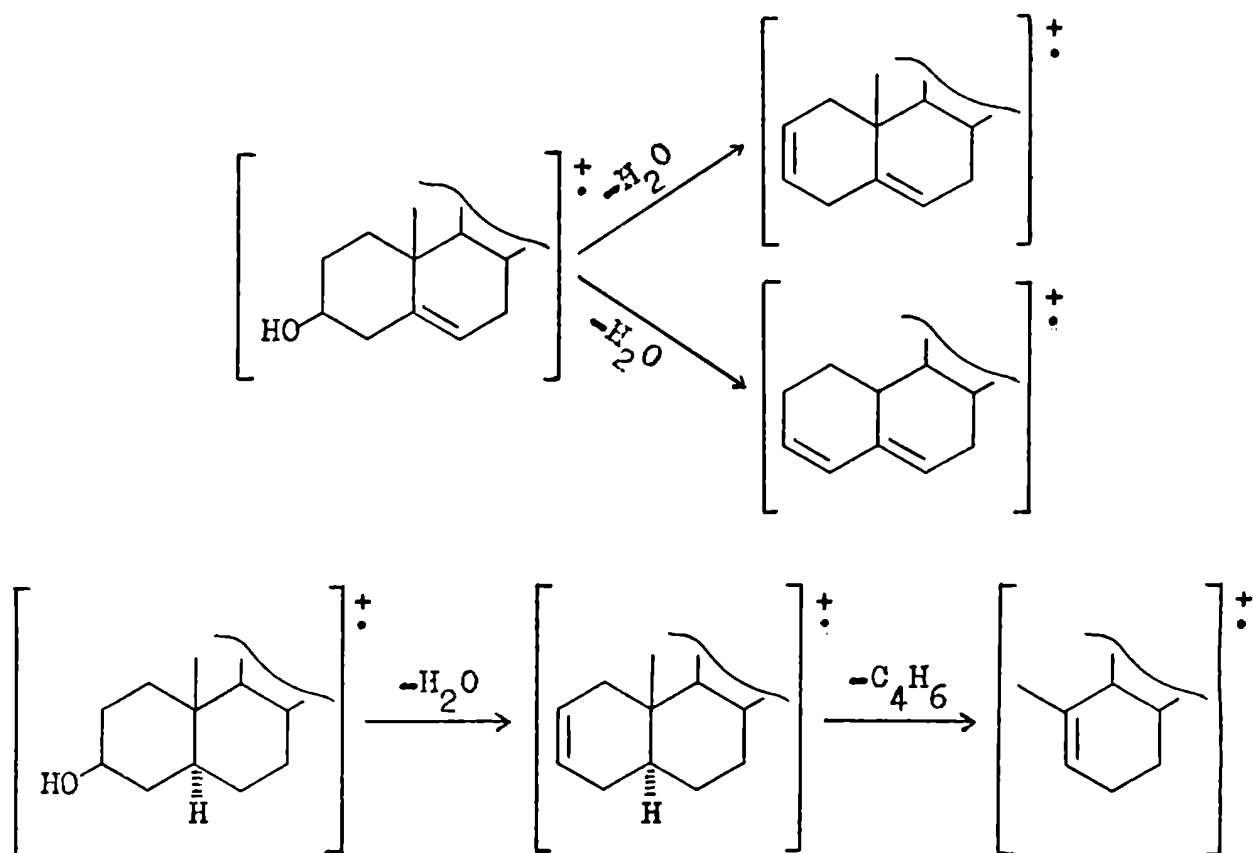


Figura 32. Eliminación de agua en 3β-hidroxi-compuestos.

compuestos que por eliminación de agua dan lugar a los mismos iones indicados para los 3β-acetoxi-derivados aunque con una abundancia relativa menor⁽¹⁴¹⁾ (Figura 32).

Una característica de los espectros de masa de esteroides con sustituyentes alquílicos en la posición 17, es la eliminación de la cadena lateral mas 42 unidades de masa. Se ha determinado⁽¹⁴²⁾ que la ruptura predominante es la de las uniones 13-17 y 14-15, perdiéndose el anillo D y un hidrógeno de carbono 18 que migra al carbono 17. La eliminación de ácido acético (en 3β-acetoxi-compuestos) o de agua (en 3β-hidroxi-com-

puestos) seguida de la ruptura mencionada, da origen a un pico característico en m/e 213 para toda la serie de compuestos sintetizados, con excepción de XC1a y XC1b en que dicho pico se observa en m/e 215 debido a que no poseen el doble enlace en la posición 5(6). Luego de la migración del hidrógeno de carbono 18 a carbono 17, puede tener lugar una migración de un hidrógeno de carbono 16 hacia carbono 18, siendo el resultado final la pérdida de la cadena lateral mas 41 unidades de masa (Figura 33).

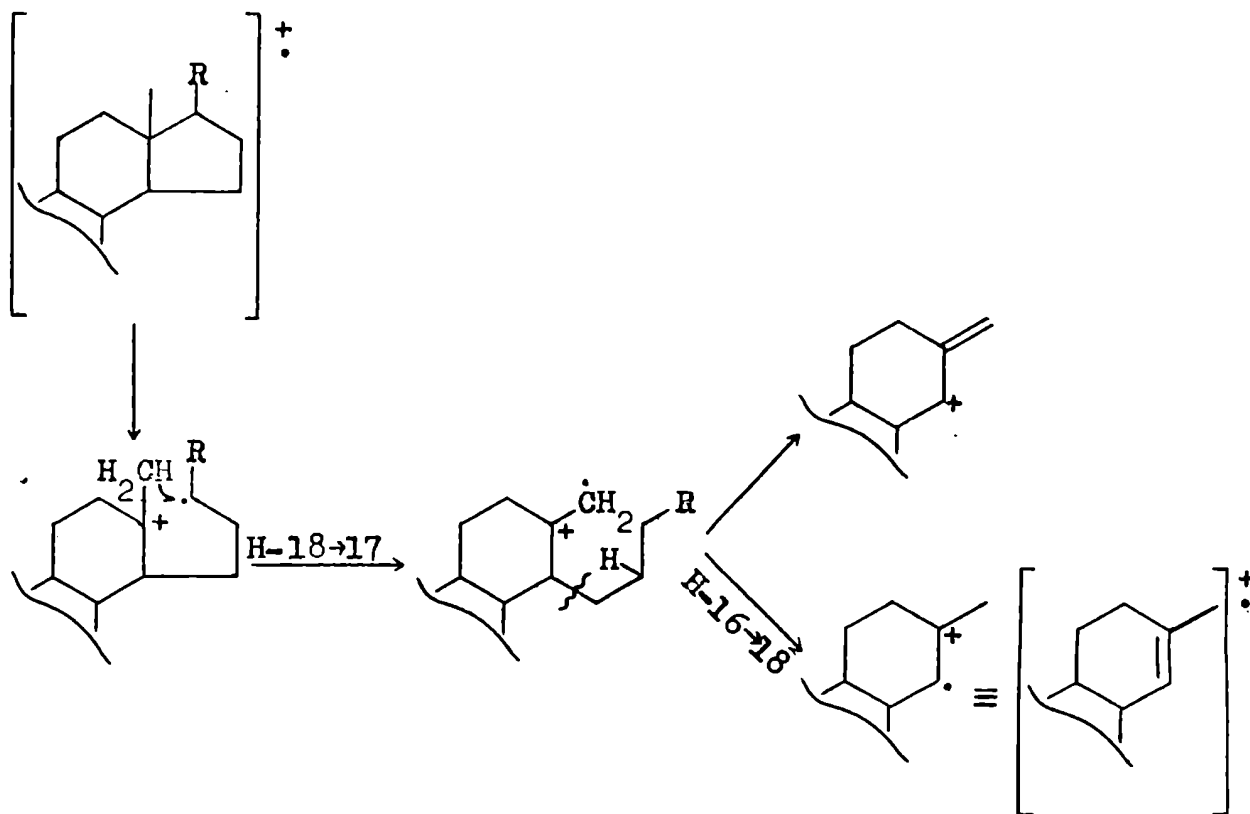


Figura 33. Pérdida de la cadena lateral mas 41 ó 42 unidades de masa.

También son observables las señales de los iones producidos por la pérdida de la cadena lateral mas 40 (migración de un hidrógeno del anillo D al resto del ión), 43 ó 44 unidades de masa (pérdida de dos o tres hidrógenos adicionales), aunque su abundancia relativa es menor.

Además puede ocurrir una ruptura parcial del anillo D, perdiéndose la cadena lateral mas 27 unidades de masa⁽¹⁴²⁾. El ión formado en este caso puede perder un metilo contribuyendo al pico correspondiente a la pérdida de la cadena lateral mas 42 unidades de masa. Esta ruptura puede ir acompañada por la migración de un hidrógeno de carbono 14 a carbono 18, lo cual correspondería a la pérdida de la cadena lateral mas 28 unidades de masa (Figura 34).

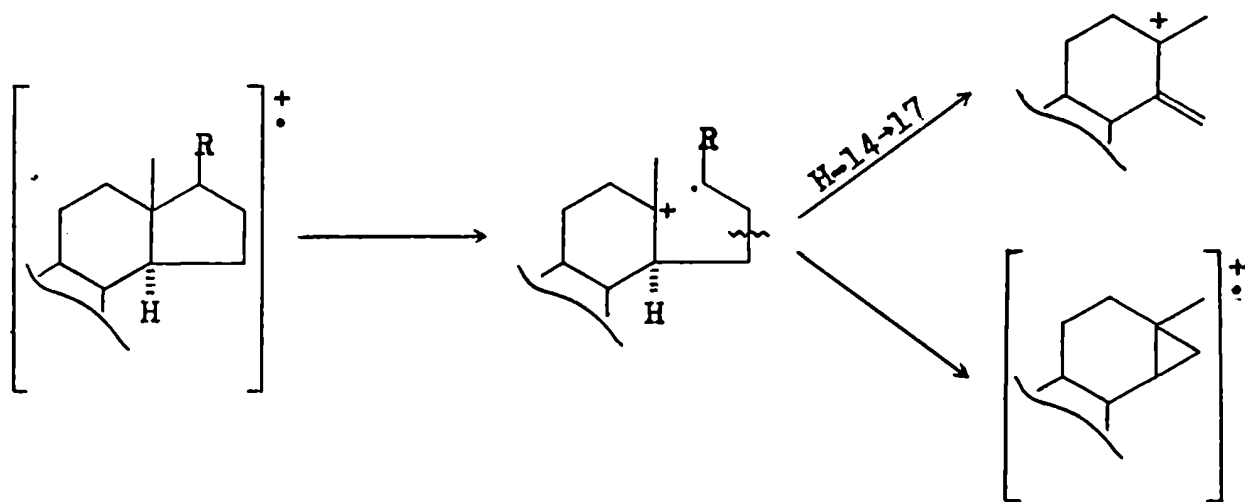


Figura 34. Pérdida de la cadena lateral mas 27 ó 28 unidades de masa.

Una ruptura de menor importancia, es la producida entre los carbonos 17 y 20, que ocasiona la pérdida de la cadena lateral; en los casos en que existen dobles enlaces en dicha cadena, esta ruptura puede ir precedida por la migración de dos hidrógenos del sistema de anillos del esteroide hacia la cadena lateral⁽¹⁴³⁾.

Por otra parte se observan las rupturas de los anillos A y B del sistema polinuclear típicos de esteroides con un doble enlace en posición 5(6) y un hidroxilo o un acetato en posición 3 β . La pérdida de los anillos A y B mas un hidrógeno adicional, por ruptura de las uniones 9-10 y 7-8 daría origen a un ión que estaría formado por los anillos C y D junto con la cadena lateral ($M - (ROH + C_9H_{13})$), donde RO es el grupo sustituyente en carbono 3)⁽¹⁴⁴⁾. Esta ruptura también se da en los esteroides que no poseen la insaturación en la posición 5(6) ($M - (ROH + C_9H_{15})$).

También puede ocurrir la ruptura de las uniones 9-10 y 6-7 con pérdida adicional de 1 ó 2 hidrógenos dando origen a los iones de m/e : $M - (ROH + C_8H_{11})$ y m/e : $M - (ROH + C_8H_{12})$ respectivamente⁽¹⁴⁴⁾.

Además son características de 3 β -hidroxi-5-en-esteroides, las señales observadas a m/e : $M - (H_2O + C_5H_6)$, $M - (H_2O + C_5H_7)$ y a m/e : $M - (H_2O + C_7H_8)$, $M - (H_2O + C_7H_9)$ ^(144,145); las

del primer grupo pueden originarse ya sea por pérdida de una unidad formada por los carbonos 2 a 6 ó 3 a 7 y uno o dos hidrógenos adicionales, o de los cuatro primeros carbonos del anillo A junto con el metilo 19 con migración de tres o dos hidrógenos hacia el fragmento cargado; las del segundo grupo pueden provenir de la eliminación de la unidad integrada por los carbonos 1 a 7 ó por ruptura de las uniones 9-10 y 5-6, con o sin migra-

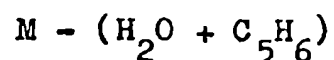
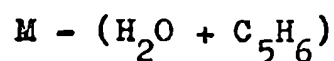
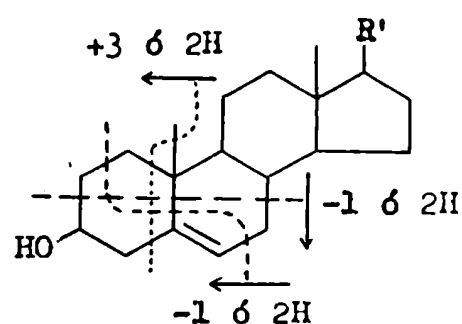
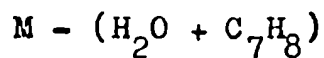
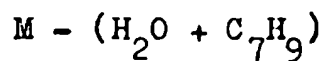
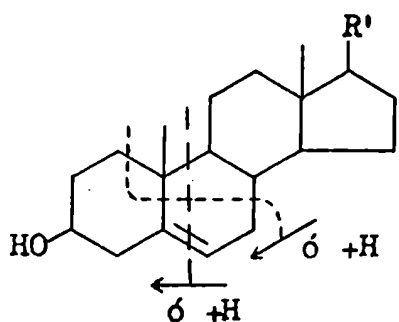
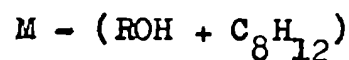
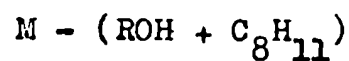
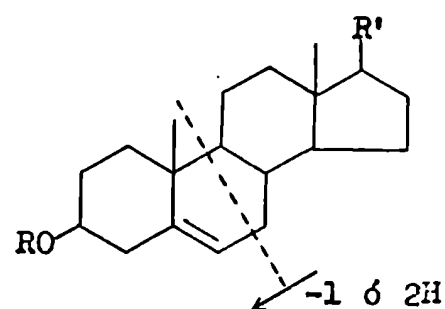
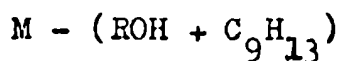
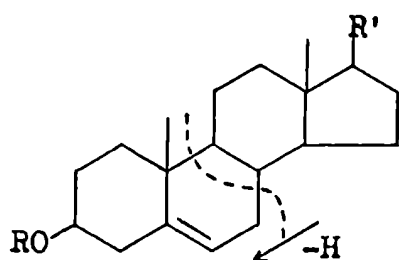


Figura 35. Rupturas de los anillos A y B del sistema polinuclear de β -hidroxi y β -acetoxi-5-en-esteroides.

ción de un hidrógeno hacia el fragmento cargado. Todas estas rupturas se han esquematizado en la Figura 35.

Por último, en todos los casos se produce la pérdida de 15 unidades de masa correspondientes a un radical metilo⁽¹⁴²⁾.

En lo que se refiere a las rupturas inherentes a los distintos grupos funcionales presentes, se observa la pérdida del radical etoxilo (45 unidades de masa) y de etanol (46 unidades de masa) en los ésteres etílicos (LXXXIIIa,b,c,d, XCIIa,b) (146) (páginas 106-110). Además en el caso de los ésteres etílicos β,γ -no saturados LXXXIIIc y LXXXIIId se puede suponer que tenga lugar una pérdida de etoxilo, seguida de una pérdida de monóxido de carbono que originaría un catión alílico según el esquema de la Figura 36.

Es característico, además, de los ésteres etílicos y metílicos no saturados, la descarboxilación (pérdida de 44 unidades de masa) y la escisión del carboxilo (pérdida de 45 unidades de masa), esta última supone una trasposición de un grupo alquilo⁽¹⁴⁷⁾.

En el caso del éster metílico Ie (página 121), se observan las pérdidas de metoxilo y metanol, análogamente a lo observado en los ésteres etílicos y la pérdida de monóxido de carbono⁽¹⁴⁸⁾.

El 3 β ,23-dihidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dieno (XCII)

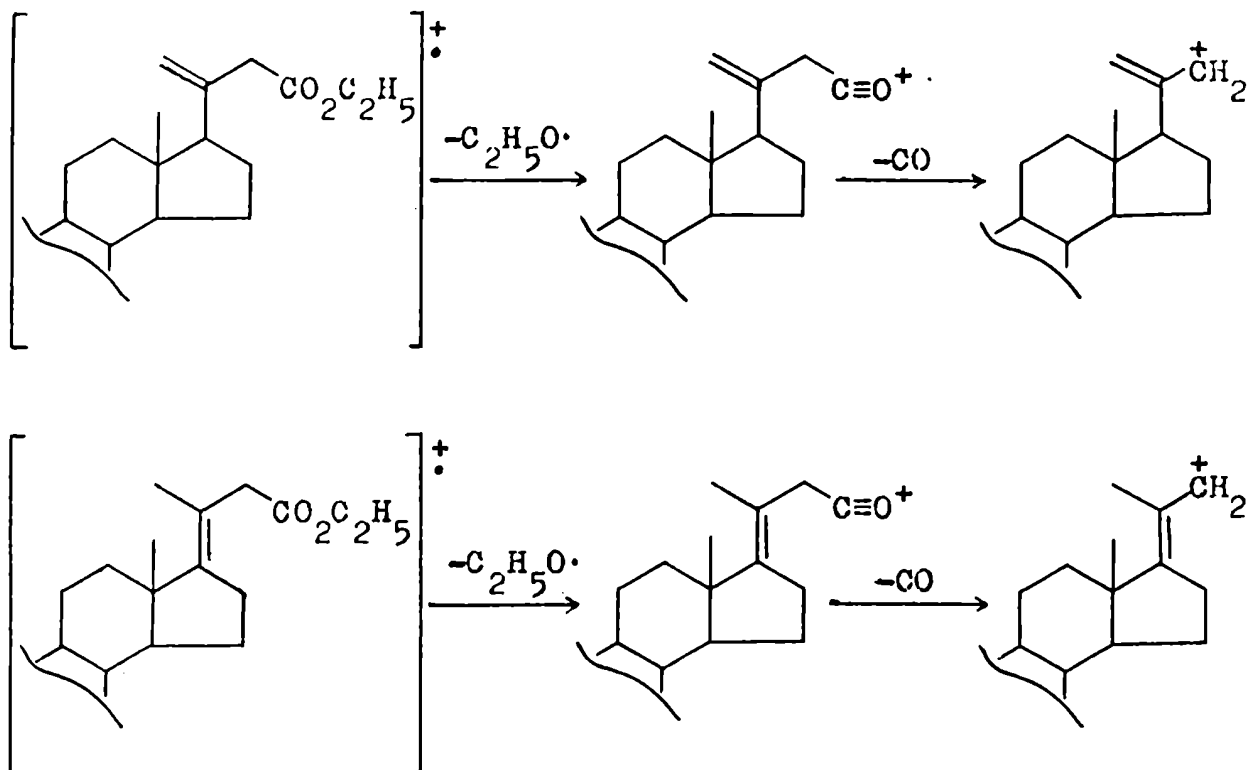


Figura 36. Rupturas de los ésteres β,γ -no saturados LXXXIIIc y LXXXIIIId.

(página 112) da origen a picos característicos, como ser la pérdida de dos moléculas de agua (m/e 308) o de un radical hidroxilo (m/e 327). En cuanto al primero, una de las moléculas de agua proviene de la eliminación-1,2 del hidroxilo de carbono 3 y un hidrógeno de carbono 2 ó 4 como se indicó anteriormente (página 94); la otra molécula de agua puede suponerse que se origina por un reordenamiento de la cadena lateral con pérdida de un hidrógeno en δ al grupo hidroxilo (hidrógenos de carbono 17 ó 21)⁽¹⁴⁹⁾ (Figura 37).

La pérdida del radical hidroxilo que rara vez ocurre en

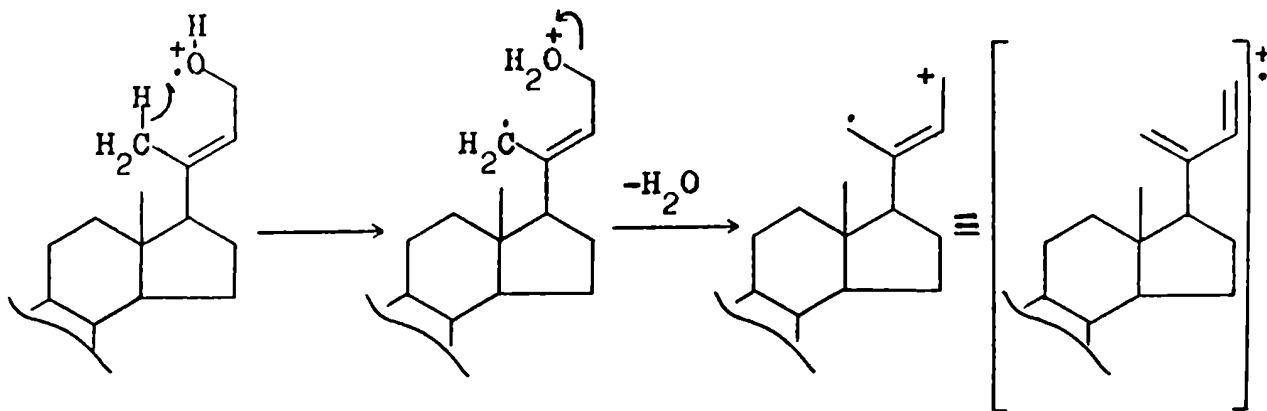


Figura 37. Pérdida de agua de la cadena lateral de XCII (ejemplificada con el hidrógeno de carbono 21).

alcoholes primarios, estaría favorecida en este caso por la presencia del doble enlace que estabilizaría el ión carbonio formado⁽¹⁵⁰⁾ (Figura 38).

Los aldehidos XCIXc y C (páginas 114,115) dan los picos M + 1 y M - 1 característicos de este tipo de compuestos y en el caso del aldehido saturado C, se observan además los iones

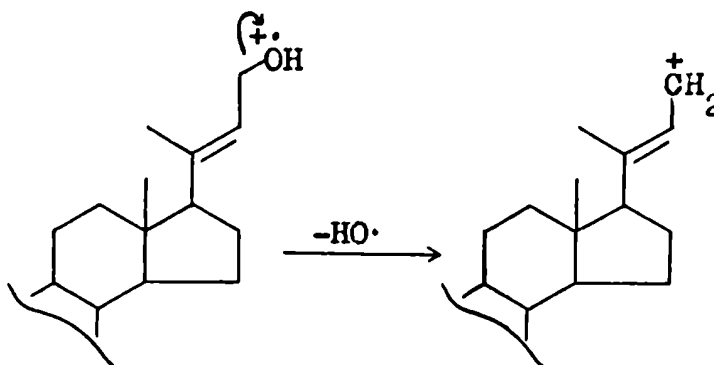


Figura 38. Pérdida del radical hidroxilo de la cadena lateral de XCII.

originados por la pérdida de 28 (C_2H_4), 43 ($CH_2=CH-O\cdot$) y 44 ($CH_2=CH-OH$) unidades de masa⁽¹⁵¹⁾.

En el espectro de masa del cloruro de 3β -acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXI) (página 117) se observan los dobletes separados por dos unidades de masa en relación 3:1 correspondientes a los fragmentos que contienen el átomo de cloro (la relación natural $^{35}Cl/^{37}Cl$ es 3,2:1⁽¹⁵²⁾), m/e 346/348, 331/333, 238/240 y 225/227, además de la señal originada por la pérdida de una molécula de ácido clorhídrico (m/e 310)⁽¹⁵³⁾.

El 3β -acetoxi-col-5-enonitrilo (CII) (página 118), sufre la eliminación de una parte de la cadena lateral con pérdida de los carbonos 22 y 23 ó 20, 21 y 22. En la Figura 39 se

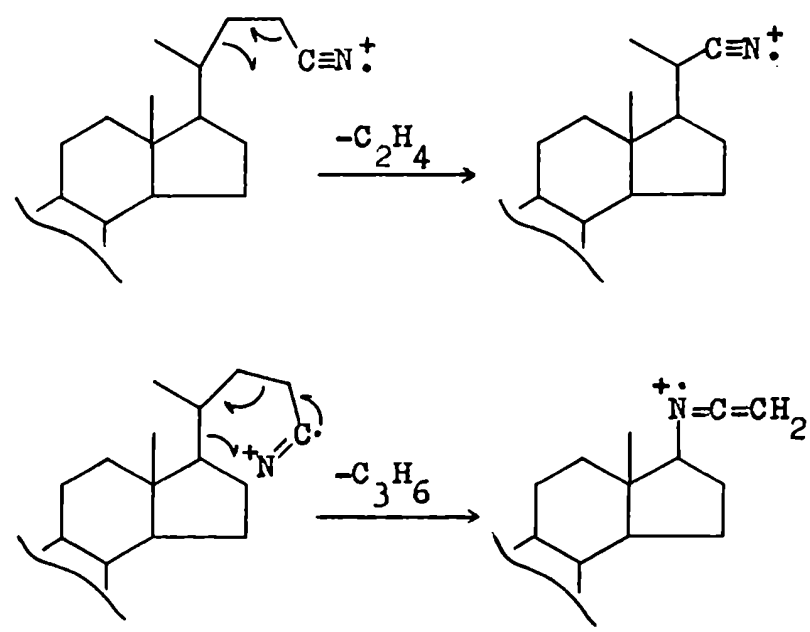


Figura 39. Pérdida de 28 y 42 unidades de masa en el 3β -acetoxi-col-5-enonitrilo (CII).

presenta una racionalización de estas señales⁽¹⁵⁴⁾. La pérdida de 42 unidades de masa puede deberse en parte a la eliminación conjunta de una molécula de ácido cianhídrico y de un radical metilo (probablemente del metilo 21) análoga a la pérdida de ácido bromhídrico y un radical metilo observada en algunos bromuros de alquilo ramificados.

Por último es interesante el hecho que el espectro de masa del anhídrido mixto CIII del ácido 3β-acetoxi-col-5-énico y del ácido acético (página 119) es muy similar al del ácido 3β-acetoxi-col-5-énico (Ib) (página 120). Esto puede racionalizarse suponiendo una pérdida de cetena del anhídrido CIII que

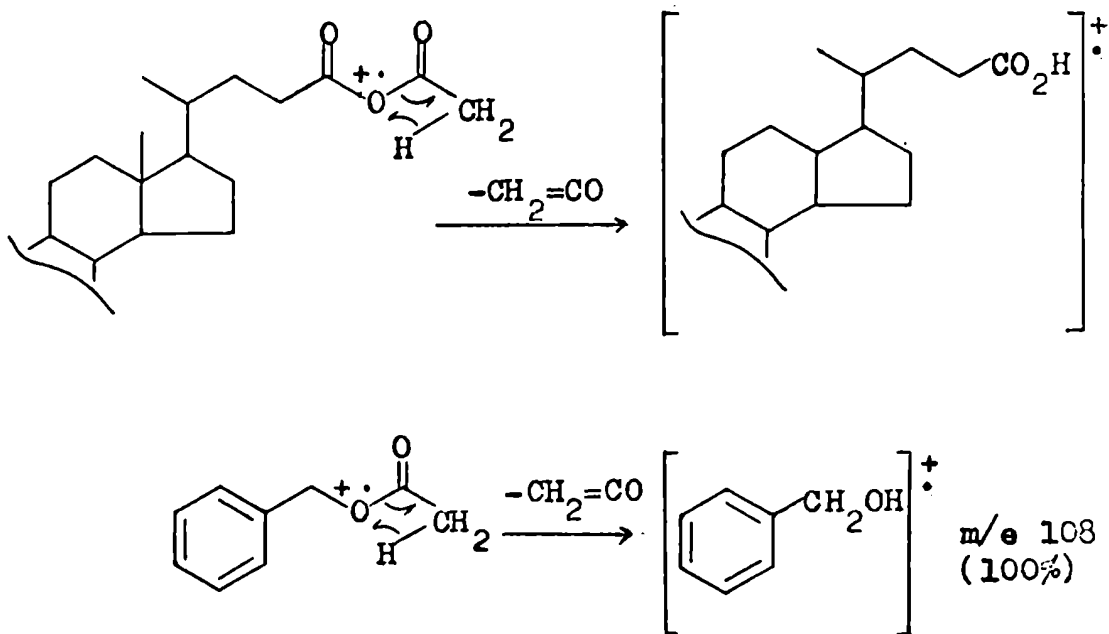


Figura 40. Eliminación de cetena en el anhídrido mixto CIII y en el acetato de bencilo.

daría origen a un radical idéntico al ión molecular del ácido
Ib; esta ruptura sería análoga a la que tiene lugar en acetatos
de bencilo, fenilo, furfurilo y similares⁽¹⁵⁵⁾ (Figura 40).

Espectro de masa del éster etílico del ácido 3β-acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
428	0,2	M ⁺
413	0,2	M - CH ₃
384	2,3	M - CO ₂
383	7	M - 45 (C ₂ H ₅ O ó CO ₂ H)
369	29	M - CH ₃ CO ₂
368	100	M - CH ₃ CO ₂ H
353	20	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₃)
323	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + 45)
322	7	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₂ H ₅ OH)
307	20	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₂ H ₅ OH + CH ₃)
279	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₂ H ₅ OH + 28 (CO ó C ₂ H ₄))
253	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 2H)
228	16	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 27)
227	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 28)
214	20	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	65	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)
212	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 43)
211	20	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 44)

Espectro de masa de la mezcla de los ésteres etílicos de los ácidos 3β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa), 3β -acetoxi-23-norcola-5,(Z)20(22)-diénico (LXXXIIIb), 3β -acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (LXXXIIIc) y 3β -acetoxi-23-norcola-5,20(21)-diénico (LXXXIIId).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
428	1,1	M^+
413	0,6	$M - CH_3$
384	1,8	$M - CO_2$
383	3,6	$M - 45 (C_2H_5O \text{ ó } CO_2H)$
382	1,2	$M - C_2H_5OH$
369	25	$M - CH_3CO_2$
368	100	$M - CH_3CO_2H$
354	12	$M - (CH_3CO_2 + CH_3)$
353	36	$M - (CH_3CO_2H + CH_3)$
340	8	$M - (CH_3CO_2H + C_2H_4)$
323	5	$M - (CH_3CO_2H + 45)$
322	10	$M - (CH_3CO_2H + C_2H_5OH)$
307	32	$M - (CH_3CO_2H + C_2H_5OH + CH_3)$
295	13	$M - (CH_3CO_2H + CO_2C_2H_5)$ en LXXXIIIc,d
281	21	$M - (CH_3CO_2H + CH_2CO_2C_2H_5)$ en LXXXIIIc,d
280	45	$M - (CH_3CO_2H + CO_2C_2H_5 + CH_3)$ en LXXXIIIc,d
254	13	$M - (CH_3CO_2H + \text{cadena lateral} + H)$

continuación.

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
253	46	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 2H)
247	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₉ H ₁₃)
228	14	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 27)
227	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 28)
215	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 40)
214	21	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	79	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)
212	64	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 43)
211	29	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 44)

Espectro de masa del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-nor-5 α -colánico (XC1a).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
433	6	M + 1
432	16	M ⁺
417	3	M - CH ₃
387	3	M - C ₂ H ₅ O
373	25	M - CH ₃ CO ₂
372	100	M - CH ₃ CO ₂ H
357	19	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₃)
318	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₄ H ₆ (RDA))
290	16	M - (cadena lateral + 27)
286	10	M - (CH ₃ CO ₂ + CH ₂ CO ₂ C ₂ H ₅)
285	41	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₂ CO ₂ C ₂ H ₅)
275	11	M - (cadena lateral + 42)
230	25	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 27)
217	16	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 40)
216	31	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
215	66	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)
201	14	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41 + CH ₃)

Espectro de masa del éster etílico del ácido 3β-hidroxi-23-nor-5α-colánico (XC1b).

m/e	Intonsidad relativa (%)	Asignación tontativa
391	26	M + 1
390	79	M ⁺
388	10	M - 2
375	17	M - CH ₃
373	10	M - OH
372	31	M - H ₂ O
357	20	M - (H ₂ O + CH ₃)
345	10	M - C ₂ H ₅ O
327	11	M - (C ₂ H ₅ O + H ₂ O)
318	4	M - (H ₂ O + C ₄ H ₆ (RDA))
303	20	M - (H ₂ C + C ₄ H ₆ + CH ₃)
285	49	M - (H ₂ O + CH ₂ CO ₂ C ₂ H ₅)
273	9	M - (H ₂ O + C ₄ H ₆ + C ₂ H ₅ O)
264	20	M - (H ₂ O + C ₈ H ₁₂)
257	4	M - (H ₂ O + cadena lateral)
248	33	M - (cadena lateral + 27)
234	31	M - (cadena lateral + 41)
233	89	M - (cadena lateral + 42)
230	10	M - (H ₂ O + cadena lateral + 27)
217	23	M - (H ₂ O + oadena lateral + 40)

continuación.

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
216	31	M - (H ₂ O + cadena lateral + 41)
215	100	M - (H ₂ O + cadena lateral + 42)
201	17	M - (H ₂ O + cadena lateral + 41 + CH ₃)

Espectro de masa del 3 β ,23-dihidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-
dieno (XCII).

m/e	Intonsidad relativa (%)	Asignación tentativa
345	26	M + 1
344	100	M ⁺
329	10	M - CH ₃
327	10	M - OH
326	41	M - H ₂ O
312	10	M - (CH ₃ + OH)
311	36	M - (CH ₃ + H ₂ O)
309	3	M - (H ₂ O + OH)
308	5	M - 2H ₂ O
293	28	M - (CH ₃ + 2H ₂ O)
271	13	M - (cadena lateral + 2H)
255	5	M - (H ₂ O + cadena lateral)
253	10	M - (H ₂ O + cadena lateral + 2H)
246	13	M - (cadena lateral + 27)
245	10	M - (cadena lateral + 28)
232	14	M - (cadena lateral + 41)
231	28	M - (cadena lateral + 42)
230	19	M - (cadena lateral + 43)
229	70	M - (cadena lateral + 44)
228	17	M - (H ₂ O + cadena lateral + 27)

continuación.

m/e	Intonsidad relativa (%)	Asignación tentativa
227	9	M - (H ₂ O + cadena lateral + 28)
226	15	M - (H ₂ O + cadena lateral + C ₂ H ₅)
215	13	M - (H ₂ O + cadena lateral + 40)
214	24	M - (H ₂ O + cadena lateral + 41)
213	82	M - (H ₂ O + cadena lateral + 42)
212	17	M - (H ₂ O + cadena lateral + 43)
211	59	M - (H ₂ O + cadena lateral + 44)
201	13	M - (2H ₂ O + C ₈ H ₁₁)
200	10	M - (2H ₂ O + C ₈ H ₁₂)

Espectro de masa del 3 β -acetoxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dien-23-al (XCIIXc).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
385	0,1	M + 1
384	0,1	M ⁺
383	0,1	M - 1
325	27	M - CH ₃ CO ₂
324	100	M - CH ₃ CO ₂ H
310	5	M - (CH ₃ CO ₂ + CH ₃)
309	20	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₃)
306	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + H ₂ O)
291	12	M - (CH ₃ CO ₂ H + H ₂ O + CH ₃)
253	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 2H)
228	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 27)
227	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 28)
214	8	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	23	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)
212	8	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 43)
211	20	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 44)

Espectro de masa del 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-al (C).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
387	0,2	M + 1
386	0,3	M ⁺
385	0,8	M - 1
371	0,9	M - CH ₃
344	1,3	M - CH ₂ =CO
343	0,4	M - CH ₂ =CH-O
342	0,4	M - CH ₂ =CH-OH
327	26	M - CH ₃ CO ₂
326	100	M - CH ₃ CO ₂ H
311	16	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₃)
298	3	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₂ H ₄)
283	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₂ =CH-O)
282	6	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₂ =CH-OH)
255	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral)
253	8	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 2H)
228	6	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 27)
219	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₁)
218	14	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₂)
214	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	12	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)
205	8	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₉ H ₁₃)

Espectro de masa del 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-ol (CI).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
388	0,3	M ⁺
370	0,5	M - H ₂ O
329	26	M - CH ₃ CO ₂
328	100	M - CH ₃ CO ₂ H
314	10	M - (CH ₃ CO ₂ + CH ₃)
313	17	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₃)
255	14	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral)
228	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 27)
221	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₁)
220	14	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₂)
214	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	11	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)
207	14	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₉ H ₁₃)

Espectro de masa del cloruro de 3β -acetoxi-24-norcol-5-enilo
(LXXXI).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
349	10	$M(^{37}\text{Cl}) - \text{CH}_3\text{CO}_2$
348	35	$M(^{37}\text{Cl}) - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$
347	25	$M(^{35}\text{Cl}) - \text{CH}_3\text{CO}_2$
346	100	$M(^{35}\text{Cl}) - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$
333	7	$M(^{37}\text{Cl}) - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{CH}_3)$
331	21	$M(^{35}\text{Cl}) - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{CH}_3)$
310	3	$M - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{ClH})$
255	13	$M - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{cadena lateral})$
240	7	$M(^{37}\text{Cl}) - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{C}_8\text{H}_{12})$
238	20	$M(^{35}\text{Cl}) - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{C}_8\text{H}_{12})$
228	4	$M - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{cadena lateral} + 27)$
227	11	$M(^{37}\text{Cl}) - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{C}_9\text{H}_{13})$
225	30	$M(^{35}\text{Cl}) - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{C}_9\text{H}_{13})$
214	5	$M - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{cadena lateral} + 41)$
213	13	$M - (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{cadena lateral} + 42)$

Espectro de masa del 3 β -acetoxi-col-5-enonitrilo (CII).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
397	2,3	M ⁺
369	2,8	M - C ₂ H ₄
338	32	M - CH ₃ CO ₂
337	100	M - CH ₃ CO ₂ H
323	10	M - (CH ₃ CO ₂ + CH ₃)
322	32	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₃)
309	4	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₂ H ₄)
295	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + 42 (C ₃ H ₆ δ CNH + CH ₃))
255	16	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral)
230	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₁)
229	37	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₂)
228	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 27)
216	42	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₉ H ₁₃)
215	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 40)
214	16	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	26	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)

Espectro de masa del anhídrido mixto del ácido 3 β -acetoxi-cól-
5-énico y del ácido acético (CIII).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
357	27	M - (CH ₃ CO ₂ + CH ₂ =CO)
356	100	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₂ =CO)
341	16	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₂ =CO + CH ₃)
255	14	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral)
249	8	M - (CH ₂ =CO + CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₁)
248	18	M - (CH ₂ =CO + CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₂)
235	27	M - (CH ₂ =CO + CH ₃ CO ₂ H + C ₉ H ₁₃)
214	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	11	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)

Espectro de masa del ácido 3 β -acetoxi-cól-5-énico (Ib).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
357	46	M - CH ₃ CO ₂
356	100	M - CH ₃ CO ₂ H
341	26	M - (CH ₃ CO ₂ H + CH ₃)
255	17	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral)
249	10	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₁)
248	23	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₈ H ₁₂)
235	38	M - (CH ₃ CO ₂ H + C ₉ H ₁₃)
214	5	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 41)
213	15	M - (CH ₃ CO ₂ H + cadena lateral + 42)

Espectro de masa del éster metílico del ácido 3 β -hidroxi-cól-5-
énico (Ic).

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
389	28	M + 1
388	100	M ⁺
374	10	M - 14
373	36	M - CH ₃
371	23	M - OH
370	75	M - H ₂ O
357	10	M - CH ₃ O
356	16	M - CH ₃ OH
355	53	M - (CH ₃ + H ₂ O)
339	13	M - (CH ₃ O + H ₂ O)
329	11	M - CO ₂ CH ₃
328	13	M - (CH ₃ OH + CO)
304	13	M - (H ₂ O + C ₅ H ₆)
303	53	M - (H ₂ O + C ₅ H ₇)
278	19	M - (H ₂ O + C ₇ H ₈)
277	86	M - (H ₂ O + C ₇ H ₉)
273	24	M - cadena lateral
263	12	M - (H ₂ O + C ₈ H ₁₁)
255	44	M - (H ₂ O + cadena lateral)
249	24	M - (H ₂ O + C ₉ H ₁₃)

continuación.

m/e	Intensidad relativa (%)	Asignación tentativa
246	11	M - (cadena lateral + 27)
245	11	M - (cadena lateral + 28)
232	9	M - (cadena lateral + 41)
231	28	M - (cadena lateral + 42)
228	16	M - (H ₂ O + cadena lateral + 27)
227	13	M - (H ₂ O + cadena lateral + 28)
215	13	M - (H ₂ O + cadena lateral + 40)
214	19	M - (H ₂ O + cadena lateral + 41)
213	70	M - (H ₂ O + cadena lateral + 42)

Discusión de los resultados obtenidos en la inoculación del trazador radiactivo a sapos Bufo paracnemis.

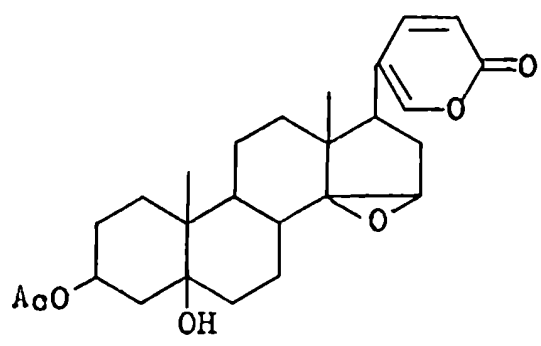
Los resultados obtenidos de la inyección del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico-24-¹⁴C (Ia-¹⁴C) (7,3x10⁸ dpm/mM) se presentan en la Tabla 3, donde los valores de actividad específica (dpm/mg) corresponden a una determinación realizada sobre el producto indicado. Dadas las pequeñas cantidades de material disponible, solo fue posible una purificación por recristalización en el caso de la acetilmarinobufagina (CIV).

De los valores de incorporación específica que figuran en la Tabla 3, se deduce que el ácido 3β-hidroxi-col-5-énico-24-¹⁴C suministrado es un precursor poco eficiente de los bufadienólidos de origen animal. Como elemento comparativo puede utilizarse el dato experimental que el colesterol (IIa) obtenido

T A B L A 3

<u>Días</u>	<u>Veneno total</u> dpm/mg	<u>Extracto crudo</u> dpm/mg	<u>CIV</u> dpm/mg	<u>CIV</u> Incorporación específica %	<u>LXXV</u> dpm/mg	<u>LXXVI</u> dpm/mg
30	15	16	7 ^b	0,0004 ^b	68 ^a	--
78	27	52	8 ^b	0,0005 ^b	--	--
80	21	35	78 ^a , 17 ^b	0,001 ^b	--	28 ^b
118	12	9	3 ^b	0,0002 ^b	67 ^a	38 ^a

a: producto crudo; b: producto recristalizado una vez.



(CIV)

del hígado de un animal sacrificado a los 78 días desde la inoculación del trazador, poseía una radiactividad que representaba una incorporación específica de 0,0002% y es conocido que el ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ia) no es precursor del colesterol⁽¹⁰⁹⁾.

Estos datos no se contradicen con los obtenidos por Chen y Osuch⁽¹¹⁰⁾, dado que como se indicó anteriormente (página 52), los referidos autores determinaron la radiactividad de los bufadienólidos luego de su aislamiento por cromatografía en placa preparativa sin realizar una ulterior purificación de los mismos. Como puede observarse en la Tabla 3, la acetilmarrubifagina (CIV) proveniente de la experiencia de 80 días tenía una actividad específica de 78 dpm/mg (incorporación específica 0,005%) la cual disminuyó considerablemente al recristalizarla de etanol absoluto (17 dpm/mg, incorporación específica 0,001%). Este resultado indicaría la presencia de un producto no identificado que acompaña a la marrubifagina, que no es separable

por cromatografía pero si por recristalización del acetyl derivado CIV, y al cual se le atribuye la radiactividad hallada en el producto crudo.

Cuando el residuo de extracción del veneno de 118 días con cloroformo-metanol 95:5 fue nuevamente extraído con un solvente mas polar (cloroformo-metanol 1:1), se obtuvo un sólido amorfo con una actividad específica tres veces mayor que la del primer extracto; al ser analizado por cromatografía en capa delgada (alúmina, solvente de desarrollo diclorometano-metanol 95:5) el segundo extracto resultó una mezcla compleja de productos con un Rf menor que el de la telocinobufagina (LXXVI). Dichos productos no pudieron ser identificados.

Por otra parte los datos de actividad específica correspondientes a los bufadienólidos bufalina (LXXV) y telocinobufagina (LXXVI) no son totalmente confiables debido a que estos productos no pudieron ser sometidos a una ulterior purificación por recristalización dada la pequeña cantidad obtenida de ellos, con excepción de la telocinobufagina proveniente de la experiencia de 80 días que fue recristalizada de acetona obteniéndose una actividad específica menor que en la aislada del veneno de 118 días.

Se hace notar que toda la experiencia fue llevada a cabo en los meses de abril a agosto, época en que el metabolismo

de los animales es mas lento⁽¹¹²⁾.

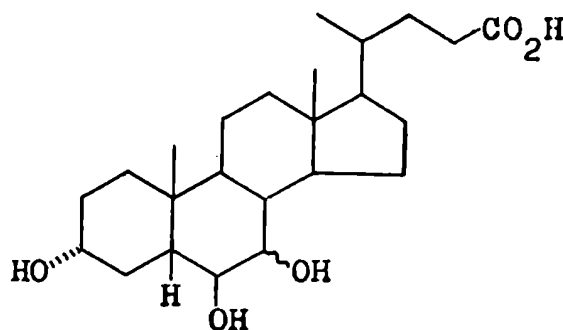
Por lo tanto, a pesar que el hecho que un trazador radiactivo no se incorpore a un dado producto no es una prueba absoluta de que dicho trazador no sea un precursor del producto en cuestión, los resultados anteriores indican que es poco probable que el ácido 3β -hidroxi-col-5-énico (Ia) se encuentre en el camino biosintético normal de los bufadienólidos de sapos.

Teniendo en cuenta que se ha demostrado que el colesterol (IIa) es precursor de los bufadienólidos de origen animal⁽¹¹²⁾ y dado que el ácido 3β -hidroxi-col-5-énico no lo es según se ha indicado mas arriba, se puede concluir que la saturación del doble enlace en la posición 5(6) ocurre con anterioridad a la ruptura de la cadena lateral.

Es factible entonces suponer en base a los resultados obtenidos que la transformación biosintética del colesterol (IIa) a los bufadienólidos en sapos, ocurre por reducción del doble enlace en la posición 5(6) del esterol a través de un 3-ceto-4-en-intermediario de 27 carbonos para dar el 3β -hidroxi- 5β -H-derivado correspondiente, el cual se hidroxilaría posteriormente en forma análoga a los cardenólidos (páginas 28-41). Alternativamente, en los casos de 5β -hidroxi-bufadienólidos, la saturación del doble enlace 5(6) podría producirse por hidratación directa del mismo. La ruptura oxidativa de la cadena late-

ral del esteroide podría ocurrir después de estas hidroxilaciones para dar un derivado del ácido $3\beta,5\beta$ -dihidroxi ó 3β -hidroxi- 5β -H-colánico (LXXIIIc). Estas posibilidades se esquematizan en la Figura 41.

Además es probable que las hidroxilaciones adicionales ocurran con anterioridad a la ruptura de la cadena lateral, esta suposición se ve apoyada por el hecho que el ácido 3β -hidroxi-col-5-énico (Ia) ha demostrado ser precursor de los ácidos biliares quonodesoxicólico (XXd), α -muricólico (CVa) y β -muricólico (CVb) en ratas⁽¹⁵⁶⁾ estando en el camino principal hacia éstos, pero es un precursor deficiente del ácido cólico (XXa) y del ácido desoxicólico (XXb), postulándose que se encuentra en un camino minoritario⁽¹⁵⁷⁾, ya que en estos últimos el camino principal transcurre por hidroxilación en el sistema polinuclear del esteroide previamente a la ruptura de la cadena lateral^(157,158); en este caso la 12α -hidroxilasa interviniente se



(CVa), 7α -OH

(CVb), 7β -OH

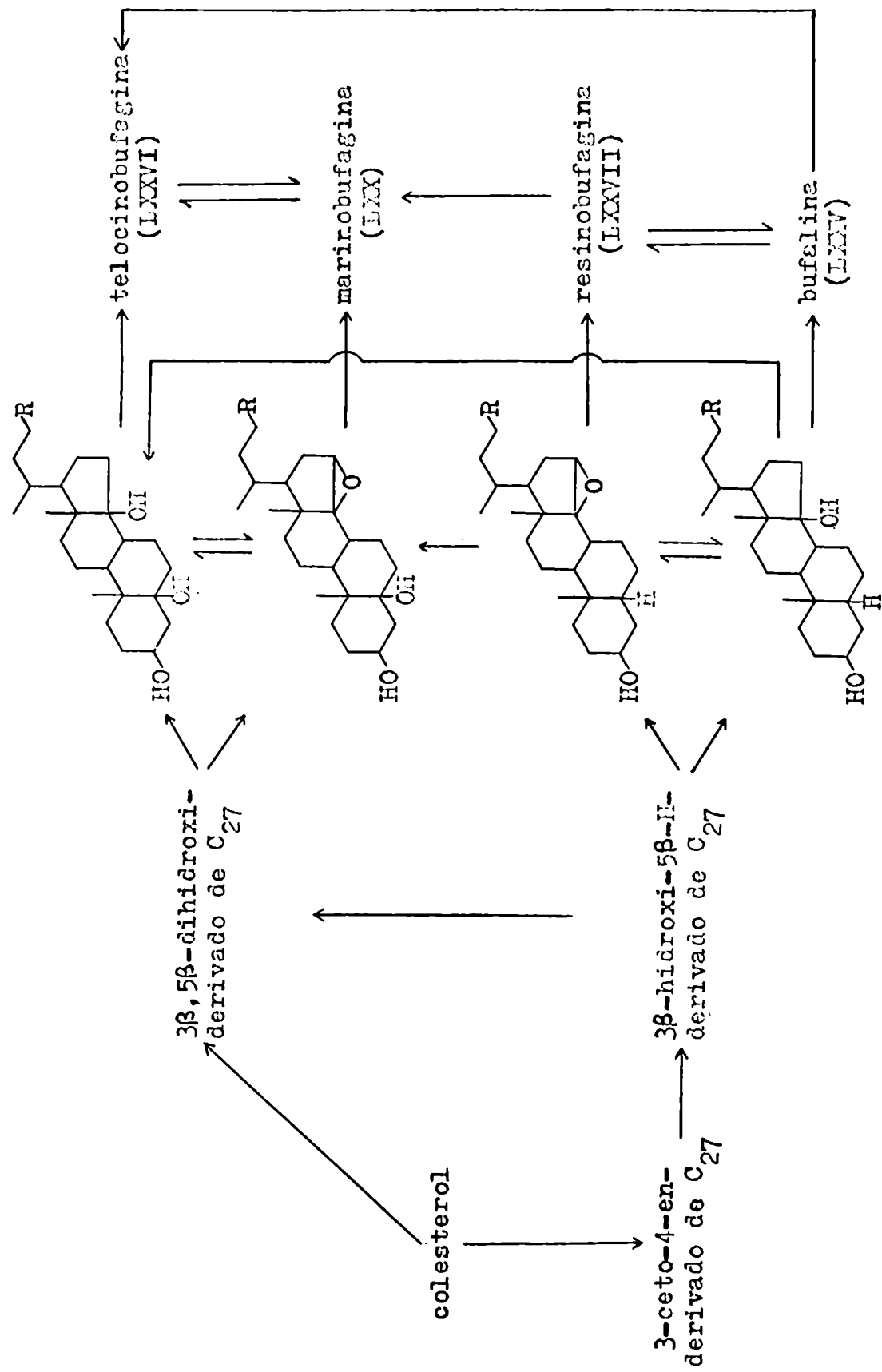


Figura 41. Posibles rutas biosintéticas de colesterol (IIa) a bufadienólidos en sapos.

en base a los resultados obtenidos en esta tésis (R: CO₂H ó CH₂CH(CH₃)₂).

vería inhibida cuando ya ha ocurrido dicha ruptura. Un efecto similar podría tener lugar sobre las hidroxilasas intervinientes en el proceso biosintético por el cual se forman los bufadionólidos, sin embargo comprobar ésto requeriría estudios posteriores.

=====

Parte experimental.

General.

Los puntos de fusión fueron determinados con un aparato Fisher-Johns y no han sido corregidos.

Los poderes rotatorios fueron determinados con un polarímetro automático Perkin-Elmer modelo 141; la temperatura y el solvente se indican en cada caso particular.

Los espectros de absorción en el infrarrojo (I.R.) se realizaron en dispersión en Nujol excepto en los casos en que se indica lo contrario, con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 421, o con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 137, Infracord.

Los espectros de absorción en el ultravioleta (U.V.) se realizaron en solución de etanol 95% en un espectrofotómetro Beckman DK-2A, utilizando como fuente una lámpara de hidrógeno.

Los espectros de resonancia magnética protónica (R.M.P.) se efectuaron a 60 MHz con un espectrofotómetro Varian A-60; se utilizó cloroformo deuterado como solvente excepto en los casos en que se indica lo contrario; en todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) como señal de referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en δ (p.p.m.) y las constantes de acoplamiento (J) en herz (Hz); se indican en cada

caso como s: singulete, d: doblete, dd: doble doblete, t: triplete, o: cuarteto, m: multiplete, b.a.: banda ancha.

Los espectros de masa (E.M.) se realizaron a 70 ev en un espectrómetro de masa Varian-Mat CH-7 provisto de introduccion directa de muestras.

Las mediciones de radiactividad se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3003. Las muestras se disolvieron en una mezcla de 1 ml de agua y 14 ml de solución centelladora de dioxano que contenía naftaleno (50 g), 2,5-difeniloxazol (3,5 g) y 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno (0,150 g) por cada 500 ml.

Las cromatografías gas-líquido (c.g.l.) fueron realizadas con un cromatógrafo gaseoso Varian Aerograph modelo 204 con inyección directa, equipado con una columna de vidrio de 2 metros (diámetro interno 3 mm) conteniendo como fase fija OV-17 2% sobre Chromosorb G H-P (80-100) y detector de ionización de llama.

La cromatografía en capa delgada (c.c.d.) se realizó utilizando como fase fija silicagel-G (Merck) u óxido de aluminio G (Merck) y como reveladores vapores de iodo o solución de tricloruro de antimonio en etanol 95%-ácido clorhídrico concentrado (1:1) en las cromatografías analíticas y solución de berberina 1% en etanol 95%, observando a la luz ultravioleta a 366

nm, en las cromatografías preparativas. Los sistemas de desarrollo utilizados fueron: 1) diclorometano-benceno (1:1); 2) diclorometano; 3) diclorometano-metanol (97,5:2,5); 4) diclorometano-metanol (96:4); 5) acetato de etilo; 6) acetato de etilo-metanol (98:2); 7) acetona.

La cromatografía en columna se realizó utilizando como adsorbentes silicagel Davison (malla 100-200) o alúmina Woelm neutra (actividad I).

Los microanálisis fueron realizados por la Dra. B. B. de Deferrari (Departamento de Química Orgánica, F.C.E. y N., U.B.A.) y por el laboratorio Dr. A. Bernhardt (Alemania Occidental).

El cianuro de potasio marcado con carbono-14, fue adquirido a "Commissariat A L'Energie Atomique", Francia.

Los solventes fueron evaporados a presión reducida por debajo de 50°.

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-20-hidroxi-23-norcol-5- α -énico
(IXXVII).

Acetato de pregnenolona (XXIb) (30 g), fue disuelto en una mezcla de éter anhidro y benceno anhidro 1:1 (30 ml), y la solución tratada en atmósfera de nitrógeno con zinc activado (15 g) y varios cristales de iodo. Se agregó bromoacetato de etilo seco y rocién destilado (21 ml), primero una porción de 2 ml calentando para iniciar la reacción y luego el resto, lentamente, para mantener el reflujo. Finalizado el agregado, se calentó a reflujo una hora mas y se volcó sobre ácido clorhídrico diluido con hielo. Se disgregó el sólido gomoso formado y se extrajo dos veces con éter.

La fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó el solvente. El residuo se trató con anhídrido acético y piridina 1:1 (100 ml) y se dejó 20 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre agua-hielo y se filtró el sólido formado (37,3 g).

El producto se reoristalizó de metanol, pf 141-144°
 (lit⁽¹¹⁸⁾ pf 136-138°); $\left| \alpha \right|_D^{25} -54,7^\circ$ (c 1,00 CHCl₃).
I.R.: 3400, 1715, 1240, 1040, 815 cm⁻¹;
R.M.P.: 0,87 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,25 (s, Me-21 del 20R); 1,28 (t, 3H, J 7Hz, CH₃CH₂O₂C-); 1,36 (s, Me-21

del 20S); 2,03 (s, 3H, CH_3CO_2^-); 3,38 (b.a., 1H, OH); 4,19 (c, 2H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$ -); 4,58 (b.a., 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6).

Ester etílico del ácido 3β-acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa).

Método A. El éster etílico del ácido 3β-acetoxi-20-hidroxi-23-norcol-5-énico (LXXXII) (30 g) se disolvió en piridina seca (360 ml), se agregó lentamente oxiloloruro de fósforo (60 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante 22 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre ácido clorhídrico diluido con hielo (1 lt) y se extrajo tres veces con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, con ácido clorhídrico diluido, con agua, con solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua; se secó sobre cloruro de calcio y se evaporó el solvente. El residuo se cromatografió en una columna de alúmina (1 kg), eluyendo con benceno. Se obtuvieron 17 g de un producto que resultó ser una mezcla de cuatro sustancias detectadas mediante c.g.l..

El producto anterior se recristalizó dos veces de etanol 95%, obteniéndose el éster etílico del ácido 3β-acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) (8,6 g), pf 148-150° (lit⁽¹¹⁸⁾ pf 141-144°), homogéneo en c.g.l..

U.V.: λ_{max} 226 nm (E 20000);

I.R.: 1730, 1710, 1625, 1240, 1150, 1035, 870 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,61 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, 3H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$); 2,03 (s, 3H, CH_3CO_2-); 2,18 (d, 3H, J 1,5 Hz, Me-21); 4,18 (c, 2H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$); 4,58 (b.a., 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6); 5,72 (m, 1H, H-22);

E.M.: m/e 428 (M^+), 368 (M-60, 100%); (página 106).

Método B. Una mezcla de acetato de pregnenolona (XXIb) (200 mg) y carbetoimetilentrifenilfosforano (LXXXIV) (800 mg) se calentó a 175° en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas con agitación permanente. El producto resultante se trató con éter (20 ml) y se calentó a reflujo, se dejó enfriar y se filtró. El filtrado se llevó a sequedad y el residuo se cromatografió en una columna de silicagol (20 g). La elución con benceno dió un producto blanco cristalino (56 mg), homogéneo en c.g.l., que fue recristalizado de etanol 95%, y sus espectros de I.R. y R.M.P., resultaron idénticos a los del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) obtenido por el método A.

Mozola de los ésteres etílicos de los ácidos 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa), 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(Z)20(22)-diénico (LXXXIIIb), 3 β -acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (LXXXIIIc) y 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20(21)-diénico (LXXXIIId).

Método A. Por concentración de las aguas madres de la recristalización del producto obtenido por el método A de la preparación anterior, se obtuvieron 3,1 g de producto de pf 79-81°, que presentaba tres bandas al ser analizado por c.g.l..

U.V.: λ_{\max} 226 nm (ϵ 7400);

I.R.: 1730, 1625, 1240, 1150, 1040, 870 cm^{-1} ;

R.N.P.: 0,61 (s, Me-18 en LXXXIIIa,b); 0,68 (s, Me-18 en LXXXIIIc,d); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,25 y 1,27 (t, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$ en LXXXIIIc,d); 1,28 (t, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$ en LXXXIIIa,b); 1,91 (d, J 1Hz, Me-21 en LXXXIIIb); 2,03 (s, 3H, CH_3CO_2-); 2,20 (d, 3H, J 1Hz, Me-21 en LXXXIIIa); 2,93 (s, 0,67 H; H-22 en LXXXIIIc); 3,08 (m, 0,33H, H-22 en LXXXIIId); 4,15 (c, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$ en LXXXIIIc,d); 4,18 (c, 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$ en LXXXIIIa,b); 4,58 (b.a., 1H, H-3); 5,05 (m, 0,33H, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$ en LXXXIIId); 5,40 (m, 1H, H-6); 5,72 (m, 0,25H, H-22 en LXXXIIIa); 5,77 (m, 0,25H, H-22 en LXXXIIIb);

E.M.: m/e 428 (M^+), 368 (M-60, 100%); (página 107).

NOTA: Las integraciones indicadas como fracciones menores que

1H en el espectro de resonancia magnética protónica (R.M.P.), fueron calculadas tomando como la unidad las integraciones de las señales correspondientes a H-3 y H-6 comunes a los cuatro compuestos.

Método B. Una solución del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20-hidroxi-23-norcol-5-énico (LXXXII) (112 mg) en éter anhidro (5 ml), se trató con solución de tribromuro de fósforo (0,05 ml) en éter anhidro (1,5 ml) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se agregó agua (30 ml), se agitó unos minutos y se extrajo con éter. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó el solvente.

El producto resultante tenía sus espectros de resonancia magnética protónica e infrarrojo, idénticos a los del producto obtenido por el método A.

Bromuro de (acetoximetil)etil-trifenilfosfonio (LXXXVI).

A una solución de 2-butenato de etilo (LXXXVII) recién destilado y seco (12,5 ml) en éter anhidro (17 ml) se le burbujeó ácido bromhídrico anhidro⁽¹⁶³⁾ (0,15 moles), y se agitó a temperatura ambiente durante 23 horas. Se eliminó el éter a presión reducida (100 torr) y el residuo se destiló a 13 torr, recogién dose la fracción de punto de ebullición 73° correspondiente al 3-bromo-butenato de etilo (LXXXVIII) (7,8 g) (lit

(164) $\text{po}(13 \text{ torr}) 74-76^\circ$;

I.R. (film): 1730, 1300, 1220, 1170, 1040 cm^{-1} .

El producto anterior (7,47 g) se trató con trifenilfosfina anhidra (10,1 g) y la mezcla se calentó a 100° durante 1 hora y a $110-115^\circ$ durante 30 minutos, obteniéndose un líquido viscoso que solidificó al enfriar. El sólido formado se disgregó con éter, y se filtró el residuo insoluble que fue recristalizado de éter-etanol 95%. Se secó sobre pentóxido de fósforo a 90° y 10^{-3} torr, durante 24 horas, $\text{pf } 166-169^\circ$.

I.R.: 1730, 1220, 1160, 1110, 1030, 995, 755, 725, 695 cm^{-1} ;

R.M.P.: 1,27 (t, 3H, J 7Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,55 (dd, 3H, $J_{\text{H-H}}$ 7Hz, $J_{\text{P-H}}$ 18Hz, $\text{CH}_3\text{CH-P}^\dagger$); 2,67 (m, 2H, CH_2CO_2^-); 4,20 (o, 2H, J 7Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,67 (b.a., 1H, $-\text{CH-P}^\dagger$); 7,90 (m, 15H, H aromáticos).

Ester etílico del ácido 3β -hidroxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (XC).

Una solución del éster etílico del ácido 3β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) (175 mg) en etanol 95% (12 ml) fue tratada con ácido sulfúrico concentrado (3 gotas) y se calentó a reflujo durante 46 horas. Se volcó sobre agua, se refrigeró y el sólido formado se filtró (167 mg).

El producto se recristalizó de metanol, $\text{pf } 132-134^\circ$;

I.R.: 3400, 1720, 1625, 1150, 800 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,61 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, 3H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$); 2,18 (d, 3H, J 1,5Hz, Me-21); 3,50 (b.a., 1H, H-3); 4,18 (c, 2H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$); 5,40 (m, 1H, H-6); 5,72 (m, 1H, H-22).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-nor-5 α -colánico (XCIA).

El éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E) 20(22)-diénico (LXXXIIIa) (100 mg) se disolvió en ácido acético glacial (10 ml), se agregó dióxido de platino (10 mg) y se hidrogenó durante 6 horas a presión atmosférica y temperatura ambiente. Se filtró el catalizador y el filtrado se llevó a sequedad.

El producto se recristalizó de etanol 95%, pf 102-109°.

I.R.: 1730, 1720, 1240, 1150, 1035 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,68 (s, 3H, Me-18); 0,82 (s, 3H, Me-19); 0,92 (d, J 6 Hz, Me-21 del 20S); 0,98 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,25 (t, 3H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$); 2,01 (s, 3H, CH_3CO_2-); 4,13 (c, 2H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$); 4,67 (b.a., 1H, H-3);

E.M.: m/e 432 (M^+), 372 (M-60, 100%); (página 109).

Ester etílico del ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 α -colánico (XCIB).

El éster etílico del ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,(E) 20(22)-diénico (XC) (106 mg) se disolvió en ácido acético gla-

cial (11 ml), y se le agregó dióxido de platino (11 mg); la mezcla se hidrogenó a temperatura ambiente y a 3 atmósferas de presión, durante 24 horas. Se filtró el catalizador y el filtrado se llevó a sequedad.

El producto se recristalizó de metanol, pf 108-112° y resultó homogéneo al ser analizado por c.g.l..

I.R.: 3300, 1725, 1250, 1150, 1040, 800 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,69 (s, 3H, Me-18); 0,80 (s, 3H, Me-19); 0,92 (d, J 6 Hz, Me-21 del 20S); 0,98 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,25 (t, 3 H, J 7Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$); 3,58 (b.a., 1H, H-3); 4,14 (o, 2H, J 7 Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$);

E.M.: m/e 390 (M^+), 215 ($\text{M} - (\text{H}_2\text{O} + \text{cadena lateral} + 42)$), 100%; (página 110).

Acido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (XCIII).

A una solución del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico (LXXXIIIa) (1 g) en etanol 95% (28 ml), se le agregó una solución de hidróxido de sodio (2 g) en agua (2 ml) y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (4 ml) y la suspensión resultante se volcó sobre agua, se refrigeró y se filtró el precipitado formado (828 mg).

El producto obtenido, se recristalizó de etanol 95%, pf

262-265° (lit⁽¹⁵⁹⁾ pf 262-265°).

U.V.: λ_{max} 221 nm (ϵ 7200);

I.R.: 3300, 3200-2300, 1670, 1620, 1050 cm^{-1} ;

R.M.P. (piridina-d₅): 0,62 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19);
2,42 (d, 3H, J 1Hz, Me-21); 3,83 (b.a., 1H, H-3); 5,40 (m, 1H,
H-6); 6,15 (m, 1H, H-22).

3 β .23-dihidroxi-24-norcola-5.(E)20(22)-dieno (XCII).

El éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,(E) 20(22)-diónico (LXXXIIIa) (8,56 g) se disolvió en éter anhidro (200 ml), se enfrió a 0° y se le agregó hidruro de aluminio y litio (8 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas y el exceso de hidruro de aluminio y litio se destruyó por agregado de éter húmedo y luego hielo.

La mezcla resultante se volcó sobre agua, se acidificó con ácido sulfúrico diluido y se extrajo con éter; la fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó el solvente, obteniéndose un producto blanco cristalino (6,3 g).

El producto se recristalizó de acetato de etilo, pf 193-194° (lit⁽¹⁶⁰⁾ pf 197-198°).

I.R.: 3200, 1650, 1040, 800 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,58 (s, 3H, Me-18); 1,02 (s, 3H, Me-19); 1,50 (s, 1H,

OH desaparece con D₂O); 1,70 (d, 3H, J 1Hz, Me-21); 3,55 (b.a., 2H, H-3 y OH); 4,23 (d, 2H, J 6,5Hz, H-23); 5,40 (m, 1H, H-6); 5,53 (m, 1H, H-22);

E.M.: m/e 344 (M⁺, 100%); (página 112).



3β-acetoxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dien-23-al (XCIXc).

3β,23-dihidroxí-24-norcola-5,(E)20(22)-diene (XCII) (4,5 g) se disolvió en una mezola de benceno y cloroformo 4:1 (700 ml) y se le agregó dióxido de manganeso activado (según Attenburrow⁽¹³²⁾) (45 g). La suspensión se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad, se filtró el dióxido de manganeso y el filtrado se llevó a sequedad obteniéndose el 3β-hidroxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dien-23-al (XCIXa) (3,7 g);

I.R.: 3300, 1650, 1610, 1040, 800 cm⁻¹.

El producto anterior se trató con anhídrido acético y piridina 1:1 (40 ml) y se dejó en reposo durante 18 horas a temperatura ambiente. La solución resultante se volcó sobre agua, se extrajo con diclorometano y la fase orgánica se lavó con agua, con ácido clorhídrico diluido, con agua, con solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua; se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó el solvente.

El residuo (4,02 g) recristalizado de acetona tenía pf

140-142° (lit^(118,160) pf 140-142°).

U.V.: λ_{\max} 250 nm (ϵ 18600);

I.R.: 1730, 1670, 1610, 1250, 1040 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,63 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 2,03 (s, 3H,

CH₃CO₂-); 2,22 (d, 3H, J 1Hz, Me-21); 4,58 (b.a., 1H, H-3);

5,42 (m, 1H, H-6); 5,97 (d, 1H, J 8Hz, H-22); 10,10 (d, 1H, J 8 Hz, H-23);

E.M.: m/e 384 (M⁺), 324 (M-60, 100%); (página 114).

3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-al (C).

3 β -acetoxi-24-norcola-5,(E)20(22)-dien-23-al (XCIXc) (3,1 g) se disolvió en etanol 95% (300 ml), se agregó paladio sobre carbón 10% (310 mg) y la mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente, durante 3 horas. Se filtró el catalizador, y el filtrado se llevó a sequedad (3,09 g).

El producto se recristalizó de isopropanol, pf 123-125° (lit⁽¹³³⁾ pf 125-130°); $[\alpha]_D^{25}$ -55,6° (c 0,63 CHCl₃).

I.R.: 2720, 1735, 1725, 1630, 1250, 1040, 800 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,75 (s, 3H, Me-18); 0,92 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R);

1,03 (s, 3H, Me-19); 2,03 (s, 3H, CH₃CO₂-); 4,58 (b.a., 1H, H-3); 5,42 (m, 1H, H-6); 9,77 (dd, 1H, J 1,5Hz, H-23);

E.M.: m/e 386 (M⁺), 326 (M-60, 100%); (página 115).

3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-ol (CI).

Método A. A una suspensión de triterbutoxihidruro de aluminio y litio (1,52 g) en tetrahidrofurano anhidro (24 ml), enfriada a -78°, se agregó lentamente una solución de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-ol (C) (478 mg) en tetrahidrofurano anhidro (1,9 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas 30 minutos, a la misma temperatura, bajo atmósfera estática de nitrógeno, y luego se dejó en reposo a 2° durante 18 horas. Se volcó sobre una solución de ácido acético (2,6 ml) en agua (72 ml) y se extrajo con benceno. La fase orgánica se lavó con agua, con solución saturada de bicarbonato de sodio y nuevamente con agua; se secó sobre sulfato de magnesio. El residuo obtenido por evaporación del solvente (410 mg) fue cromatografiado en una columna de silicagel (10 g); por elución con benceno se obtuvieron 140 mg del producto CI.

El producto se recristalizó de metanol, mp 145-146° (lit⁽¹⁶¹⁾ mp 154-156°); $[\alpha]_D^{25}$ -56,3° (c 1,00 CHCl₃).

I.R.: 3350, 1730, 1250, 1040, 800 cm⁻¹;

R.M.P.: 0,72 (s, 3H, Me-18); 0,88 (d, J 6Hz, Me-21 del 20S); 0,97 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,57 (s, 1H, OH desaparece con D₂O); 2,03 (s, 3H, CH₃CO₂⁻); 3,70 (m, 2H, H-23); 4,63 (b.a., 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6);

E.M.: m/e 388 (M⁺), 328 (M-60, 100%); (página 116);

-17-

Microanálisis: Calculado para $C_{25}H_{40}O_3$, C: 77,27; H: 10,38. Obtenido, C: 77,00; H: 10,40.

Método B. A una solución de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-al (C) (100 mg) en metanol (6 ml), se agregó borohidruro de sodio (20 mg), y se agitó durante 5 horas a 0°. Se volcó sobre agua, se acidificó con ácido clorhídrico diluido y se extrajo con éter. La fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio, y con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. El residuo obtenido por evaporación del solvente se cromatografió en una columna de silicagel (4 g); por elución con benceno se obtuvieron 62 mg del producto CI, que recristalizado de metanol resultó idéntico al obtenido por el método A.

Método C. A una solución de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-al (C) (2,2 g) en etanol 95% (150 ml) se le agregó borohidruro de sodio (300 mg) y se agitó a temperatura ambiente durante 50 minutos; se agregó una solución de ácido clorhídrico concentrado en etanol 95% 1:2 hasta que cesó el desprendimiento de hidrógeno y se obtuvo reacción ácida; se diluyó con agua (700 ml) y se extrajo con éter. La fase orgánica se lavó con agua, con solución saturada de bicarbonato de sodio y nuevamente con agua, se secó sobre sulfato de magnesio. El residuo obtenido por evaporación del solvente, se cromatografió en una columna seca de silicagel (100 g), eluyendo inicialmente con benceno

y luego aumentando la polaridad gradualmente hasta diclorometano-metanol 98:2 obteniéndose 2,06 g del producto CI, homogéneo en c.c.d. (silicagel, sistema 3) e idéntico al obtenido por los métodos anteriores.

Cloruro de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXI).

Una solución de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-ol (CI) (600 mg) y trifenilfosfina anhidra (468 mg) en tetracloruro de carbono seco y recientemente destilado (3,3 ml) se calentó a reflujo durante 22 horas. Se agregó éter de petróleo (3,3 ml), se filtró el precipitado formado y el filtrado se llevó a sequedad. El residuo se cromatografió en una columna seca de silicagel (45 g) eluyendo con mezclas de éter de petróleo-benceno (1:1 a 1:9); se obtuvieron 450 mg de producto blanco cristalino homogéneo en c.c.d. (silicagel, sistema 1), que recristalizado de metanol tenía pf 128-130°; $|\alpha|_D^{25} -51,1$ (c 1,00 CHCl₃).

I.R.: 1725, 1250, 1040, 720 cm⁻¹;

R.M.P.: 0,72 (s, 3H, Me-18); 0,93 (d, J 6Hz, Me-21 del 20S); 0,98 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,03 (s, 3H, Me-19); 2,03 (s, 3H, CH₃CO₂-); 3,55 (m, 2H, H-23); 4,58 (b.a., 1H, H-3); 5,42 (m, 1H, H-6);

E.M.: m/e 346-348 (3:1) (M-60, 100%); (página 117);

Microanálisis: Calculado para C₂₅H₃₉O₂Cl, C: 73,77; H: 9,66;

Cl: 8,71. Obtenido, C: 73,79; H: 9,90; Cl: 9,00.

3 β -acetoxi-col-5-enonitrilo (CII).

Se mezcló cianuro de potasio anhidro (110 mg) y cloruro de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXII) (204 mg) y se agregó dimetilsulfóxido anhidro y recientemente destilado (3,75 ml). La mezcla se agitó durante 5 horas mientras se mantenía a 100°; se enfrió y se volcó sobre agua extrayéndose con éter. La fase orgánica se lavó con solución acuosa de cloruro de sodio hasta neutralidad y se secó sobre sulfato de magnesio. El residuo obtenido por evaporación del solvente se cromatografió en una placa preparativa de silicagel utilizando el sistema de desarrollo 1.

Por elución de la banda apropiada, se obtuvieron 180 mg del producto CII, que recristalizado de metanol tenía pf 141-142°; $[\alpha]_D^{25}$ -49,4 (c 1,01 CHCl₃).

I.R.: 2240, 1720, 1250, 1040, 800 cm⁻¹;

R.M.P.: 0,72 (s, 3H, Me-18); 0,87 (d, J 6Hz, Me-21 del 20S); 0,97 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,03 (s, 3H, Me-19); 2,03 (s, 3H, CH₃CO₂-); 2,30 (m, 2H, H-23); 4,58 (b.a., 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6);

E.M.: m/e 397 (M⁺), 337 (M-60, 100%); (página 118);

Microanálisis: Calculado para C₂₆H₃₉O₂N, C: 78,54; H: 9,89;

N: 3,52. Obtenido, C: 78,52; H: 9,79; N: 3,70.

Acido 3 β -hidroxi-col-5- δ nico (Ia).

Una solución de 3 β -acetoxi-col-5-enonitrilo (CII) (183 mg) e hidróxido de sodio (610 mg) en etanol 90% (4,5 ml) se calentó a reflujo durante 44 horas. La solución marrón oscura resultante se volcó sobre agua, se lavó dos veces con éter para eliminar productos neutros y se acidificó con ácido clorhídrico diluido. El sólido formado se extrajo con éter, y la fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se decoloró con carbón activado y se secó sobre sulfato de sodio. Por evaporación del solvente se obtuvieron 150 mg de producto, que en c.c.d. (silicagel, desarrollando dos veces con el sistema 6) mostraba dos manchas en relación aproximada 1:1, de las cuales la de menor R_f era idéntica a la del ácido 3 β -hidroxi-col-5- δ nico comercial (epímero 2OR). El producto recristalizado de acetato de etilo tenía pf 189-193°; $[\alpha]_D^{25}$ -34,5° (c 0,93 piridina), y continuaba mostrando dos manchas en c.c.d. en relación aproximada 1:1 (el ácido 3 β -hidroxi-col-5- δ nico comercial (epímero 2OR) tenía pf 230-232°; $[\alpha]_D^{25}$ -35,6° (c 0,96 piridina)).

I.R.: 3300, 3200-2400, 1710, 1680, 1250, 1170, 1060, 1040, 960, 810 cm⁻¹;

R.M.P. (piridina-d₅): 0,66 (s, Me-18 del 2OR); 0,71 (s, Me-18

del 20S); 0,89 (d, J 6Hz, Me-21 del 20S); 1,05 (s, 3H, Me-19);
1,06 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 3,83 (b.a., 1H, H-3); 5,43 (m,
1H, H-6).

Por cromatografía en placa preparativa de silicagel de-
sarrollando dos veces con el sistema 6, se aisló el producto de
mayor Rf, que se recrystalizó de ácido acético glacial, pf 211-
212°, homogéneo en c.c.d. (silicagel, desarrollando dos veces
con el sistema 6).

I.R.: 3300, 3200-2500, 1710, 1250, 1060, 815 cm^{-1} .

Anhidrido mixto del ácido 3 β -acetoxi-col-5-énico y ácido acéti-
co (CIII).

Se disolvió ácido 3 β -hidroxi-col-5-énico (mezcla 20R-
20S) (Ia) (100 mg) en piridina seca (2,5 ml), se agregó anhi-
drido acético (2,5 ml) y se dejó en reposo durante 20 horas a
temperatura ambiente. Se volcó sobre ácido clorhídrico-agua
1:10 (66 ml) y se extrajo tres veces con diclorometano. La fase
orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó sobre sul-
fato de magnesio y se evaporó el solvente.

El producto se descompone parcialmente al analizarlo
mediante c.c.d. y al recrystalizarlo; el producto crudo tenía
pf 117-123°.

I.R.: 1810, 1750, 1725, 1250, 1045, 810 cm^{-1} ;

R.M.P.: 0,70 (s, 3H, Me-18); 0,87 (d, J 6Hz, Me-21 del 20S);
 0,97 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,02 (s, 3H, Me-19); 2,03 (s, 3
 H, CH₃CO₂-); 2,22 (s, 3H, CH₃CO₂-COCH₂-); 2,40 (m, 2H,
CH₃CO₂-COCH₂-); 4,67 (b.a., 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6);
E.M.: m/e 356 (M - (CH₃CO₂H + CH₂=CO), 100%); (página 119).



Acido 3β-acetoxi-col-5-énico (Ib).

A una solución del anhídrido mixto del ácido 3β-acetoxi
 -col-5-énico y ácido acético (CIII) (80 mg) en piridina (8 ml),
 se le agregó agua (2 ml) y se agitó durante 30 minutos calen-
 tando a 70°. Se diluyó con agua hasta turbidez, se volcó sobre
 ácido clorhídrico-agua 1:10 (140 ml) y se extrajo dos veces con
 diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua hasta neutra-
 lidad, se secó sobre sulfato de magnesio y el solvente se eva-
 poró. El producto se reoristalizó dos veces de acetona, pf 155-
 165° (lit⁽¹⁾ epímero 20R pf 186-187°); resultó homogéneo al ser
 analizado mediante o.c.d. en silicagel en los sistemas de desa-
 rrollo 3, 6 y 7.

I.R.: 3500-2500, 1725, 1705, 1280, 1250, 1040, 810 cm⁻¹;
R.M.P.: 0,69 (s, 3H, Me-18); 0,83 (d, J 6Hz, Me-21 del 20S);
 0,94 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,02 (s, 3H, Me-19); 2,03 (s, 3
 H, CH₃CO₂-); 4,62 (b.a., 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6);
E.M.: m/e 356 (M-60, 100%); (página 120).

Estor metílico del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (Ic).

Acido 3β-hidroxi-col-5-énico (mezcla 20R-20S) (Ia) (45 mg) parcialmente disuelto en una mezcla de éter y metanol 2:1 (3 ml) fue tratado gota a gota con una solución etérea de diazometano hasta color amarillo persistente de la mezcla de reacción. Finalizado el agregado la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se destruyó el exceso de diazometano con ácido acético glacial y la solución se llevó a sequedad. El residuo obtenido se recristalizó de metanol, pf 151-154° (lit⁽²⁾ epímero 20R pf 144°).

I.R.: 3400, 1715, 1210, 1180, 1065, 840 cm⁻¹;

R.M.P.: 0,70 (s, 3H, Me-18); 0,85 (d, J 6Hz, Me-21 del 20S); 0,94 (d, J 6Hz, Me-21 del 20R); 1,01 (s, 3H, Me-19); 1,20 (s, 1 H, OH desaparece con D₂O); 3,68 (s, 3H, -CO₂CH₃); 3,58 (b.a., 1 H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6);

E.M.: m/e 388 (M⁺, 100%); (página 121).



Acido 3β-hidroxi-5α-colánico (LXXIVb).

El ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (mezcla 20R-20S) (Ia) (80 mg) se disolvió en ácido acético glacial (15 ml), se le agregó dióxido de platino (8 mg) y la mezcla se hidrogenó a temperatura ambiente y presión atmosférica durante 24 horas. Se

filtró el catalizador y el filtrado se llevó a sequedad.

Por recristalización fraccionada del residuo obtenido, de acetato de etilo, se obtuvo el ácido 3β-hidroxi-5α-colánico (epímero 20S) (LXXIVb-20S), pf 239-241°; $|\alpha|_D^{25} +11,4^\circ$ (c 0,20 etanol 95%).

I.R.: 3270, 3200-2400, 1715, 1225, 1035 cm^{-1} ;

R.M.P. (piridina-d₅): 0,68 (s, 3H, Me-18); 0,81 (s, 3H, Me-19); 0,87 (d, 3H, J 6Hz, Me-21); 3,83 (b.a., 1H, H-3).

De las aguas madres de la recristalización se obtuvo el ácido 3β-hidroxi-5α-colánico (epímero 20R) (LXXIVb-20R), pf 208-213°; $|\alpha|_D^{25} +23,5^\circ$ (c 0,20 etanol 95%); el ácido 3β-hidroxi-5α-colánico (epímero 20R) obtenido por hidrogenación del ácido 3β-hidroxi-col-5-énico (epímero 20R) comercial en iguales condiciones que las indicadas, tenía luego de recristalizarlo de acetato de etilo pf 218-220°; $|\alpha|_D^{25} +24,4^\circ$ (c 0,23 etanol 95%) (lit⁽¹⁶²⁾ pf 220°; $|\alpha|_D^{25} +23^\circ$ (c 0,28 etanol 95%)).

I.R.: 3250, 3200-2400, 1680, 1270, 1185, 1075, 1030 cm^{-1} ;

R.M.P. (piridina-d₅): 0,63 (s, 3H, Me-18); 0,81 (s, 3H, Me-19); 1,05 (d, 3H, J 6Hz, Me-21); 3,83 (b.a., 1H, H-3).

3β-acetoxi-col-5-enonitrilo-24-¹⁴C (CII-¹⁴C).

Se diluyó cianuro de potasio anhidro marcado con carbono-14 (1,44 mg, .45 mC/mM) con material inactivo (12,9 mg), se

mezcló con cloruro de 3 β -acetoxi-24-norcol-5-enilo (LXXXI) y se agregó dimetilsulfóxido anhidro y recientemente destilado (1 ml). La mezcla se agitó durante 5 horas mientras se mantenía a 100°; se enfrió y se volcó sobre agua extrayéndose dos veces con éter. La fase acuosa se saturó con cloruro de sodio y se extrajo nuevamente con éter. Las fases orgánicas se juntaron, se lavó tres veces con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. El residuo obtenido por evaporación del solvente se cromatografió en placa preparativa de silicagel utilizando el sistema de desarrollo 1. Por elución de la banda apropiada, se obtuvieron 78 mg del producto CII-¹⁴C que tenía una actividad específica de 6,88x10⁸ dpm/mM.

Acido 3 β -hidroxi-col-5-énico-24-¹⁴C (Ia-¹⁴C).

Una solución de 3 β -acetoxi-col-5-enonitrilo-24-¹⁴C (CII-¹⁴C) (76 mg) e hidróxido de sodio (310 mg) en etanol 90% (2,2 ml) se calentó a reflujo durante 46 horas. La solución resultante se volcó sobre agua (150 ml), se lavó dos veces con éter y se acidificó con ácido clorhídrico diluido. El sólido formado se extrajo dos veces con éter, la fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se decoloró con carbón activado y se secó sobre sulfato de sodio. Por evaporación del solvente se obtuvieron 69 mg de producto que en c.c.d. (silicagel, desarro-

lloando dos veces con el sistema 6) resultó idéntico al ácido
3β-hidroxi-col-5-énico (mezcla 20R-20S) (Ia). El producto se
recristalizó de acetato de etilo hasta actividad específica
constante de $7,3 \times 10^8$ dpm/mM; pf 182-185°.

155

Inoculación de sapos Bufo paracnemis con el trazador radiactivo y extracción de los venenos.

A seis ejemplares Bufo paracnemis (oriundos de la Provincia de Tucumán) les fue extraído el veneno de las glándulas parótidas y tibiales por simple presión de éstas⁽¹⁶⁵⁾, y al día siguiente fueron inoculados con ácido 3β-hidroxi-col-5-énico-24-¹⁴C (Ia-¹⁴C) (24 mg, $7,3 \times 10^8$ dpm/mM) (4 mg por animal) emulsionado en agua destilada (5,5 ml) que contenía Tween 80 (0,5 ml).

Las inyecciones se realizaron en la región dorsal donde se supuso se hallaba el corazón linfático del animal⁽¹⁰⁵⁾. Los animales se mantuvieron en un recipiente común con circulación de agua y fueron alimentados periódicamente con carne vacuna cruda. En el transcurso del experimento murieron por razones desconocidas tres ejemplares.

Al cabo de 30 días se separó un animal y se le extrajo el veneno de sus glándulas parótidas y tibiales por el procedimiento indicado. La operación se repitió con el mismo animal 48 días mas tarde (78 días desde la inyección del trazador radiactivo), luego de lo cual fue sacrificado, extrayéndosele el hígado con la vesícula biliar.

A los otros dos ejemplares se les extrajo el veneno a los 80 y 118 días respectivamente.

Aislamiento de colesterol (IIa) del hígado y vesícula biliar.

El hígado junto con la vesícula biliar del sapo sacrificado a los 78 días, fue disgregado con metanol (200 ml), se le agregó hidróxido de potasio (3 g) y se calentó a reflujo durante 40 minutos; se filtró y la solución obtenida se extrajo tres veces con éter de petróleo (pe 60-80°). La fase orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. El residuo obtenido por eliminación del solvente, se cromatografió en columna de alúmina eluyendo con benceno. El producto obtenido (230 mg, actividad específica 3 dpm/mg; incorporación específica 0,0002%) era homogéneo en c.c.d. (alúmina, desarrollando con el sistema 3) e idéntico a una muestra auténtica de colesterol.

Fraccionamiento del veneno. Aislamiento de los bufadienólidos.

(Procedimiento general).

El veneno seco se molió con arena y se extrajo en un Soxhlet con una mezcla de cloroformo y metanol 95:5 durante 12 horas. El residuo obtenido por evaporación del solvente, se purificó por sucesivas cromatografías en placa preparativa (alúmina, desarrollando con el sistema 3), aislándose los bufadienólidos bufalina (LXXV), marinobufagina (LXX) y telocinobufagina (LXXVI) por elución de las bandas apropiadas.

La marinobufagina obtenida fue tratada con exceso de

anhidrido acético y piridina 1:1, a temperatura ambiente durante 18 horas; se volcó sobre ácido clorhídrico diluido y se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad y se secó sobre sulfato de magnesio. El residuo obtenido por eliminación del solvente, fue recristalizado de etanol absoluto y resultó idéntico a una muestra auténtica de acetilmarrinobufagina (CIV) al ser comparado por c.c.d. (alúmina, desarrollando con el sistema 3).

Los otros bufadienólidos aislados (bufalina (LXXV) y telocinobufagina (LXXVI)) no pudieron ser purificados debido a la pequeña cantidad obtenida, pero eran homogéneos por c.c.d. (alúmina, desarrollando con el sistema 3) y resultaron idénticos a las muestras auténticas.

=====

Resumen.

El presente trabajo tuvo por objeto la síntesis del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico-24- ^{14}C , y la aplicación del mismo al estudio de la biosíntesis de los bufadienólidos en sapos.

En el mismo se describen:

- a. Los métodos de síntesis previamente utilizados para la obtención del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico y los métodos generales para marcación de ácidos biliares en el carbono 24.
- b. Los estudios realizados en el campo de la biosíntesis de los cardenólidos, y de los bufadienólidos de origen vegetal y animal, con los respectivos esquemas biosintéticos posibles.
- c. Las reacciones realizadas en esta tesis para la síntesis del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico a partir de acetato de pregnenolona. El procedimiento elegido permitiría marcar los átomos de carbono 22, 23 y 24 de la cadena lateral del ácido, ya que se realizó mediante la homologación en dos átomos de carbono a partir del carbono 20 (carbono carbonílico) del acetato de pregnenolona, utilizando la reacción de Reformatsky entre el intermediario tipo pregnano y bromoacetato de etilo. La elección de acetato marcado en carbono 1 ó carbono 2 permitiría marcar selectivamente el carbono 23 ó el carbono 22 respectivamente. El producto homologado (el éster de un ácido tipo norcolánico) fue deshidratado obteniéndose una mez-

255-

cla de ésteres insaturados, cuya composición se determinó por métodos espectroscópicos. De dicha mezcla se aisló el éster etílico del ácido 3β -acetoxi-23-norcola-5,(E)20(22)-diénico, el cual fue reducido al dihidroxi-intermediario; la oxidación y posterior hidrogenación selectivas del mismo condujeron al 3β -acetoxi-24-norcol-5-en-23-al que fue reducido al 23-hidroxi-compuesto correspondiente. Sobre este producto se aplicó la secuencia halogenación, cianuración e hidrólisis, obteniéndose el ácido 3β -hidroxi-col-5-énico. La cianuración con cianuro de potasio marcado con carbono-14 dió lugar luego de la hidrólisis a dicho ácido con la marcación radiactiva en la posición 24 (carbono carboxílico).

- d. Las propiedades espectroscópicas (espectros de resonancia magnética protónica y masa) de los compuestos sintetizados y su interpretación, que permitieron confirmar las estructuras de los mismos, dándose un énfasis especial a la utilización de los espectros de resonancia magnética protónica para determinar la configuración del carbono 20 de aquellas sustancias obtenidas como mezclas de los epímeros 20R y 20S.
- e. Los resultados obtenidos en la inoculación del ácido 3β -hidroxi-col-5-énico-24- ^{14}C a sapos Bufo paracnemis. Habiéndose determinado que dicho ácido es un precursor poco eficiente de los bufadienólidos en sapos, se postula un posible esque-

ma biosintético de los mismos, a través de derivados del ácido colánico donde la saturación del doble enlace en posición 5(6) ocurriría con anterioridad a la ruptura oxidativa de la cadena lateral, ya sea por adición de agua para dar un 5 β -hidroxi-derivado o por reducción al 5 β -H-compuesto a través de un 3-ceto-4-en-intermediario.

=====



Bibliografía.

1. L. Ruzicka y A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 18, 986 (1935)
2. E. S. Wallis y E. Fernholz, *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 1504
(1935)
3. A. Butenandt y H. Dannembaum, *Z. Physiol. Chem.*, 229, 192
(1934)
4. M. V. Mukhina, *Khim. Farm. Zh.*, 5, 53 (1971); *Chem. Abstr.*,
76, 14798 (1972)
5. J. E. Van Lier y L. L. Smith, *J. Chromatog.*, 41, 37 (1969)
6. I. Makino, J. Sjovall, A. Norman y B. Strandvik, *F.E.B.S.
Lett.*, 15, 161 (1971)
7. G. M. Murphy, F. H. Jansen y B. H. Billing, *Biochem. J.*,
129, 491 (1972)
8. L. F. Fieser y M. Fieser, "Steroids", Reinhold Publishing
Corp., New York, p. 362, 545 y 647 (1959)
9. J. A. Campbell, D. M. Squires y J. C. Babcock, *Steroids*, 13,
567 (1969)
10. A. Metayer, A. Quesnau-Thierry y M. Barbier, *Tetrah. Let-
ters*, 595 (1974)
11. J. Kučera, E. Jiráť y V. Schwarz, *Českoslov. farm.*, 5, 331
(1956)
12. J. Kučera y F. Šorm, *Chem. listy*, 51, 1354 (1957); *Chem.
Abstr.*, 51, 17963e (1957)

13. J. Kučera y F. Šorm, Coll. Czechoslov. Chem. Commun., 23, 116 (1958)
14. H. Illy Ruiz, Anales inst. farmacol. españ., 4, 289 (1955); Chem. Abstr., 52, 2877g (1958)
15. I. Kiprianov y A. M. Veitsman, Ukrain. Chim. Zh., 22, 612 (1956); Chem. Abstr., 51, 5783d (1957)
16. K. Yamasaki y I. Ushizawa, Proc. Japan Acad., 28, 546 y 550 (1952)
17. K. Shimizu, J. Biochem. Japan, 40, 75 (1953)
18. A. Corbellini, G. Nathanson, V. Gurdjian y O. Cerri, Ricerca sci., 24, 2290 (1954)
19. L. Vargha y M. Rados, Chem. and Ind., 896 (1955)
20. P. Ziegler y K. R. Bharucha, Chem. and Ind., 1351 (1955)
21. L. Vargha, M. Rados y M. Kraut, Chim. Acad. Sci. Hung., 8, 303 (1955); Chem. Abstr., 51, 16505b (1957)
22. A. Corbellini, G. Nathanson y V. Gurdjian, Gazz. chim. ital., 86, 35 (1956)
23. K. R. Bharucha, G. C. Buckley, C. K. Cross, L. J. Rubin y P. Ziegler, Can. J. Chem., 34, 982 (1956)
24. P. Ziegler y S. V. Hochner, Patente, Chem. Abstr., 51, 10594i (1957)
25. A. Corbellini, G. Nathanson, V. Gurdjian y O. Cerri, Rend. Inst. lombardo sci. Pt. I, 91, 147 (1957)

26. A. Corbellini y G. Nathanson, Gazz. chim. ital., 86, 1240 (1956)
27. P. Ziegler, Can. J. Chem., 37, 1004 (1959)
28. I. Ushizawa, I. Yamane y K. Yamasaki, Proc. Japan Acad., 33, 159 (1957)
29. I. Ushizawa, Yonago Igaku Zasshi, 11, 14 (1960); Chem. Abstr., 55, 6534g (1961)
30. F. Hodosan, N. Serban, A. Balogh y I. Jude, Z. Chem., 1, 29 (1961); Chem. Abstr., 55, 26024b (1961)
31. F. Hodosan, N. Serban, A. Balogh y I. Jude, Bull. Soc. Chim. France, 713 (1962)
32. G. Lehmann, W. Ehrlichmann y G. Hilgetag, J. Prakt. Chem., 315, 909 (1973); Chem. Abstr., 80, 48236 (1974)
33. R. Hayatsu, Pharm. Bull., 5, 452 (1957)
34. S. Bergström y K. Pääbo, Acta Chem. Scand., 9, 699 (1955)
35. S. Bergström, M. Rottenberg y J. Voltz, Acta Chem. Scand., 7, 481 (1953)
36. D. L. Hachey, P. A. Szczepanik, O. W. Berngruber y P. D. Klein, J. Labelled Compds., 9, 703 (1973)
37. J. K. Kochi, J. Org. Chem., 30, 3265 (1965)
38. R. A. Smiley y C. Arnold, J. Org. Chem., 25, 257 (1960)
39. L. Friedman y H. Shechter, J. Org. Chem., 25, 877 (1960)
40. G. Burton y E. G. Gros, J. Steroid Biochem., en prensa

41. G. Burton y E. G. Gros, J. Labelled Compds., en prensa
42. A. Stoll, Chem. and Ind., 1558 (1959)
43. K. K. Chen y A. L. Chen, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 49,
543 (1933)
44. Y. Kobayashi, Folia Pharmacol. Japon, 39, 134 (1943); Chem.
Abstr., 41, 5217e (1947)
45. N. Höriger, H. H. A. Linde y K. Meyer, Helv. Chim. Acta,
53, 1503 (1970)
46. N. Höriger, D. Zivanov, H. H. A. Linde y K. Meyer, Helv.
Chim. Acta, 53, 1993 y 2051 (1970)
47. E. Ramstadt y J. L. Beal, Chem. and Ind., 177 (1960)
48. E. Ramstadt y J. L. Beal, J. Pharm. Pharmacol., 12, 552
(1960)
49. H. Gregory y E. Leete, Chem. and Ind., 1242 (1960)
50. E. Leete, H. Gregory y E. G. Gros, J. Am. Chem. Soc., 87,
3475 (1965)
51. E. G. Gros y E. Leete, J. Am. Chem. Soc., 87, 3479 (1965)
52. J. v. Euw y T. Reichstein, Helv. Chim. Acta, 47, 711 (1964)
53. R. Tschesche y G. Lilienweiss, Z. Naturforschg., 19b, 265
(1964)
54. R. Tschesche y B. Brassat, Z. Naturforschg., 21b, 894 (1966)
55. E. Caspi, D. O. Lewis, D. M. Piatak, K. V. Thimann y A.
Winter, Experientia, 22, 506 (1966)

56. H. H. Sauer, R. D. Bennett y E. Heftmann, *Naturwissenschaften*, 54, 226 (1967)
57. H. H. Sauer, R. D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 6, 1521 (1967)
58. R. D. Bennett, H. H. Sauer y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 7, 41 (1968)
59. E. Caspi y D. O. Lewis, *Science*, 156, 519 (1967)
60. E. Caspi y G. M. Hornby, *Phytochemistry*, 7, 423 (1968)
61. R. Tschesche, R. Hombach, H. Scholten y M. Peters, *Phytochemistry*, 9, 1505 (1970)
62. H. H. Sauer, R. D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 7, 1543 (1968)
63. H. H. Sauer, R. D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 8, 69 (1969)
64. H. H. Sauer, R. D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 8, 839 (1969)
65. H. Lichti, Ch. Tamm y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 39, 1933 (1956)
66. J. H. Russell, O. Schindler y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 44, 1315 (1961)
67. R. Tschesche y G. Snatzke, *Ann.*, 636, 105 (1960)
68. M. Hayano, "Oxygenases" (Editor O. Hayaishi), Academic Press, New York, p. 182 (1962); citado en referencia 69

69. E. Caspi y D. O. Lewis, *Phytochemistry*, 7, 683 (1968)
70. K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Sasaki, M. L. Chang y H. Y. Hsu, *Chem. Commun.*, 915 (1966)
71. M. N. Galbraith y D. H. S. Horn, *Chem. Commun.*, 905 (1966)
72. K. Heusler, J. Kalvoda, G. Anner y A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 46, 352 (1963)
73. R. Tschesche, H. Hulpke y H. Scholten, *Z. Naturforschg.*, 22b, 677 (1967)
74. R. Tschesche, R. Becker y R. Hombach, *Z. Naturforschg.*, 23b, 1615 (1968)
75. L. Canonica, F. Ronchetti y G. Russo, *Chem. Commun.*, 1675 (1970)
76. L. Canonica, A. Fiecchi, M. Galli Kienle, A. Scala, G. Galli, E. Grossi Paoletti y R. Paoletti, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 3597 y 6532 (1968)
77. G. F. Gibbons, L. J. Goad y T. W. Goodwin, *Chem. Commun.*, 1458 (1968)
78. E. Caspi, P. J. Ramm y R. E. Gain, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4012 (1969)
79. D. H. Aberhart, J. G. Lloyd-Jones y E. Caspi, *Phytochemistry*, 12, 1065 (1973)
80. R. Tschesche y U. Kleff, *Phytochemistry*, 12, 2375 (1973)
81. P. Nánási, B. Lenkey y P. Tétényi, *Phytochemistry*, 14, 1755

(1975)

82. R. Tschesche, *Planta Medica*, Suppl.4, 34 (1971)
83. R. Tschesche, *Proc. R. Soc. London B.*, 180, 187 (1972)
84. J. Schmutz, *Helv. Chim. Acta*, 32, 1442 (1949)
85. A. Stoll y J. Renz, *Helv. Chim. Acta*, 33, 286 (1950)
86. A. Stoll, J. Renz y A. Brack, *Helv. Chim. Acta*, 34, 2301
(1951)
87. A. Stoll, J. Renz y A. Brack, *Helv. Chim. Acta*, 35, 1934
(1952)
88. K. K. Chen, *Ann. Rev. Physiol.*, 7, 677 (1945)
89. M. Okada, T. Suga y S. Matsumoto, *Asian Med. J.*, 5, 405
(1962)
90. H. Linde y K. Meyer, *Pharm. Acta Helv.*, 33, 327 (1958)
91. K. K. Chen y H. Jensen, *J. Am. Pharm. Ass.*, 18, 244 (1929)
92. V. Deulofeu y J. R. Mendive, *Ann.*, 534, 288 (1938)
93. H. Wieland, W. Konz y H. Mittasch, *Ann.*, 513, 1 (1934)
94. F. Märki, A. V. Robertson y B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.*,
83, 3341 (1961)
95. B. Robinson, G. F. Smith, A. H. Jackson, D. Shaw, B.
Frydman y V. Deulofeu, *Proc. Chem. Soc.*, 310 (1961)
96. H. Wieland y T. Wieland, *Ann.*, 528, 234 (1937)
97. K. Meyer, *Pharm. Acta Helv.*, 24, 222 (1949)
98. R. Zelnik, L. M. Ziti y C. V. Guimarães, *J. Chromatog.*, 15,

9 (1964)

99. H. Linde, N. Ergenc y K. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 49, 1246 (1966)
100. E. Iseli, M. Kotake, Ek. Weiss y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 48, 1093 (1965)
101. H. Wieland y R. Alles, *Ber.*, 55, 1789 (1922)
102. R. Tschesche y B. Brassatt, *Z. Naturforschg.*, 20b, 707 (1965)
103. R. Tschesche, H. Scholten y M. Peters, *Z. Naturforschg.*, 24b, 1492 (1969)
104. A. M. Porto y E. G. Gros, Comunicación previa presentada en las XII Sesiones Químicas Argentinas, Córdoba, abril 1967, comunicación 6-26; citado en 105
105. E. G. Gros y A. M. Porto, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 55, 177 (1967)
106. A. M. Porto y E. G. Gros, *Experientia*, 26, 11 (1970)
107. J. Doull, K. P. Dubois y E. M. K. Geiling, *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, 86, 454 (1951)
108. M. D. Siperstein, A. W. Murray y E. Titus, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67, 154 (1957)
109. G. Popják y J. W. Cornforth, *Advances in Enzymol.*, 22, 281 (1960)
110. C. Chen y M. V. Osuch, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 1797 (1969)

111. M. V. Osuch y C. Chen, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 1803 (1969)
112. A. M. Porto, F. E. Baralle y E. G. Gros, *J. Steroid Biochem.*, 3, 11 (1972)
113. G. A. D. Haslewood, *Biol. Rev.*, 39, 537 (1964)
114. E. Staple, "Biogenesis of Natural Compounds", (Editor P. Bernfeld), Pergamon Press, New York, p. 207 (1967)
115. I. Björkhem, *Acta Chem. Scand.*, 21, 2561 (1967)
116. A. M. Porto y E. G. Gros, *Experientia*, 27, 506 (1971)
117. E. Staple, "Methods in Enzymology", (Editor P. Bernfeld), Academic Press, New York, Vol. 15, p. 562 (1969)
118. A. O. Colonna y E. G. Gros, *J. Steroid Biochem.*, 4, 171 (1973)
119. K. E. Cooney y M. R. Uskokovik, *Helv. Chim. Acta*, 57, 771 (1974)
120. B. Koechlin y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 27, 549 (1944)
121. J. Faulkner, *Synthesis*, 175 (1971)
122. A. Maercker, "Organic Reactions", (Editores R. Adams, A. H. Blatt, V. Boekelheide, T. L. Cairns, A. C. Cope y C. Niemann), John Wiley & Sons Inc., New York, Vol. 14, p. 276 (1965)
123. W. S. Wadsworth Jr. y W. D. Emmons, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 1733 (1961)

124. A. K. Rose y R. T. Dahill Jr., J. Org. Chem., 30, 505
(1965)
125. R. Greenwald, M. Chaykovsky y E. J. Corey, J. Org. Chem.,
28, 1128 (1963)
126. G. Aksnes, Acta Chem. Scand., 15, 438 (1961)
127. R. T. Blickenstaff, J. Am. Chem. Soc., 82, 3673 (1960)
128. H. Alper y L. Dinkes, Synthesis, 81 (1972)
129. E. W. Collington y A. I. Meyers, J. Org. Chem., 36, 3044
(1971)
130. E. J. Corey, C. U. Kim y M. Takeda, Tetrah. Letters, 4339
(1972)
131. E. D. Hughes, Quart. Rev., 5, 245 (1951)
132. J. Attenburrow, A. F. B. Cameron, J. H. Chapman, R. M.
Evans, B. A. Hems, A. B. A. Jensen y T. Walker, J. Chem.
Soc., 1094 (1952)
133. S. K. Dasgupta, D. R. Crump y M. Gut, J. Org. Chem., 39,
1658 (1974)
134. H. O. House, H. Babad, R. B. Toothill y A. W. Noltes, J.
Org. Chem., 27, 4141 (1962)
135. H. C. Brown, J. Chem. Ed., 38, 173 (1961)
136. S. G. Levine y N. H. Eudy, J. Org. Chem., 35, 549 (1970)
137. I. M. Downie, J. B. Holmes y J. B. Lee, Chem. and Ind.,
900 (1966)

138. D. Klaasen, *Clin. Chim. Acta*, 35, 225 (1971)
139. J. N. Shoolery y M. T. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 512 (1958)
140. R. F. Zürcher, *Helv. Chim. Acta*, 46, 2054 (1963)
141. H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams, "Structural Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry", Holden-Day Inc., San Francisco, Vol. II, p. 98 (1964)
142. L. Tökes, G. Jones y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 5465 (1968)
143. S. G. Wyllie y C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 33, 305 (1968)
144. B. A. Knights, *J. Gas Chromatog.*, 5, 273 (1967)
145. S. H. M. Naqvi, *Steroids*, 22, 285 (1973)
146. H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day Inc., San Francisco, p. 184 (1967)
147. J. H. Bowie, D. H. Williams, P. Madsen, G. Schroll y S. O. Lawesson, *Tetrahedron*, 23, 305 (1967)
148. Referencia 146, p. 175 y 180
149. Referencia 146, p. 99
150. Referencia 146, p. 123
151. Referencia 146, p. 130
152. Referencia 146, p. 431
153. Referencia 146, p. 435

154. Referencia 146, p. 408
155. R. M. Silverstein, C. G. Bassler y T. C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", John Wiley & Sons Inc., New York, p. 30 (1974)
156. K. A. Mitropoulos y N. B. Myant, Biochim. Biophys. Acta, 144, 430 (1967) y las referencias citadas en el mismo
157. N. Wachtel, S. Emerson y N. B. Javitt, J. Biol. Chem., 243, 5207 (1968) y las referencias citadas en el mismo
158. R. B. Clayton, Quart. Rev., 168, 201 (1965)
159. L. Ruzicka, P. A. Plattner y J. Pataki, Helv. Chim. Acta, 25, 425 (1942)
160. I. Letourneux, M. Mee Lee Lo, N. Chaudhuri y M. Gut, J. Org. Chem., 40, 516 (1975)
161. W. Sucrow, Chem. Ber., 99, 2765 (1966)
162. A. Stoll y J. Renz, Helv. Chim. Acta, 24, 1380 (1941)
163. A. Roedig, "Methoden der Organischen Chemie" (Houben-Weyl), (Editor E. Müller), Stuttgart, Vol. 5/4, p. 18 (1960)
164. H. Burton y C. K. Ingold, J. Chem. Soc., 2022 (1929)
165. R. Bolliger y K. Meyer, Helv. Chim. Acta, 40, 1659 (1957)

=====