



S.B.-

MEMORIA DESCRIPTIVA

para una patente de Invención por veinte años en España, por: *Procedimiento para la preparación de cetonas no saturadas de la serie del ciclopentano-polihidro-fenantreno por procedimiento bioquímico*, a favor de la r.s. SCHERING A.G., residente en Berlin (ALEMANIA), Mollerstrasse, 170/172.

* ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Es sabido que por vía bioquímica y precisamente por reducción parcial mediante fermentos se puede preparar de la $\Delta^{4,5}$ -androstenediona-(3,17) la testosterona. Igualmente se realiza con fermento una reducción de la dehidroandrosterona en el $\Delta^{5,6}$ -androstenediol-3,17. (Mamoli y colaboradores, Berichte de la Sociedad Química Alemana, 70,470 (1937); rev. de Química Fisiológica 245,93 (1937)).

Ahora bien, se ha descubierto que empleando también otros métodos bioquímicos puede llegarse a la testosterona, cuando en efecto se aprovecha la acción oxidante de ciertos microorganismos. Con auxilio por ejemplo de bacterias del grupo de las acetobacterias, en especial con el bacterium (acetobacterium) pasteurianum se puede realizar una oxidación parcial del $\Delta^{5,6}$ -androstenediol-(3,17), de suerte que se



origine la testosterona. También se emplean bacterias como el micrococcus oblongus o las bacterias de la serbosa para oxidación bioquímica. Los hongos del moho, por ejemplo ciertos aspergilaceos, pueden emplearse ventajosamente para esta reacción. De igual modo que al androstenodiol puede oxidarse la dehidroandrosterona con auxilio de las mismas bacterias en la $\Delta^{4,5}$ -androstenodiona-(3,17) y el $\Delta^{5,6}$ -androstenodiol-(3,17)-monopropiato-17 en testosterona.

La testosterona se ha preparado ya por via sintética y precisamente del acetato de dehidroandrosterona pasando por el monoacetato de androstenodiol, el acetato-benzoato de androstenodiol, monobenzoato de androstenodiol, benzoato de testosterona. Como de este esquema se desprende, se necesita para esta preparación cinco fases de trabajo, lo que significa naturalmente un procedimiento mucho más complicado frente al actual que en dos fases proporciona la testosterona desde la dehidroandrosterona pasando por el androstenodiol.

Frente al método arriba indicado de la reducción parcial de la androstenodiona de Mamoli, que por via enzimática, llega también a la testosterona, el procedimiento actual presenta la ventaja técnica de que el material de partida para él necesario, por ejemplo el androstenodiol, se puede obtener con rendimiento cuantitativo (100%) de la dehidroandrosterona, mientras que el material de partida que hay que emplear en el método de reducción de Mamoli, la androstenodiona, puede obtenerse con menor rendimiento.

Describiremos más detenidamente el procedimiento valiendonos de los adjuntos ejemplos.

Ejemplo 1

Como disolución nutritiva para las bacterias se empleó caldo de cerveza sin lúpulo para cerveza almacenada. El contenido de malta del caldo se determinó y por dilución con agua se llegó a un contenido de 4% aproximadamente. La disolución nutritiva se calentó luego en el autoclave durante 20 minutos a 115° después de agregar carbonato cálcico y después de enfriar se filtro clara. La disolución nu



tritiva calentada nuevamente bajo presión se introdujo después en cápsulas Petri amplias estériles y se inoculó con el bacterium pasteurianum. Después de tres días de reposo a la temperatura del local en cada cápsula o placa Petri que contenía la disolución nutritiva de 300 cm³, se incorporó una disolución de 300 mg de androstenodiona en 15 cm³ de alcohol etílico con todo cuidado. Después de otro reposo de dos días a la temperatura del local se agregó nuevamente la misma cantidad de androstenodiol y se abandonó nuevamente durante dos días a la misma temperatura. Después se reunieron los contenidos de las cápsulas Petri y se trataron con éter hasta agotamiento. La disolución etérea se privó del ácido acético por lavado, ácido que se había formado también en la fermentación y se evaporó después del secado. El residuo se precipitó con digitonina, el filtrado se privó de la digitonina y en metanol se hizo reaccionar con acetato de semicarbazida. La semicarbazona se aisló y se disoció del modo conocido. Después de tratar con metanol ácido se cristalizó en este acético. El producto presentó en metanol un índice de rotación de $[\alpha]_D^{20} + 108^\circ$; punto fusión 152° y se comportó como testosterona. Rendimiento: 16%.

Ejemplo 2

Empleando el mismo sustrato para las bacterias que se ha descrito en el ejemplo precedente, se agregó al cultivo bacteriano la disolución alcohólica del producto que se ha de oxidar. Se emplearon 200 mg de dehidroandrosterona en una cantidad de sustrato de 300 cm³. Después de un reposo de tres días se extrajo con éter, se lavó la disolución etérea, se secó y se evaporó. El residuo para eliminar la dehidroandrosterona no alterada se trató durante 4 horas en piridina absoluta con anhídrido del ácido ftálico, la mezcla de reacción se vertió en agua, se extrajo con éter y la piridina se eliminó lavando con agua acidulada. El éster ácido del ácido ftálico de la dehidroandrosterona se pudo luego separar con álcali y la disolución etérea después de evaporada dejó un cristalizado que se trató con metanol acidulado y



después de la recristalización en hexano dio androstenodiona con índice de rotación $[\alpha]_D^{20} = +198^\circ$ (CHCl_3) y Pf. 173° . Rendimiento: 20%.

Ejemplo 3

5 Como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, en otro ensayo se sometió a la oxidación el monopropionato-17 de androstenodiol, utilizando 300 mg de este producto (Pf. 146° ; $[\alpha]_D^{20} = -62^\circ$ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)) para un cultivo de bacterias con 300 cm^3 de sustrato. Después de un reposo de cuatro días a la temperatura del local se trabajó como se ha descrito en el ejemplo 2 y también se eliminó el monopropionato no alterado como éster ácido del ácido ftálico. El propionato de testosterona remanente después de la isomerización, se cristalizó después 10 en hexano y tenía las siguientes características: Pf. 121° ; $[\alpha]_D^{20} = +87^\circ$ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Rendimiento: 21%.

Ejemplo 4

15 Sobre un litro de una disolución nutritiva con la composición:

- 1% peptona
- 0,2% bifosfato amónico
- 0,1% bifosfato potásico
- 0,025% fosfato magnésico

20 se hicieron crecer bien bacterias de serbosa. Luego a esta disolución de cultivo se incorporaron en porciones 10 cm^3 de una disolución al 2% de colesteroína en alcohol. Después de largo reposo se extrajo con éter toda la mezcla de reacción. La disolución etérea se lavó con agua, se secó y se evaporó. A continuación el residuo se hizo reaccionar en 25 metanol con acetato de semicarbazida. Se separó la colestenoasemicarbazona. La semicarbazona después de la disociación suministró la colestenoína con las características: Pf. $80-81^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = +87^\circ$ (CHCl_3). Rendimiento 29%.

Ejemplo 5

30 60 cm^3 de agua de fermentos estéril, se amortiguaron agregando 10 cm^3 de fosfato sódico secundario n/5 y 10 cm^3 de fosfato potásico



primario m/5 se trataron con 200 mg de dehidro-androsterona finamente pulverizada y durante una hora se esterilizó en la autoclave. Después de enfriar, se infectó con unas gotas de una mezcla bacteriana aeró-
5 bia, que se había cultivado con los métodos ordinarios de fermento milanés (fermentos milaneses floculosos). La mezcla de reacción se agitó después a 32° bajo oxígeno durante 46 horas. A continuación se interrumpió el ensayo y se filtró la suspensión. Hirviendo con acetona se eliminó del residuo remanente sobre el filtro el producto de reac-
10 ción. Después de concentrar la disolución de acetona y agregar cuidadosamente agua, cristalizó la Δ^4 -androstenediona de punto de fusión 168° (sin corregir) con un rendimiento de 87%.

Ejemplo 6

60 cm³ de agua de fermentos estéril se compensaron agregando 10 cm³ de fosfato sódico sec. m/5 y 10 cm³ de fosfato potásico prim.
15 m/5 se mezclaron con 200 mg de pregnenolona finamente pulverizada y durante una hora se esterilizó en el autoclave. Después de enfriar se infectó con algunas gotas de una mezcla bacteriana deshidrogenante recién cultivada en agua de fermentos. La mezcla de reacción se agitó luego a 32° bajo oxígeno durante seis días. A continuación se
20 interrumpió el ensayo y se filtró la suspensión. El producto de reacción se extrajo con acetona por coacción del residuo remanente sobre el filtro y se hizo cristalizar. Era una mezcla de pregnenolona y progesterona. La separación de esta mezcla se hizo según Butenandt y Westphal del modo siguiente:

25 La mezcla se disuelve en 3 cm³ de cloroformo y 1 1/2 cm³ de piridina absoluta. Después de enfriar la disolución a 0° se incorpora poco a poco una mezcla también enfriada de 0,5 cm³ de ácido cloro-sulfúrico y 2 cm³ de cloroformo. El producto de la reacción se calienta y durante una hora se hierve al baño maría. Después de enfriar se
30 incorporan unos 40 cm³ de éter y 20 cm³ de disolución de carbonato sódico 2n y se agita enérgicamente.

153281.



La sal sódica del sulfato ácido de pregnenolona precipita y se lava con éter. Se reúnen todas las disoluciones etéreas, se lavan con ácido sulfúrico diluido y agua, se secan y se concentran por evaporación. El residuo se disuelve en alcohol diluido y proporciona 5 80 mg de progesterona (Δ^4 -pregnenodiona). La sal sódica se disocia con una mezcla de dos partes de alcohol y 1 parte de ácido sulfúrico 5n; da 80 mg. de pregnenolona.

- - - - -

153281

1.-

N O T A.-

La presente patente de invención comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Un procedimiento para la obtención de cetonas no saturadas de la serie del ciclopentano-polihidro-fenantreno, caracterizado porque combinaciones no saturadas de la serie del ciclopentano-polihidro-fenantreno con grupo hidroxilo secundario situado en el anillo se someten a procedimientos de oxidación enzimáticos o fitequímicos.

10 2.- Un procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque en los alcoholes secundarios no saturados de la serie del ciclopentano-polihidro-fenantreno, por ejemplo en el andrestenodiol, se oxida el grupo alcohólico secundario en la posición 3 respecto al grupo cetónico.

15 3.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 y 2, caracterizado porque la oxidación se realiza con auxilio de bacterias del grupo acetobactérico, especialmente el bacterium pasteurianum.

20 4.- Procedimiento para la obtención de cetonas no saturadas de la serie del ciclopentano-polihidro-fenantreno por procedimiento bioquímico.- Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva.

Consta esta descripción de hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 20 de Junio de 1941.

Cuana
153281