

H/v.



199253

*Memoria Descriptiva*

*para*

una Patente de Invención

*a favor de*

la r.s. The Upjohn Company

*residente en*

Kalamazoo 99, Michigan (U.S.A.)

*por:*

" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN ESTEROIDE OXIGENADO "

=====

INVENTORES: Dr. Herbert Charles Murray, y  
Dr. Durey Harold Peterson,  
ambos de nacionalidad norteamericana.

=====

199253

1.-



El presente invento se refiere a un nuevo método para la introducción de oxígeno dentro de una molécula de esteroide y a ciertos nuevos productos producidos por el método del invento.

5 Ya es sabido un método de introducir oxígeno en la posición once de una molécula de esteroide, pero este resultado solo se logra mediante síntesis orgánicas muy técnicas que requieren un número considerable de fases u operaciones. La consecuencia de esto es que el rendimiento generalmente logrado en  
10 esteroide oxigenado en posición 11 ha sido menor que el requerido y el coste de tal producción ha sido extremadamente elevado, por no decir prohibitivo. Esto ha dado lugar a un handicap insuperable en los intentos de los químicos farmacéuticos en hacer asequibles cierto número de esteroides 11-oxigenados a  
15 los miembros del público general afectados de varias enfermedades que en la actualidad solo se sabe que puedan tratarse beneficiosamente por ciertos esteroides 11-oxigenados, ya que el elevado coste de su producción y el aprovisionamiento inadecuado de estas importantes drogas ha impedido su difusión y el que  
20 pueda adquirirse por un gran número de personas o de un modo general. Entre estas drogas o medicamentos que poseen una estructura de esteroides 11-oxigenados, pueden citarse por ejemplo la corticosterona, 11-dehidrocorticosterona, 11-dehidro-17-hidroxicorticosterona (compound E, cortisona), y 17-hidroxicorticosterona (compound F). Es por consiguiente de importancia  
25 considerable el encontrar un método más satisfactorio de producir esteroides oxigenados, especialmente compuestos esteroides 11-oxigenados, que en la posición once contengan el grupo

199253

2.-



(=O) ceto (oxo), en el que el oxígeno está fijado en la posición once en varios medicamentos muy convenientes, o el grupo (-OH) hidroxilo (oxi), que también se encuentra en muchos compuestos esteroideos muy valiosos y que además mediante métodos de oxidación conocidos puede transformarse fácilmente en el grupo ceto. A este fin no se ha llegado hasta el presente con éxito digno de mencionarse a pesar de los grandes gastos y del mucho tiempo consumido por lograrlo.

Uno de los objetos del presente invento es proporcionar un nuevo método para la introducción de oxígeno dentro de una molécula esteroide, especialmente dentro de la posición 11 de una molécula de esteroide. Otro objeto del invento es el de proporcionar un método tal por el que un 11-desoxi-esteroide (el término "11-desoxi-esteroide" se empleará aquí siempre para indicar un esteroide que no contiene oxígeno en la posición 11) se convierte con gran rendimiento en un esteroide 11-oxigenado gracias a la acción de un hongo del orden de los Mucorales o gracias a las enzimas oxidantes obtenibles del mismo. Otro objeto del invento es proporcionar un procedimiento para la producción de esteroides 11-oxigenados partiendo de esteroides 11-desoxi, en el que la conversión se efectúa por la acción de un hongo del orden Mucorales, o de enzimas oxidantes del mismo. Otro objeto del invento es proporcionar un procedimiento para la introducción de oxígeno dentro de al menos la posición once de un 11-desoxi-esteroide gracias a la acción de un hongo del orden Mucorales, especialmente de la familia Mucoraceae, y más especialmente del género Rhizopus, o de enzimas oxidantes producidas por ellos.



AGO. 1957

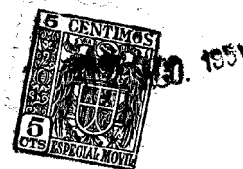
S.-

199253

Constituye también otro objeto del invento el proporcionar productos nuevos obtenidos exclusivamente por el método del presente invento y que por tanto son de gran valor para la preparación de medicamentos valiosos conteniendo esteroides 11-oxigenados. Otros objetos del invento y otros detalles del mismo se deducirán de las explicaciones siguientes.

Ahora bien se ha descubierto que 11-desoxi-esteroides, que contienen el núcleo ciclopentanopolihidrofenantríco, especialmente los 10,13-dimetil-ciclopentano-polinidro-fenantrenos, pueden convertirse fácilmente y con rendimiento elevado en los correspondientes esteroides oxigenados sometiendo el compuesto esteroide a la acción de un hongo del orden Mucorales o de las enzimas oxidantes endocelulares o exocelulares producidas por estos hongos. Por el método del presente invento se logra un método eficaz, económico y comercialmente satisfactorio para introducir oxígeno en la posición 11 de una molécula de 11-desoxi-esteroide. Gracias a esto se obtiene también la nueva posibilidad de obtener de un modo sencillo la producción de medicamentos a base de esteroides 11-oxigenados, que, como antes se ha indicado, tienen la mayor importancia para las profesiones químicas, farmacéuticas y médicas, y de modo especial para el público en general que sufre anormalidades fisiológicas que solo se saben combatir beneficiosamente mediante medicamentos a base de esteroides 11-oxigenados.

El método del presente invento en su aspecto general consiste en someter un 11-desoxi-esteroide a la acción de un hongo oxidante del orden Mucorales o de enzimas oxidantes de estos hongos que son capaces de introducir un átomo de oxígeno



4.-

199253

dentro del núcleo esteroide en la posición once. Otra forma de expresar el resultado del procedimiento del presente invento es la de decir que el esteroide "se oxigena", ya que se introduce en él un átomo de oxígeno. Expresándolo de otro modo, puede decirse que se oxigena la posición once del esteroide. También otras posiciones de la molécula esteroide pueden en casos aislados someterse a transformación debida a la acción del hongo o de las enzimas del mismo, pero estas transformaciones no se han de mirar como inconvenientes ya que la introducción de oxígeno en otras porciones de la molécula esteroide puede dar por resultado productos definitivos o intermedios terapéuticamente valiosos, p. ej. los que contienen un grupo hidroxil en la posición 17. En el caso de que tales grupos adicionales no se consideren convenientes, existen métodos adecuados para eliminar con facilidad tales grupos. La importancia del presente invento, por lo que se refiere a los resultados, es la de que la molécula del 11-desoxi-esteroide se oxigena por lo menos en la posición once, cuando anteriormente la molécula esteroide estaba desoxigenada en dicha posición once. Los grupos hidroxil que existen ya en la molécula esteroide que se ha de oxigenar en la posición once y que por sí mismos podrían oxidarse en grupos ceto, pueden, si se considera necesario como en el caso de que se desean lograr rendimientos extraordinariamente elevados en productos hidroxisteroidicos 11-oxigenados, protegerse de ataques de varios tipos, incluido el ataque con los hongos oxidantes o por sus enzimas oxidantes, mediante conversión, p. ej. mediante esterificación, eterificación, halogenación o similares, en un grupo que puede volver-



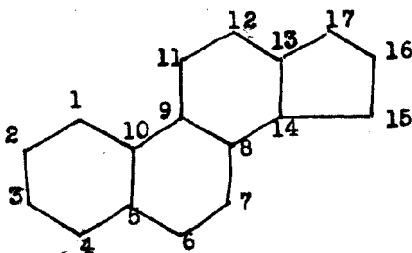
AGOSTO 1951

5.-

**199253**

se a convertir en un grupo hidroxilo. Sin embargo, este modo de proceder no constituye un requisito previo a la introducción de oxígeno, especialmente de oxígeno en posición 11, dentro del hidroxisteroide por el método del presente invento.

5 Los esteroides utilizables en el método del presente invento no están limitados por el tipo o número de sustituyentes, y para poderlos utilizar en este procedimiento solo es necesario que contengan una posición once no oxigenada, o, dicho de otro modo, que sean un 11-desoxi-esteroide. Tales compuestos contienen el núcleo:



15 el cual puede además contener sustituyentes o combinaciones de sustituyentes alrededor del núcleo, en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 y 17, especialmente grupos 10, 13-dimetilo, grupos 13, 7 o 12-ceto, hidroxilo o aciloxi; cadenas laterales en posición 17, de las cuales merecen especial mención las cadenas laterales de la progesterona y corticosterona (ceto); un grupo ceto en posición 17; un grupo hidroxilo también en posición 17, y similares. Pueden encontrarse también enlaces dobles en las posiciones 4, 5, 6, 7, 8, 9 (11), 11, (12), 16 (17) o en otras o también combinaciones de dobles enlaces alrededor del núcleo; o dobles enlaces saturados por adición

20



6.-

199253

5 a ellos de halógenos o halogenhíricos; productos de adición de dienofilos, como ácido maleico, anhídrido maleico o ésteres del ácido maleico con esteroides que poseen un sistema de doble enlace conjugado, p. ej. en posiciones 5,7; y otros sustituyentes y combinaciones de sustituyentes, enlaces dobles etcétera demasiado numerosos para citarlos de modo especial, siendo conocido un gran número de los mismos en la química de los esteroides. La presencia o ausencia de insaturación en las posiciones 9 (11) u 11 (12) del núcleo no constituye un factor de importancia en el método del presente invento, pues aunque se prefiere aplicar el procedimiento a un esteroide con un grupo 11-metileno, esto es a un esteroide sin insaturación en las posiciones 9 (11) u 11 (12), por razones de economía y para evitar transformaciones innecesarias de los compuestos saturados en no saturados, la biooxidación puede aplicarse con igual facilidad a cualesquiera compuestos saturados o no saturados.

10 Como representantes de los esteroides que pueden oxigenarse por el método del presente invento, señalaremos p. ej. la progesterona, la 9,11 o 11,12-dehidroprogesterona, 7,9 (11)-bisdehidroprogesterona, 17-hidroxiprogesterona, pregnenolona, las aciloxipregnenolonas, como el acetato de pregnenolona, 11-desoxicorticosterona, delta 9,11 o 11,12-desoxicorticosterona, 11-desoxi-17-hidroxycorticosterona y los derivados aciloxi, p. ej. derivados acetoxi de la misma, 21-hidroxipregnenolona y 21 acilésteres, p. ej. acetilésteres de la misma, 17,21-dihidroxipregnenolona y derivados 17,21-diaciloxi de la misma, p. ej. el derivado diacetoxi, androstendiona, androstan-17-ol, 9,11 o 11,12-dehidroandrostendiona, 3-hidroxi-delta 9,11 o

19253

7.-



11,12-pregnen-20-onas, 3,21-dihidroxi-delta 9,11 o 11,12-pregnen-20-onas, 3,17,21-trihidroxi-delta 9,11 o 11,12-pregnen-20-onas, 5-androsten-3-ol-17-ona- y ésteres 3-acílicos, p. ej. el éster 3-acetílico de la misma, 5-androsten-3-ol-17-ona y ésteres 3-acílicos, p. ej. el éster 3-acetílico de la misma; ergosterol, estigmasterol, estigmastanol y ésteres 3-acílicos, p. ej. el éster 3-acetílico del mismo; ergostenona, estigmatenona, estigmastanona, colestenona, ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido colánico, ácido norcolánico, ácido bisnorcolánico, ácido colénico, ácido norcolénico, ácido bisnorcolénico y los derivados 3-hidroxi, 3-ceto, 3,7-dihidroxi, 3,7-diceto, 3,7,12-trihidroxi, 3,7,12-triceto, o los derivados no saturados en las posiciones 9,11 o 11,12, los ésteres, tioésteres y otros derivados de los anteriores ácidos, y cuerpos similares.

La oxigenación bioquímica por microorganismos se lleva a cabo empleando un hongo oxidante que es una especie de un género de una familia del orden Mucorales o los enzimas oxidantes obtenibles del mismo. Entre las diversas familias de este orden ofrecen la mayor utilidad los géneros de la familia Mucoraceae y entre los géneros de esta familia de hongos se ha descubierto que el Rhizopus y mucor son los que tienen más valor para el método del presente invento. De las especies de estos géneros que pueden utilizarse en el método del presente invento citaremos a título de ejemplo las especies Rhizopus microsporus, circinans, oligosporus, arrizus, cohnii, oryzae y nigricans y especies sinónimas, que de hecho son idénticas con las anteriores aunque se denominen diferentemente, y las espe-

199253

8.-



5 cles típicas *Mucor*, *mucedo*, *gríseo-cyanus*, *hiemalis*, *hiemalis*  
var. *albus*, *rouxi*, *adventitius*, *christianiensis*, *circinelloi-*  
*des*, *dubius*, *genevensis*, *javanicus*, *microsporus*, *parasiticus*  
y similares. Aunque las especies de géneros de familias del  
10 órden de los microorganismos señalados del modo general como los  
Mucorales y de modo especial los de la familia *Mucoraceae*, pue-  
den en general emplearse en el método del presente invento co-  
mo los hongos oxidantes, por razones de economía y de producti-  
vidad se prefieren las especies del género *Rhizopus*, y de es-  
te género la especie *arrhizus*, a la que frecuentemente nos re-  
feriremos después designándola por RH-176, se utiliza con pre-  
ferencia para la obtención de rendimientos óptimos de esterci-  
des 11-oxigenados, si bien en ciertos casos y en circunstancias  
particulares pueden emplearse ventajosamente los otros géneros  
15 y las otras especies. Las especies de estos géneros citados  
poseen sin embargo de modo particular gran abundancia de me-  
canismos enzimáticos, por lo cual se prestan bien, en confor-  
midad con el método del invento, cuando se las cultiva cuida-  
dosamente y se las pone en contacto con un 11-desoxi-esteroide  
20 para realizar la oxigenación del esteroide en posición once en  
una escala de importancia industrial.

Aunque para la producción abundante de esteroide  
11-oxigenado se prefieren especies de ciertos géneros de hon-  
gos, en particular del género *Rhizopus* y el género *Mucor*, los  
25 cuales ambos pertenecen a la familia *Mucoraceae*, y aunque por  
consideraciones económicas puedan limitarse los métodos prác-  
ticos a ciertas especies y razas que poseen propiedades fisio-  
lógicas específicas, pueden también emplearse especies de otras



# 199253

familias y géneros del orden Mucorales para convertir 11-desoxiesterooides en esterooides 11-oxigenados en cantidades industrialmente importantes.

5 Por ejemplo otros géneros representantes de la familia Mucoraceae y especies representativas de las mismas, según las reúne H. Zycha en "Kryptogamenflora der Mark Brandenburg", tomo VIA, 1-264 (1934), comprenden la Parasitella (*P. simplex*), Zygorhynchus (*Z. heterogamus*), Circinella (*C. spinosa*), Actinomucor (*A. repens*), Pirella (*P. circinans*), Absidia (*A. reflexa*), Spinellus (*S. sphaerosporus*), Phycomyces (*Ph. Blakesleeanus*), Sporodinia (*Sp. grandis*), Pilaira (*P. anomala*), Pilobolus (*P. crystallinus*), Diccocum (*D. asperum*). Otras familias Mucorales con sus géneros y especies representativas comprenden las Thamniaceae; Thamnidium (*Th. elegans*), Diceranophora (*D. fulva*), Chaetostylum (*Ch. Fresenii*), Helicostylum (15 *H. piriforme*), Chaetocladium (*Ch. Brefeldii*); Choanephoraceae; Blakesleea (*B. trispora*), Choanephora (*Ch. cucurbitarum*), Rhopalomyces (*Rh. elegans*), Cunninghamella (*C. elegans*), Thamnocephalis (*Th. quadrupedata*); Cephalidaceae; Piptocephalis (*P. Freseniana*), Syncephalis (*S. reflexa*), Spinalia (*Sp. radians*), Syncephalastrum (*S. racemosum*), Dispira (*D. cornuta*), Coemansia (*C. pectinata*), Kickxella (*K. alabastrina*); Mortierellaceae: Mortierella (*M. pusilla*), Haplosporangium (*H. bisporale*), Dissophora (*D. decumbens*); Endogonaceae; Endogone (*E. reniformis*), Sclerocystis (*S. coromiodes*), Glaziella (*G. vesiculosa*). 20 25

Del género Rhizopus, cuyas especies, como se ha indicado antes, se prefieren en el método del invento, muchas



# 199253

de las especies comunmente conocidas son sinónimas, según advierte H. Zycha en "Krypt. der Mark Brandenburg" tomo VIA, 110-120 (1935). Así el *Rhizopus microsporus* se conoce con el nombre de *Rh. minimus*, *Mucor speciosus*, *Rh. speciosus* y *Rh. equinus*; el *Rhizopus circinans* puede ser conocido como *Rh. reflexus*; el *Rhizopus oligosporus* puede conocerse como *Rh. Delamar* o *Rh. Tamari*; el *Rhizopus arrhizus* puede conocerse como *Rh. nodosus*, *Rh. racemosus*, *Rh. maydis*, *Mucor arrhizus*, *Mucor norvegicus*, *Rh. pusillus*, *Rh. bovinus*, *Rh. Cambodja*, *Rh. chinensis* y *Rh. tritici*; el *Rhizopus Cohnii* es también conocido como *Rh. suinus*; el *Rhizopus Oryzae* puede conocerse como *Rh. japonicus* o *Rh. tonkinensis*; el *Rhizopus nigricans* puede conocerse como *Mucor stolonifer*, *Rh. niger*, *Rh. artocarp*, *Mucor niger*, *Rh. nigricans var. minor* o *Rh. nigricans var. luxurians*; y el *Rhizopus echinatus* es de por sí una especie dudosa que puede ser sinónima del *Rhizopus nigricans*.

Los organismos fungales pueden obtenerse de fuentes conocidas, como the Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois o American Type Culture Collection, Washington, DC, o del Centraalbureau voor Schimmelcultuur Baarn, Holanda. Alternativamente pueden también explotarse fuentes naturales conocidas por los microbiologistas.

Las técnicas usuales de los microbiologistas se siguen en el aislamiento de hongos de fuentes naturales. Medios estériles o terrenos de cultivo se preparan de diversas fuentes que contienen hidratos de carbono y nitrógeno y se solidifican en un gel mediante adición de dos por ciento de



# 199253

agar. El nitrógeno puede ser de origen muy diverso y puede p.  
ej. comprender nitratos inorgánicos, sales de amonio o extrac-  
tos proteínicos. Los medios pueden esterilizarse mediante pre-  
sión de vapor o en autoclave en frascos o tubos cerrados con  
5 algodón y utilizarse asépticamente para llenar discos o placas  
Petri. Estas o se inoculan con disoluciones de esteroide con-  
taminado con hongos o se exponen al polvo o al aire exterior.  
De estas placas se desarrollan cultivos de hongos, entre los  
que pueden reconocerse por cualquier microbiólogo experimenta-  
do colonias de Mucorales, especialmente las especies Mucora-  
10 ceae Mucor y Rhizopus, y los organismos se cogen luego y se  
transportan bien al mismo medio en tubos testigo, bien a cual-  
quier otro medio adecuado para el cultivo y crecimiento de los  
hongos. Una aireación enérgica activa considerablemente el  
15 crecimiento de los organismos cualquiera que sea el terreno de  
cultivo. Para la práctica y objeto del presente invento el cul-  
tivo del organismo, que puede ser de fuente natural o comercial,  
se utiliza para cubrir ciertos medios o terrenos de cultivo bac-  
teriológico convenientes para el desarrollo de los hongos. Pue-  
de utilizarse para este objeto el medio de cultivo de Peterson  
20 y Murray con resultados satisfactorios y después en toda la  
memoria y en los ejemplos, si no se dice otra cosa, se debe  
entender que se emplea el medio de cultivo de Peterson y Murray  
el cual contiene por litro de agua de cañería utilizada para  
suministrar trazas de elementos y sales inorgánicas, los si-  
25 guientes aditamentos: cinco mililitros de agua de maceración  
de maiz (corn steep liquor), veinte gramos de extracto comer-



# 19253

cial de albúmina láctea ("Edamine"), y cincuenta miligramos de dextrosa comercial ("Cerelesa"). El pH de este medio de cultivo o de otros que pudieran emplearse, se ajusta ordinariamente entre <sup>unos</sup> 5,5 y 5,9 antes de inocular con los organismos de los hongos. El tratamiento del caldo en autoclave bajo presión de 0.7 kg/cm<sup>2</sup> durante 30 minutos para lograr condiciones asepticas, hace bajar el pH desde unos 6,5 hasta unos 5,5 - 5,9, y esta reducción del pH debe tenerse en cuenta al ajustar el medio antes de encerrarlo en el autoclave de manera que se obtengan las mejores condiciones de crecimiento después de terminarse esta fase. Después de 24 horas de crecimiento de los hongos en el medio puede comprobarse que ha tenido lugar un descenso considerable del pH del medio, de ordinariamente a próximamente 3,5 a 4,2. En este estado de crecimiento de los hongos es cuando preferentemente se agrega el esteroide que se ha de oxidar o cuando el líquido de fermentación fungosa que se emplee en la oxidación fermentativa de los esteroides, se separa del cultivo.

La inoculación del medio de cultivo que contiene los hongos crecidos con el hongo seleccionado del orden de los Mucorales puede realizarse por cualquier modo conveniente usual en la microbiología. Por ejemplo la inoculación puede efectuarse de modo muy conveniente con esporas de los organismos, aunque también da por resultados la inoculación empleando micelio vegetativo. El desarrollo de los hongos se activa bien manteniendo las temperaturas de incubación a la temperatura aproximada del local, p. ej. de veinte a veinticinco grados

199253

13.-



centígrados, aunque es también posible un intervalo de temperaturas relativamente grande, p. ej. desde unos 15 hasta unos 45 grados centígrados, obteniéndose también dentro de esta zona crecimientos satisfactorios de los hongos.

5 El periodo de crecimiento de los hongos que se requiere antes de que el esteroide que se ha de oxigenar se exponga a la acción de los hongos o a la acción de sus enzimas, no parece que tenga una importancia decisiva. Por ejemplo, el esteroide que se quiere oxigenar en la posición once puede  
410 agregarse bien al tiempo de inocular el medio con la especie seleccionada de Mucorales, o en cualquier tiempo, p. ej. 24 horas después. En la práctica se ha descubierto que el esteroide que se ha de oxigenar puede agregarse al medio de cultivo de los hongos incluso cinco días después de la inoculación del medio con la especie seleccionada de Mucorales, sin que pueda observarse ningún efecto sobre el resultado. La adición de un  
15 11-desoxisteroide al caldo de fermentación después de un tiempo de crecimiento de los hongos de 16 a 24 horas, es el método preferido para esta operación, ya que en esta fase del crecimiento de los hongos parece que se desarrolla totalmente el mecanismo de las enzimas oxidantes. De modo análogo, si se quiere efectuar la oxigenación empleando líquido de fermentación conteniendo la enzima oxidante únicamente, por lo más  
20 después de esta fase del desarrollo es cuando el líquido de fermentación se separa de ordinario y preferentemente.

25 La manera de agregar el esteroide que se desea oxidar al hongo oxidante, al medio de cultivo de los hongos o al



# 199253

líquido de fermentación, no parece que tenga importancia decisiva. Dicha adición puede realizarse de cualquier modo conveniente para favorecer el contacto íntimo del esteroide con el hongo y/o las enzimas del hongo, p. ej. desarrollando los organismos fungosos en presencia de cristales finamente triturados del esteroide, por dispersión de este último a través de todo el caldo de cultivo de los hongos, o de cualquier otra manera análoga. Para este objeto pueden emplearse agentes que reducen la tensión superficial, agentes dispersores, medios de suspensión como los que pueden adquirirse en el comercio, como Spans, Tweens, Aerosoles, Naconol y similares. Sin embargo es preferible incorporar el esteroide al hongo, al medio o al caldo de fermentación en forma de una disolución en disolvente orgánico miscible con agua, p. ej. de una disolución en acetona, alcoholes e incluso éter, el cual se disuelve solo un poco en agua, y luego mezclar bien el medio y el esteroide de manera que formen una suspensión o dispersión de finas partículas de esteroide y favorezcan el contacto máximo del esteroide a oxidar con el hongo oxidante o con las enzimas del mismo. Pueden emplearse bien con facilidad métodos de cultivo superficiales o por submersión, aunque este último cultivo es el preferido. Alternativamente el líquido de fermentación de un cultivo de los hongos puede separarse, mezclarse con el esteroide o una disolución del mismo y someterse la mezcla a condiciones aerobias para realizar la oxigenación del esteroide.

La temperatura empleada durante el periodo de la oxidación del esteroide por los hongos no es necesario que sea



# 199253

distinta de cuando está ausente el esteroide. Unicamente debe mantenerse dentro de los límites en que puede conservarse la vida o el crecimiento activo de los organismos de los hongos. La temperatura de incubación durante la acción oxidante de los hongos sobre los esteroides puede ser p. ej. entre unos quince y unos cuarenta y cinco grados centígrados, prefiriéndose la temperatura del local, p. ej. de veinte a veinticinco grados centígrados para conseguir la actuación óptima de los organismos o enzimas de los hongos.

Las condiciones con que los organismos de los hongos se desarrollan son aerobias y la intensidad del desarrollo parece que está relacionada con la intensidad de la aireación. Por consiguiente aunque pueda ser satisfactoria cualquier norma de incubación aerobia, para conseguir el desarrollo máximo de los organismos de los hongos se emplea de ordinario una aireación intensa, p. ej. mediante agitación y/o haciendo pasar aire a través del medio de cultivo, con lo cual a su vez parece que se reduce el tiempo requerido para convertir el desoxisteroide en esteroide 11-oxigenado. El grado de conversión del desoxisteroide en esteroide 11-oxigenado parece con esto que depende del grado de aireación o del grado de desarrollo de los hongos al tiempo de agregar el esteroide, habiéndose descubierto que las conversiones empleando los hongos o el medio de fermentación únicamente, son más rápidas cuando el grado de aireación es mayor y también cuando el hongo se deja desarrollar durante 16 a 24 horas antes de agregar el esteroide que se ha de oxidar. Esto indica que el mecanismo de las enzi-

19253

16.-



5 mas oxigenadoras de los hongos está completamente desarrollado después de 16 a 24 horas de crecimiento y que la aireación o activa la transformación y la velocidad de la transformación aumentando el grado de desarrollo de los organismos de los hongos con el correspondiente aumento del grado de desarrollo del mecanismo enzimático de la oxigenación, o que la aireación únicamente favorece la oxigenación por aumentar el suministro de oxígeno disponible. La explicación teórica anterior debe entenderse únicamente como ilustrativa y no debe considerarse como una limitación del invento, ya que el método de cultivo superficial también puede emplearse sin agitación u otros medios de aireación y además el esteroide puede incorporarse al caldo del terreno de cultivo simultáneamente a la inoculación con los organismos de los hongos, sin perjudicar en nada este método.

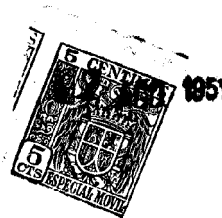
10 El tiempo requerido para la bio-oxigenación del desoxisteroide por el mecanismo oxigenador de los hongos o de las enzimas oxigenadoras de los mismos no puede señalarse exactamente, ya que deben tenerse en cuenta diversos factores. Desde una a setenta y dos horas se ha encontrado ser suficientes para la conversión del desoxisteroide en esteroide 11-oxigenado por la acción de los hongos oxidantes o de las enzimas oxidantes de los mismos. Sin embargo existen indicaciones de que la oxidación del esteroide comienza sustancialmente inmediatamente después de exponerlo al caldo de fermentación de un hongo oxidante completamente desarrollado o de sus enzimas oxidantes, considerándose completamente desarrollado el crecimiento de los hongos en el espacio de cuatro a veinticuatro horas, de-

199253



pendiendo en algún grado de la intensidad de la aireación empleada. Cuando el esteroide se agrega al medio de fermentación al mismo tiempo que el medio se inocula con el organismo fungoso, vienen indicados periodos más largos de tiempo para obtener elevadas transformaciones del desoxisteroide, y, como se ha indicado previamente esto parece deberse al hecho de que el mecanismo enzimático oxidante del hongo no se encuentra totalmente desarrollado hasta algún tiempo después del desarrollo de los hongos. Consiguientemente cuando el esteroide se agrega al tiempo de la inoculación del medio, se emplean de ordinario periodos desde 8 a 72 horas, siendo la longitud del periodo inversamente proporcional al grado de aireación empleada. Por otro lado, cuando el esteroide se agrega a los hongos, al terreno de cultivo o a las enzimas de los hongos en el líquido de fermentación después de algún desarrollo importante de los organismos fungosos, p. ej. después de 16-24 horas sin aireación importante, o después de 2-4 horas con intensa aireación, la conversión del desoxisteroide en esteroide 11-oxigenado comienza inmediatamente y se logran rendimientos elevados en el espacio desde 1 a 72 horas o en periodos más breves o más largos, dependiendo también en esto del grado de aireación empleada. Debe advertirse que con periodos más largos de exposición del desoxisteroide a la acción del hongo oxidante o de las enzimas del mismo se obtiene una conversión algo mayor en derivados polioxigenados, pero que en todo caso tiene lugar la oxidación del esteroide en la posición once.

Después de completada la reacción fermentativa



# 199253

oxidante, se recupera el esteroide 11-oxigenado de la mezcla de dicha reacción siguiendo cualquier método conveniente. Un modo muy ventajoso de separar el esteroide oxigenado consiste en extraer la mezcla de reacción oxigenante, especialmente el líquido de fermentación y los micelios en los casos en que el esteroide se agrega directamente al cultivo, con un disolvente orgánico no miscible con agua, p. ej. un hidrocarburo halogenado, como cloruro de metileno, cloruro de etileno o cloroformo, éteres y similares. Los extractos pueden reunirse después de lavados sucesivamente con disolución de bicarbonato sódico y agua destilada, y los extractos reunidos se secan después mediante una corriente de aire, al vacío, o de una manera análoga y los sólidos se recogen en un disolvente orgánico p. ej. cloruro de metileno u otros de los antes citados, con el fin de recristalizarlos o purificarlos. Si se quiere pueden efectuarse recristalizaciones adicionales en disolventes orgánicos, p. ej. metanol. El material cristalino puede caracterizarse por los métodos conocidos, como análisis elemental, punto de fusión, análisis infrarrojo, difracción de rayos X, rayos ultravioleta, microcombustión y por otros métodos. Alternativamente el material cristalino o extractos de material no cristalino, producidos por la bio-oxidación pueden identificarse o caracterizarse según el sistema de papel cromatográfico de Zaffaroni descrito detalladamente a continuación.

Un método muy conveniente para la separación de los productos de oxidación obtenidos por el método del presente invento es la cromatografía de los extractos o materiales só-



199253

5 lidos, los cuales últimos se obtienen por evaporación del di-  
solvente de extracción y subsiguiente cristalización si se  
desea, mediante una columna de alúmina ( $Al_2O_3$ ) o de otro ad-  
sorbente, empleando como disolvente p. ej. benceno y varios  
10 disolventes y mezclas de disolventes para desarrollar el cro-  
matograma, como se indica en los Cuadros cromatográficos de  
los ejemplos. Esto resulta especialmente útil al identificar  
los compuestos producidos por la oxidación, ya que puede com-  
probarse, si se quiere, cada fracción de la columna por el mé-  
15 todo Zaffaroni. Pueden por el sistema de cromatogramas de pa-  
pel según Zaffaroni comprobarse cantidades tan pequeñas como  
de diez a cuarenta microgramas e identificarse sustancias quí-  
micas, fracciones conteniendo las mismas sustancias químicas  
combinadas y los compuestos cristalizados de las fracciones  
combinadas.

20 La técnica de Zaffaroni, citada en toda la memoria  
y en los ejemplos, es un método relativamente nuevo pero ya  
bien establecido para identificar ciertos compuestos orgánicos,  
p. ej. los compuestos relacionados con las hormonas corticales  
adrenales, método analítico que se basa en parte en la pola-  
ridad de los compuestos examinados. La literatura relativa a  
este método de análisis es la siguiente: Burton, Zaffaroni, y  
Keutmann, "A New Analytical Method for Adrenal Cortical Hor-  
25 mones", *Science* 110, 442 (1949) y Zaffaroni, Burton y Keutmann,  
*Science* 111, 6 (1950). Como la polaridad de los compuestos or-  
gánicos varía con variaciones en la molécula, entre ellas la  
presencia o ausencia de ciertos grupos (cada uno de cuyos gru-

199253

20.-



1951

pos introduce por sí mismo cierto influjo definido sobre la polaridad de la molécula en su conjunto) y variaciones de la posición de un grupo dado en una molécula dada, es posible por el método de Zaffaroni identificar con certeza pequeñas cantidades de un compuesto orgánico de la serie de los esteroides de la corteza adrenal o de compuestos esteroides afines, gracias a su polaridad. El que compuestos diferentes presentan polaridades diferentes, es un hecho largo tiempo conocido, pero la técnica de Zaffaroni es en la actualidad el único método práctico de aprovechar las diferencias de polaridad para identificar cantidades pequeñas de esteroides. Este método citado constantemente en la memoria y en los ejemplos, proporciona una ayuda grandísima en la investigación de la bio-oxidación de esteroides por organismos de hongos oxidantes o de sus enzimas oxidantes, y en la identificación de varios esteroides nuevos oxigenados y hasta ahora desconocidos, igualmente que en la identificación de esteroides oxigenados conocidos.

El método de Zaffaroni y de sus colaboradores es una forma de la conocida "Cromatografía por tiras de papel" y se funda esencialmente en los mismos principios que la cromatografía ordinaria que utiliza una columna de alúmina o de otro tipo.

El método de Zaffaroni y de sus colaboradores es esencialmente el siguiente. Primeramente una clase conveniente de papel de filtro de 7 a 10,5 cm. de ancho y de aproximadamente 56 cm de largo, se pliega en un punto alejado del extremo unos 7,5 cm. En un punto situado pulgada y media por debajo de este pliegue, se traza una línea transversalmente

199253

21.-



1951

5

10

15

20

25

al papel, la cual marca el punto para la aplicación del esteroide que se ha de examinar, en el papel. Este se corta luego a lo largo en tiras con un ancho aproximado de tres octavos de pulgada, comenzando por el extremo opuesto al extremo en que se ha de aplicar el esteroide a examinar. Así se forman varias tiras de papel, todas las cuales están unidas a una cabeza común. Cada una de estas tiras proporciona una "pista" separada para cada "mancha" o gota del compuesto examinado, como se comprenderá mejor por lo acaño a continuación. Alternativamente, el papel no se corta en pistas o tiras separadas, sino que se emplea una sola tira. En este caso, sin embargo, debe tenerse cuidado en no colocar los diversos compuestos que se han de examinar, demasiado juntos unos con otros, p. ej. no deben quedar más próximos de una pulgada próximamente en la tira única de papel. Luego se selecciona un sistema disolvente constituido por un disolvente no polar para la fase móvil y un disolvente polar para la fase estacionaria. El benzol o benceno disolvente no polar y la formamida disolvente polar constituyen un sistema disolvente y el tolueno disolvente no polar y el propilenoglicol disolvente polar constituyen otro sistema disolvente, los cuales ambos se han empleado con buen resultado, aunque para ciertos fines se ha comprobado ser muy satisfactorio el sistema que comprende éter dietilenoglicol-monoetílico ("carbitol") como fase polar estacionaria y el metil ciclohexano como fase no polar móvil.

El papel de filtro se satura con el disolvente polar, p. ej. propilenoglicol y se elimina del papel cualquier exceso con cantidades adicionales de papel de filtro, por estru-



# 199253

5 jamiento, por un retorcedor ordinario para ropa blanca o por cualquier otro medio adecuado. Luego el disolvente no polar (llamado también desarrollador), de la fase móvil, en este caso tolueno, se satura con el disolvente polar y de este modo se termina esta parte de las preparaciones.

10 Un vaso de batería de dimensiones convenientes, p. ej. de 30 por 45 centímetros, conteniendo 100 mililitros del disolvente de la fase no polar, se reviste con una noja grande de papel de filtro impregnada en el disolvente que se ha de emplear para la fase estacionaria, p. ej. propilenoglicol. Un soporte anular dentro de la cámara o vaso de cristal sostiene una bandeja o cápsula conteniendo 350 mililitros del disolvente desarrollador o de la fase móvil, p. ej. tolueno, el cual, como ya se ha indicado anteriormente está saturado con el disolvente de la fase estacionaria, p. ej. propilenoglicol. La cabeza común del papel de filtro dividido o el corto plegado se 15 inmerge en el recipiente del disolvente desarrollador, p. ej. el tolueno disolvente no polar de la fase móvil y que se ha saturado con propilenoglicol.

20 El esteroide que se ha de examinar, disuelto en metanol o cloroformo, se aplica mediante una micropipeta en una cantidad de 10 a 300 microgramos aproximadamente en el punto situado aproximadamente 4 cm por debajo del pliegue, después que la tira se ha cortado y saturado con la fase estacionaria, 25 p. ej. propilenoglicol, pero antes de meter la cabeza común de las tiras dentro del recipiente. Este luego se cierra con la tapa de cristal y se sella con un mastico o pasta de glicerina y almidón, que se prepara calentando 9 g de fécula o al-

199253

25.-



midón soluble y 20 g de glicerina hasta consistencia clara a 140 grados centígrados.

5 El líquido de la fase móvil fluye luego por adsorción sobre el papel de filtro suspendido hacia abajo y así "desarrolla" la tira. Estas tiras se desarrollan durante cuatro a se-  
tenta y dos horas o más según el sistema disolvente y el este-  
roide particular tratado. Después del conveniente desarrollo, que depende de la movilidad de los compuestos, se secan las  
10 tiras de papel a la temperatura del local por medio de un ven-  
tilador y luego se tratan con una disolución de diez mililitros de nitrato de plata 0,1 n ( $AgNO_3$ ), al que se han agregado diez  
gotas de hidróxido de amonio concentrado, y cinco mililitros de hidróxido sódico al cinco por ciento. El área de la tira de  
papel que contiene el esteroide adquiere una coloración parda  
15 a negra. Lavando el papel con un tiosulfato sódico al diez por ciento ( $Na_2S_2O_3$ ) se impide toda ulterior actuación del nitrato de plata y se disuelve el óxido de plata ( $Ag_2O$ ), con lo que se  
obtiene un contraste de color bien marcado entre la mancha o  
gota de esteroide y el fondo del papel. El desarrollo o revela-  
20 do del nitrato de plata puede aplicarse para identificar este-  
roides conteniendo grupos reductores, p. ej. la cadena lateral de cetol (hidroxi-cetona) como ocurre en las hormonas de la corteza de las suprarrenales. Alternativamente ciertas manchas de esteroides pueden hacerse visibles aprovechando su facultad  
25 de absorber luz ultravioleta, según Haines y Drake, Fed. Proc. Soc. Biol. Chem. 9. 180 (Marzo 1950). Este desarrollo o revelado puede aplicarse en el caso de esteroides con un sistema de doble enlace conjugado, p. ej. la progesterona.



# 199253

La traza o mancha de esteroide, presente al principio en el punto de aplicación se comprueba que se ha trasladado con la fase móvil en una distancia proporcional inversamente a su atracción hacia la fase estacionaria y dependiente también de su coeficiente de distribución entre los dos disolventes y del coeficiente de adsorción-elución existente entre el papel de filtro y el sistema disolvente. La afinidad para la fase estacionaria, p. ej. el propilenoglicol, es la máxima para los compuestos esteroides con el número mayor de grupos hidroxil y por consiguiente estos compuestos se separan del punto de aplicación más lentamente que lo hacen los esteroides que contienen un número menor de grupos hidroxil. La desoxicorticosterona, con tres átomos de oxígeno, es la que se traslada más rápidamente entre los corticosteroides conocidos, mientras que los corticosteroides con cuatro átomos de oxígeno se mueven más lentamente y los corticosteroides con cinco átomos de oxígeno son los que se mueven más lentamente de todos los corticosteroides conocidos. El siguiente cuadro I presenta algunos de los corticosteroides conocidos según el número de átomos de oxígeno y su movilidad:

Cuadro I

	Nombre
O <sub>2</sub>	progesterona
O <sub>3</sub>	11-desoxicorticosterona 17-hidroxi progesterona
O <sub>4</sub>	11-dehidrocorticosterona 17-hidroxi-11-desoxicorticosterona(S) Corticosterona
O <sub>5</sub>	17-hidroxi-11-dehidrocorticosterona (R) 17-hidroxicorticosterona (F).



199253

25.-

5

Una comparación de alguno de los sistemas disolventes en relación a la identificación de algunos de los tipos de esteroides conteniendo diversos números de átomos de oxígeno, se ilustra en el siguiente cuadro II, del que resulta que un sistema que emplea éter dietilenglicol-monoetílico como la fase estacionaria y el metilciclohexano como la fase móvil permite diferenciar e identificar aquellos esteroides que son menos polares y por consiguiente más rápidamente móviles que la corticosterona, en tanto que el sistema disolvente de propilenglicol-tolueno no es tan eficaz bajo este respecto.

199253

26.-



Cuadro II.

Movilidades relativas de algunos esteroides en cromatogramas de papel (orden descendente de movilidad)  $\neq$  .

Sistema propilenglicol-tolueno	Sistema carbitol-metilciclohexano
--------------------------------	-----------------------------------

	progesterona
	androstendiona
	testosterona
11-desoxicorticosterona	11-desoxicorticosterona
17-hidroxi progesterona	17-hidroxi progesterona
11-alfa-hidroxi progesterona (U-III)	20-alfa-, 21-dihidroxi-4-pregneno-3-ona*
Corticosterona	20-beta-, 21-dihidroxi-4-pregneno-3-ona
17-hidroxi-11-desoxicorticosterona (S)*	11-alfa-hidroxi progesterona (U-III)
20-alfa-, 21-dihidroxi-4-pregneno-3-ona*	17-hidroxi-11-desoxicorticosterona (S)*
20-beta-, 21-dihidroxi-4-pregneno-3-ona	
17-hidroxi-11-dehidrocorticosterona (E)	
Dihidroxi progesterona (U-I)	
17-hidroxicorticosterona (F)	

(los esteroides que se mueven más rápidamente se encuentran al principio del cuadro)

(estos esteroides se mueven más rápidamente que los de la columna de la izquierda, hallándose a la cabeza del cuadro los de movimiento más rápido)

\* no distinguible en este sistema

\*distinguible en este sistema

$\neq$  orden de movilidad HC > ésteres > cetonas en cualquier posición en todas las combinaciones dadas.



# 199253

Nos referimos ahora a los adjuntos dibujos que son reproducciones fotográficas de algunos resultados analíticos obtenidos por el método del presente invento o que se relacionan con el presente invento.

5

En los dibujos;

La fig. 1 es una fotografía que parangona los modelos o imágenes del análisis infrarrojo de 11-cetoprogesterona auténtica y el compuesto U-VI, identificado como 319 DHP 108. En el ejemplo 1 se hace referencia a esta figura.

10

La fig. 2 es una fotografía que compara los modelos o imágenes de difracción de rayos X de 11-cetoprogesterona auténtica y el compuesto U-VI, identificado como 319 DHP 108.2. En el ejemplo 1 se hace referencia a esta figura.

15

La fig. 3 es una fotografía que compara los resultados del análisis infrarrojo de varios compuestos esteroides citados en el ejemplo 1.

20

La fig. 4 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de 11-cetoprogesterona y el producto de oxidación por  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  de U-III, designado U-VI, demostrando ser los mismos.

25

Las figs. 5 y 6 son fotografías de cromatogramas de tira de papel de productos de bio-oxidación de la 11-desoxi-17-hidroxicorticoesterona (compound S), cromatogramas que en los ejemplos 4 y 14 (2) se citan como 349 SHE 32.

Las figs. 7, 8 y 9 son fotografías de cromatogramas de tira de papel de productos de bio-oxidación de 17-alfa-hidroxiprogesterona, citados en los ejemplos 5 y 14 (1) como 349 SHE 36, 37 y 38.

199253

28.-



1931

La fig. 10 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citados en el ejemplo 7 como 349 SHE 40 P<sub>4</sub>.

La fig. 11 es un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citados en el ejemplo 8 como 363 MIU 21.

La fig. 12 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de un producto de bio-oxidación de progesterona, citado en el ejemplo 10 como 349 SHE 44P.

La fig. 12 es también una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citados en el ejemplo 11 como 349 SHE 44P<sub>2</sub>.

La fig. 13 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de 11-desoxicorticosterona, citados en el ejemplo 12 como 363 MIU 22.

La fig. 14 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de 17-alfa-hidroxiprogesterona, citados en el ejemplo 14 (3) como 349 SHE 22.

La fig. 15 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de acetato de 11-desoxi-17-hidroxi-corticosterona (acetato del compound 3) citados en el ejemplo 14 (5) como 349 SHE 31.

La fig. 16 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de acetato de 11-desoxicorticosterona y de 11-desoxicorticosterona, citados en los ejemplos 14 (7) y 14 (8) como 349 SHE 21.

La fig. 17 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de 11-desoxi-17-



# 199253

hidroxicorticosterona (compound S), citado en el ejemplo 14 (9) como 349 SHE 25.

5 La fig. 18 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona (compound S) y acetato de 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona (acetato de S) citados en los ejemplos 14 (10) y 14 (11) como 349 SHE 26.

10 La fig. 19 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona (compound S), citados en el ejemplo 14 (12) como 349 SHE 48.

Las figs. 20 y 21 son fotografías de cromatogramas de tira de papel de productos de bio-oxidación de androstendiona, citados en el ejemplo 15 (1) como 349 SHE 70-3.

15 La fig. 22 es una fotografía de cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de colestana, citado en el ejemplo 15 (2) como 349 SHE 70-2.

20 La fig. 23 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de ergosterona, citado en el ejemplo 15 (3) como 349 SHE 70-1.

La fig. 24 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de ergosterol, citado en el ejemplo 15 (4) como 349 SHE 70-4.

25 La fig. 25 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citado en el ejemplo 16 como 349 SHE 53.

La fig. 26 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona,



199253

30.-

citado en los ejemplos 17 (1), 17 (4) y 17 (5) como 349 SHE 47.

La fig. 27 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citado en los ejemplos 17 (2), 17 (3) y 17 (6) como 349 SHE 40.

5 La fig. 28 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citado en los ejemplos 17 (7) y 17 (8) como 349 SHE 47.

La fig. 29 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citado en los ejemplos 17 (9), 17 (10) y 17 (14) como 349 SHE 47.

La fig. 30 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citado en los ejemplos 17 (11) y 17 (12) como 349 SHE 40.

15 La fig. 31 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona, citado en los ejemplos 17 (13), 17 (15) y 17 (16) como 349 SHE 50.

20 Las figs. 32, 33 y 34 son fotografías de cromatogramas de tira de papel de productos de bio-oxidación de 11-desoxi-corticosterona, citados en los ejemplos 17 (17), 17 (18) y 17 (19) como 349 SHE 50.

25 La fig. 35 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de progesterona obtenidos del filtrado del caldo de fermentación, citado en el ejemplo 18 como 349 SHE 41.

La fig. 36 es una fotografía de un cromatograma de tira de papel de productos de bio-oxidación de 11-alfa-hidroxi-

199253

31.-



1951

progesterona (U-III) referidos al ejemplo 19 como 349 SHE 72.

Los factores comprendidos en el procedimiento Zaffaroni y colaboradores son esencialmente los siguientes:

5 a) la afinidad de los compuestos esteroides de diferentes polaridades respecto al más polar de dos disolventes. Así los compuestos esteroides más polares, como los que contienen un grupo o grupos hidroxil, tendrán mayor atracción respecto al disolvente polar que los compuestos menos polares, como los que no contienen grupos hidroxil, lo cual en parte determina la fase en que el esteroide se encontrará y con qué rapidez se moverá su huella o mancha; b) el coeficiente de distribución del compuesto esteroide que se ha de examinar, entre dos disolventes no miscibles, con lo cual se determinará en cierto grado la fase en que se encuentra el esteroide, o sea en el cual de los dos disolventes inmiscibles es presente éste, y también la velocidad de traslado de su mancha; c) el coeficiente de adsorción-elución del esteroide examinado, colocado en una tira de papel de filtro previamente tratado y expuesto a una mezcla de dos disolventes inmiscibles, lo cual también determina en cierto grado la fase en que se encontrará el esteroide y la velocidad con que se trasladará su mancha.

15 La combinación de estos tres factores determina el punto hasta el que la mancha del esteroide se moverá sobre la tira de papel cromatográfico con relación a la mancha o huella de una sustancia conocida. La duración que el desarrollo de la tira necesita a través de la fase móvil, carece de importancia, ya que la localización relativa de la mancha con relación a un control conocido es lo que identifica el compuesto

199253

32.-



5 analizado por este método. Esto aparecerá fácilmente de la  
observación atenta de las fotografías de los cromatogramas de  
papel, que acompañan a los siguientes ejemplos y que se identi-  
fican en ellos. Cada mancha en el cromatograma de papel se  
ha de entender que identifica un compuesto esteroide indivi-  
dual, moviéndose más rápidamente los compuestos menos polares  
y trasladándose a una posición más alejada del punto inicial  
que los compuestos esteroides más polares y más altamente oxige-  
nados, que se han examinado en el mismo ensayo. No solamente es  
10 así posible identificar cualitativamente el compuesto esteroi-  
de examinado, sino que también por comparación con un control  
adecuado de cantidad conocida es también posible determinar  
la cantidad aproximada del compuesto particular. Por consiguien-  
te es posible determinar la conversión bio-oxidativa aproxima-  
15 da de un esteroide determinado de partida en diversos deriva-  
dos más altamente oxigenados; la cantidad del esteroide emplea-  
do en la aplicación primitiva sobre la tira, siendo conocida,  
es suficiente una sencilla observación del número de manchas  
de los diferentes compuestos esteroides más altamente oxigena-  
dos y una comparación de la claridad o densidad relativas pa-  
20 ra poder apreciar aproximadamente la clase de conversión y los  
rendimientos de la bio-oxidación de un esteroide particular  
o de otros productos de transformación.

25 Los siguientes ejemplos deben entenderse únicamente  
como ilustrativos y en ningún caso se han de considerar como  
limitativos del invento.



# 199253

## Ejemplo 1.

Oxidación de progesterona (266 HCM 179,319 DHP 95-108).

A 4 litros de un cultivo continuado durante 32-48 horas de RH 176 (raza *Rhizopus arrhizus* se incorporó un gramo de progesterona en 50 mililitros de acetona y así se preparó una suspensión del esteroide en el líquido de cultivo. Este cultivo se incubó luego a la temperatura del local durante 48 horas. Al final de este tiempo el pH del medio era de 3,5 y el líquido de fermentación y el micelio se extrajeron sucesivamente por tres veces con un litro, por una vez con dos litros y por otra vez con un litro de cloruro de metileno. Los extractos del cloruro de metileno se reunieron y lavaron por dos veces con 400 mililitros cada vez de disolución acuosa de bicarbonato sódico al 2% y por tres veces con 500 mililitros cada vez de agua destilada. El extracto de cloruro de metileno se evaporó a sequedad al vacío y el residuo seco se recogió en 50 mililitros de cloruro de metileno. La disolución se puso en una cápsula de cristal de 100 mililitros y se evaporó mediante una corriente de aire. El residuo sólido que pesaba 1,585 g., se disolvió en 5 mililitros de metanol caliente y se dejó enfriar poco a poco a la temperatura del local. Se separaron 75 miligramos de cristales con punto de fusión de 245-249 grados centígrados. Estos cristales se designaron por U-I. Los cristales se disolvieron en 5 mililitros de metanol y se retiraron en un tubo centrífugo y después del enfriamiento dió la solución un rendimiento de 23 miligramos de cristales U-I con punto de fusión de 246-248 grados centígrados. Por el método de Zaffaroni del cromatograma de papel, como antes se ha

199253

34.-



indicado, empleando éter dietileno-glicol-monoetílico como fase estacionaria y metilciclohexano como fase móvil, estos cristales produjeron una única mancha más polar que la progesterona. Las microcombustiones indicaron la fijación o adición de dos átomos de oxígeno a la molécula de progesterona, como se indica a continuación:

Análisis; calculado para progesterona	C 80,23 H 9,56
" " dihidroxiprogesterona	C 72,8 H 8,7
hallado para U-I	C 72,8 H 8,6

En el análisis infrarrojo el compuesto U-I presentó más de un grupo hidróxilo, pero por otro lado conservaba la estructura básica 3-ceto, delta 4- y 20-ceto de la progesterona, como puede comprobarse por el análisis infrarrojo.

Acetilando el compuesto U-I utilizando 0,3 mililitros de piridina y 0,3 mililitros de anhídrido acético para 9,0 miligramos de U-I, dejando la mezcla reposar a la temperatura del local durante 16 horas, agregando 12,5 mililitros de agua y reposando nuevamente durante una hora a la temperatura del local, y enfriando para obtener cristales, se obtuvieron 6,7 miligramos de diacetato cristalino con punto de fusión de 154-155° C y el cual se designó por U-II. Los análisis infrarrojos de este compuesto revelaron la ausencia del grupo hidroxilo y la presencia de nuevos grupos acetoxi.

Las aguas madres del primer compuesto cristalino U-I con peso de 1,5 gramos, se privaron del disolvente por aireación, se disolvieron en 20 mililitros de bencol y se cromatografiaron sobre óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ) como puede ver-

199253

35.-



1951

se en el cuadro III. 50 g de alúmina lavada con ácido, secada a 45 grados centígrados, se utilizaron como adsorbente y se utilizaron porciones de 100 mililitros de disolventes para desarrollar la columna (véase cuadro III). A base de los estudios de los cromatogramas de papel según Zaffaroni, se encontró que la fracción A solo daba una mancha más polar que la progesterona pero menos polar que un segundo compuesto, el U-I, descrito anteriormente y que se presentaba en las fracciones 21 a 23.

La fracción A se disolvió en dos mililitros de metanol caliente y se filtró. Después de enfriarse durante la noche, se obtuvieron 171 miligramos de cristales de un compuesto designado por U-III con punto de fusión de 166-167 grados centígrados. La recrystalización en 3 mililitros de metanol produjo 98,7 miligramos de U-III con punto de fusión de 166-167 grados centígrados y con un  $[\alpha]_D^{20} = +175^{\circ}$  (C, 1,0127 en cloroformo). Las microcombustiones señalaron la adición de un átomo de oxígeno a la progesterona.

Análisis:

Calculado para monohidroxiprogesterona:	C 76,4	H 9,10
Hallado para U-III	C 76,66	H 8,92

Los análisis infrarrojos de U-III indicaron la presencia de un grupo hidróxi y la molécula básica de la progesterona.

199253

26.-



## Cuadro III

Cromatografía al  $Al_2O_3$  de progesterona transformada por método biológico

Empleando los organismos RH 176 (Rhizopus arrhizus).

	Fracción N <sup>o</sup>	Disolvente	Peso del residuo en mg	Análisis con cromatogramas en papel
5	1	benceno	0	manchas nulas
	2	benceno	182,2	
	3	benceno + 5% éter	128,0	
10	4	benceno + 5% éter	246,6	manchas nulas
	5	benceno + 10% éter	162,9	
	6	benceno + 10% éter	18,0	
	7	benceno + 10% éter	11,2	manchas nulas
15	8	benceno + 50% éter	128,2	
	9	benceno + 50% éter	33,6	
	10	éter	16,1	manchas nulas
	11	éter	15,4	
	12	éter + 5% $CHCl_3$	3,8	
20	13	éter + 5% $CHCl_3$	2,0	
	14	éter + 10% $CHCl_3$	3,4	
	15	éter + 10% $CHCl_3$	3,6	
	16	éter + 50% $CHCl_3$	3,5	
	17	éter + 50% $CHCl_3$	2,1	
	18	$CHCl_3$	2,5	
25	19	$CHCl_3$	222,6)	Fracción A Únicamente una mancha es más polar que la progesterona. Una mezcla de 2 manchas, una similar a la fracción 20, la otra más polar que la fracción 20.
	20	$CHCl_3$ + 5% acetona	167,9)	
	21	$CHCl_3$ + 5% acetona	23,5	
30	22	$CHCl_3$ + 10% acetona	17,3	Solo la mancha que se mueve más lentamente.
	23	$CHCl_3$ + 10% acetona	8,7	
	24	$CHCl_3$ + 50% acetona	30,9	
35	25	$CHCl_3$ + 50% acetona	6,1	Solo la mancha que se mueve más lentamente.
	26	acetona	13,0	
	27	acetona	8,4	
40	28	acetona + 5% MeOH	25,0	
	29	acetona + 5% MeOH	4,6	
	30	acetona + 10% MeOH	7,4	
	31	acetona + 10% MeOH	1,4	
45	32	acetona + 50% MeOH	8,1	
	33	acetona + 50% MeOH	5,3	

199253

37.-



207 1951

5 La posición del grupo hidroxil en U-III se comprobó estar en la posición 11 mediante oxidación de 30 miligramos de U-III en 0,5 mililitros de ácido acético cristalizante, empleando un mililitro de ácido acético cristalizante conteniendo 5 miligramos de óxido crómico y 5 microlitros de agua y dejando la mezcla reposar durante una hora a la temperatura del local. Unas gotas de metanol se agregaron luego y después de 10 minutos el metanol se diluyó a 45 mililitros con agua, se extrajo la disolución con tres porciones de 15 mililitros cada una de cloruro de metileno y luego finalmente se evaporó el cloruro de metileno. El residuo se cristalizó en 0,5 mililitros de metanol con un rendimiento de 19 miligramos de una tricetona U-VI, con punto de fusión de 172-175 grados centígrados y un  $[\alpha]_D^{25} = + 227$  grados en cloroformo, viniendo indicada la estructura de la tricetona por análisis infrarrojos. Otros análisis infrarrojos demostraron que los nuevos grupos cetónicos solo podían estar presentes en las posiciones 1, 7, 11 o 12. No se conoce ningún 1-cetosteroide natural o sintético. Las constantes físicas de la hidroxiprogesterona U-II no coinciden con las de la 12-alfa-hidroxiprogesterona {punto fus. 200-203 grados centígrados;  $[\alpha]_D^{17} = + 205$  grados (c, 1,0 en acetona) (Wettstein, Helv. Chim. Acta 31, 1963 (1945))} o con 12-beta-hidroxiprogesterona { punto fus. 164-167 grados centígrados, después de enfriar funde nuevamente a 195-198 grados centígrados,  $[\alpha]_D^{15} = + 205$  (c, 0,502 en acetona), (Reichstein, C.A. 36, 2261 (1942))} . Esto deja únicamente las posiciones 7 y 11 para el nuevo grupo ceto del compuesto U-VI.

10

15

20

25



199253

5  
10  
15  
20  
25

Una comparación de las constantes físicas indica que la tricetona (compuesto U-VI) es una 11-cetoprogesterona { pun. fus. 172-175 grados centígrados;  $[\alpha]_D^{25} = + 238$  grados  $+ 8^\circ \text{C}$  (C, 0,9 en acetona), (Reichstein, Helv. Chim. Acta 23, 684 (1940); *ibid.* 26, 721 (1942))}. Si se la compara con la 11-ceto-progesterona auténtica mediante análisis infrarrojo (Fig. 1), difracción de rayos X (Fig. 11), cromatografía en papel (técnica de Zaffaroni) y exámen del pun. de fus., se comprueba que el compuesto U-VI es idéntico a la 11-ceto-progesterona auténtica (véase fig. 4).

Las constantes físicas del compuesto U-III no coinciden con las de la 11-beta-hidroxiprogesterona { pun. fus. 187-188 grados centígrados;  $[\alpha]_D^{17} = + 222-225$  grados (C, 1,75 en acetona), (Shoppes y Reichstein, C.A. 36, 2261 (1942))}. Por consiguiente como U-VI demuestra que el oxígeno se ha introducido en la posición 11, U-III debe ser una 11-alfa-hidroxiprogesterona.

20 miligramos del compuesto U-III se acetilaron empleando 0,6 mililitros de piridina y 0,6 mililitros de anhídrido acético. Después de 16 horas a la temperatura del local, se agregaron 25 mililitros de agua. Después de una hora, se enrió la preparación para hacerla cristalizar. Los cristales formados se lavaron con agua y se secaron produciendo 16,1 miligramos de un monoacetato U-V, con un punto de fusión de 175-177 grados centígrados. El análisis infrarrojo indicó la ausencia del grupo hidróxilo y la presencia de un nuevo grupo acetoxi.

Microanálisis elemental:

199253

39.-



NO. 1951

Calculado para monoacetoxiprogesterona:	C	H
	74,0	8,85
Hallado	74,33	8,78

La fig. 3 es una fotografía para comparar las curvas infrarrojas de algunos de los compuestos antes citados.

5

Ejemplo 2.

Oxidación de la progesterona (226 HCH 206 P<sup>B</sup>, 190 GBS 244)

A un cultivo durante 24 horas de los organismos RH 176 (raza *Rhizopus arrhizus*) en 4,0 litros del medio se incorporó un gramo de progesterona en 50 mililitros de acetona, después de una incubación y agitación en presencia de aire durante 24 horas, el caldo de la fermentación se extrajo como se ha descrito en el ejemplo 1. Los extractos de cloruro de metileno se lavaron dos veces con 500 mililitros de bicarbonato sódico al 2% y otras dos veces con 500 mililitros de agua destilada, los extractos reunidos se secaron con un mínimo de sulfato sódico anhidro y 6 mililitros de esta disolución, que representan 2 miligramos de la progesterona primitiva, se utilizaron para los análisis de cromatogramas de papel según Zaffaroni, empleando los disolventes utilizados en el ejemplo 1. Estos análisis indicaron una conversión o transformación elevada en la 11-alfa-hidroxiprogesterona. El extracto remanente de cloruro de metileno se evaporó a sequedad con una corriente de aire. El residuo sólido (1,584 g) se disolvió en 100 mililitros de benceno y se separó por filtración una fracción insoluble (190 GBS 244-2) de 145 miligramos. El punto de fusión de este compuesto era de 190-230 grados centígrados. Un total de 90 miligramos del compuesto U-I, pun. fus. 230-240 grados

10

15

20

25



199253

centígrados, se recuperó como cristales disolviendo la fracción insoluble (145 miligramos) en 20 mililitros de acetona calentando, concentrando la disolución a 10 mililitros y enfriando. Los cristales formados se examinaron luego por el cromatograma de papel de Zaffaroni y presentaron un pun. de fus. que indicaba ser un compuesto dihidroxi, o sea el compuesto U-I. El filtrado, que contenía 1,439 gramos de sólidos, se cromatografió sobre la columna de alúmina ( $Al_2O_3$ ) (cuadro IV) por la técnica descrita en el ejemplo 1, empleando porciones de 100 mililitros de disolventes para desarrollar la columna. La fracción B de la separación cromatográfica (cuadro IV) conteniendo 571 miligramos de la 11-alfa-hidroxiprogesterona (compuesto U-III) se disolvió en 20 mililitros de metanol, se agregaron a la disolución 20 mililitros de agua, se calentó la disolución y luego se enfrió en un refrigerante.

5

10

15

199253

Cuadro IV

41.-



1951

Cromatografía en  $Al_2O_3$  de progesterona biológicamente transformada

Utilizando organismos RH 176 (*Rhizopus arrhizus*)

Fracción Nº	Disolvente	Peso del residuo en mg	Análisis en papel cromatográfico
1	benceno	208	
2	benceno	12	
3	benceno + 5% éter	4	
4	benceno + 5% éter	14	
5	benceno + 10% éter	37	
6	benceno + 10% éter	19	
7	benceno + 50% éter	7	
8	benceno + 50% éter	19	
9	éter	4	
10	éter	16	
11	éter + 5% $CHCl_3$	8	
12	éter + 5% $CHCl_3$	4	
13	éter + 10% $CHCl_3$	0	
14	éter + 10% $CHCl_3$	0	
15	éter + 50% $CHCl_3$	4	
16	éter + 50% $CHCl_3$	2	
17	$CHCl_3$	11)	
18	$CHCl_3$	265)	Fracción B
19	$CHCl_3$ + 5% acetona	265)	
20	$CHCl_3$ + 5% acetona	60)	
21	$CHCl_3$ + 10% acetona	16)	Unica mancha de 11-alfa-hidroxi progesterona U-III, más trazas de otros tres compuestos más lentamente móviles.
22	$CHCl_3$ + 10% acetona	22	Mezcla de dihidroxiprogestero- na U.D. y dos compuestos más polares.
23	$CHCl_3$ + 50% acetona	27	
24	$CHCl_3$ + 50% acetona	37	Fracción 24 la misma que fracción 22, pero 2 manchas más débiles y una tercera y cuarta más fuertes.
25	acetona	29	
26	acetona	43	
27	acetona + 5% MeOH	16	
28	acetona + 5% MeOH	24	Fracción 26 compuesto menos polar que las dos manchas en fracción 22, pero más po- lar que 11-alfa-hidroxi pro- gesterona, U-III.
29	acetona + 10% MeOH	4	
30	acetona + 10% MeOH	0	
31	acetona + 50% MeOH	1	
32	acetona + 50% MeOH	23	
33	MeOH	9	

199253

42.-



Cuadro V 1ª parte

Fermentación

5

Ensayos	Progesterona agregada mg	Vol. del medio litros	Duración incubación horas	Designación
266HCM179	1000	4	48	219DHP95
266HCM195	1200	4	67	299BJM195
266HCM206PA	1000	4	24	229RBO60
266HCM206PB	1000	4	30	190GBS244
266HCM212	3000	10	24	229RBO63

10

Cuadro V 2ª parte

Fracciones obtenidas en la columna  $Al_2O_3$ :

15

Ensayo	Progesterona mg	11-alfa-hidroxi- progesterona U-III mg	dihidroxi- progesterona U-I mg	Otros pro- ductos transfor- mación
266HCM179	0	391	142	18
266HCM195	0	507	222	95
266HCM206PA	0	571	225	94
266HCM206PB	0	471	265	120
266HCM212		1520	1260	76

20

199253

43.-



1951

5 Se agregaron otros 20 mililitros de agua y se continuó la refrigeración. Se produjo cristalización y se recuperaron 300 miligramos de cristales secos de 11-alfa-hidroxi-progesterona (compuesto U-III) con punto de fusión de 165-166 grados centígrados.

Un resumen de cierto número de bio-oxidaciones se presenta en el cuadro V.

Ejemplo 3.

Oxidación de progesterona (266 HCM 218,358 VRS 5).

10 Un mililitro de una suspensión salina fisiológica esteril de las esporas (conidia) de una placa de cultivo de malta, agar y edamina de 10 mililitros (cultivo durante cinco  
15 dias) se utilizó para inocular un medio esteril de 150 mililitros de 2 % de edamina, 5 % de dextrosa, y 5 % de agua de maceración de maíz, y agua de cañería. Este cultivo de 150 mililitros se agitó y aireó sacudiéndolo durante 24 horas para favorecer el crecimiento rápido y enérgico vegetativo. 100 mililitros de este cultivo vegetativo se agregaron a 4 litros de un medio esteril que por sacudimiento se aireó y agitó durante  
20 te 24 horas, después se agregaron 4 gramos de progesterona en 40 mililitros de metanol y se continuó la aireación. Después de 24 horas y 45 minutos, se eliminó el medio por extracción con cloruro de metileno como se ha descrito en el ejemplo 1, empleando un total de 4 litros de cloruro de metileno. Se elaboró la disolución de cloruro de metileno y se concentró obteniendo 4,38 gramos de residuo. Este material se cromatografió como antes se ha descrito en el ejemplo 1 dando las si-

25

199253

44.-



1951

güientes fracciones (358 VRS 5):

<u>Fracciones</u>	<u>Composición</u>	<u>Peso en g</u>
insol. en benceno	dihidroxiprogesterona (U-I)	0,635
14-16	progesterona	0,694
20-22	11-alfa-hidroxiprogesterona (U-III)	1,994
23-25	colas (Comp. mono + dihidroxi)	0,437

La fracción 11-alfa-hidroxiprogesterona (U-III) se disolvió en 15 mililitros de metanol caliente, se agregaron 2 mililitros de agua y se filtró la disolución. Después de enfriar durante la noche, se recogieron 1,15 gramos de producto cristalino con pun. fus. 163-166 grados centígrados. El rendimiento en (U-III) 11-alfa-hidroxiprogesterona cristalina fué de 29 % (279 BJM 205). También se obtuvo otra pequeña cantidad de cristales.

Ejemplo 4.

Oxidación de 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona (S) en la posición 11.

Empleando un cultivo de RH 176 (Rhizopus arrhizus) continuado durante 16 horas se incubó 1,0 gramos del compound S en 50 mililitros de metanol durante 4 horas a la temperatura del local (266 HCM 213) en presencia de aire.

El medio de fermentación con un pH de 3,8, se extrajo con una porción de 2 litros de cloruro de metileno y sucesivamente con tres porciones cada una de un litro del mismo cloruro. Los extractos se reunieron y lavaron dos veces cada vez con 500 mililitros de disolución de bicarbonato sódico.

**199253**

co al 2%. Los extractos de cloruro de metileno se reunieron y lavaron dos veces cada vez con porciones de 500 mililitros de agua destilada. Los extractos de cloruro de metileno reunidos y lavados se privaron luego de agua con un mínimo de sulfato sódico anhidro y luego se privó del cloruro de metileno por una corriente de aire. Una pequeña porción alicuota de residuo se sometió al análisis del papel cromatográfico con el resultado de que apareció una nueva mancha ligeramente móvil junto con otra (349 SHE 3z). El total del residuo sólido, con peso de 1,5286 gramos se disolvió en benceno y cromatografió sobre  $Al_2O_3$  como se indica en el cuadro VI. Una de las manchas lentamente móviles resaltó en la fracción C del cromatograma y se utilizó para separar por cristalización un compuesto diferente del material de partida, compound S. La fracción C con peso 376,5 miligramos se disolvió en 2 mililitros de metanol caliente y se filtró. Empleando una corriente de nitrógeno se redujo el volúmen a 1,5 mililitros, con lo que se formaron cristales. Estos pesaban 152 miligramos y tenían un punto de fusión de 198 a 210 grados centígrados. Recristalizando en un mililitro de metanol caliente se produjeron 35,6 miligramos con punto de fusión 223-226 grados centígrados. La recristalización de este último producto dió cristales puros fundentes a 222-225 grados centígrados (319 DHP III). Este compuesto se oxidó en la posición 11 del núcleo esteroide.

199253

46.-



	<u>C</u>	<u>H</u>
Análisis: calculado para 17-hidroxi- corticosterona:	69,5	8,28
319 DHP 114,5 hallado:	69,66	8,20

Ejemplo 5.

5 Oxidación de 17-alfa-hidroxiprogesterona en la posición 11.

Utilizando un cultivo continuado 24 horas de RH 176 (raza de Rhizopus arrhizus) se incubó 1,0 gramos de 17-alfa-hidroxiprogesterona en 50 mililitros de metanol durante 48 horas a la temperatura del local y en presencia de aire (266 HCM 214).

10

Se extrajo el medio de fermentación (pH 3,6) con 2 litros de cloruro de metileno y luego sucesivamente con tres porciones cada una de un litro del mismo disolvente. Los extractos se reunieron y lavaron dos veces con 500 mililitros de una disolución de bicarbonato sódico al 2%. Luego se reunieron los extractos de cloruro de metileno y se lavaron dos veces, cada vez con 500 mililitros de agua destilada. Después los extractos de cloruro de metileno reunidos y lavados se privaron de agua con un mínimo de sulfato de sodio y después se privaron del cloruro de metileno por destilación al vacío. Una pequeña fracción alícuota del residuo presentó tres manchas diferentes de 17-alfa-hidroxiprogesterona en las tiras de papel cromatográfico (349 SHE 36-38). Toda la porción sólida de 1,8849 gramos se disolvió en benceno y se cromatografió con  $Al_2O_3$  como se indica en el cuadro VII. Una de las manchas sobresalía en la fracción B y las porciones sólidas, 307 miligramos, se cristalizaron en un mililitro

15

20

25

199253

47.-



de metanol caliente. Después de enfriar se obtuvieron 61 miligramos de cristales rudentes a 178-210 grados centígrados. La recristalización en 0,5 mililitros de metanol produjo 25 miligramos de cristales, con pun. fus. 219-222 grados centígrados. Por nueva cristalización se obtuvieron cristales puros con un punto de fusión de 220-223 grados centígrados (319 DHP 111). Este compuesto estaba oxigenado en la posición 11 del núcleo esteroide.

5

	<u>C</u>	<u>H</u>
Análisis; calculado para 11,17-dihidroxi-progesterona	72,8	8,60
319 DHP 112.3 hallado	73,01	8,65

.. 10

..

199253

Cuadro VI

48.-



Cromatografía por  $Al_2O_3$  de 11-desoxi-17-hidroxycorticosterona  
(S) biológicamente transformada

Empleando organismos RH 176 (Rhizopus arrhizus)

5	Fracción Nº	Disolvente	Peso del resí- duo en mg	Análisis cromatogra- mas papel
	1	benceno	281,5	
	2	benceno	47,9	
	3	benceno + 5% éter etílico	78,4	
10	4	benceno + 5% éter etílico	58,5	
	5	benceno + 10% éter etílico	12,0	
	6	benceno + 10% éter etílico	0,8	
	7	benceno + 10% éter etílico	2,3	
	8	benceno + 50% éter etílico	4,2	
15	9	benceno + 50% éter etílico	5,6	
	10	éter	7,0	
	11	éter	7,6	
	12	éter + 5% $CHCl_3$	21,6)	manchas nulas
	13	éter + 5% $CHCl_3$	39,9)	manchas nulas
20	14	éter + 10% $CHCl_3$	32,5) A	manchas nulas
	15	éter + 10% $CHCl_3$	15,7)	manchas nulas
	16	éter + 50% $CHCl_3$	7,9	
	17	éter + 50% $CHCl_3$	15,2)	
	18	$CHCl_3$	76,2)	manchas nulas
25	19	$CHCl_3$	53,3) B	manchas nulas
	20	$CHCl_3$ + 5% acetona	20,1)	manchas nulas
	21	$CHCl_3$ + 5% acetona	6,4	
	22	$CHCl_3$ + 10% acetona	3,6	
	23	$CHCl_3$ + 10% acetona	2,2	
30	24	$CHCl_3$ + 50% acetona	7,5	
	25	$CHCl_3$ + 50% acetona	9,0	
	26	acetona	22,5)	
	27	acetona	19,1)	
	28	acetona + 5% metanol	62,9)	mancha lentamente
	29	acetona + 5% metanol	43,7)	móvil
35	30	acetona + 10% metanol	46,1)	mancha lentamente
	31	acetona + 10% metanol	27,8)	móvil
	32	acetona + 50% metanol	44,4)	mancha lentamente
	33	acetona + 50% metanol	14,1)	móvil

199253

49.-



1951

## Cuadro VII

Cromatografía por  $Al_2O_3$  de 17-alfa-hidroxiprogesterona biológicamente transformada

Empleando organismos RH 176 (Rhizopus arrhizus)

5	Fracción N <sup>o</sup>	Disolvente	Peso del residuo en mg	Análisis cromatogramas papel	
	1	benceno	357,8	manchas nulas	
	2	benceno	46		
	3	benceno + 5% éter etílico	5		
10	4	benceno + 5% éter etílico	14 )	17-alfa-hidroxi-progesterona	
	5	benceno + 10% éter etílico	19 )		
	6	benceno + 10% éter etílico	17,7)		
	7	benceno + 10% éter etílico	12,2)		
15	8	benceno + 50% éter etílico	41,4)		
	9	benceno + 50% éter etílico	58,7) A		
	10	éter	72,3)		
	11	éter	72,2)		
	12	éter + 5% $CHCl_3$	47,9)		
	13	éter + 5% $CHCl_3$	28,2)		
20	14	éter + 10% $CHCl_3$	13,5)		
	15	éter + 10% $CHCl_3$	10,5)		
	16	éter + 50% $CHCl_3$	8,6)		
	17	éter + 50% $CHCl_3$	12,9)		
	18	$CHCl_3$	54,2)		
25	19	$CHCl_3$	144,3)		Una mancha y traza de 17-alfa-hidroxi-progesterona
	20	$CHCl_3$ + 5% acetona	87,9) B		
	21	$CHCl_3$ + 5% acetona	20,2)		
	22	$CHCl_3$ + 10% acetona	52,6)	Contenía dos manchas	
	23	$CHCl_3$ + 10% acetona	16,2)		
30	24	$CHCl_3$ + 50% acetona	54,0)		
	25	$CHCl_3$ + 50% acetona	45,0)		
	26	acetona	126,1)		
	27	acetona	61,9)		
	28	acetona + 5% metanol	61,2) C		
35	29	acetona + 5% metanol	27,8)		
	30	acetona + 10% metanol	21,3)		
	31	acetona + 10% metanol	10,9)		
	32	acetona + 50% metanol	25,4)		
	33	acetona + 50% metanol	6,8)		

199253

50.-



Ejemplo 6.

Oxidación de 11-desoxicorticosterona.

Empleando un cultivo de RH 176 (*Rhizopus arrhizus*) continuado durante 64 horas, se incubó a la temperatura del local durante 54 horas un gramo de 11-desoxicorticosterona en 4,0 litros del medio (266 HCH 186). El líquido de fermentación y los micelios se extrajeron sucesivamente con una porción de dos litros y tres porciones cada una de un litro de cloruro de metileno. Se reunieron los extractos de cloruro de metileno y se lavaron con dos porciones de 500 mililitros de disolución acuosa al 2% de bicarbonato sódico y finalmente con dos porciones de 500 mililitros de agua destilada. Se concentró a sequedad el extracto de cloruro de metileno mediante una corriente de aire y el residuo sólido se recogió en 50 mililitros de cloruro de metileno. La disolución se transportó a un recipiente de cristal de 100 centímetros cúbicos y se evaporó mediante una corriente de aire. El residuo sólido con peso de 1,4218 gramos se disolvió en benceno y cromatografió en alúmina ( $Al_2O_3$ ) como se representa en el cuadro VII A. La fracción B indicaba la formación de tres componentes de movimiento lento, predominando una de las manchas. Una porción de esta fracción demostró actividad biológica, y señaló una transformación de aproximadamente el 5% con referencia a la corticosterona en el ensayo hecho según la prueba de glicógeno de hígado de rata por el método de Papst y colaboradores, *Endocrinology*, 41, 55, (1947). El material restante, 200 miligramos, se recristalizó en un mililitro de metanol

199253

51.-



AGO 1953

para dar 26 miligramos de cristales fundentes a 180-189 grados centígrados. Recristalizado este material por dos veces dió 8 miligramos de cristales fundentes a 190-192 grados centígrados. El análisis infrarrojo señaló la adición de un grupo hidroxil a la 11-desoxicorticosterona por la acción del organismo RH 176 (319 DHP 106, 326 MIU 61 y 78, 365 DAL 2,4). El compuesto 11-desoxicorticosterona se oxigenó en la posición 11 por la acción del organismo RH 176.

5

# 199253

52.-



Cuadro VII A

Cromatografía por Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 11-desoxicorticosterona transformada biológicamente

Empleando organismos RH 176 (Rhizopus arrhizus)

5	Fracción Nº	Disolvente	Peso del resí- duo en mg	Análisis cromatogramas papel
	1	éter	230,3)	
	2	éter	155,0)	
	3	éter	15,8)	
10	4	éter + 10% CHCl <sub>3</sub>	8,0)	
	5	éter + 10% CHCl <sub>3</sub>	2,5)	
	6	éter + 10% CHCl <sub>3</sub>	1,5)	
	7	éter + 50% CHCl <sub>3</sub>	2,1)	
	8	éter + 50% CHCl <sub>3</sub>	2,8)	
	9	éter + 50% CHCl <sub>3</sub>	3,9)	A
.. 15	10	CHCl <sub>3</sub>	5,8)	
	11	CHCl <sub>3</sub>	228,6)	
	12	CHCl <sub>3</sub>	114,2)	
..	13	CHCl <sub>3</sub> + 5% acetona	42,7)	
	14	CHCl <sub>3</sub> + 5% acetona	17,9)	
20	15	CHCl <sub>3</sub> + 5% acetona	14,6)	
	16	CHCl <sub>3</sub> + 10% acetona	10,8)	
	17	CHCl <sub>3</sub> + 10% acetona	7,4)	
	18	CHCl <sub>3</sub> + 10% acetona	5,9)	
	19	CHCl <sub>3</sub> + 50% acetona	15,8)	
25	20	CHCl <sub>3</sub> + 50% acetona	8,7)	
	21	CHCl <sub>3</sub> + 50% acetona	24,5)	
	22	acetona	32,1)	
	23	acetona	14,4)	B
	24	acetona	9,9)	Tres componen- tes lentamente móviles.
30	25	acetona + 5% metanol	34,0)	
	26	acetona + 5% metanol	22,3)	
	27	acetona + 5% metanol	13,8)	
	28	metanol	73,8)	
	29	metanol	25,6)	
35	30	metanol	15,6)	

199253

53.-



Ejemplo 7.

Oxidación de progesterona (266 HCM 199/150 T).

150 miligramos de progesterona en unos tres mililitros de acetona se agregaron a 150 mililitros del medio (descrito anteriormente), conteniendo 60 miligramos de Tween 40 al tiempo de inocular con esporas con RH 176. Después de 72 horas se había efectuado la conversión completa y aproximadamente el 30 % de la transformación fué en 11-alfa-hidroxiprogestero-  
na (compuesto U-III), como se comprobó mediante un cromatograma de papel 349 4OP<sub>4</sub> utilizando para demostrar el aprovechamiento de la progesterona un sistema disolvente de carbitol-metilciclohexano y otro sistema de tolueno-propileno-  
glicol para comprobar el grado y el tipo de la transformación.

Ejemplo 8.

Oxidación de progesterona (266 HCM 199 OCl).

Un cultivo de RH 176 continuado con aireación durante cinco días en 150 mililitros del medio se incubó, después de agregar 150 miligramos de progesterona en tres mililitros de acetona, siendo la concentración de un miligramo por mililitro. Después de 32 horas no quedaba progesterona y se había completado la transformación en los compuestos U-I y U-III, siendo la conversión en U-III, 11-alfa-hidroxiprogestero-  
na, de unos 50 % como se comprobó por el cromatograma de papel 363 MIU 21, utilizando para demostrar el aprovechamiento de la progesterona un sistema disolvente de carbitol-metilciclohexano y para determinar el grado y el tipo de la trans-

199253

54.-



formación un sistema de propilenoglicol-tolueno.

Ejemplo 9.

Oxidación de progesterona (266 HCM 206 PB, 279 BJM 198, 329 RBO 60).

5 De modo análogo, un cultivo de RH 176 continuado durante 41 horas se aireó durante 30 horas con un gramo de progesterona, incorporado en 40 mililitros de acetona y por extracción del líquido de fermentación y de los micelios se obtuvo un rendimiento de 47 % de 11-alfa-hidroxiprogesterona (compuesto U-III). El rendimiento en compuesto dihidroxi (U-I) fué de unos 26,5 por ciento, habiéndose determinado los rendimientos después de la separación por cromatografía en una columna de alúmina y antes de la recristalización. Estos productos se recristalizaron por el procedimiento del ejemplo 1 para obtener elevados rendimientos de los dos compuestos.

Ejemplo 10.

Oxidación de progesterona (266 HCM 212/300 B).

20 300 miligramos de progesterona en unos tres mililitros de acetona se incorporaron a 150 mililitros de un cultivo de RH 176 continuado durante veinticuatro horas y el cultivo se aireó durante 24 horas. La conversión de progesterona en 11-alfa-hidroxiprogesterona (compuesto U-III) fué próximamente de 60 %, corregido por lo que respecta a la progesterona no transformada, se determinó por el cromatograma de papel 349 SHE 44P<sub>1</sub>, un rendimiento total de unos 37 %, empleando para descubrir la progesterona un sistema disolvente de carbitol-metilciclohexano y para diferenciar los productos

199253

55.-



de la conversión, un sistema de tolueno-propilenoglicol.

Ejemplo 11.

Oxidación de progesterona (266 HCM 199/300 T).

5        Se repitió el anterior ejemplo empleando 150 mililitros del medio, inoculando con RH 176 y agregando 300 miligramos de progesterona en tres mililitros de acetona. La concentración era de dos gramos por litro del medio. Aun después de 72 horas pudo comprobarse mediante el cromatograma de papel 349 SHE 44P<sub>2</sub> y observando el crecimiento del cultivo, que la progesterona agregada podía seguir transformándose, pero que 10        los rendimientos en U-III y U-I eran más pequeños que de ordinario. De igual modo, la adición de progesterona al medio de cultivo, a) al tiempo de la inoculación primera del medio con RH 176, b) 24 horas después de la inoculación, y c) cinco días 15        después de la inoculación del medio, no originó variación importante en el tipo o clase de los compuestos producidos, expresamente computándose en todos los casos la presencia de dihidroxiprogesterona U-I y 11-alfa-hidroxiprogesterona U-III.

Ejemplo 12.

20        Oxidación de 11-desoxicorticosterona (266 HCM 204 DR).

      Se repitió el procedimiento del ejemplo 1 con un cultivo de RH 176 continuado durante 24 horas y se obtuvieron algunos compuestos nuevos oxigenados en posición 11, como pudo 25        comprobarse por el cromatograma de papel según Zaffaroni empleando como fase estacionaria éter dietileno-glicol-monoetílico, y como fase móvil, metilciclohexano (363 MIU 22).

Ejemplo 13.

Oxidación de 3-hidroxipregnano-20-ona en la posición 11.

Del mismo modo que se ha indicado anteriormente para oxigenar la 17-alfa-hidroxiprogesterona en la posición 11 del núcleo esteroide, se oxigenó la 3-hidroxipregnano-20-ona en la posición 11 del núcleo exponiéndola a la acción del cultivo de RH 176, una raza de *Rhizopus arrhizus*.

Ejemplo 14.

Oxidación de los esteroides en la posición 11.

Del mismo modo que se ha indicado anteriormente en los ejemplos precedentes, se oxidaron en la posición 11 los siguientes esteroides, habiéndose señalado en el siguiente cuadro los datos exactos:

1.	Ensayo	266 HCM 214
	Organismos	RH 176 <i>Rhizopus arrhizus</i>
	Duración del cultivo:	24 horas
	Esteroides:	17-hidroxiprogesterona
	Cantidad de esteroide	1 g en 60 cm <sup>3</sup> de acetona
	Cantidad del medio:	4 litros, pH 5,9 después de la esterilización, pH 3,9 después de la reacción
	Duración reacción:	24 horas con aireación
	Resultados (por cromatografía):	

Tres componentes principales, dos más rápidamente móviles que U-I, y uno coincidente posiblemente con U-I. Todos tres en cantidades aproximadamente iguales. Un cuarto componente pequeño sobre U-I. Todos los componentes análogos

199253

57.-



a los producidos de progesterona. No quedó 17-hidroxiprogeste-  
rona. Sistema disolvente propilenoglicol-tolueno (349 SHE 36)  
utilizando una mancha de 300 gamma. El cromatograma de papel  
de la mancha de 160 gamma de la fracción  $Al_2O_3$  señala en el  
extracto crudo 3 componentes principales, uno en posición U-I,  
dos más rápidamente móviles que U-I y un componente pequeño  
de movimiento más lento que U-I. Una separación parcial de los  
tres materiales puede apreciarse en la columna  $Al_2O_3$ .

2. Ensayo; 266 HCM 213  
Organismos; RH 176 Rhizopus arrhizus  
Duración cultivo; 24 horas  
Esteroides; 17-hidroxi-11-desoxicorticosterona (S)  
Cantidad esteroide; 1 g en 60 cm<sup>3</sup> de acetona  
Cantidad medio; 4 litros  
Duración reacción; 28 horas con aireación  
Resultados (por cromatografía):

Todo el compound S se consumió en 28 horas. A las  
16 horas quedaba aproximadamente un tercio de S. Unos 25 % de  
la transformación en la región F y algunos compuestos más  
próximos al origen que F. Sistema disolvente propilenoglicol-  
tolueno. El cromatograma de papel de una mancha de 160 gamma  
de una fracción del cromatograma <sup>en</sup>  $Al_2O_3$  coincide con el cromato-  
grama del extracto crudo demostrando que el componente prin-  
cipal es distinto al S y que es un material que se mueve más  
lentamente que el compound F (349 SHE 32).

199253

58.-



3. Ensayo: 266 HCM 198 HP2  
Organismos: RH 176 Rhizopus arrhizus  
Duración cultivo: 48 horas  
Esteroides: 17-hidroxiprogesterona  
5 Cantidad esteroide: 2 mg en 0,1 cm<sup>3</sup> de acetona  
Cantidad medio: 0,01 litros, pH 4,05 después de la reacción  
Duración reacción: 44 horas con aireación.

Resultados (por cromatografía):

10 Sistema disolvente propilenoglicol-tolueno. Cinco componentes, tres grandes y dos pequeños. Una pequeña cantidad del material se mueve incluso más lentamente que la dihidroxiprogesterona (U-I). Una cantidad media del cual parece ser U-I. Grandes cantidades de dos materiales se mueven algo  
15 más rápidamente que U-I. Este cromatograma confirma el ensayo anterior 266 HCM 214 (349 SHE 22).

4. Ensayo: 266 HCM 187  
Organismos: RH 176 Rhizopus arrhizus  
20 Duración cultivo: 27 horas  
Esteroides: androstendiona  
Cantidad esteroide: 1 g en 60 cm<sup>3</sup> acetona  
Cantidad medio: 4 litros  
Duración reacción: 64 horas con aireación

25 Resultados (por cromatografía):

Sistema disolvente, propilenoglicol-tolueno. Toda la androstendiona se convirtió en tres sustancias (326 MIU 62), todas más polares que la progesterona. El cromatograma Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

199253

69.-



AGO. 1950

10 (326 MIU 79) demuestra la presencia de tres fracciones. La fracción D dió cristales con punto de fusión 205-208, que conservaban los grupos dieno y ceto, como se demostró por el análisis ultravioleta.

5

5.      Ensayo:                                   266 HCM 209 SA  
          Organismos:                           RH 176 Rhizopus arrhizus  
          Duración cultivo:                   46 horas  
          Esteroides:                           acetato de 11-desoxi-17-hidroxi-  
  corticosterona (acetato S)  
          Cantidad esteroide:               1 g en 60 cm<sup>3</sup> de acetona  
          Cantidad medio:                    4 litros, al final pH = 3,85  
          Duración reacción:                49 horas con aireación  
          Resultados (por cromatografía):

10

15    Sistema disolvente propilenoglicol-tolueno. Una sustancia que se mueve un poco más lentamente que la 17-hidroxicorticosterona. También alguna en la región de 11-desoxicorticosterona. (349 SHE 31).

15

6.      Ensayo:                                   266 HCM 178 E  
          Organismos:                           RH 176 Rhizopus arrhizus  
          Duración cultivo:                   24 horas  
          Esteroides:                           ergosterol  
          Cantidad esteroide:                210 mg en 25 cm<sup>3</sup> acetona  
          Cantidad medio:                    1050 cm<sup>3</sup>  
          Duración reacción:                52 horas con aireación.

20

Resultados (por cromatografía):

25    300 miligramos de material sólido extraído del líquido de fermentación. Mas soluble en metanol que el

25

199253

60.-



ergosterol.

7. Ensayo: 266 HCM 198 DA2  
Organismos: RH 176 Rhizopus arrhizus  
Duración cultivo: 48 horas  
5 Esteroides: acetato de 11-desoxicorticosterona  
Cantidad esteroide: 2 mg  
Cantidad medio: 10 cm<sup>3</sup>  
Duración reacción: 44 horas con aireación  
Resultados (por cromatografía):

10 Sistema disolvente, propilenglicol-tolueno. Seis componentes. 12,5 % encima de la posición de F (más cerca del principio), 1,5 % en la posición de F, 6 % por bajo de la posición de F, 2,5 % en la posición de E, 37,5 % por bajo de E, 40,5 % por bajo E pero encima de S. 100 % de transformación.  
15 Se consumió toda la 11-desoxicorticosterona, comprobación por el sistema carbitol-metilciclohexano (349 SHE 21).

8. Ensayo: 266 HCM 198 D2  
Organismos: RH 176 Rhizopus arrhizus  
Duración cultivo: 48 horas  
20 Esteroides: 11-desoxicorticosterona  
Cantidad esteroide: 2 mg  
Cantidad medio: 10 cm<sup>3</sup>  
Duración reacción: 44 horas con aireación  
Resultados (por cromatografía):

25 Sistema disolvente, propilenglicol-tolueno, Aproximadamente el 76 % de transformación. Seis componentes. 10 % de un componente con movimiento más lento que F, 1,5 % en

199253

61.-



posición de F, 0,5 % con movimiento algo más rápido que F, 2,5 % en posición de E, 30 % de un compuesto que se mueve por bajo de E, 31 % de un compuesto que se mueve más por debajo E, pero por encima S. (266 SHE 21).

- 5 9. Ensayo: 266 HCM 198 S-2  
Organismos: RH 176 Rhizopus arrhizus  
Duración cultivo: 48 horas  
Esteroides: 11-desoxi-17-hidroxicorticostero-  
na (S)  
Cantidad esteroide: 2 mg  
10 Cantidad medio: 10 cm<sup>3</sup>  
Duración reacción: 44 horas con aireación  
Resultados (por cromatografía):

15 Sistema disolvente propilenglicol-tolueno. Cinco componentes. 13 % de transformación. Aproximadamente 13 % por encima de F, 1,5 % en la posición de F, 2,5 % en la posición de E y unas trazas por bajo de E. (349 SHE 25).

- 20 10. Ensayo: 266 HCM 198 S4  
Organismos: RH 176 Rhizopus arrhizus  
Duración cultivo: 48 horas  
Esteroides: 11-desoxi-17-hidroxicorticoste-  
rona (S)  
Cantidad esteroide: 2 mg  
Cantidad medio: 10 cm<sup>3</sup> + 10 mg Tween 40 en 0,1 cm<sup>3</sup>  
de etanol  
Duración reacción: 44 horas con aireación  
Resultados (por cromatografía):

25 Sistema disolvente propilenglicol-tolueno. 13 % aproximadamente de transformación y rendimiento. 10 % por

199253

62.-



encima de F, 1,6 % en la posición de F, 1,6 % proxicamente en posición de E y unas trazas por bajo de E. (349 SHE 26).

- 5
11. Ensayo: 266 HCM 198 SA4
- Organismos: RH 176 Rhizopus arrhizus
- Duración cultivo: 48 horas
- Esteroides: acetato de 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona (acetato S)
- Cantidad esteroide: 2 mg
- Cantidad medio: 10 cm<sup>3</sup> + 10 mg Tween 40 en 0,1 cm<sup>3</sup> de etanol
- Duración reacción: 44 horas con aireación
- 10 Resultados (por cromatografía):

Sistema disolvente, propilenglicol-tolueno. 10 % de conversión. Unos 7 % por encima de F, 1,3 % en la posición de F, unos 0,4 % en la posición de E, 0,4 % por bajo de E. (349 SHE 26).

- 15
12. Ensayo: 266 HCM 217 MuS
- Organismos: Mucor Mucedo (tipo cultivo americano n<sup>o</sup> 9836)
- Duración cultivo: 24 horas
- 20 Esteroides: 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona (S)
- Cantidad esteroide: 50 mg
- Cantidad medio: 150 cm<sup>3</sup>
- Duración reacción: 20 horas con aireación
- Resultado (por cromatografía):

25 Sistema disolvente, propilenglicol-tolueno. Con la corrección del 33 % proxte. del S que no reaccionó, se obtuvo 23 % de un compuesto con movimiento algo más rápido que E,



199253

63.-

un 26 % de un compuesto con movimiento más lento que F y unos 5 % en la posición de F. (349 SHE 48).

Ejemplo 15.

Oxidación de esteroides en la posición 11 (266 HCM 219).

500 mililitros del medio de cultivo usual, conteniendo 2 % de "Edamine", 5 % de dextrosa y el líquido de maceración de maíz con un pH de 6,5, se inoculó con esporas del organismo RH 176 (raza de *Rhizopus arrhizus*) y se agitó durante 24 horas con aireación. De este medio de cultivo se introdujeron muestras de 20 cm<sup>3</sup> cada una en frascos estériles de 100 mililitros y a cada una de estas muestras se agregaron aproximadamente 6 miligramos de los siguientes esteroides, disueltos en un máximo de 0,3 mililitros de acetona para obtener una fina suspensión del esteroide en el medio de cultivo. Después de 24 horas se extrajo el contenido de los frascos para determinar los cambios mediante cromatogramas de papel. El siguiente cuadro señala los esteroides tratados y las referencias a los cromatogramas de las figuras adjuntas.

5

10

15

17 AGO



# 199253

## Quadro VIII

	<u>Esteroides</u>	<u>Prueba</u>	<u>*pH final</u>	<u>Cromatograma</u>
	1. Androstendiona	AR	3,75	349 SHE 70-3
	2. Colestenona	OR	4,12	349 SHE 70-2
5	3. Ergosterona	OR	3,9	349 SHE 70-1
	4. Ergosterol	ER	3,6	349 SHE 70-4
	5. Acetato de 21-aceto- xipregnenolona	APA	3,75	
10	6. Acetato de pregne- nolona	PA	3,9	*Exactamente antes de la extracción
	7. Estigmastadienona	S	3,4	
	8. Bis-óxido del aducto de anhídrido maléico a anhídrido ergosterol	AP	3,85	
15	9. Aducto del anhídrido maléico a la 3-aceto- xi-5,7,9-(11)-pregna- trien-20-ona	ZOL	3,8	

Estos compuestos se oxigenaron todos en la posición once del núcleo esteroide por la acción de RH 176.

### Ejemplo 16.

Oxidación de progesterona en la posición once (266 HCM 220 V).

Un mililitro de una suspensión de 10 mililitros salina de esporas de un cultivo inclinado de RH 176 (raza Rhizopus arrhizus) se empleó para inocular 150 mililitros del caldo esteril usual de "edamine", glucosa y agua de maceración de maíz, y agua de cañería. Después de 24 horas de agitación, se emplearon 5 mililitros del cultivo para inocular 150 mililitros de un medio esteril con la siguiente composición; 0,3



1951

65.-

**199253**

gramos de fosfato ácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1,5 gramos de nitrato amónico ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), 0,25 gramos de heptahidrato de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) completando con agua de tubería hasta un litro. Después de la esterilización a una temperatura de

5

Después de un periodo de aireación de 24 horas, que dió por resultado un fuerte crecimiento, se agregaron al cultivo 60 miligramos de progesterona, empleando 3 mililitros de metanol para disolver el esteroide. Después de otras 24 horas de aireación, el caldo de fermentación se extrajo con cloruro de metileno. Según se demostró por los cromatogramas de tiras de papel (349 SHE 53), la conversión en 11-alfa-hidroxiprogesterona (U-III) y en derivados más altamente oxigenados era considerable. El material extraído (U-III) era de estructura cristalina y estaba más debilmente coloreado que cuando se utilizó un medio más complejo.

10

15

#### Ejemplo 17.

Oxidación de esteroides en la posición once.

Los organismos empleados se cultivaron en un medio conteniendo 20 gramos de "edamina", 5 mililitros de agua de maceración de maiz, 50 gramos de dextrosa y agua de cañería hasta completar un litro, se ajustó el pH a 6,5 y luego se esterilizó a 120 grados centígrados durante aproximadamente 20 minutos.

20

Los cultivos se inocularon con cultivos inclinados, cubiertos de muchas esporas y conteniendo 10 % de extracto de malta seca y 2 % de agar. Los frascos contuvieron generalmente

25

199253

66.-



30. 1951.

30 mililitros del medio cada uno.

5 Los balones o frascos se agitaron con aireación durante 24 horas a la temperatura del local. Luego cierta cantidad de los esteroides se incorporó en forma de una disolución de 2 % en peso por volúmen de acetona y los frascos se siguieron agitando a la temperatura del local durante otras 24 horas. Se emplearon 6 miligramos de esteroide por 30 mililitros del medio.

10 La mezcla de fermentación conteniendo la solución del medio de cultivo, el esteroide y los organismos se extrajo tres veces con cloruro de metileno, empleando un volúmen de disolvente igual al volúmen de la fase acuosa. El extracto se separó en un embudo separador de la fase acuosa, se lavó con disolución de bicarbonato sódico al 2 % y con agua destilada. El disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se analizó por cromatografía de tiras de papel. Los esteroides empleados se oxidaron todos en la posición once por la acción de los organismos examinados.

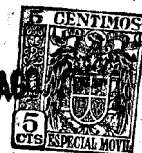
15 El siguiente cuadro IX señala los organismos examinados, los esteroides empleados y hace referencias a los cromatogramas de tiras de papel de las adjuntas figuras.

20

199253

67.-

17 A

Cuadro IX

Esteroides: progesterona

	<u>Organismos</u>	<u>American Type Culture Collection Nr.</u>	<u>Prueba Nº</u>	<u>Cromatograma</u>
5	1. Mucor rouxii	4857	M <sub>1</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
	2. Mucor griseo cyanus (+)	1207a	M <sub>2</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 40
	3. Mucor griseo cyanus (-)	1207b	M <sub>3</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 40
	4. Mucor hiemalis var. albus	6800	M <sub>4</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
10	5. Mucor hiemalis	8690	M <sub>5</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
	6. Mucor mucedo	9836	M <sub>6</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 40
	7. Mucor mucedo	9635	M <sub>7</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
	8. Mucor mucedo	7941	M <sub>8</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
	9. Rhizopus nigricans	10404	R <sub>1</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
15	10. Rhizopus nigricans	7577	R <sub>2</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
	11. Rhizopus nigricans (+)	6227a	R <sub>3</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 40
	12. Rhizopus nigricans (-)	6227b	R <sub>4</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 40
	13. Rhizopus chinensis (-)	1227b	R <sub>5</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 50
	14. Rhizopus japonicus	8446	R <sub>6</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 47
20	15. Rhizopus oryzae	10260	R <sub>7</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 50
	16. Rhizopus oryzae	9363	R <sub>8</sub> /P <sub>6</sub>	349 SHE 50

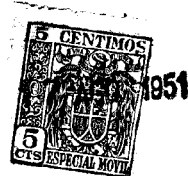
Esteroides: 11-desoxicorticosterona

	17. Mucor rouxii	4857	M <sub>1</sub> /DOC <sub>6</sub>	349 SHE 50
	18. Mucor griseo cyanus (+)	1207a	M <sub>2</sub> /DOC <sub>6</sub>	349 SHE 50
25	19. Mucor griseo cyanus (-)	1207b	M <sub>3</sub> /DOC <sub>6</sub>	349 SHE 50

Los cromatogramas de papel demuestran que la 11-desoxicorticosterona se ha convertido en los "compounds" E y F

199253

68.--



por los organismos con el número 17 y 18.

5 Ensayos de los organismos indicados en el cuadro IX sobre 11-desoxicorticosterona, 17-hidroxiprogesterona y 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona dieron resultados análogos, o sea, oxidaron la posición once del núcleo esteroide.

10 De modo análogo se obtuvo el mismo resultado en los ensayos de la acción de los organismos a continuación citados sobre la progesterona, 11-desoxicorticosterona, 11-desoxi-17-hidroxicorticosterona y 17-hidroxiprogesterona: *Mucor genevensis*, *plumbeus*, *parasiticus*, *dubius*, *javanicus*, *adventitius*, *microsporus*, *rouxianus*, *racemosus*; *Rhizopus reflexus*, *shanghaiensis*, *tritici*, *cohnii*, *delamar*, *tonkinensis*, *kazanensis*; *Phycomyces blakesleeanus*, *theobromatus*; *Adsidia glauca*; *Zygorhynchus moelleri*, *heterogamus*; y *Syncephalus nodosa*.

15 Ejemplo 18.

Oxidación de progesterona empleando filtrados del líquido de fermentación de Rh 176 (349 SHE 41).

20 Un cultivo de Rh 176 continuado durante 72 horas se filtró para obtener 160 mililitros de filtrado del caldo de fermentación con un pH 4,1. El micelio se trituró en un mezclador "Waring" con una solución de 0,9 % de cloruro sódico durante 15 minutos y se centrifugó para obtener 100 mililitros de líquido sobrenadante, que se dividió en dos porciones iguales. Una se dejó a pH 4,65 y la otra se ajustó a pH 6,76 con disolución semimolar de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . El residuo de micelios junto con la sal agregada se colocó en una botella o matraz separado. A cada matraz se agregó progesterona (30 miligramos a cada mililitro de acetona) como sigue:

25

199253

69.-



	<u>Fración</u>	<u>Progesterona agregada</u>
	S I = líq. sobrenadante con pH 6,76	30 mg
	S II= " " con pH 4,65	30 mg
	R = residuo micelial	60 mg
5	BF = filtrado no diluido de fermentación con pH 4,1	30 mg

Los matraces con tapón de algodón se agitaron durante 17 horas a la temperatura del local y se extrajeron con cloruro de metileno como en el ejemplo 1. Los cromatogramas de papel de algunas porciones alícuotas de 320 gamma de esteroides, obtenidos empleando el sistema disolvente "carbitol"-metilciclohexano, demostraron que S I dió una conversión muy pequeña en compuestos más altamente oxigenados, S II dió una conversión considerable y BF una conversión todavía mejor, pero que los residuos de micelios dieron una conversión completa.

Ejemplo 19.

Oxidación de 11-alfa-hidroxiprogesterona (266 HCM 229).

20 miligramos de 11-alfa-hidroxiprogesterona (U-III) [190 GBS 244B] se agregaron a 150 mililitros de un cultivo durante 48 horas de Rh 176 (Rhizopus arrhizus) en el medio líquido usual de dextrosa, "edamine" y líquido de maceración de maiz y se continuó la aireación durante 22 horas. Los materiales se extrajeron con cloruro de metileno del modo indicado en el ejemplo 1. Los cromatogramas de papel (349 SHE 72) demostraron que la conversión se realizó en el compuesto dihidroxi (U-I) y en un segundo compuesto que también se obtiene



1951

70.-

199253

por conversión de la misma progesterona y que aparentemente es un producto más oxigenado de 11-alfa-hidroxiprogesterona.

La 11-alfa-hidroxiprogesterona (U-III) y la dihidroxiprogesterona (U-I) pueden convertirse en los correspondientes mono- y diaciloxi-derivados, como se ha indicado en el ejemplo 1, por los métodos de acilación conocidos, por ejemplo mediante reacción con un anhídrido ácido o cloruro ácido conveniente, en un disolvente orgánico, p. ej. piridina o similares. Como representantes de ésteres de la 11-alfa-hidroxi-  
progesterona (U-III) citaremos los derivados formoxi, acetoxi, propionoxi, butiroxi, valeroiloxi, hexanoiloxi, heptanoiloxi, octanoiloxi, benzoiloxi, toluoiloxi, naftoiloxi, ciclopentanoiloxi, ciclohexanoiloxi, los ésteres monobásicos del grupo hidroxilo en la posición 11 con ácidos malónico, succínico, glutárico y adipínico y similares. Los mismos diésteres o similares pueden prepararse de la dihidroxiprogesterona (U-I), como también los ésteres cíclicos de los dos grupos hidroxilo con los indicados ácidos dicarboxílicos. Los grupos acilo pueden también contener sustituyentes no reaccionantes, como halógeno, grupos hidroxilo, metoxi o similares.

Otros microorganismos se ha comprobado que pueden utilizarse en la oxidación de esteroides, comprendidos en los 11-desoxisteroides, aunque no han de producir necesariamente los mismos resultados que los hongos del orden Mucorales, como son diversas especies de *Penicillium*, por ejemplo P-100, *Aspergilli*, por ejemplo *Aspergillus niger*, *Neurospora sitophila*, *Neurospora crassa*, *Oospora lactis*, *Polioporus abietinus* y especies similares de los géneros citados.

199253

71.-



Ejemplo 20.

Oxidación del acetato de des-oxicorticosterona (DOCA).

En un recipiente de fermentación de vidrio de 5 litros de capacidad, provisto con un agitador, 3 litros de medio cultivo (dextrosa 50 g., agua de maceración de maíz 5 g. peptona, obtenida a partir de caseína 20 g., agua destilada 1000 c. c.) fueron inoculados con esporas del hongo *Rhizopus nigricans* Ehrenberg (determinado según H. Zycha, *Kryptogamenflora der Mark Brandenburg*, tomo VI a ( Pilze II, Mucorineae) Leipzig, 1939, y G. Lindau, *Die mikroskopischen Pilze*, (Berlin 1922)). Los cultivos de partida para la inoculación tenían cada vez 5 días de edad y fueron cultivados previamente sobre extracto de malta con agua de maceración de maíz (cultivo inclinado de agar). Por el medio de cultivo inoculado fué conducido bajo agitación a 24° C. aire estéril con una rapidez de 500 litros por minuto. Para evitar la formación de espuma fueron añadidos 6 c.c. de aceite de esperma. Al cabo de 24 horas de crecimiento se añadieron 1,5 g. de acetato de desoxicorticosterona (DOCA), disueltos en 7,5 c.c. de alcohol bencílico, y después se agitó durante otras 24 horas con el mismo aire. Para la obtención del producto de reacción se sacude el contenido del recipiente de fermentación tres veces con un total de 4 litros de cloruro de metileno. El cloruro de metileno se lava dos veces con 500 c.c. de solución de bicarbonato de sodio al 2 % cada vez y luego dos veces con 1 litro de agua cada vez. A continuación se lo somete a una destilación, quedando un residuo oleoso. Para eliminar los restos de agua se vuelve a mezclar el residuo de destilación con cloruro de metileno,



199253

72.-

separando el último por destilación.

Para determinar el rendimiento de los productos de reacción fué pesado el residuo total. Una parte pesada fué disuelta en un volumen conocido de cloroformo. Una parte alícuota se transmite mediante una jeringa micrometro sobre papel impregnado con glicol de propileno (Schleicher & Schüll No. 2043 b) y se somete con tolueno a una cromatografía descendiente. La DOCA no alterada se mueve muy rápidamente en el papel (más o menos en el límite del tolueno), mientras los productos de oxidación quedan muy cerca de la mancha de partida. Las sustancias en las manchas se hicieron visibles y se determinaron por el tratamiento del papel secado con cloruro de trifeniltetrazolio alcalino (solución al 2% con el mismo volumen de solución de nitrato de sodio 1 n) y calentamiento siguiente a 45° en la estufa de aire. Después se lava el papel con agua y se vuelve a secarlo. Las manchas rojas, que se forman con sustancias reductoras se pueden ahora cortar, separar por lavado con glicol de metilo y determinar colorimétricamente. Para fines de comparación se trazó una curva de titulación con DOCA con tal que se transmitieron ciertas cantidades de esta sustancia sobre papel y se sometieron al mismo tratamiento que el papel del análisis. La extinción de manchas, las cuales se habían obtenido con corticosterona, era más o menos la misma que la de la DOCA, por lo tanto basta emplear DOCA como sustancia de titulación. Para mayor seguridad se preparó cada cromatograma de papel tres veces, tomando el valor medio de los resultados.

199253



GO. 1951

73.-

Por las determinaciones del producto oxidado, efectuados según este método, se obtuvo un rendimiento de 60 - 70 % de la DOCA empleada.

5 Luego, los preparados de reacción fueron aislados en forma químicamente pura. Para este fin se disolvió el aceite obtenido en una mezcla de benceno y éter de petróleo (1:1) y la solución fué cromatografiada en 25 g. de  $Al_2O_3$  ácido. Las diversas fracciones se aislaron del modo usual con los agentes de benceno, éter y cloroformo.

10 La fracción principal se encontraba en las soluciones de cloroformo. El producto crudo estuvo cristalizado ya, pesando alrededor de 0,6 g. del cual se pudo aislar por cristalización con éster acético y éter (1,5 :5) la 11-epi-corticosterona. Punto de fusión  $159^{\circ}$  (con);  $\alpha_D^{20} = +149^{\circ}$  (en éster acético). La sustancia no produjo ninguna depresión del punto de fusión con epi-corticosterona obtenida por síntesis. Los espectros ultrarrojos de ambas sustancias fueron idénticos.

15 Debe entenderse que el invento no se limita a los detalles exactos de operar ni a los compuestos exactos ilustrados y descritos, ya que cualquier persona entendida en la materia puede introducir modificaciones fáciles y equivalentes y por consiguiente el invento solo podrá limitarse por el alcance de las siguientes reivindicaciones.

20  
= = = = =

199253

74.-

17 AGO



N O T A.-  
=====

La presente patente de invención comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Un procedimiento para la producción de un esteroide oxigenado, el cual está oxigenado, por lo menos, en la posición once del núcleo del esteroide, caracterizado por la operación de exponer un esteroide no oxigenado en la posición once a la acción de enzimas oxigenantes producidas por el desarrollo de una especie de hongos del orden de los Mucorales.

10 2.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la operación de exponer un esteroide que contenga un grupo once-metileno en condiciones aeróbicas a la acción de las enzimas oxigenantes producidas por el desarrollo de una especie oxigenante de hongos del orden de los Mucorales.

15 3.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la operación de exponer un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción de las enzimas oxigenantes producidas por el desarrollo de una especie oxigenante de hongos de la familia de los Mucoraceae.

20 4.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la operación de exponer un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción de las enzimas oxigenantes producidas por el desarrollo

25

1 99253

75.-



de una especie oxigenante de hongos del género de los Rhizopus.

5.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la operación de exponer un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción de las enzimas oxigenantes producidas por el desarrollo de una especie oxigenante de hongos del género de los Mucor.

6.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la operación de exponer un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción de las enzimas oxigenantes producidas por el desarrollo de una cepa de hongos oxigenantes de la especie de los Rhizopus arrhizus.

7.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la operación de exponer un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción de las enzimas oxigenantes producidas por el desarrollo de una cepa oxigenante de la especie Mucor mucedo.

8.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la operación de desarrollo aerobio de un cultivo de una especie de hongos oxigenantes de la familia de los Mucoraceae, y la exposición de un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción oxigenante de las enzimas producidas por el cultivo mencionado.

9.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por las operaciones de desarrollo aerobio de un cultivo de una especie de hongos oxigenantes de la familia de los Mucoraceae sumergido en un medio nutritivo adecuado, y la exposición de un esteroide que contenga

199253

76.-



Q. 1951

un grupo once-metileno a la acción oxigenante del cultivo mencionado, con aireación y agitación de la mezcla reaccionante.

5  
10  
10.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por las operaciones de desarrollo aerobio de un cultivo de una especie de hongos oxigenantes de la familia de los Mucoraceae en un medio nutritivo adecuado, y la exposición de un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción oxigenante de las enzimas producidas por el cultivo mencionado, y extracción del esteroide oxigenado de la mezcla reaccionante.

15  
20  
11.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por las operaciones de desarrollo aerobio de un cultivo de una especie de hongos oxigenantes de géneros seleccionados del grupo que forman los Rhizopus y los Mucor en un medio nutritivo adecuado, y la exposición de un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción oxigenante de las enzimas producidas por el cultivo mencionado, y extracción del esteroide oxigenado de la mezcla reaccionante.

12.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el esteroide inicial es la progesterona.

25  
13.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el esteroide inicial es la 17-hidroxiprogesterona.

14.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque, el esteroide inicial es la 11-desoxi-17-



199253

77.-

hidroxicorticosterona. (Compound S).

15.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el esteroide inicial es la 11-desoxicorticosterona.

5 16.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque se parte de la 3-hidroxipregnano-20-ona.

10 17.- Un procedimiento para la producción de una once-hidroxiprogesterona, caracterizado porque las operaciones de desarrollo aerobio de un cultivo de una cepa de Rhizopus arrhizus, y la exposición de la progesterona a la acción oxigenante de las enzimas producidas por el cultivo mencionado.

15 18.- Un procedimiento para la producción de una 11-alfa-hidroxiprogesterona, caracterizado por las operaciones de desarrollo aerobio de un cultivo de Rhizopus arrhizus en un medio nutritivo adecuado, y la exposición de la progesterona a la acción oxigenante del cultivo mencionado.

20 19.- Un procedimiento para la producción de un esteroide once-oxigenado, caracterizado por la fermentación aerobia de un substrato de contenido nutritivo y que contiene un esteroide provisto de un grupo once-metileno mediante un desarrollo sumergido de una especie oxigenante de hongos de la familia de los Mucoraceae, en presencia, dentro del medio, de un gas que contenga oxígeno.

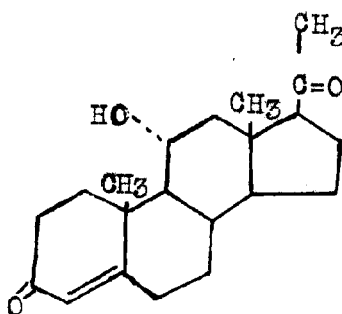
25 20.- Un procedimiento para la producción de un esteroide oxigenado por lo menos en la posición once del núcleo esteroídico, caracterizado por las operaciones del desarrollo aerobio de un cultivo de hongos del orden de los Mucorales, y



la exposición de un esteroide que contenga un grupo once-metileno a la acción oxigenante de dicho cultivo.

5 21.- Un procedimiento para la producción de esteroideos oxigenados, caracterizado porque se oxigena un esteroide por medio de una cepa oxigenante de un hongo del orden Mucorales.

22.- Un procedimiento, caracterizado porque se prepara el compuesto 11-alfa-hidroxiprogesterona que corresponde a la siguiente fórmula:

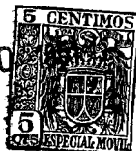


10 23.- Procedimiento para introducir oxígeno en un esteroide, caracterizado porque en condiciones aerobias se cultiva una raza oxidante de una especie de hongos del orden Mucorales sobre un terreno de cultivo que contiene nitrógeno y carbono asimilables además del carbono del esteroide, se somete a la acción oxidante de este cultivo un esteroide con  
15 hasta 22 átomos de carbono inclusive en el esqueleto C-C y se separa el esteroide oxidado originado con igual número de átomos C en el esqueleto C-C que el esteroide de partida.

20 24.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 23, caracterizado porque el hongo empleado pertenece a la familia Mucoraceae.

25.- Procedimiento según lo reivindicado en el

17 AGO



199253

79.-

punto 23, caracterizado porque el hongo empleado pertenece al género *Rhizopus*.

5

26.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 23, caracterizado porque el hongo empleado pertenece a la familia *Choanephoraceae*.

27.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 23, caracterizado porque el hongo empleado pertenece al género *Cunninghamella*.

10

28.- Procedimiento para introducir oxígeno en un esteroide, caracterizado porque en condiciones aerobias se cultiva una raza oxidante de una especie de hongos del género *Rhizopus* en un terreno de cultivo conteniendo nitrógeno e hidratos de carbono asimilables, se somete a la acción oxidante de este cultivo un esteroide con una cadena lateral de 2 átomos C en posición 17 y un grupo 11-metileno, y se aísla un esteroide 11-oxidado con igual número de átomos C en el esqueleto C-C que el esteroide de partida.

15

29.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 28, caracterizado porque como esteroide de partida se emplea progesterona.

20

30.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 28, caracterizado porque el hongo empleado es *Rhizopus arrhizus*.

25

31.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 28, caracterizado porque como esteroide de partida se emplea progesterona y el hongo empleado es *Rhizopus arrhizus*.

32.- Procedimiento según lo reivindicado en el pun-

199253

80.-



to 28, caracterizado porque el hongo empleado es *Rhizopus nigricans*.

5 33.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 28, caracterizado porque como esteroide de partida se emplea progesterona y el hongo empleado es *Rhizopus nigricans*.

34.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 28, caracterizado porque como esteroide de partida se emplea acetato de desoxicorticosterona y el hongo empleado es *Rhizopus nigricans* Ehrenberg.

10 35.- Procedimiento para introducir oxígeno en un esteroide, caracterizado porque en condiciones aerobias se cultiva una raza oxidante de una especie de hongos del género *Mucor* sobre un terreno de cultivo conteniendo nitrógeno e hidratos de carbonos asimilables, se somete a la acción oxidante de este cultivo un esteroide con una cadena lateral de 2 átomos C en posición 17 y un grupo 11-metileno y se aísla un esteroide 11-oxidado con igual número de átomos C en el esqueleto C-C que el esteroide de partida.

15 36.- Procedimiento para introducir oxígeno en un esteroide, caracterizado porque en condiciones aerobias se cultiva una raza oxidante de una especie de hongos del orden Mucorales en un terreno de cultivo conteniendo nitrógeno y carbono asimilables además del carbono del esteroide, se somete a la acción oxidante de este cultivo un esteroide hasta con 22 átomos C inclusive en el esqueleto C-C y se separa el esteroide oxidado producido.

20

25



199253

81.--

37.- Un procedimiento para la producción de un esteroide oxigenado.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva y se ilustra con los cromatogramas que a la misma se acompañan.

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

Madrid, a 17 de agosto de 1951.

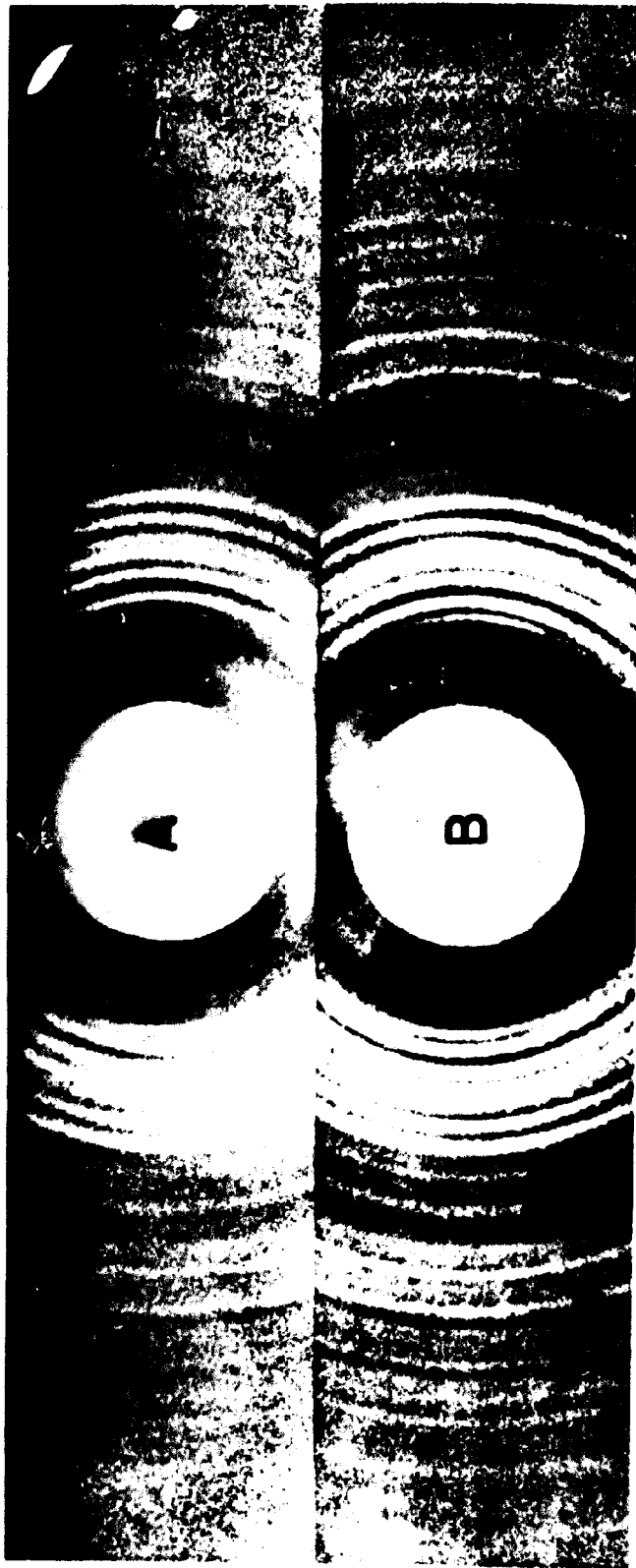


FIGURE 2

A = 319 - DHP - 108.2

B = 11 - CETO - PROGESTERONA

199253

102 AG

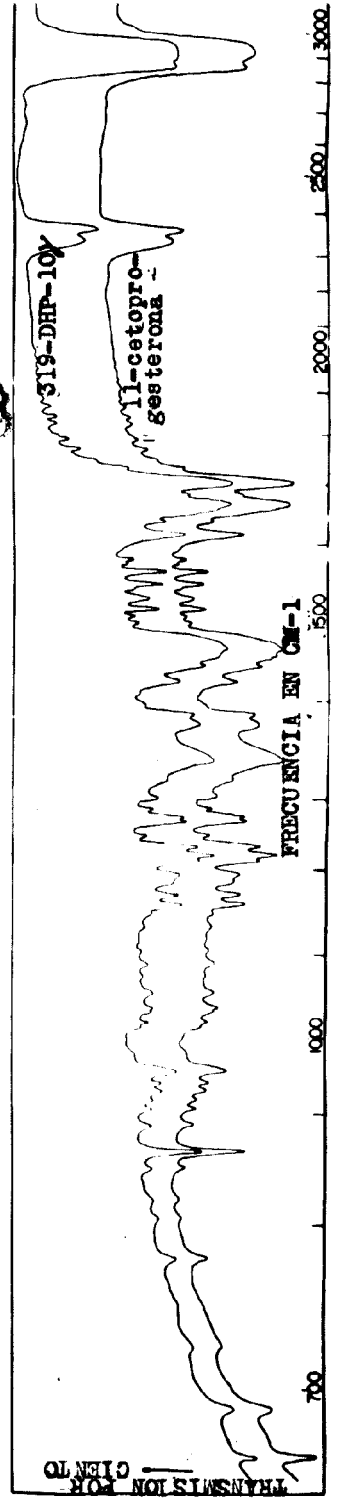


FIGURE 1

ESCALA VARIABLE

*Miller*

199253

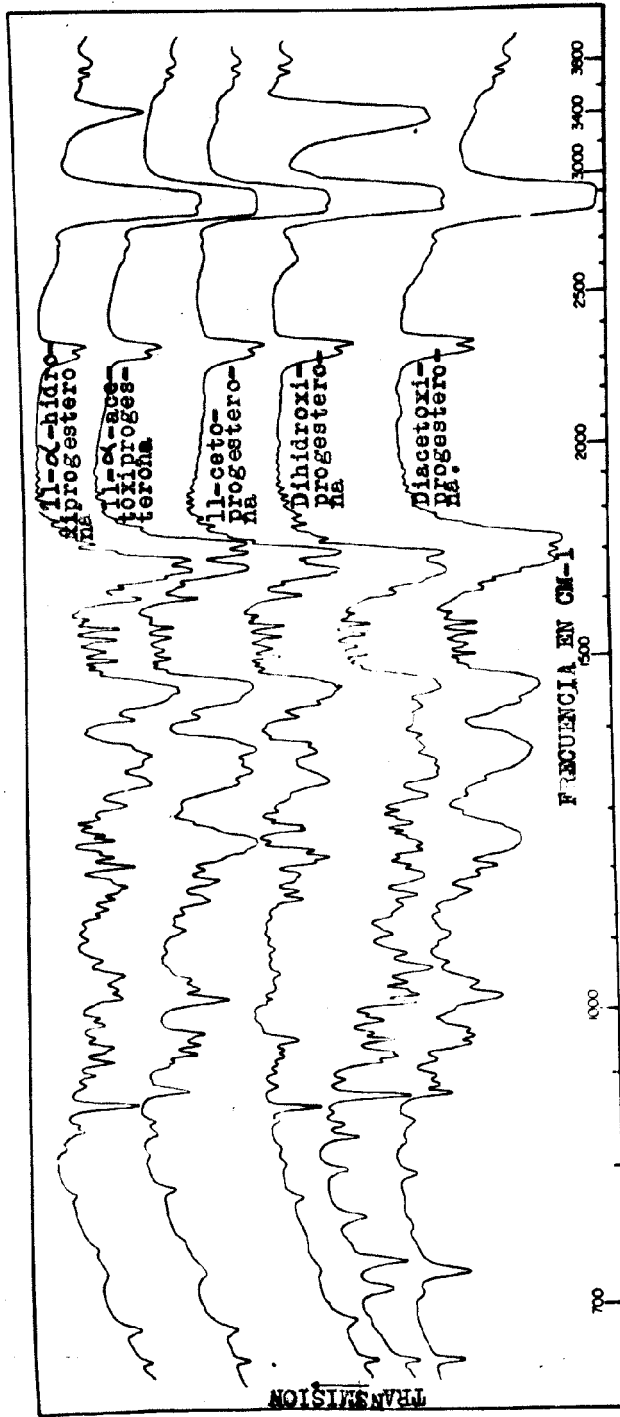


Fig. 3

ESCALA VARIABLE

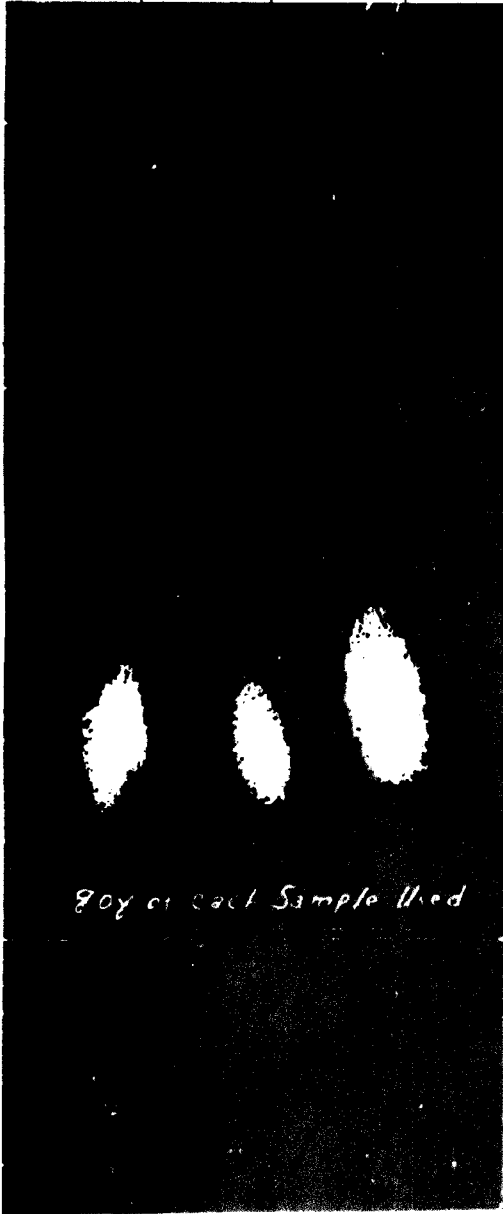
*Handwritten signature or initials*

199253

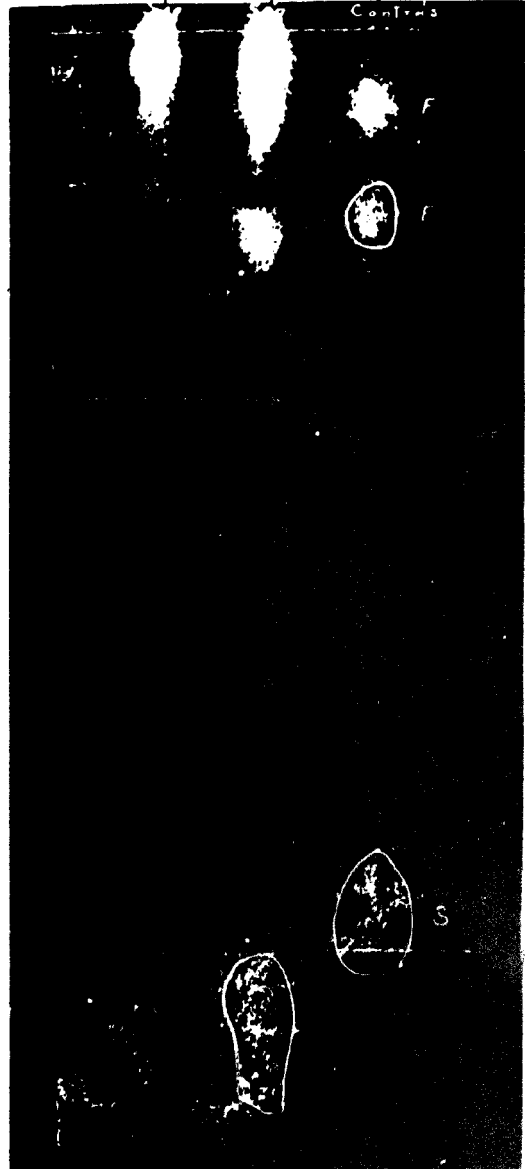


11-Cetoprogesterona- Identidad  
Control DHP-108.3 Control +  
DHP-108.3 DHP-108.3

Comp.S Bioconversion por RH 176  
S48 Control +  
S48



319-DHP-108.3  
326-MIU-126  
DHP-108.3 = Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> OXIDACION de  
COMP. S = III (80%)  
CONTROL AUTENTICA  
11-CETOPROGESTERONA (80%)



266-HOM-213 ~ 349-SHE-32  
Propilenoglicol-Tolueno

S48 = 48Hr. fermentacion de  
compuesto S (300%)  
S48 + Control +  
Control + Compuesto F (16%)  
" " E (16%)  
" " S (32%)

fig. 4 ESCALA VARIABLE fig. 5  
*[Signature]*

02.11



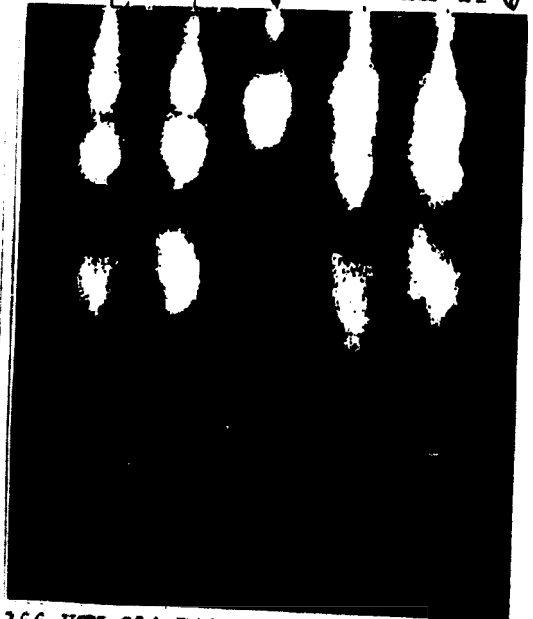
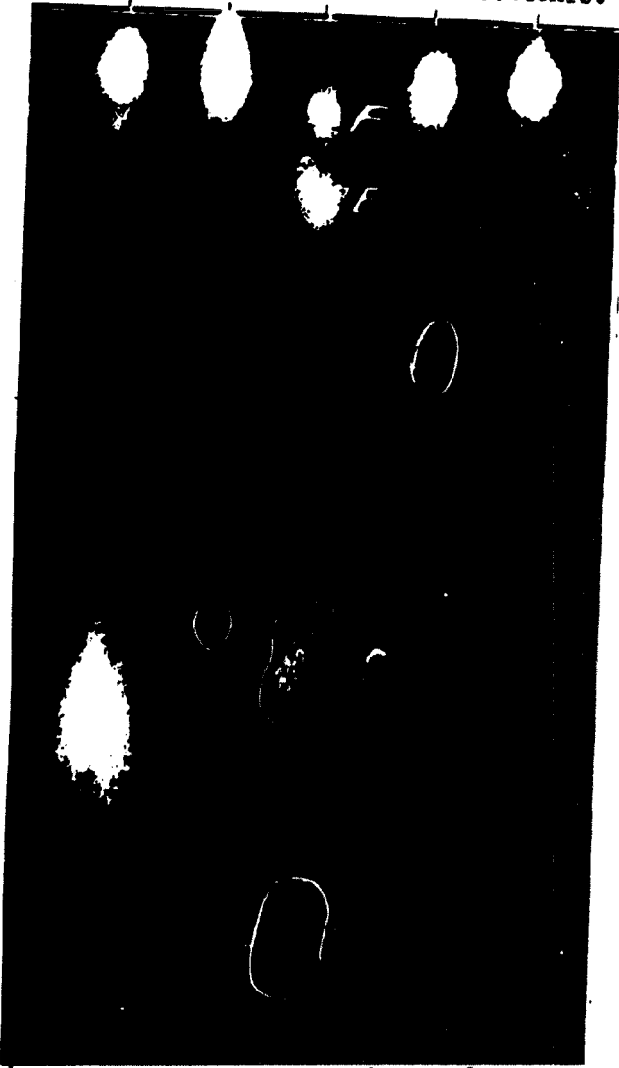
199253

Comp. S Bioconversion por RH 176

S16hrs. S28hrs. Control.S40hrs.S48hrs.

17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona Convers.

HOP-16 HOP-24  $\overbrace{\text{HOP-16 HOP-24}}^{\text{Controles}}$



166 HCM-214 349-SHE-36 y sig.  
Propileno glicol-Tolueno  
HOP-16= 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona  
(300 $\mu$ ), 16 hr.Fermentacion  
HOP-24= idem 24 hr.Fermentacion  
Controles:  
11- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (ca.240 $\mu$ )  
Dihidroxiprogesterona, DHP-95.4 (60 $\mu$ )

266-HCM-213 ~349-SHE-32  
Propileno glicol-tolueno

S= fermentacion compuesto S  
(320 $\mu$ ); a continuacion las horas  
de fermentacion

Controles: compuesto F (16 $\mu$ )  
" E (16 $\mu$ )  
" S (32 $\mu$ )  
corticosterona (32 $\mu$ )

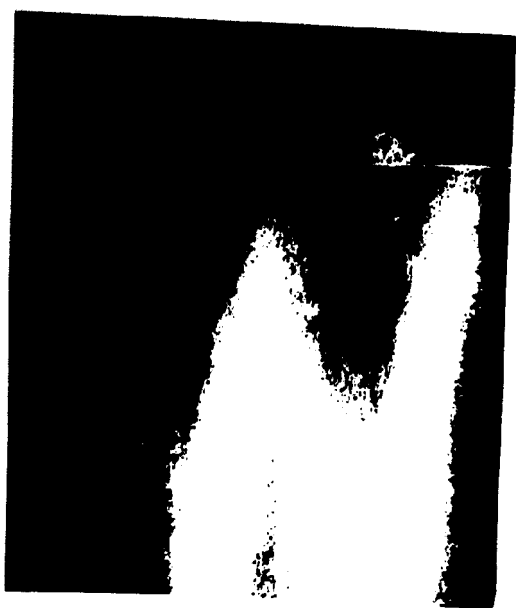
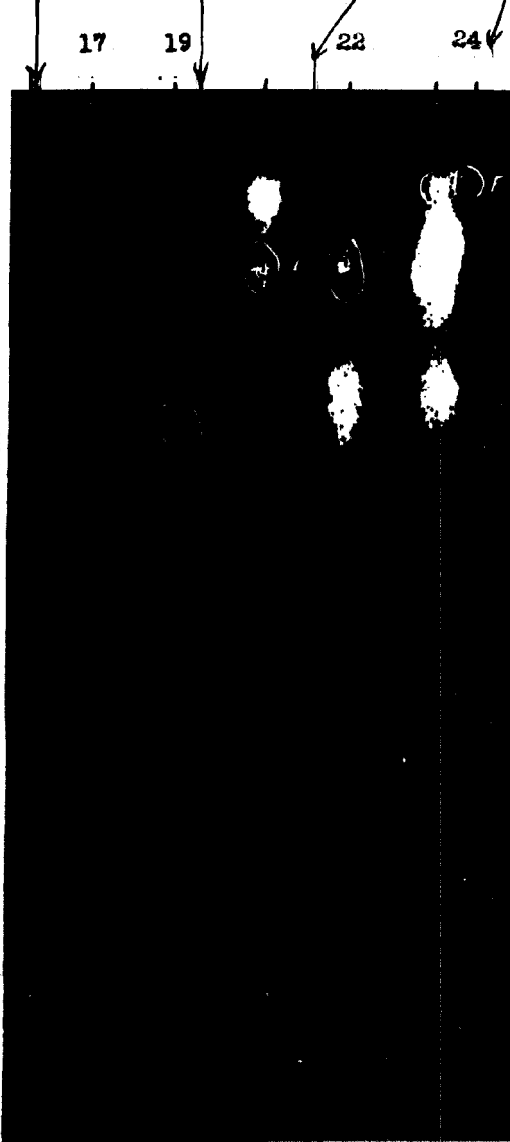


fig. 6

ESCALA VARIABLE fig. 7

*Almilla*

Cromatograma  $Al_2O_3$  22-(HOP-24)  
fracciones controles y fraccion F

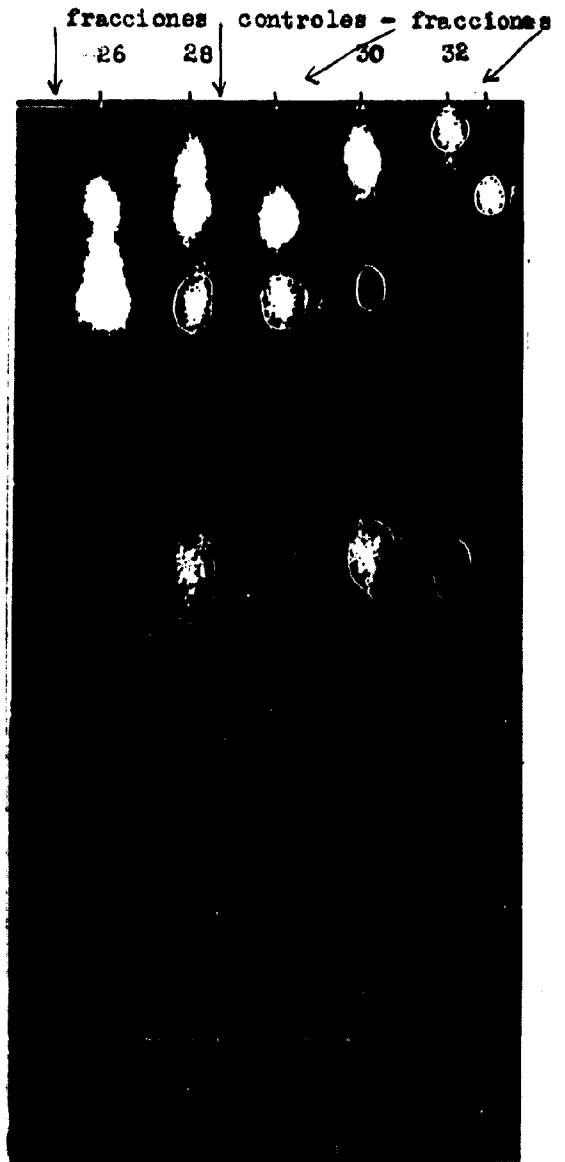


319 - DHP - 111  
349 - SHE - 37,38  
Todas las fracciones aplicadas al nivel 160 $\gamma$   
Control mixto:  
Compuesto E (16 $\gamma$ )  
dihidroxiprogesterona (DHP95.4) (30 $\gamma$ )  
F= control compuesto F (16 $\gamma$ )  
El cromatograma  $Al_2O_3$  de 266-HCM-214 (17- $\alpha$ -HO, progesterona)

fig. 8



Cromatograma  $Al_2O_3$  22-(HOP-24)



319 - DHP - 111  
349 - SHE - 37,38  
Todas las fracciones aplicadas al nivel 160 $\gamma$   
Control mixto:  
Compuesto E (16 $\gamma$ )  
dihidroxiprogesterona (DHP 95.4) (30 $\gamma$ )  
F= control compuesto F (16 $\gamma$ )  
El cromatograma  $Al_2O_3$  de 266-HCM-214 (17- $\alpha$ -HO, progesterona)

fig. 9

ESCALA VARIABLE

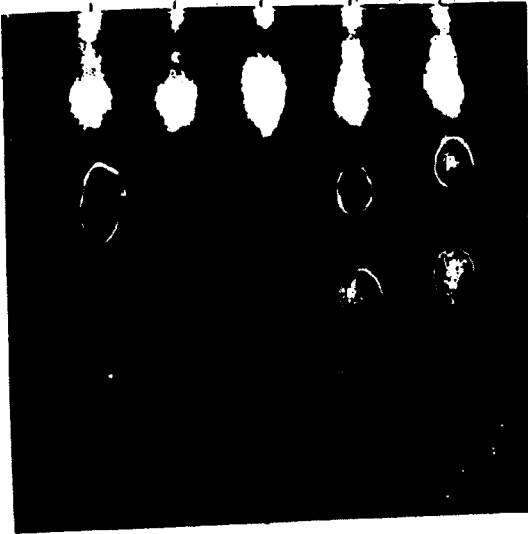
*[Handwritten signature]*



199253

Bioconversion progesterona

P1 P2-Control P3 P4



266-HCM-199/150T  
349-SHE-40 (P4)  
Propilenglicol-tolueno  
P4- fermentacion progesterona  
(300%)

Controles:  
dihidroprogesterona (DHP95.4)  
60%  
11- $\alpha$ -HO, progesterona (unos  
240%)

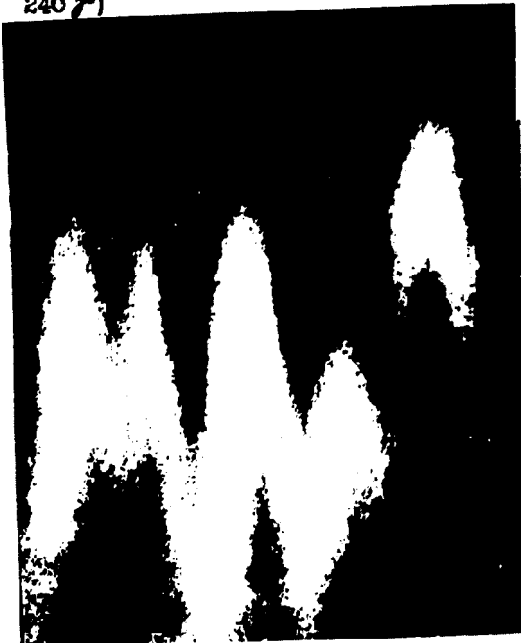
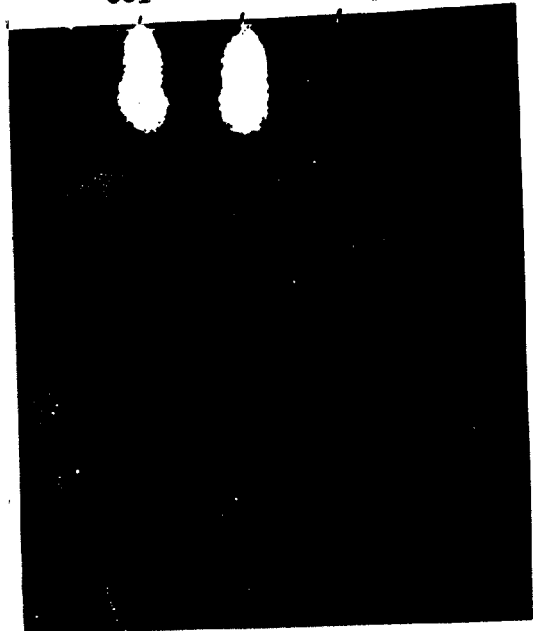


fig. 10

Bioconversion progesterona

OC1 OC2 Prog



266-HCM-199-OC1 y OC2  
363-MIU-21  
carbitol-metilciclohexano

OC1) fermentaciones progesterona  
OC2) (500%)

Prog: control progesterona (80%)



fig. 11

ESCALA VARIABLE

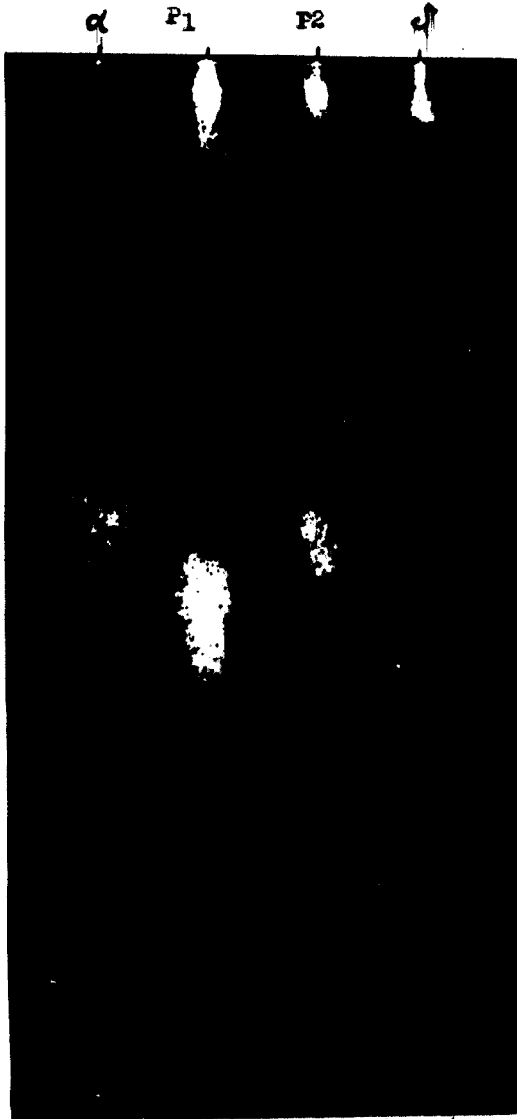
*[Handwritten signature]*



Control

Control

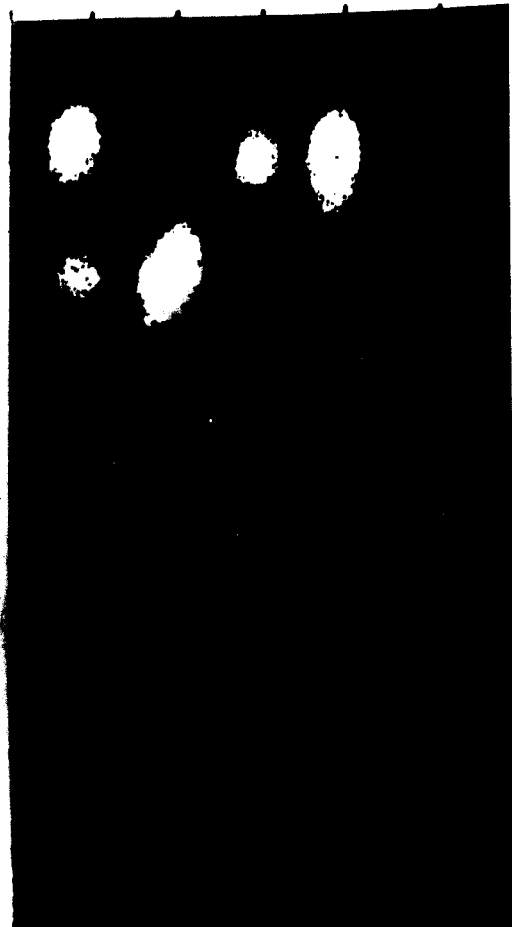
DOC, conversion progesterona



266-HCM-218/300B y 199/300T  
 349-SHE-44P1 y 44P2  
 propileno glicol-tolueno  
 P1=fermentacion progesterona  
 (HCM-218/300B) (300  $\gamma$ )  
 P2= fermentacion progesterona  
 (HCM-199/300T) (300  $\gamma$ )  
 Controles  
 $\alpha$  = 11- $\alpha$ -HO, progesterona (30  $\gamma$ )  
 $\sigma$  = dihidroxiprogesterona (DHP  
 95.4) (30  $\gamma$ )

fig. 12

204DR DOC Cort 205PP PROG



266-HCM-204DR y 205 PP  
 363-MIU-22  
 carbitol-metilciclohexano  
 204DR= fermentacion 11-desoxi-  
 corticosterona (320  $\gamma$ )  
 DOC=control 11-desoxicortico-  
 rona (64  $\gamma$ )  
 CORT=control corticosterona  
 (64  $\gamma$ )  
 PROG=control progesterona (80  $\gamma$ )  
 205 PP=fermentacion progesterona  
 (320  $\gamma$ )



fig. 13

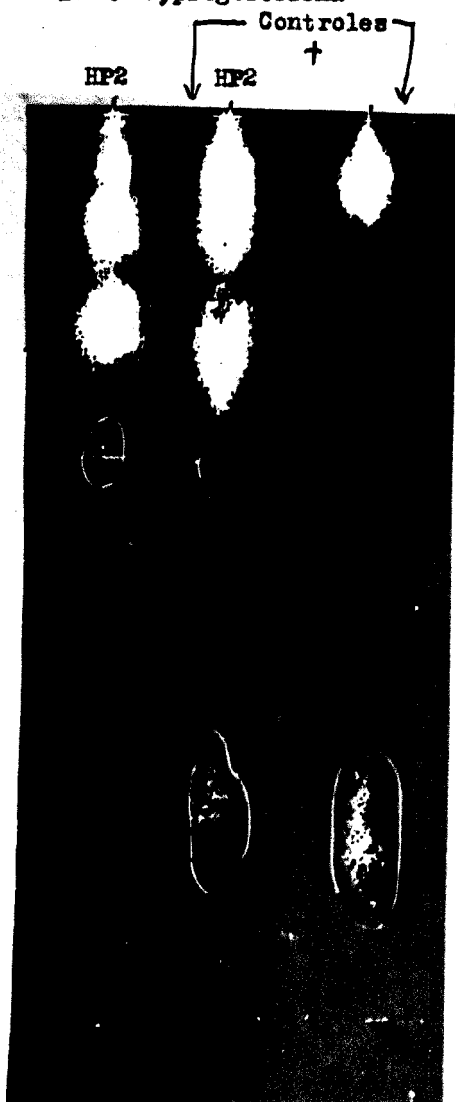
ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*

199253



Bioconversion  
17- $\alpha$ -HO, progesterona

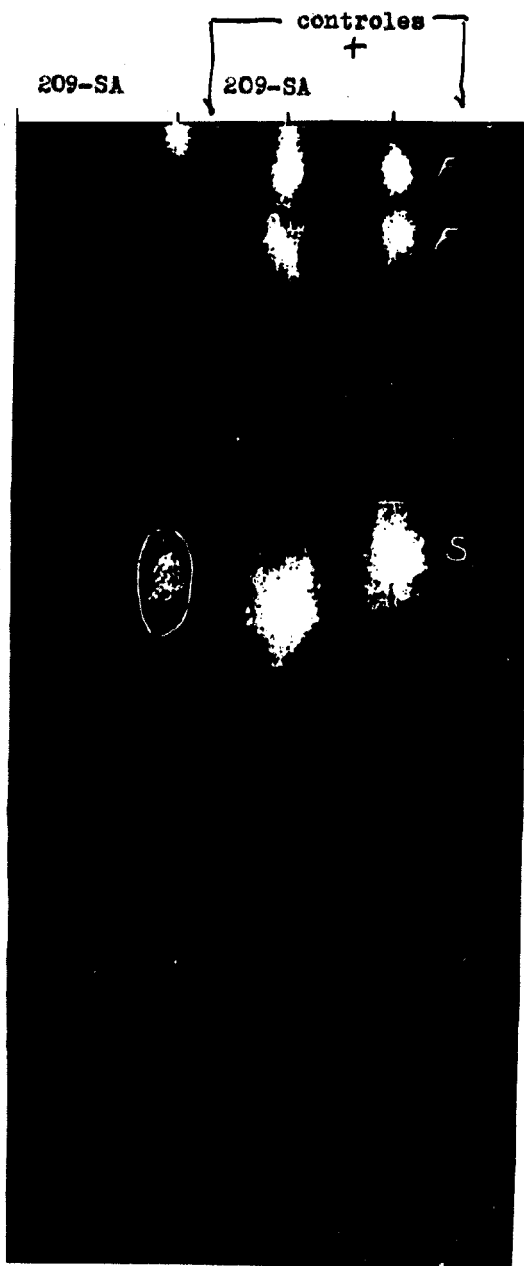


266-HCM-198 HP2  
349-SHE-22  
propileno glicol-tolueno.  
HP2=fermentacion 17- $\alpha$ -HO, pro-  
gesterona (320  $\gamma$ )  
Controles:  
dihidroxi progesterona (DHP 95.4)  
(60  $\gamma$ )  
corticosterona (64  $\gamma$ )



fig. 14

Bioconversion acetato comp.S



266-HCM-209SA ~ 349-SHE-31  
propileno glicol-tolueno  
209-SA=fermentacion acetato compues-  
to S (320  $\gamma$ )  
Controles:  
Compuesto F (16  $\gamma$ )  
" E (16  $\gamma$ )  
" S (64  $\gamma$ )

ESCALA VANILLO fig. 15

199253

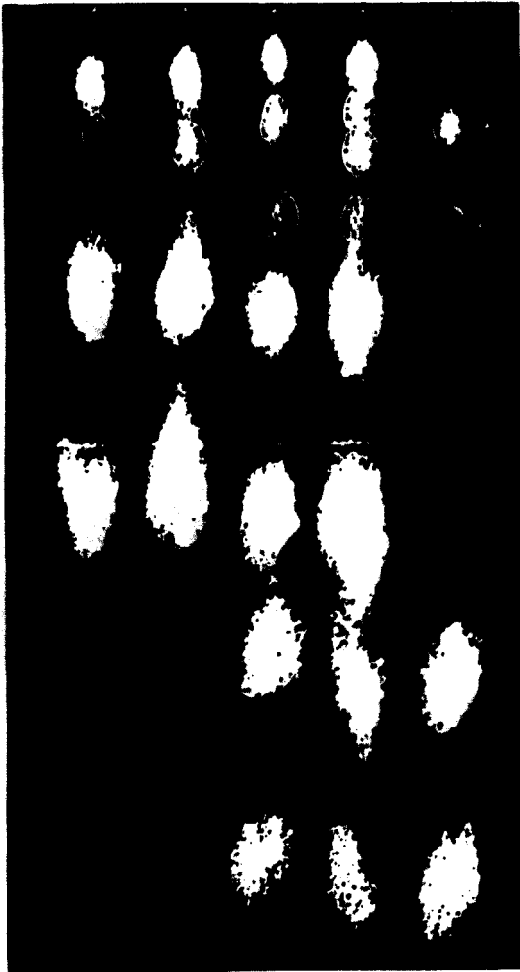
07 AG



Bioconversion compuesto S por RH176

DOC, DOCA Bioconversion

		Controlles +	
D2	DA2	D2	DA2

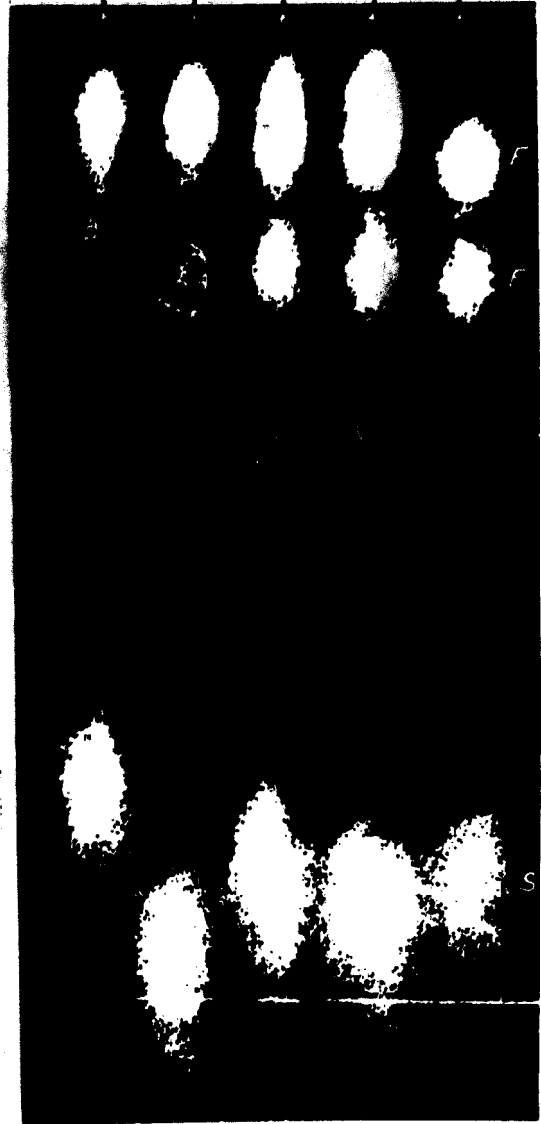


266-HCM-198-D2 + DA2  
349-SHE-21  
propileno glicol-tolueno

D2=11-desoxicorticosterona (320  $\gamma$ )  
 DA2= acetato 11-desoxicorticoste-  
 rona (320  $\gamma$ )  
 Controlles + D2  
 Controlles + DA2  
 Controlles: compuesto F (16  $\gamma$ )  
                               "      E (16  $\gamma$ )  
                               "      S (64  $\gamma$ )  
 corticosterona          (64  $\gamma$ )

fig. 16

		Controlles +	
SA2	S2	SA2	S2



266-HCM-198 S2 y SA2  
349-SHE-25  
propileno glicol-tolueno

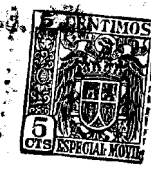
S2= fermentacion compuesto S (320  $\gamma$ )  
 SA2= fermentacion compuesto acetato  
       S(320  $\gamma$ )  
 Controlles: compuesto F (16  $\gamma$ )  
                               "      E (16  $\gamma$ )  
                               "      S (64  $\gamma$ )

fig. 17

ESCALA VARIABLE  
*Albino*

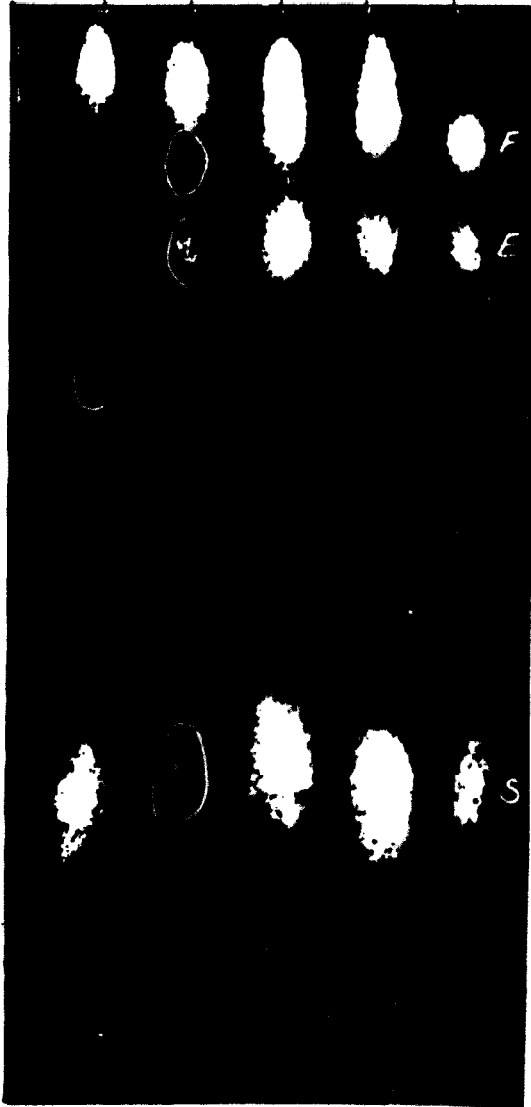
199253

Bioconversion S y acetato S  
Control +

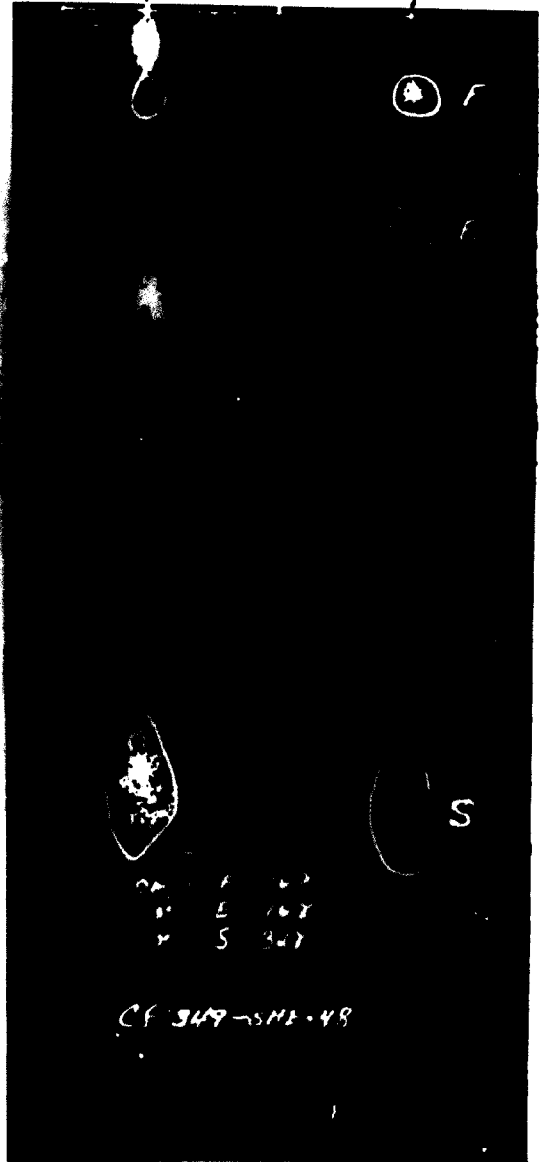


Bioconversion comp. S por M6

SA4 S4 S4 SA4



Controles



266-HCM-198-S4 y SA4  
349-SHE-26  
propileno glicol-tolueno

S4= fermentacion compuesto S  
(320 γ)  
SA4= fermentacion compuesto ace-  
tato S (320 γ)

Controles: compuesto F (16 γ)  
" E (16 γ)  
" S (64 γ)

266-HCM-217MuS ~ 349-SHE-48  
propileno glicol-tolueno

l=fermentacion compuesto S (320 γ)

Controles: compuesto F (16 γ)  
" E (16 γ)  
" S (32 γ)

fig 18

fig 19

ESCUELA VARIANTE  
*[Handwritten signature]*

12 AR



199253

Bioconversion androstenediona

And AR DOC Prog S

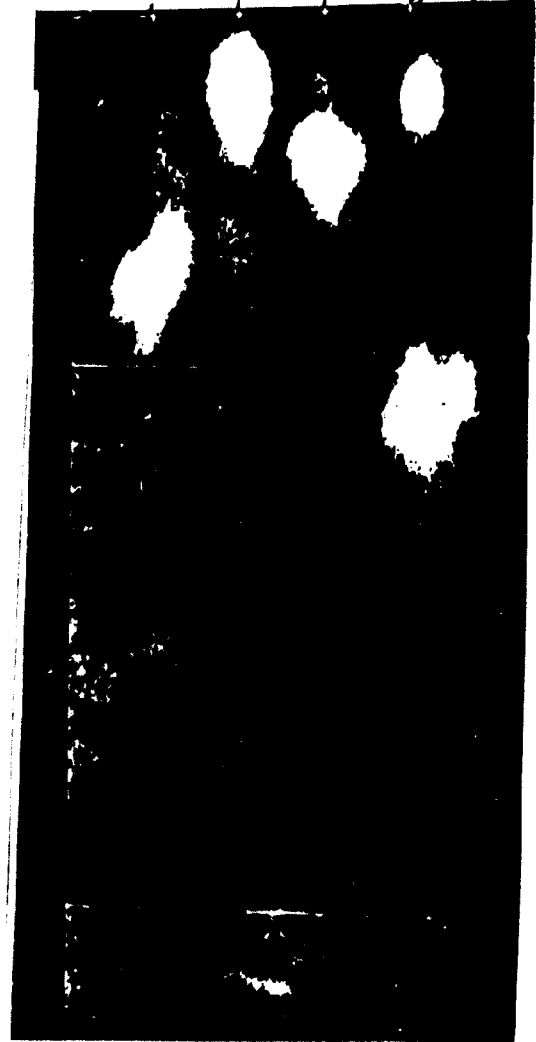


266-HCM-219 AR ~ 349-SHE 70.3  
propileno glicol-tolueno  
And= control androstenediona (80%)  
AR= fermentacion androstenediona  
(500%)  
DOC= control 11-desoxicorticosterona  
(64%)  
Prog= control progesterona (80%)  
S= control compuesto S (32%)

fig. 20

Bioconversion androstenediona

And AR DOC Prog S



266-HCM-219 AR ~ 349-SAH-70.3  
carbitol-metilciclohexano  
And= control androstenediona  
(80%)  
AR= fermentacion androstenediona  
(500%)  
DOC= control 11-desoxicorticoste-  
rona (64%)  
Prog= control progesterona (80%)  
S= control compuesto S (32%)

fig. 21

ESCALA VARIABLE

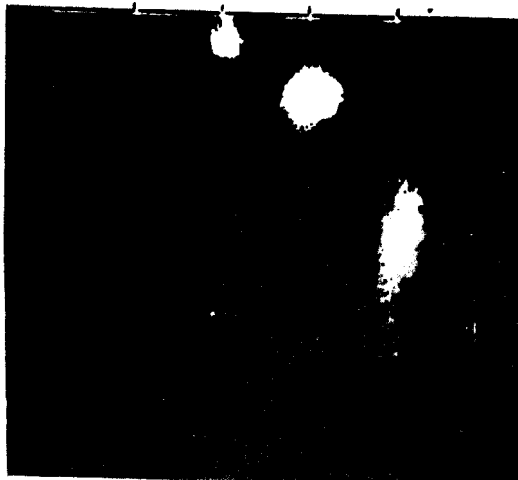
*Alvarez*



199253

Bioconversion colestenona por  
RH 176

Chol CR DOC Prog



266 HCM-219CR ~ 349-SHE-70.2  
Carbitol-metilciclohexano  
Chol= control colestenona (80%)  
CR=fermentacion colestenona  
(500%)  
DOC= control 11-desoxicorticosterona (64%)  
Prog= control progesterona (64%)

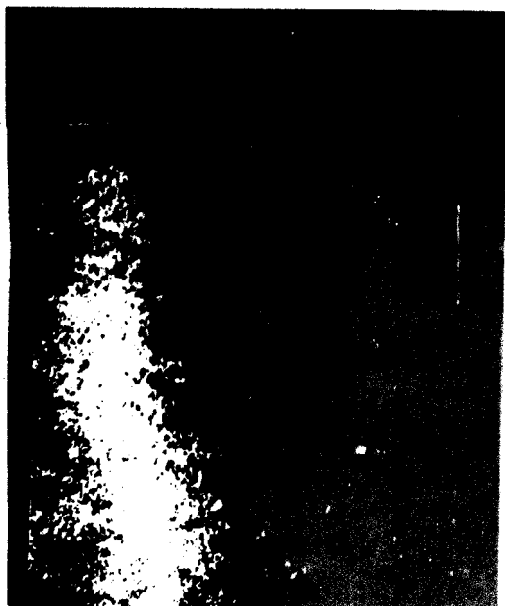
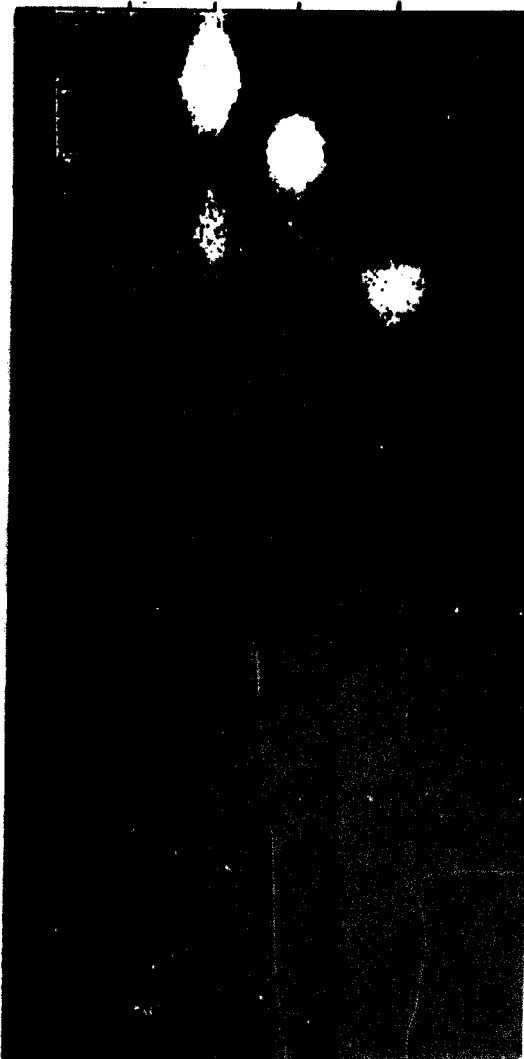


fig. 22

Bioconversion ergosterona por  
RH 176

Erg OR DOC Prog



266-HCM-219-OR ~ 349-SHE-70.1  
Carbitol-metilciclohexano  
OR= fermentacion ergosterona (500%)  
Erg= control ergosterona (80%)  
DOC= control 11-desoxicorticosterona (64%)  
Prog= control progesterona (64%)

fig. 23

ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*

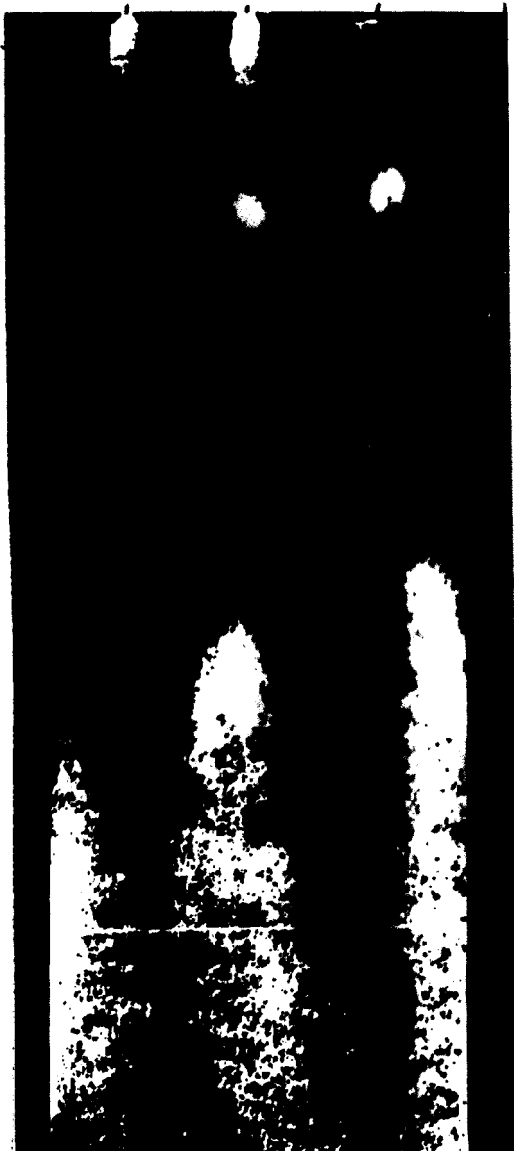


199253

Conversion progesterona, inocu-  
lacion vegetativa, medio sen-  
cillo

Bioconversion ergosterol  
Controles

ER + ER Controles



266-HCM-219ER ~ 349-SHE-70.4  
propileno glicol-tolueno  
ER= fermentacion ergosterol (500 $\gamma$ )

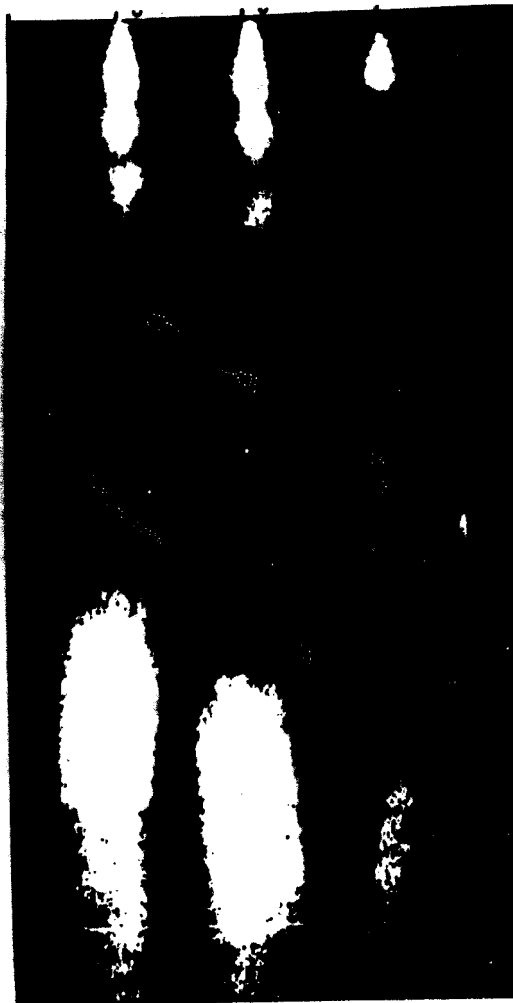
Controles:

11-desoxicorticosterona (64 $\gamma$ )  
ergosterol (96 $\gamma$ )  
compuesto S (32 $\gamma$ )

fig. 24

Controles

Veg + Veg Controles



266-HCM-220V ~ 349-SHE-53.2  
propileno glicol-tolueno  
Veg= fermentacion progesterona  
Controles:  
11- $\alpha$ -HO, progesterona (60 $\gamma$ )  
dihidroxiprogesterona (30 $\gamma$ )

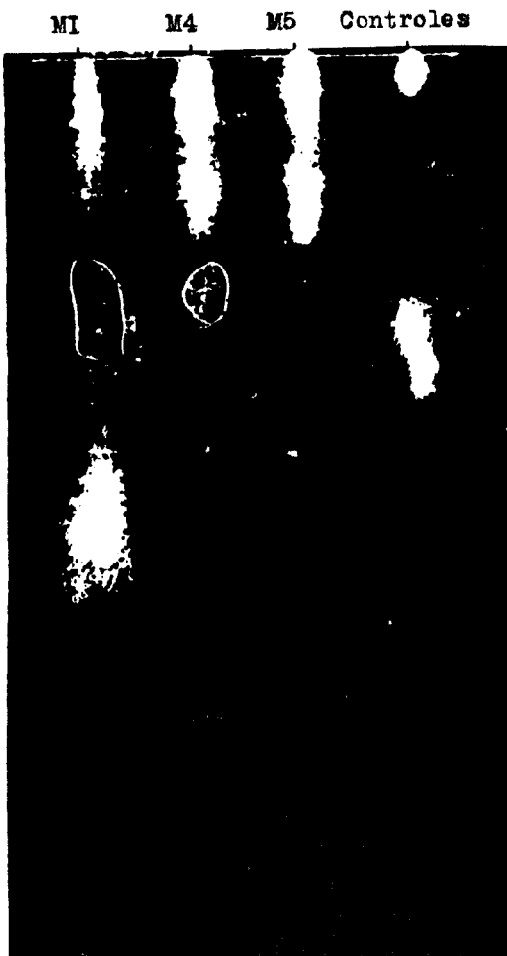
fig. 25

ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*

199253

Bioconversion progesterona por Mucorales



314 AW-64-71 ~ 349-SHE-47  
propileno glicol-tolueno

M1= fermentacion progesterona  
M1/P6 (320%)

M4= fermentacion progesterona  
M4/P6 (320%)

M5= fermentacion progesterona  
M5/P6 (320%)

Controles:

11- $\alpha$ -HO, progesterona (30%)

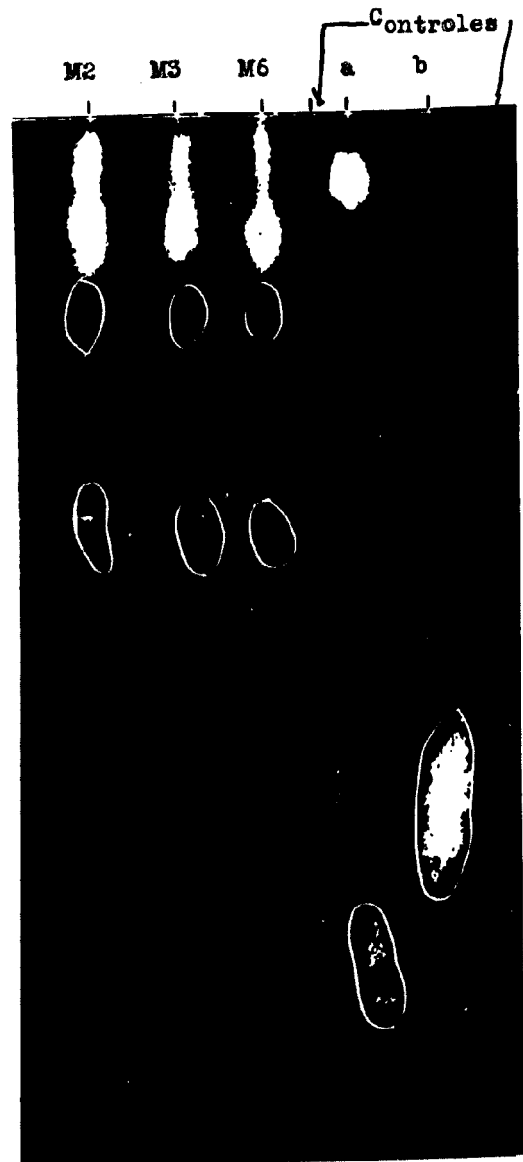
dihidroprogesterona (DHP

95.4) (30%)

fig. 26



Bioconversion progesterona por Mucorales



314-AW-64-71 ~ 349-SHE-40

prolineno glicol-tolueno

M2= fermentacion M2/P6 (240%)

M3= fermentacion M3/P6 (240%)

M6= fermentacion M6/P6 (240%)

Controles

- a) { 11- $\alpha$ -HO, progesterona (30%)  
dihidroprogesterona (DHP  
95.4) (30%)
- b) { 11- $\alpha$ -HO, progesterona (60%)

fig. 27

ESCALA VARIABLE

Bioconversion progesterona por Mucorales

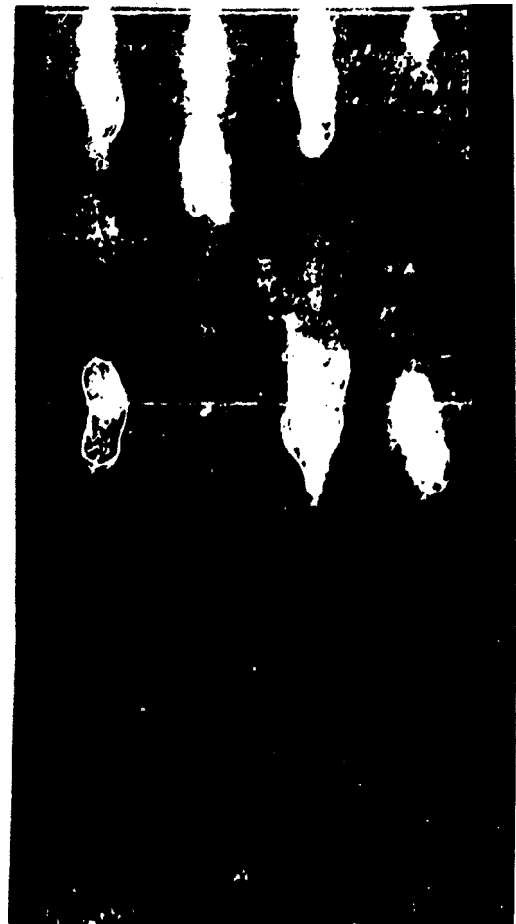
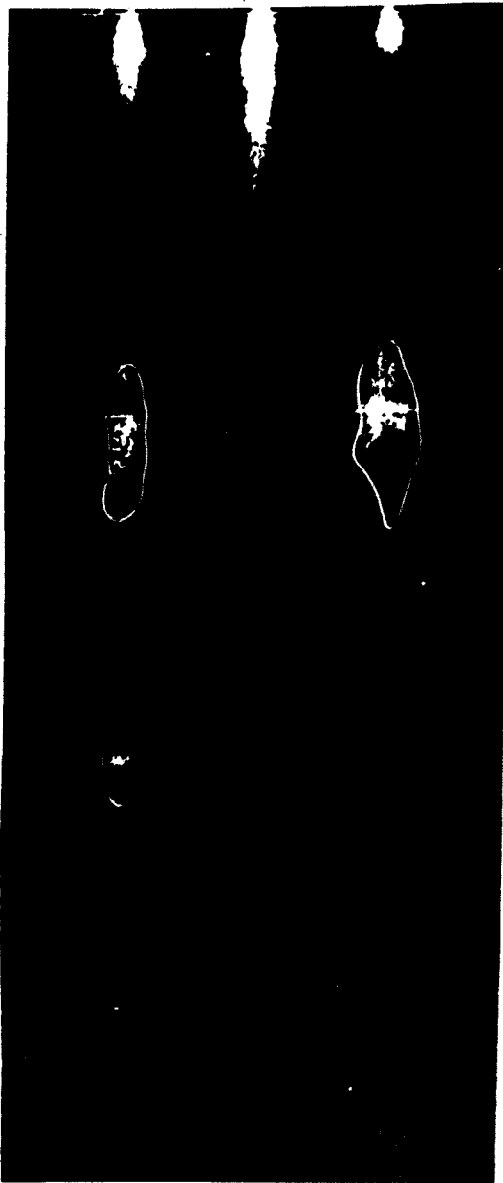
Bioconversion progesterona por Mucorales



199253

M7 M8 Controles

R1 R2 R6 Controles



314-AW-64-71—349-SHE-47  
propileno glicol-tolueno  
M7=fermentacion M7/P6 (320 $\gamma$ )  
M8=fermentacion M8/P6 (320 $\gamma$ )  
Controles:  
11- $\alpha$ -HO, progesterona (30 $\gamma$ )  
dihidroxi progesterona (30 $\gamma$ )

314-AW-64-71 349-SHE-47

propileno glicol-tolueno  
R1= fermentacion R1/P6 (320 $\gamma$ )  
R2= fermentacion R2/P6 (320 $\gamma$ )  
R6= fermentacion R6/P6 (320 $\gamma$ )  
Controles:  
11- $\alpha$ -HO, progesterona (30 $\gamma$ )  
dihidroxi progesterona (DHP 95.4)  
(30 $\gamma$ )



fig. 28

fig. 29

ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*

Bioconversion progesterona por  
Mucorales

Bioconversion progesterona por  
Mucorales

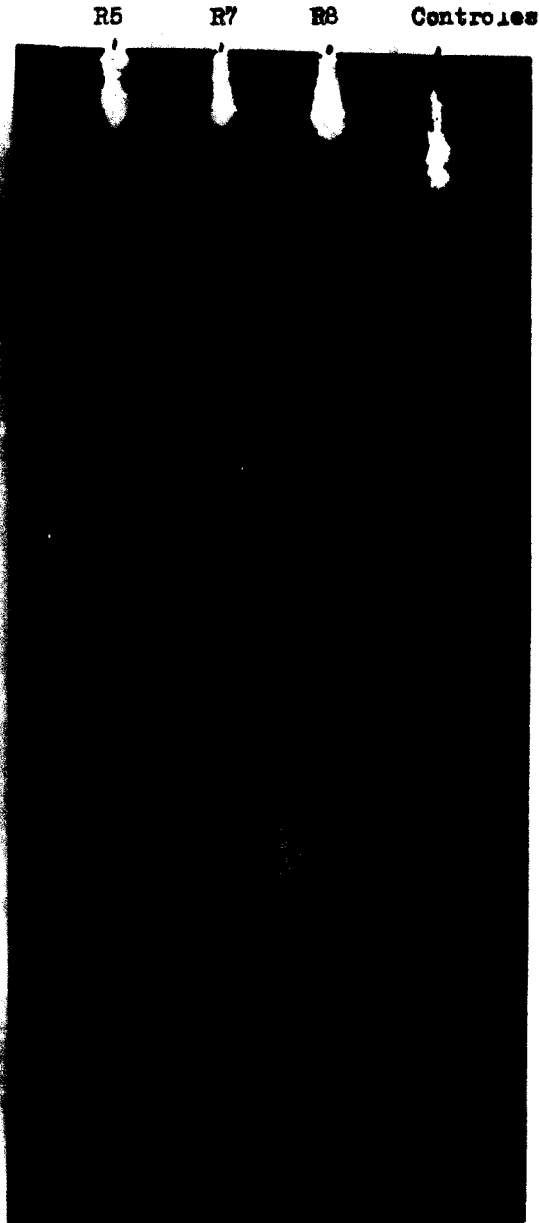


199253



314-AV-64-71—349-SHE-40  
Propileno glicol-tolueno  
R3= fermentacion R3/P6 (240 $\mu$ )  
R4= fermentacion R4/P6 (240 $\mu$ )  
Controles:  
a =11- $\alpha$ -HO, progesterona (30 $\mu$ )  
dihidroxi progesterona  
(DHP 95,4) (30 $\mu$ )  
B =11- $\beta$ -HO, progesterona (60 $\mu$ )

fig. 30



314-AV-64-71—349-SHE-50  
propileno glicol-tolueno  
R5= fermentacion R5/P6 (320 $\mu$ )  
R7= fermentacion R7/P6 (320 $\mu$ )  
R8= fermentacion R8/P6 (320 $\mu$ )  
Controles: 11- $\alpha$ -HO, progesterona  
(64 $\mu$ ), (30 $\mu$ ) dihidroxipro gesterona  
(DHP 95.4)

fig. 31

ESCALA VARIABLE

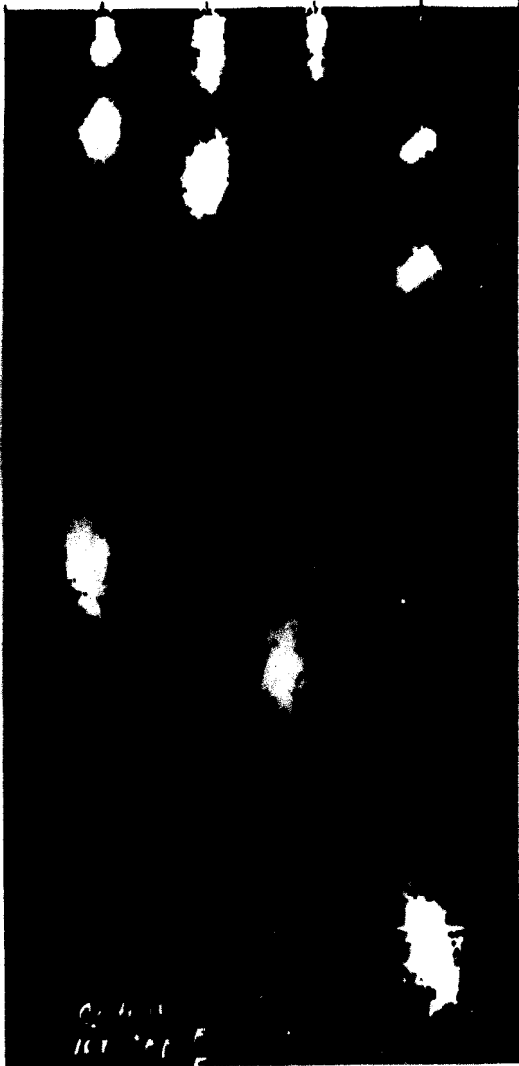
*[Handwritten signature]*

199253

22 AGO 1964  
CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Bioconversion DOC por Mucorales

M1 M2 M3 Controles



314-AW-64-71 ~ 349-SHE-50

propileno glicol-tolueno  
M1=fermentacion M1/DOC6 (320 $\mu$ )  
M2= fermentacion M2/DOC6 (320 $\mu$ )  
M3= fermentacion M3/DOC6 (320 $\mu$ )  
Controles: mezcla de  
compuesto F (16 $\mu$ )  
" E (16 $\mu$ )  
corticosterona (64 $\mu$ )

fig 32

Bioconversion DOC por Mucorales

M2(ATCC 120 7A)

M2 Controles M2 Controles



314-AW-64-71 ~ 349-SHE-50

propileno glicol-tolueno  
M2=fermentacion M2/DOC6 (320 $\mu$ )  
Controles: mezcla de  
compuesto F (16 $\mu$ )  
" E (16 $\mu$ )  
corticosterona (64 $\mu$ )

fig. 33

ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*

199253

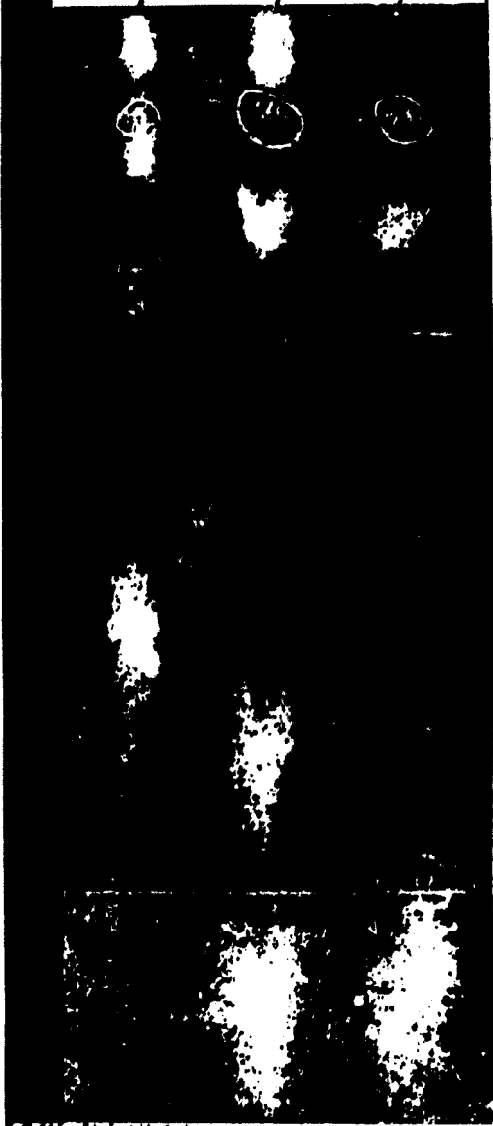


Bioconversion DOC por Mucorales

M1 (ATCC 4857)

Controles

M1 + M1 Controles



314-AW-64-71 ~ 349-SHE-50

propileno glicol-tolueno

M1=fermentacion M1/DOC5 (320 $\gamma$ )

Controles: mezcla de

compuesto F(16 $\gamma$ )

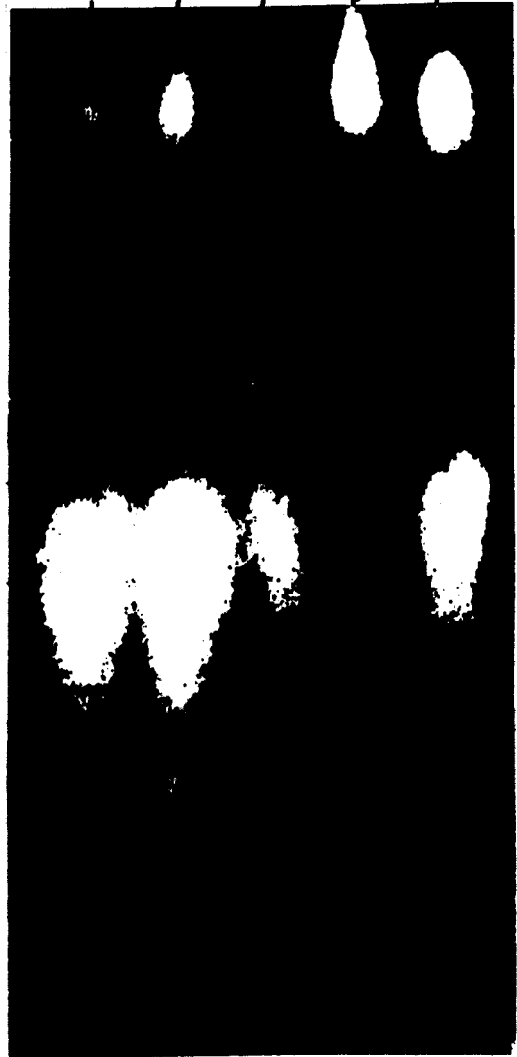
" B(16 $\gamma$ )

corticosterona (64 $\gamma$ )

fig. 34

Conversion progesterona por fil-  
trado caldo

SI SII Control R BF



349-SHE-41

control= progesterona (64 $\gamma$ )

SI=fermentacion por filtrado de  
caldo diluido pH 6,76

SII= análogo SI, pero pH 4,65

R=fermentacion por micelio

BF=fermentacion por filtrado caldo  
sin diluir ph 4,1

carbitol-metilciclohexano

fig. 35

ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*

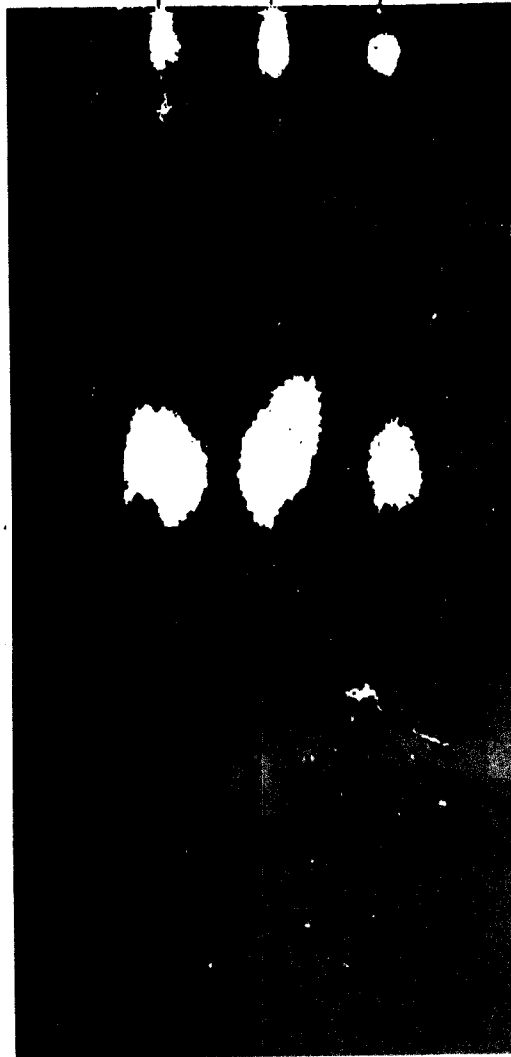
199253

Conversion 11- $\alpha$ -HO, progesterona  
por RH 176

72 + 72      Controles



02 ARI 1952



266-HCM-229 ~ 349-SHE-72

propileno glicol-tolueno  
72<sup>a</sup> fermentacion 11 $\alpha$ -HO, proges-  
terona (320 $\gamma$ )

Controles:  
11 $\alpha$ -HO, progesterona (60 $\gamma$ )  
dihidroxi progesterona (DHP  
95,4) (30 $\gamma$ )

*fig. 36*

ESCALA VARIABLE  
*[Signature]*