



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

PREPARACION DE PROFARMACOS POTENCIALES
DE LA DEHIDROEPIENDROSTERONA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MAYRA APARICIO GUERRERO



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE : PROF. KORKOWSKI PLESS IRMA
VOCAL : PROF. CORNEJO ROJAS ROSA LUZ
SECRETARIO : PROF. HERNÁNDEZ LUIS FRANCISCO
1ER. SUPLENTE : PROF. VILLATORO MÉNDEZ MARÍA ELENA
2DO. SUPLENTE : PROF. HERNÁNDEZ CAMPOS MARÍA ALICIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA., LABORATORIO 122. CONJUNTO E.
FACULTAD DE QUÍMICA, U.NA.M.**

ASESOR



M.C. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

SUPERVISOR TÉCNICO



M.C. ALICIA HERNÁNDEZ CAMPOS

SUSTENTANTE



MAYRA APARICIO GURRERO

***Gracias a Dios, por haberme dado la oportunidad de vivir esta vida,
por haberme rodeado de gente tan maravillosa y por darme la fuerza para
poder luchar por mis objetivos.***

***A la UNAM, de la que me enorgullezco tanto, por ser una escuela
que nos da la oportunidad de ir más allá de lo académico dentro de sus
instalaciones y a quien le debo mucho.***

A ti padre por tu gran amor y apoyo incondicional, por despertar en mí el deseo de superación y por poner a mi alcance todos los recursos para lograrlo; por enseñarme que el trabajo, la constancia y el esfuerzo son las principales armas para conseguir nuestros objetivos.

A ti mamá por tu comprensión y aliento y por todos esos detalles de amor que has tenido siempre.

A ustedes hermanos Arcelia, Alma y Eric, por su comprensión y cariño.

GRACIAS, FAMILIA.

- Al Maestro Francisco, por la oportunidad de trabajar con él, por su apoyo, confianza y paciencia. Por todos esos detalles que despertaron en nosotros, sus alumnos, un gran cariño y admiración.

- Al Dr. Castillo, por haberme permitido ser un pollito en su laboratorio, por su apoyo y por todas las oportunidades que se presentaron a raíz de ello.

- A la maestra Alicia y a todos los chicos y chicas del laboratorio 122 que hacen el laboratorio un lugar muy placentero para trabajar.

Gracias también a mis amigos

- A Celso y a Mario por haber sido mis mejores amigos desde la infancia, por todos los momentos divertidos, felices y, ¿por qué no?, también los tristes. Gracias a ellos y a José Luis por ser mis maestros y porque gracias a su aliento y confianza, en especial en los inicios de la carrera, me permitieron llegar hasta el final.

- A mis mejores amigas de la Facultad, a Diana y a Lupita, con quien compartí tantos momentos tan especiales y que siempre estuvieron ahí, en los momentos difíciles y en los de felicidad.

- A mis amigas del fútbol y a los entrenadores con especial cariño a Emma Luz, Laura, Ceci, Laurita, Jaqueline y Pedro, con los que viví momentos tan emocionantes y divertidos.

- A mis amigos de la adolescencia y de hoy en día Fabiola, Gaby, Rocío, Sandra, Tania y José Antonio.

- A todos mis maestros que me transmitieron sus conocimientos y en especial a aquellos que además de eso dejaron una huella de cariño. A las maestras Emma Rosa, Teresita Labardini, Lorenia, al maestro Jesús y al maestro Juan Manuel.

- A mi mejor amiga de la infancia, Reyna, de la cual sólo recibí cosas lindas y que me dió un claro ejemplo de lo que es la verdadera amistad.

- Y a todos mis compañeros y amigos de la Facultad con los que compartí grandes momentos y que por temor a omitir algún nombre prefiero no mencionar de forma individual.

*A ti cariño, por haber traído tantas cosas bellas a mi vida y por lo mucho que significas para mi, esperando que este sea el primero de muchos logros que alcancemos juntos.
Te amo.*

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. GENERALIDADES.....	3
2.1. ¿QUÉ ES LA DEHIDROEPIANDROSTERONA?	3
2.2. LOS PROFÁRMACOS.....	9
2.3. IMPORTANCIA DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA.....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. OBJETIVOS.....	16
5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO.....	17
6. MÉTODOS DE PREPARACIÓN.....	23
7. RESULTADOS.....	29
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIONES.....	52
10. PARTE EXPERIMENTAL.....	53
10.1. INSTRUMENTACION.....	53
10.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	54
10.3. PREPARACIÓN DEL 3-(CLOROMETIL)BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	55
10.4. PREPARACIÓN DEL 3-(N,N-DIETILAMINOMETIL)- BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	55
10.5. PREPARACIÓN DEL ÁCIDO 4-(TERBUTOXICARBONILAMINO- METIL)BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	56
10.6. PREPARACIÓN DEL 4-(<i>ter</i> -BUTOXICARBONILAMINOMETIL)- BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	57
10.7. PREPARACIÓN DEL CLORHIDRATO DE 4-(AMINOMETIL)- BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	57
10.8. PREPARACIÓN DEL N-METILNICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	58
10.9. PREPARACIÓN DEL YODOHIDRATO DE N-METILNICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	58

10.10 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SOLUBILIDAD.....	59
10.11 TRATAMIENTO DE LOS DESECHOS.....	60
11. ESPECTROS.....	61
12. BIBLIOGRAFÍA.....	111

1. INTRODUCCIÓN

La dehidroepiandrosterona (DHEA), es una sustancia esteroidal con diversas funciones fisiológicas y que se encuentra en forma abundante en el sistema circulatorio. No obstante, se sabe que los niveles plasmáticos de esta hormona disminuyen con la edad y durante ciertos estados patológicos, sobre todo aquellos relacionados con el envejecimiento. Así por ejemplo, se han detectado niveles plasmáticos disminuidos de DHEA en pacientes con cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis¹, Alzheimer, anorexia nerviosa, artritis reumatoide crónica, así como en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) y sífilis congénita. También, bajos niveles de DHEA en plasma o una excreción urinaria anormal de los metabolitos de la misma, se han asociado con otras condiciones patológicas como deficiencia de 5 α -reductasa, síndrome de Cushing² e hipertiroidismo.

Por otro lado, se le ha atribuido un papel importante en el reforzamiento de la respuesta inmune contra enfermedades infecciosas, y un efecto estimulante en el metabolismo de los huesos y contra la osteoporosis.

Se ha demostrado, además, que la administración de la DHEA tiene efecto potencial terapéutico en el tratamiento de varias enfermedades tales como cánceres, obesidad, diabetes, Parkinson, etc previniendo o retardando la incidencia de tales enfermedades. En la clínica se ha empezado a utilizar la DHEA en el tratamiento de la esclerosis múltiple y en la enfermedad de Alzheimer.

¹ Aterosclerosis: Formación de ateromas que ocluyen la luz arterial, obstruyendo el flujo sanguíneo en arterias grandes y medianas. La aterosclerosis debe diferenciarse de la arteriosclerosis que es el endurecimiento de las arterias debida a diversas causas y no necesariamente a la formación de ateromas.^(6,9)

² Síndrome de Cushing: Se caracteriza por un aumento de la secreción de las hormonas glucocorticoides por parte de la corteza suprarrenal, por un tumor benigno o maligno.^(6,9)

Por todo lo anterior, se puede deducir la gran importancia de la dehidroepiandrosterona no sólo por su actual uso en la clínica, sino porque además constituye una sustancia con un alto potencial terapéutico para el tratamiento de cáncer, osteoporosis, obesidad, y diabetes que son enfermedades de una alta incidencia

Sin embargo, una de las dificultades que se presentan al administrar la DHEA es su baja solubilidad acuosa que restringe las alternativas de preformulación y limita su absorción gastrointestinal. Todo ello da como resultado que su utilidad terapéutica se vea comprometida.

Dentro de las técnicas empleadas para incrementar la solubilidad de un compuesto se encuentra el diseño de profármacos. Este consiste esencialmente en convertir, por modificación química, un compuesto biológicamente activo en una forma portadora inactiva que presenta características fisicoquímicas (como la solubilidad) diferentes. Dicha molécula portadora, después de un ataque enzimático o químico, libera al fármaco dentro del organismo antes o en el momento de alcanzar el sitio de acción.

En este trabajo presentamos la síntesis de cuatro profármacos diseñados con la finalidad de aumentar la solubilidad acuosa de la DHEA y, que a su vez, liberen al principio activo (DHEA) dentro del organismo mediante una hidrólisis enzimática de un grupo éster.

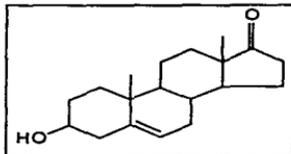
2. GENERALIDADES

En las últimas décadas, se han empleado numerosas estrategias médicas para combatir diferentes enfermedades como aquellas asociadas con el envejecimiento. Entre dichas estrategias empleadas hasta ahora (hormonales, nutricionales y ejercicio), la manipulación nutricional (restricción calórica) es un fuerte instrumento para retardar el comienzo de varias enfermedades (enfermedades del hígado, infecciosas, cánceres y enfermedades autoinmunes), y en extender una longevidad saludable en varias especies de roedores.^(1,2)

Se ha demostrado que la hormona androgénica dehidroepiandrosterona (DHEA) tiene muchos efectos benéficos, tales como la restricción calórica y la modulación de varios procesos patológicos.⁽³⁻⁶⁾ Se han encontrado niveles disminuidos de DHEA en la circulación en un gran número de enfermedades tales como cánceres, diabetes, autoinmunidad y enfermedades cardiovasculares,^(5,6) y se ha demostrado que la elevación exógena de los niveles en plasma de la DHEA previene o retarda la incidencia de tales enfermedades.

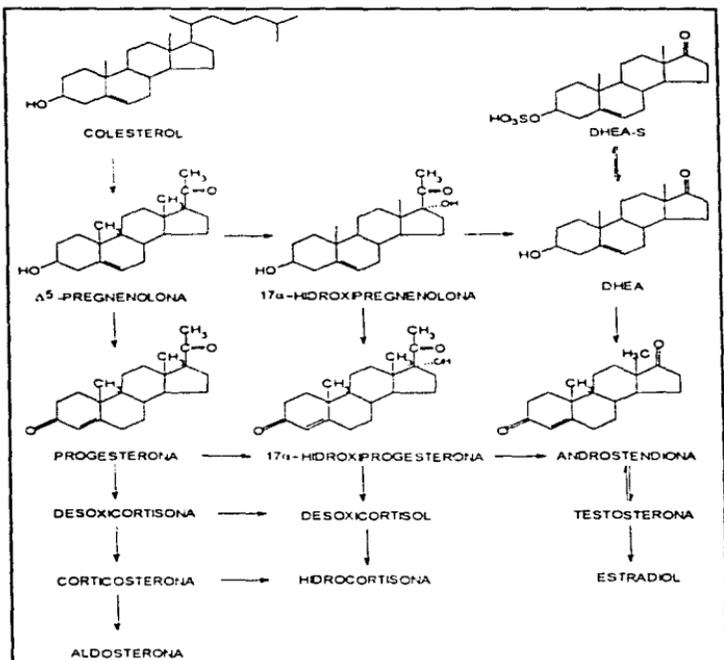
2.1 ¿QUÉ ES LA DEHIDROEPIANDROSTERONA?

La DHEA (3 β -hidroxiandros-5-en-17-ona, dehidroisoandrosterona) es un derivado de androsterona, un esteroide débilmente androgénico y estrogénico que está presente en forma abundante en el sistema circulatorio. Su estructura química se presenta a continuación:



2.GENERALIDADES

Este compuesto es sintetizado principalmente por la corteza adrenal y en menor grado por las gónadas.^(7,8) La DHEA es un intermediario metabólico en la biosíntesis de varias hormonas sexuales (testosterona, estrógeno y estradiol).



BIOSÍNTESIS DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA

La vía tiene como precursor al colesterol, el cual se convierte a pregnenolona. Este a su vez es convertido en 17α -hidroxipregnenolona, la cual finalmente se convierte en la DHEA. ^(9,10)

La DHEA esta presente en el suero humano en forma libre y en forma conjugada (principalmente en la forma sulfatada: DHEAS). La concentración de DHEA en el suero de adultos humanos es de 0.01-0.02 μ M/L, mientras que el de DHEAS es de 5-7 μ M/L y son enzimáticamente interconvertidas. ^(10,11)

Los niveles de DHEA y DHEAS están influenciados por varias condiciones tales como estados patológicos, herencia y edad. Se ha encontrado que los niveles plasmáticos de la DHEA disminuyen con el incremento de la edad. ^(5-8,12-13) Permanecen muy bajos en los primeros años de la vida, se elevan pronunciadamente en la pubertad, hasta alcanzar un máximo entre la segunda y tercera década de la vida, y finalmente declina aproximadamente en un 10% por cada década posterior. ⁽⁵⁻⁸⁾ El decremento de la DHEA relacionado con la edad parece ser más pronunciado en hombres que en mujeres. ^(7,8,14)

Se ha establecido una relación inversa entre los niveles DHEA y la severidad de enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, anorexia nerviosa, etc. ⁽⁵⁻⁸⁾ Se encontró también que los niveles de DHEA son menores en pacientes con artritis reumatoide crónica ⁽¹⁵⁾ y heridas por quemaduras. ⁽¹⁶⁾ así como en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) ⁽¹⁷⁾ y sífilis congénita ⁽¹⁸⁾. De manera similar, los bajos niveles plasmáticos de DHEA o altos niveles urinarios de los metabolitos de la DHEA (por ejemplo, androsterona y etioolanolona) se han asociado con numerosas condiciones patológicas tales como deficiencia de 5α -reductasa, síndrome de Cushing ⁽¹⁹⁾ e hipertiroidismo. ⁽²⁰⁾

2. GENERALIDADES

En contraste a los bajos niveles de DHEA en enfermedades mencionadas arriba, se han reportado altos niveles de DHEA en condiciones patológicas tales como ovarios poliquísticos e hipertricosis^{1, (16)}

Asimismo, se ha comprobado que la DHEA tiene un efecto en el metabolismo de la prolactina⁽¹⁸⁾ que media la estimulación dopaminérgica de la síntesis de esteroides C-19³¹ adrenales; por lo que se ha sugerido que la DHEA, como neuroesteroide, puede tener un papel importante en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Además, se ha observado que los niveles de DHEA decrecen en la enfermedad de Alzheimer,^(19,21) por lo que el uso de DHEA en el tratamiento de este padecimiento ya se ha iniciado.⁽²²⁾ Es interesante el hecho de que la terapia con DHEA reduce el componente sérico amiloide P en ratas viejas,⁽²³⁾ lo que podría explicar el papel terapéutico de la DHEA en la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento.

Adicionalmente, se ha demostrado que la DHEA tiene propiedades antioxidantes,⁽²⁴⁾ efectos estimulantes en la reparación de los huesos y cierta acción en contra de la osteoporosis,^(5,25) y que existe una asociación entre la DHEA y el incremento en la retención de memoria en el ratón⁽²¹⁾ y en humanos.⁽²⁶⁾

Por su parte, la DHEAS vasodilata la arteria oftálmica, incrementando el flujo sanguíneo en mujeres embarazadas, y cambios similares pueden ocurrir en otros vasos cerebrales. Este efecto vasodilatador de la DHEAS puede ser utilizado para el tratamiento de la preeclampsia.⁽²⁷⁾

*Hipertricosis: Desarrollo excesivo, anormal del sistema piloso (pelos y cabellos)

2.1.1. Efecto antiobesidad y antidiabético

Inicialmente se observó que la administración de la DHEA a ratones genéticamente obesos y no obesos, resultaba en una disminución en el ritmo con que aumentaban de peso sin afectar el consumo de alimento ⁽²⁸⁾ Estudios subsecuentes demostraron que, en algunas especies de roedores, la terapia con DHEA reduce la ingesta de alimento sin afectar el peso del cuerpo. ^(29,31)

Se ha sugerido que la DHEA puede reducir la eficiencia metabólica, y que la energía excedente es utilizada para la síntesis de masa corporal libre de grasa. Se observó también que la grasa corporal y los triglicéridos séricos disminuían y las proteínas del cuerpo aumentaban en animales tratados con DHEA comparada con los controles ⁽³²⁾

Además de su efecto antiobesidad, la DHEA también ha mostrado tener un efecto antidiabético en animales experimentales, ^(33,34) en los cuales se logró disminuir la concentración de glucosa en sangre a los niveles normales.

Por otro lado, se ha sugerido que la DHEA puede promover la proliferación de células beta y la regeneración de islotes en el páncreas. La terapia con DHEA incrementa la tolerancia a la glucosa, el tamaño de los adipocitos disminuye y su sensibilidad a la insulina se incrementa ⁽³⁵⁾ Por lo tanto, se ha sugerido que la DHEA puede tener un papel como regulador endógeno.

2.1.2. Efectos anticarcinogénicos.

Se ha encontrado una relación inversa entre los niveles en plasma de la DHEA y/o sus metabolitos y la incidencia en el desarrollo de cánceres de vejiga y gástrico. ⁽³⁶⁾ Además, se ha sugerido que niveles bajos de DHEA en plasma, o una excreción urinaria anormal de sus metabolitos, puede ser de valor clínico para evaluar el riesgo de desarrollar cáncer de mama. ⁽³⁷⁾

Se han reportado diversos estudios sobre el potencial terapéutico de la DHEA como un agente anticancerígeno en varias especies de roedores. Así, se encontró que el tratamiento de ratones y ratas con DHEA reducía el desarrollo de varios tumores inducidos o espontáneos (por ejemplo, piel, pecho, pulmón y colon) ^(34,36). Además, el tratamiento con DHEA a ratas previamente administradas con agentes carcinogénicos, dio como resultado una menor incidencia de cáncer hepático. ⁽³⁹⁾

Con respecto a su efecto anticancerígeno, se ha postulado que la DHEA puede ejercer su acción vía diversos receptores esteroidales, pues reduce el receptor hepático a glucocorticoides en un 50% ⁴⁰. Además, se ha sugerido que el efecto anticarcinogénico de la DHEA puede deberse a una alteración en la producción de citocinas que median la proliferación de la célula. ⁽⁴⁰⁾

2.1.3. Efectos inmunoestimulatorios

En presencia de una infección patógena, la DHEA y varios de sus metabolitos exhiben un acción inmunoprotectora sobre el huésped ^(15, 21-22). Por ejemplo, una sola inyección subcutánea de la DHEA a ratones, los protege de la letalidad de varios agentes infecciosos tales como, enterovirus *coxsackie B*, herpes tipo 2 y *Enterococcus faecalis* ⁽⁴¹⁻⁴²⁾. Además, el tratamiento con DHEA de ratones con quemaduras los protege de la infección letal con *Listeria*. ⁽⁴³⁾ El incremento de la resistencia a las infecciones se debe a que la DHEA contrarresta el efecto inmunosupresor de los glucocorticoides sobre la producción de interleucina-2 por las células T ⁽⁴⁴⁾.

La terapia con DHEA también mejora la supervivencia de ratones que exhiben un desorden similar al del humano en el lupus eritematoso. ⁽⁴⁵⁾

La disminución de la DHEA con la edad se correlaciona con un deterioro de la función del sistema inmune durante el envejecimiento.^(46,47) Debido a que la DHEA tiene una acción inmunoreguladora y/o inmunoestimulante sobre la función de los linfocitos,⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ se ha postulado que la terapia con DHEA puede prevenir o retardar la pérdida de la función inmune relacionada con el envejecimiento.⁽⁵¹⁾

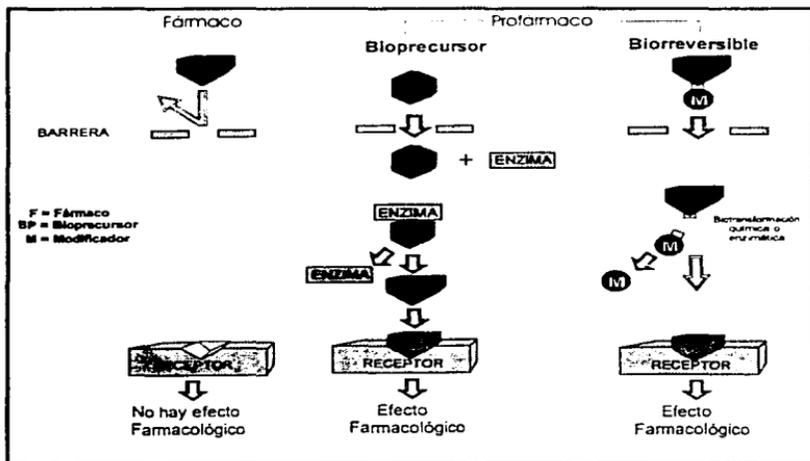
2.2 LOS PROFÁRMACOS

Debido a que la utilidad terapéutica de un fármaco puede verse comprometido por propiedades físicas o químicas desfavorables, incompatibilidad con el sistema vivo o reacciones adversas severas que pudieran impedir su utilidad terapéutica, se han desarrollado un gran número de técnicas que pueden ser empleadas para optimizar el potencial terapéutico de una entidad química recién descubierta o incluso de una ya utilizada. Frecuentemente se recurre a la modificación estructural del compuesto prototipo mediante la síntesis de análogos estructuralmente relacionados. Sin embargo, el diseño de profármacos es también una técnica comúnmente empleada en la Química Farmacéutica que con frecuencia da como resultado un mejoramiento de la utilidad terapéutica del mismo.⁽⁵²⁾

Un profármaco es un precursor farmacológicamente inactivo de un fármaco. El diseño de profármacos consiste esencialmente en convertir, por modificación química, un compuesto biológicamente activo en una forma portadora inactiva que, después de un ataque enzimático o químico, libera al fármaco dentro del organismo antes o en el momento de alcanzar el sitio de acción.

Los profármacos pueden ser de dos tipos:

- 1) **Bioprecusores:** son compuestos que no presentan la estructura del fármaco y que resultan de una modificación molecular de éste. Esta modificación genera un nuevo compuesto inactivo capaz de ser un sustrato de enzimas metabólicas que lo transforman nuevamente en el compuesto farmacológicamente activo.
- 2) **Derivados biorreversibles:** son compuestos que presentan la estructura del fármaco covalentemente unida a un modificador farmacológicamente inactivo y que por medio de una biotransformación química o enzimática liberan a éste último dentro del organismo.



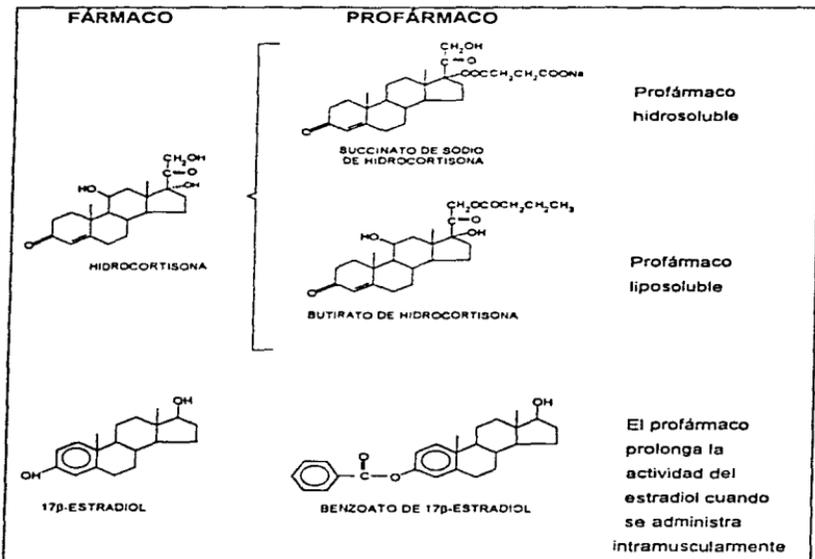
En el diseño de un profármaco deben considerarse los siguientes factores:

- El profármaco será inactivo o menos activo que el fármaco.⁽⁵³⁾
- Debe existir la posibilidad de liberar al compuesto activo por biotransformación enzimática o química dentro del organismo.⁽⁵³⁾
- El progrupo liberado no presentará ningún riesgo toxicológico, ni actividad farmacológica significativa.⁽⁵³⁾
- El enlace covalente entre el progrupo y el compuesto activo debe presentar una estabilidad adecuada que permita su formulación farmacéutica, y al mismo tiempo, su rompimiento en el sitio y/o tiempo deseado dentro del organismo.⁽⁵³⁾
- La velocidad de liberación del compuesto activo debe ser mayor que la velocidad de biotransformación del derivado para evitar la formación de metabolitos de este último o su excreción del cuerpo sin ninguna transformación.⁽⁵⁴⁾
- La síntesis del profármaco no debe ser más costoso que la del compuesto activo; deben preferirse las síntesis de un sólo paso y utilizarse progrupos económicos.⁽⁵³⁾

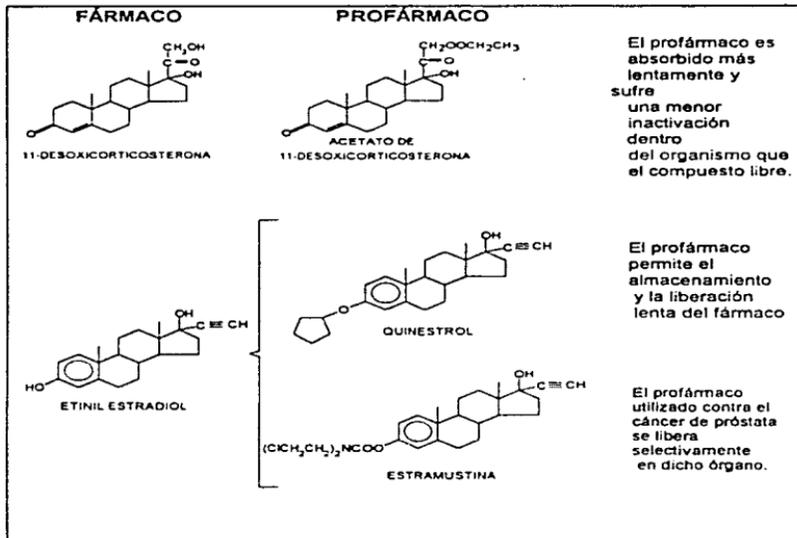
El desarrollo de profármacos tiene como objetivos:

- 1) Alterar la farmacocinética (absorción, distribución, biotransformación y excreción) del fármaco.⁽⁵³⁾
- 2) Prolongar la acción del fármaco.⁽⁵³⁾
- 3) Incrementar su estabilidad.⁽⁵³⁾
- 4) Facilitar su formulación farmacéutica.⁽⁵³⁾
- 5) Mejorar sus propiedades organolépticas.⁽⁵²⁾
- 6) Disminuir la toxicidad y los efectos secundarios.⁽⁵³⁾
- 7) Aumentar su especificidad sobre el sitio de acción.⁽⁵³⁾

Las hormonas esteroidales se prestan para el diseño de derivados biorreversibles ya que la mayoría contiene grupos hidroxilo que pueden fácilmente ser esterificados tanto con un modificador soluble en agua como por uno soluble en disolventes oleosos, según se requiere para una determinada forma farmacéutica y uso de la misma. Además es muy factible que estos ésteres sean hidrolizados dentro del organismo por enzimas esterasas y regeneren al fármaco.



APLICACIÓN DE LOS PROFÁRMACOS EN HORMONAS ESTEROIDALES



APLICACIÓN DE LOS PROFÁRMACOS EN HORMONAS ESTEROIDALES

2.3 IMPORTANCIA DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA

Un paso necesario en la terapia con un fármaco es incorporarlo en una forma farmacéutica (formulación) adecuada para su administración al paciente y que facilitará su absorción hacia el sistema circulatorio.⁽⁵²⁾

El agua es el solvente preferido para la preparación de formas farmacéuticas líquidas de los fármacos, tales como, soluciones orales e inyectables; sin embargo, en muchos casos, la solubilidad del compuesto activo en agua es muy baja para permitir la preparación de una formulación acuosa.⁽⁵²⁾

Los compuestos insolubles en agua con frecuencia son escasamente absorbidos debido a la lenta disolución del sólido y/o a una muy baja concentración en solución. lo que produce una fuerza pequeña de difusión. En tal situación, el trabajo de preformulación (optimización de un fármaco a través de la determinación y/o definición de aquellas propiedades físicas o químicas consideradas importantes en la formulación de una forma de dosificación estable, efectiva y segura) podría incluir la preparación de derivados biorreversibles solubles en agua con una mayor velocidad de disolución del fármaco.⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾

La solubilidad acuosa es un parámetro biofarmacéutico crítico que indica los problemas potenciales en la biodisponibilidad de un fármaco, sin embargo, no es una limitante estricta en la relación solubilidad-absorción. Los factores que determinan esta relación son: la velocidad de disolución y la solubilidad como una función del pH dentro del rango fisiológico, la velocidad de disolución en función del tamaño de partícula o área superficial y la dosis del compuesto.⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Dehidroepiandrosterona (DHEA) es un compuesto al que recientemente se le han atribuido diversas funciones fisiológicas y se le ha relacionado con diversas patologías y desórdenes. Por ello, ha despertado un gran interés la posibilidad de utilizarla con fines terapéuticos. Sin embargo la DHEA, debido a su naturaleza esteroidea, es prácticamente insoluble en agua, lo que cierra varias alternativas de formulación oral y parenteral o limita su biodisponibilidad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

El propósito del presente trabajo consiste en el diseño y síntesis de cuatro profármacos potenciales de la dehidroepiandrosterona (DHEA) con la finalidad de incrementar la solubilidad acuosa de este principio activo y de esta forma, facilitar su formulación farmacéutica y mejorar su biodisponibilidad.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar búsqueda bibliográfica sobre la dehidroepiandrosterona, sus actividades biológicas y posibles profármacos ya sintetizados.
- Diseñar profármacos potenciales en donde se incremente la solubilidad acuosa de la dehidroepiandrosterona
- Sintetizar los profármacos diseñados mediante rutas de preparación sencillas
- Evaluar la pureza de los productos mediante cromatografía de capa fina y punto de fusión.
- Elucidar la estructura de los productos mediante métodos espectroscópicos (IR, RMN, Masas).
- Elucidar cualitativamente la solubilidad de los profármacos a pH 7.4.

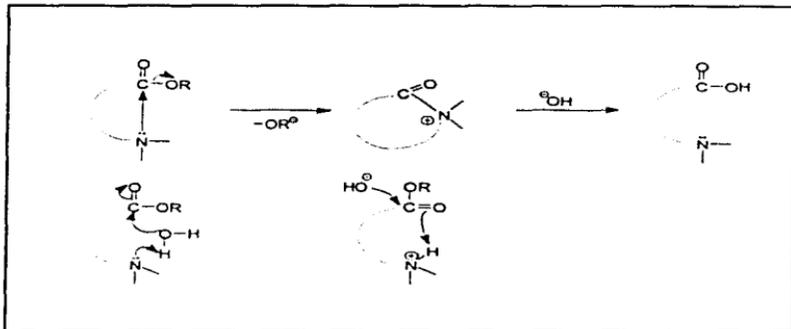
5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO

Debido a la baja solubilidad acuosa de la dehidroepiandrosterona y los problemas que esto representa para su formulación farmacéutica y biodisponibilidad, en el presente trabajo se plantea la síntesis de cuatro profármacos potenciales de la DHEA con el propósito de incrementar su hidrosolubilidad.

Dicho incremento se pretende lograr con la adición a la molécula de DHEA de porciones estructurales que por sus características de polaridad otorgarán cierta hidrosolubilidad al profármaco. Tal adición, se llevará a cabo mediante la formación de un enlace éster con el grupo hidroxilo del C-3 de la DHEA, que a su vez tendrá la factibilidad de ser hidrolizado por enzimas dentro del organismo (esterasas) que liberen al principio activo. Las esterasas, son enzimas que se encuentran en gran proporción en sangre sin embargo, también están presentes en otros órganos como el hígado, el páncreas y la piel.

Un tipo de ésteres solubles en agua que han sido descritos para el diseño de profármacos son ésteres de α -aminoácidos o ésteres relacionados de aminoácidos de cadena alifática corta. Sin embargo, estos ésteres son en general fácilmente hidrolizables por las enzimas del plasma y exhiben una muy baja estabilidad en solución acuosa.^(58,59) La razón principal por la alta inestabilidad de tales aminoácidos en soluciones acuosas a valores de pH a lo cuales presentan su solubilidad acuosa óptima (pH 3-5) es, en parte, debido al efecto electroatrayente del grupo amino protonado el cual activa el enlace éster al ser atacado por el oxígeno del agua. Esto es originado parcialmente por una catálisis intramolecular que da como resultado la hidrólisis del éster,^(60,61) como se muestra en la siguiente figura:

5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO

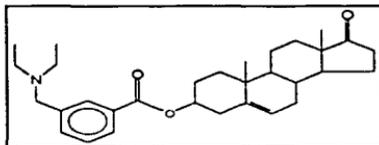


Ahora bien, se sabe que la forma más efectiva y simple de bloquear totalmente la hidrólisis facilitada por el efecto del grupo amino, y además reducir la velocidad de hidrólisis enzimática del éster, es incorporar un grupo fenilo entre la porción del éster y el grupo amino. De esta manera, la reacción catalítica intramolecular del grupo amino no es posible por razones estéricas. Además, la labilidad del éster debido al grupo amino protonado por su carácter polar, se disminuye en gran medida.

Por otra parte, debido a que se requiere un pKa mayor de 5-6 para que el grupo amino se encuentre protonado en plasma (por razones de solubilidad) el grupo no se une directamente al anillo aromático ya que esto daría una amina con un bajo pKa , pero separado de éste por un grupo alquilo (en el más simple de los casos un grupo metileno) da como resultado una amina con un pKa mayor, lo que permitiría que a pH del plasma se presentara mayoritariamente en forma iónica.

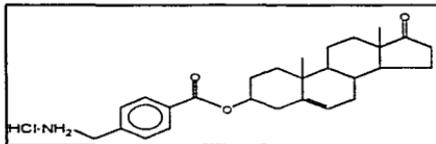
5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO

Con base a lo anterior se diseñó el primer profármaco, el compuesto 3, que presenta la siguiente estructura:



3-(N,N-Diethylaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona
(Compuesto 3)

Para el segundo profármaco, el compuesto 6, se utilizó el mismo criterio de diseño que para compuesto 3, en relación a las consideraciones del valor de pKa del grupo amino. Sin embargo, se han seleccionado dos posiciones diferentes de ubicación de dicho grupo en el modificador; en el compuesto 3, la relación de la sustitución del grupo amino con el carboxilo es 1-3; y en el compuesto 6, la relación es 1-4. Esto se hizo con la intención de que, en estudios posteriores, pueda determinarse si el reconocimiento enzimático para la hidrólisis de ambos compuestos es diferente.

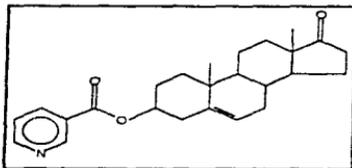


Clorhidrato de 4-(aminometil)benzoato
de dehidroepiandrosterona
(Compuesto 6)

5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO

Es importante tomar en cuenta que una de las características con la que deben cumplir los profármacos es que, al liberarse el fármaco, el modificador no tenga efectos tóxicos, lo cual se encuentra estrechamente relacionado con la facilidad con que éste último pueda ser metabolizado y excretado. Pensando en ello, los modificadores seleccionados para el primero y segundo profármacos (compuestos 3 y 6) son estructuras similares a las de los aminoácidos y que por tanto pueden ser metabolizados de manera similar. Además, se pensó en dar dos opciones para metabolizar a estos profármacos. Primero, en el caso del compuesto 3, la amina se encuentra dialquilada, por lo que se espera que su biotransformación se lleve a cabo en la porción del carboxilo mediante una reacción de conjugación con sulfato o ácido glucurónico, y segundo, en el compuesto 6 se encuentra un grupo amino sin sustituir por lo que este compuesto tiene la posibilidad de presentar reacciones metabólicas de conjugación en dos sitios: en el carboxilo y en el grupo amino.

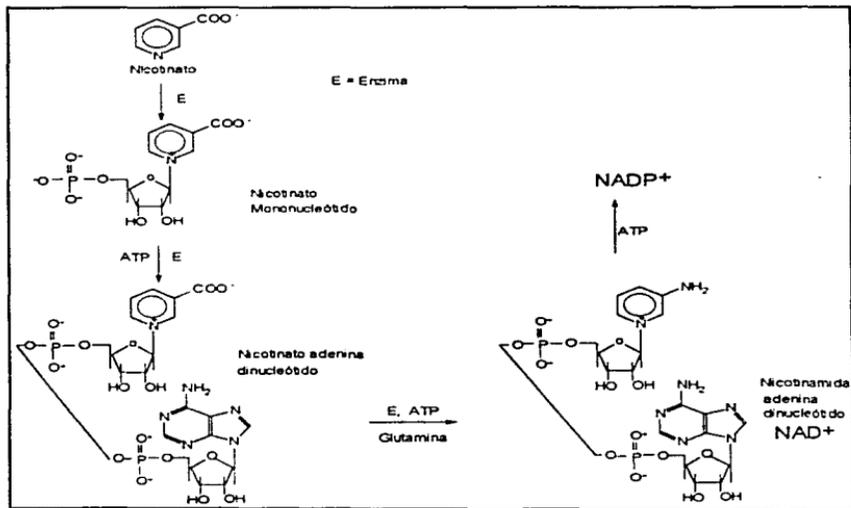
Para el diseño del tercer profármaco, el compuesto 7, se utilizó como modificador al grupo nicotinoilo, ya que por sus características de polaridad, se espera confiera una mayor hidrosolubilidad a la DHEA.



Nicotinato de Dehidroepiandrosterona
(Compuesto 7)

5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO

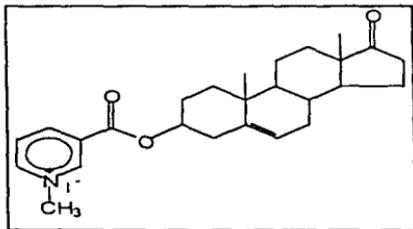
Por otra parte, al hidrolizarse el éster dentro del organismo como se espera, se liberará la DHEA y nicotinato, éste último constituye la vitamina B₃ (niacina) que normalmente es convertida fácilmente a NAD⁺ y NADP⁺ por el organismo.⁽⁶²⁾



Ruta metabólica para la síntesis de NAD⁺ y NADP⁺ a partir de nicotinato

5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO

El último profármaco, el compuesto 8, sólo presentará una ligera variación con respecto al profármaco anterior, que consiste en introducir un grupo metilo en el nitrógeno del nicotinato. Con ello se pretende lograr un compuesto que invariablemente se encuentre ionizado, independientemente del pH fisiológico en el que se encuentre, lo que facilitará su solubilidad acuosa e incrementará opciones de formulaciones farmacéuticas



Yodohidrato de N-metilnicotinato
de dehidroepiandrosterona
(Compuesto 8)

Además, el modificador liberado será el nicotinato metilado el cual puede ser metabolizado dentro del organismo mediante una N-desmetilación y posteriormente seguir la ruta metabólica del nicotinato para la síntesis de NAD⁺ y NADP⁺.

6. MÉTODOS DE PREPARACIÓN

6.1 PRIMER PROFÁRMACO

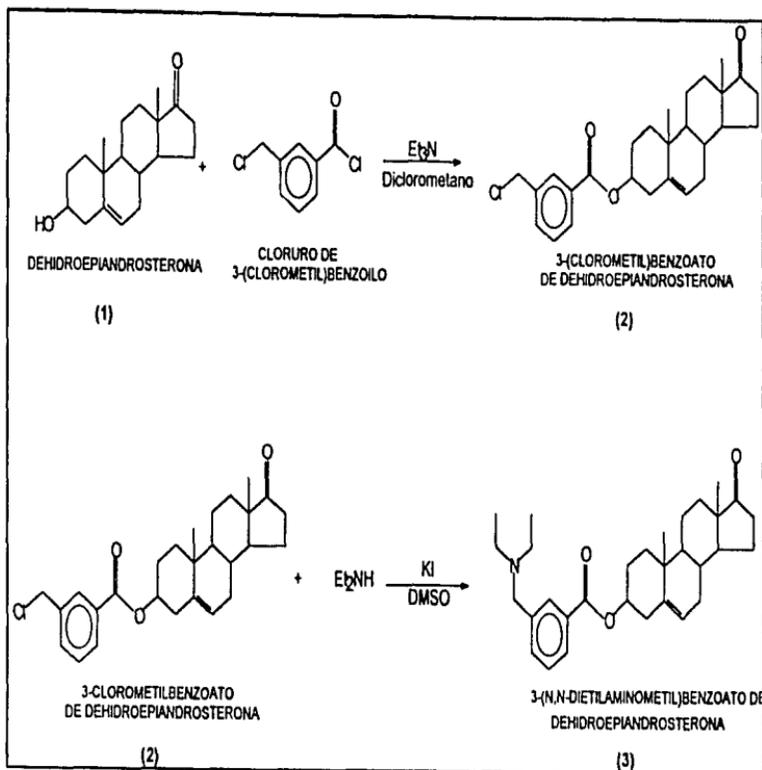
6.1.1. Preparación del 3-(Clorometil)benzoato de dehidroepiandrosterona (2)

La dehidroepiandrosterona se hizo reaccionar con cloruro de 3-(Clorometil)benzoilo, en presencia de trietilamina y diclorometano anhidro como disolvente. A las 24 horas se detuvo la reacción y se observó la formación de un sólido por lo que se filtró la mezcla de reacción, obteniéndose el producto en el filtrado. Este último se concentró en el evaporador rotatorio hasta sequedad y el sólido obtenido se lavó varias veces con agua ácida para eliminar exceso del cloruro de nicotinoilo y el clorhidrato de trietilamina y posteriormente con agua neutra obteniéndose el compuesto 2 puro. Éste presentó un Rf de 0.57 en el sistema a de elución, un punto de fusión de 173-174°C y un rendimiento del 90%.

6.1.2. Preparación del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona (3)

El compuesto 2 se hizo reaccionar con dietilamina en presencia de KI como catalizador y DMSO como disolvente, utilizando atmósfera de nitrógeno y protegido de la luz. A las 48 horas concluyó la reacción y se procedió a precipitar el producto mediante la adición de agua, obteniéndose así el compuesto 3, un sólido blanco amarillento que en CCF presentó dos manchas. Se filtró y lavó con agua fría para purificarlo. Este compuesto presentó una sola mancha en CCF con Rf de 0.61 en el sistema a de elución y un punto de fusión de 100-101°C. El rendimiento de la reacción fue de 84.4%.

(Ver esquema de reacción 1)



ESQUEMA DE REACCIÓN 1

6.2. SEGUNDO PROFÁRMACO

6.2.1. Preparación del ácido 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoico (4)

Se hizo reaccionar una suspensión de ácido 4-(aminometil)benzoico en una mezcla de etanol, agua y sosa con carbonato de di-*ter*-butilo. A las 18 horas concluyó la reacción obteniéndose el ácido 3-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoico (4).

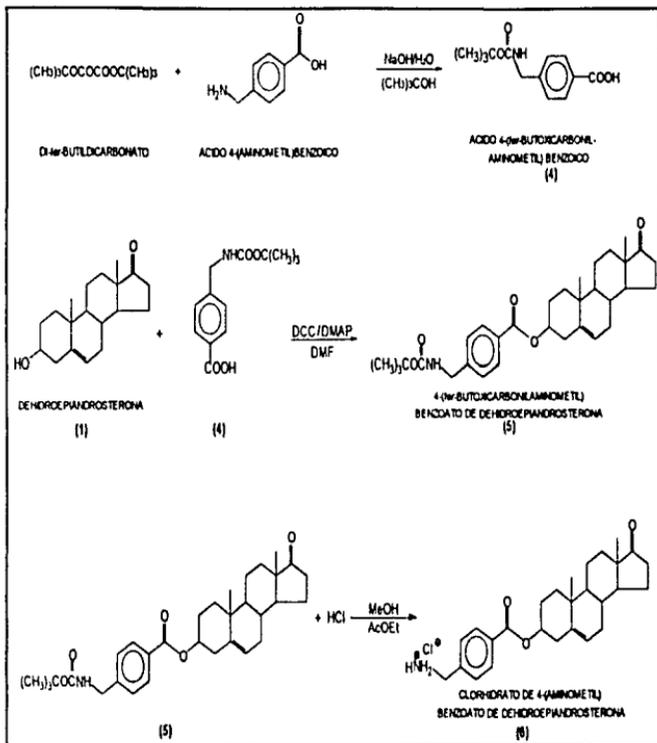
6.2.2. Preparación del 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona (5)

El compuesto 4 se hizo reaccionar con la dehidroepiandrosterona en presencia de 4-dimetilaminopiridina, dicitclohexilcarbodiimida y DMF anhidra como disolvente. A las 24 horas concluyó la reacción obteniéndose el 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona (5).

6.2.3. Preparación del Clorhidrato de 4-(aminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona (6)

El compuesto 5 se disolvió en acetato de etilo y se hizo reaccionar con una solución de HCl 3N en metanol. Al concluir la reacción se obtuvo el clorhidrato de 4-aminometilbenzoato de dehidroepiandrosterona (6).

(Ver esquema de reacción 2)



ESQUEMA DE REACCIÓN 2

6.3 TERCER PROFÁRMACO

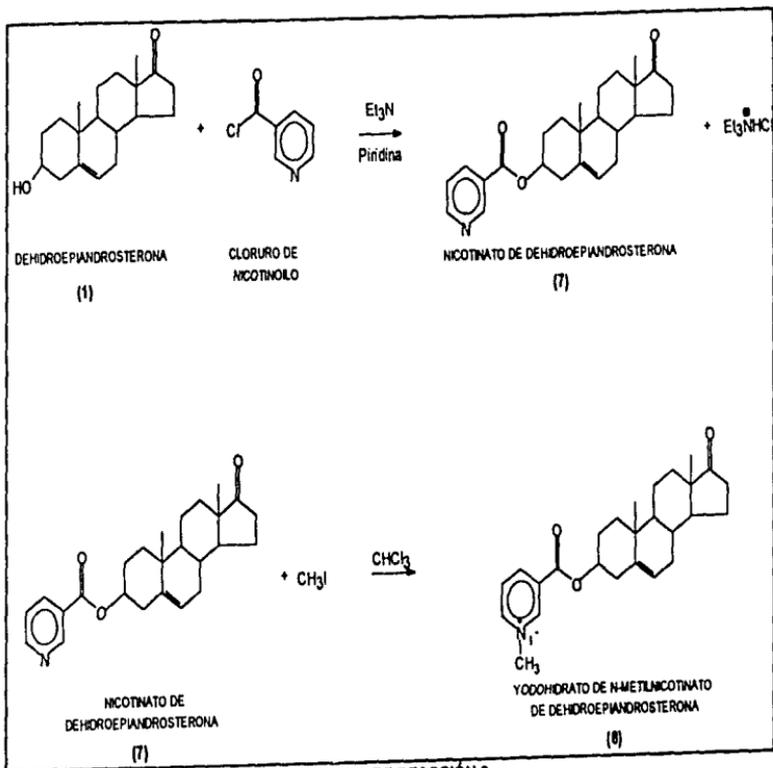
6.3.1. Preparación del Nicotinato de dehidroepandrosterona (7)

La dehidroepandrosterona se hizo reaccionar con cloruro de nicotinoilo en presencia de piridina como catalizador, trietilamina y diclorometano anhidro como disolvente. A las 8 horas se completó la reacción advirtiéndose la presencia de un sólido blanco amarillento. El compuesto obtenido presentó un $R_f = 0.78$ en el sistema b, un punto de fusión de 173°C y rendimiento de 24%. Al realizar una CCF del sólido y del disolvente, se observó que el producto se encontraba en ambos, por lo que se evaporó el disolvente y el sólido obtenido se lavó con agua fría ácida, básica y neutra sucesivamente para eliminar el exceso de cloruro de nicotinoilo, la piridina y la sal de la trietilamina, obteniéndose así el compuesto 7 puro, el cual presentó una sola mancha en CCF con un R_f de 0.53 en el sistema c, un punto de fusión de $264\text{-}265^{\circ}\text{C}$ y un rendimiento del 96.6%

6.4 CUARTO PROFÁRMACO

6.4.1. Preparación del Yodohidrato de N-metilnicotinato de dehidroepandrosterona

El compuesto 7 se hizo reaccionar con yoduro de metilo en exceso bajo atmósfera de nitrógeno y protegido de la luz, utilizando cloroformo como disolvente. La reacción se completó a las 48 horas, se evaporó el disolvente y el sólido obtenido se lavó con acetona fría para su purificación. Se obtuvo así, un sólido amarillo claro que correspondió al compuesto 8 y que en CCF presentó una sola mancha con un R_f de 0.33 en el sistema d, un punto de fusión de 265°C y un rendimiento de 47.0%
(Ver esquema de reacción 3)



ESQUEMA DE REACCIÓN 3

7. RESULTADOS

PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS PROFARMACOS SINTETIZADOS

Comp.	Rf	p.f. °C	rend. total %	Solubilidad ppm (mM)
3	0.61 ^a	100-101	76.00	NC
6	0.00 ^b	>284	21.69	NC
7	0.53 ^c	264-265	96.60	8.1(0.020)
8	0.33 ^d	265	45.40	358.0(0.666)

Sistemas de elución:

a:Cloroformo-Metanol 97:3
 b: Cloroformo-Metanol 90-10
 c: Cloroformo-Metanol-NH₄OH 97:3
 d:Cloroformo-Metanol 80:20

NC = No cuantificable

ESPECTROSCOPIA

COMP	DATOS ESPECTROSCÓPICOS
1	IR (KBr) v: 3460 (OH), 1732 (CO) cm^{-1} . ^1H RMN (TMS) CHCl_3 -d δ : 5.3 (d, 1H, C-6 H); 4.65 (d, intercambiable con D_2O , 1H, OH); 3.25 (ma, 1H, C-3 H); 2.5-1.0 (señales complejas, 19H); 0.95 (s, 3H, C-10 CH_3); 0.8 (s, 3H, C-13 CH_3) ppm.
2	IR (KBr)v: 1732 (CO) ; 1700, 1286, 1200(COOR), 1608, 1470 (arom.) cm^{-1} . ^1H RMN (TMS) DMSO-d δ : 8.1-7.8 (d, 2H, ArH); 7.7-7.3 (señal compleja, 2H, ArH); 5.4-5.5 (d, 1H, C-6 H); 4.7 (s, 2H, C-3' CH_2); 3.3 (ma, 1H, C-3 H), 2.6-1.1 (señal compleja, 19H); 1.15 (s, 3H, C-10 CH_3); 0.9 (s, 3H, C-13 CH_3) ppm.
3	IR (KBr)v: 1738(CO); 1712,1280, 1196 (COOR) cm^{-1} . ^1H RMN (TMS) CHCl_3 -d δ 7.9-7.8 (d, 2H, ArH); 7.6-7.2 (señal compleja, 2H, ArH); 5.4-5.5 (d, 1H, C-6 H); 4.8 (ma, 1H, C-3 H); 3.6 (s, 2H, C-3' CH_2); 2.3-2.6 (m, 4H, NCH_2); 2.6-0.9 (señal compleja, 19H); 1.2 (t, 6H, C-9' CH_3); 1.0 (s,3H, C-10 CH_3); 0.9 (s, 3H, C-13 CH_3) ppm.
4	IR (KBr) v: 3356, 1668 (COOH) ;1612, 1510 (arom) cm^{-1} . ^1H RMN (TMS) DMSO-d δ 7.9 (d, 2H, ArH); 7.3 (d, 2H, ArH); 1.4 (s, 9H, CH_3) ppm
5	IR (KBr) v 3440, 1692 (CONH), 1736 (CO), 1712, 1272, 1172 (COOR), 1612, 1510,1454 (arom.) cm^{-1} . ^1H RMN (TMS) CHCl_3 -d δ 8 (d, 2H, ArH); 7.3 (d, 2H, ArH); 5.5 (d, 1H, C-6 H); 5 (s, 1H, NH); 4.8 (ma, 1H, C-3 H); 4.3 (s, 2H, c-4' CH_2); 2.5-1.1 (señales complejas, 19H); (s, 9H, c-3'' CH_3); 1.1 (s, 3H, C-10 CH_3); 0.9 (s, 3H, C-13 CH_3) ppm. Masas (I.E) $m/z = 521.0$
6*	IR (KBr) v: 3396(NH_2); 1736(CO); 1712, 1276, 1114 (COOR); 1612,1466 (arom.) cm^{-1} . ^1H RMN (TMS) CHCl_3 -d δ 8 (d, 2H, ArH); 7.3 (d, 2H, ArH); 5.4 (d, 1H, C-6 H); 5 (s, 1H, NH); 4.8 (m amplio, 1H, C-3 H); 3.9 (s, 2H, C-4' CH_2); 2.5-1.1 (señales complejas, 19H); 1.1 (s, 3H, C-10 CH_3); 0.9 (s, 3H, C-13 CH_3) ppm.

* Para los espectros de este compuesto se formó la amina libre del mismo con el objeto de facilitar su elucidación estructural

7.RESULTADOS

COMP.	DATOS ESPECTROSCOPICOS
7	<p>IR (KBr) ν: 1736(CO); 1710, 1284, 1122 (COOR) cm^{-1}.</p> <p>^1H RMN (TMS) CHCl_3, δ: 9.2 (s, 1H, C2' H); 8.8 (s, 1H, C-8' H); 8.3 (d, 1H, C-4' H); 7.4 (s, 1H, C-5' H); 5.5 (d, 1H, C-6 H); 4.9 (ma, 1H, C-3 H); 2.6-1.15 (señal compleja, 19H); 1.1 (s, 3H, C-10 CH_3); 0.9 (s, 3H, C-13 CH_3) ppm.</p> <p>Massas (I.Q.) m/z = 395.2</p>
8	<p>IR (KBr) ν: 1732 (CO); 1732, 1300, 1120 (COOR) cm^{-1}.</p> <p>^1H RMN (TMS) CHCl_3, δ: 9.7(s, 1H, C4' H); 9.5 (s, 1H, C-2' H); 8.95 (d, 1H, C-8' H); 8.4(t, 1H, C-5' H); 5.5 (d, 1H, C-6 H); 4.9 (ma, 1H, C-3 H); 4.8 (s, 3H, NCH_3); 2.7-1.15 (señal compleja, 19H); 1.1 (s, 3H, C-10 CH_3); 0.9 (s, 3H, C-13 CH_3) ppm.</p>

s = singulete

d = doblete

ma = multiplete amplio

I.E. = Impacto electrónico

I.Q. = Ionización química

7.RESULTADOS

ESPECTROSCOPIA DE ^{13}C

No. ^{13}C	COMPUESTO					
	1	3	5	6	7	8
1	36.93	38 14	38 12	38 14	38 04	37.79
2	31 41	27 76	27 75	27 77	27.70	27.54
3	69 93	74 27	74 26	74 47	74 91	77 31
4	42 21	36.95	36.92	36 74	36 86	36 63
5	141 35	139 93	139 89	139 90	139 615	139 07
6	119 90	121 90	121 96	121 99	122 207	122 59
7	31 22	31 39	31 38	31 44	31 35	31 28
8	31 02	31 47	31 38	31 35	31 35	31 28
9	49 80	50 15	50 14	50 11	50 08	49 95
10	36 24	36 76	36 77	36 92	36 72	36 68
11	20 00	20 30	20 31	20 28	20 29	20 21
12	30 27	30 76	30 77	30 74	30 75	30 66
13	46 28	47 45	47 47	46 15	47 45	47 37
14	50 93	51 69	51 68	51 66	51 64	51 54
15	21 46	21 33	21 82	21 82	21 83	21 74
16	35 27	35 77	35 78	35 78	35 79	35 71
17	219 35	220 90	220 87	221 10	220 835	220 77
18	13 16	13 49	13 48	13 49	13 50	13 44
19	19 15	19 35	19 36	19 35	19 35	19 28
C=O (éster)		166 01	165 70	165 89	164 611	160 26
1'		130 64	129 80	129 27		
2'		129 91	129 80	129 82	150 82	146 04
3'		139 93	127 04	126 88	123 38	130 87
4'		133 48	121 13	127 20	136 94	144 96
5'		128 20	127 04	126 88	122 20	128 59
6'		128 20	129 80	129 827	153 20	149 01
1''		57 07	44 30	47 496		50 33
2''		46 66	144 41			
3''		11 438	74 26			
4''			28 34			

TABLA DE RESULTADOS DE SOLUBILIDAD

COMP.	ABSORBANCIAS			PROMEDIO	DILUCION	CONCENTRACION ppm (mM)
	1	2	3			
3	0.067	0.055	0.044	0.055	0	NC
6	0.028	0.028	0.028	0.028	0	NC
7	0.262	0.263	0.288	0.271	0	8.075 (0.020)
8	0.595	0.560	0.527	0.561	1:20	358.038 (0.666)

NC= No Cuantificable

7.RESULTADOS

CURVA PATRON DE 3-(N,N-DIETIL-AMINOMETILBENZOATO) DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

Concentración (ppm)	Absorbancia λ max.= 230nm
5	0.211
10	0.394
20	0.729
30	0.984

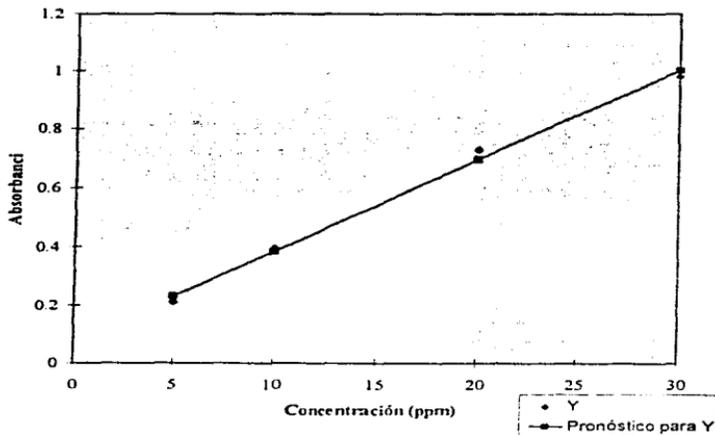
Resultados de la
regresión lineal

a = 0.0759

b = 0.0310

r = 0.997

Curva de regresión ajustada



7.RESULTADOS

CURVA PATRON DEL CLORHIDRATO DE 4-(AMINOMETIL)BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

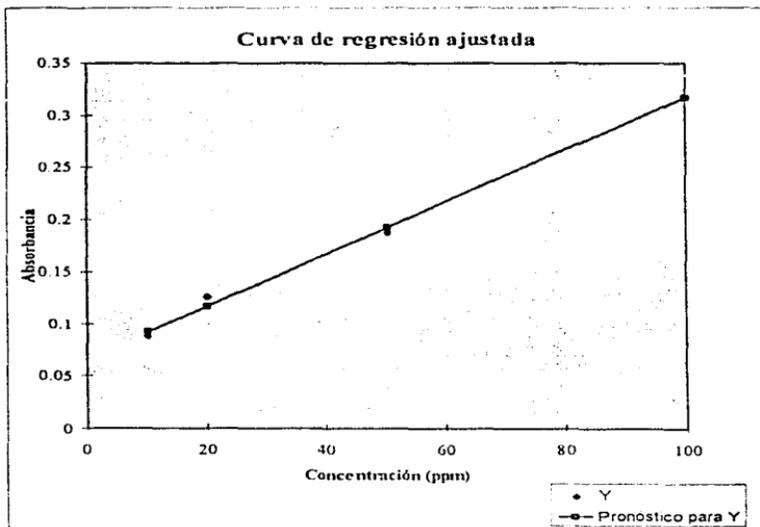
Concentración (ppm)	Absorbancia $\lambda_{max.} = 253nm$
10	0.088
20	0.126
50	0.187
100	0.318

Resultados de la regresión

$$a = -0.0677$$

$$b = 0.0025$$

$$r = 0.9980$$



7.RESULTADOS

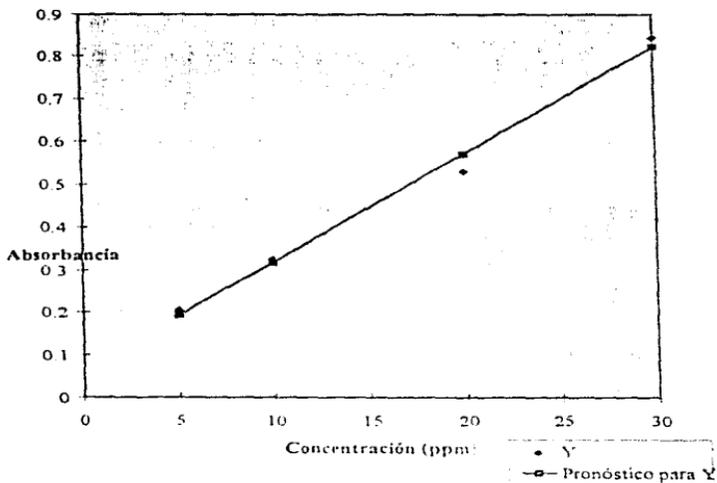
CURVA PATRON DE NICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

Concentración (ppm)	Absorbancia $\lambda_{max.} = 220nm$
5	0.205
10	0.326
20	0.529
30	0.845

Resultados
de la regresión:

a = 0.0582
b = 0.0251
r = 0.9950

Curva de regresión ajustada



**CURVA PATRON DEL YODOHIDRATO
DE N-METILNICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA**

Concentración (ppm)	Absorbancia $\lambda_{max} = 225nm$
5	0.079
10	0.317
20	0.635
30	0.978

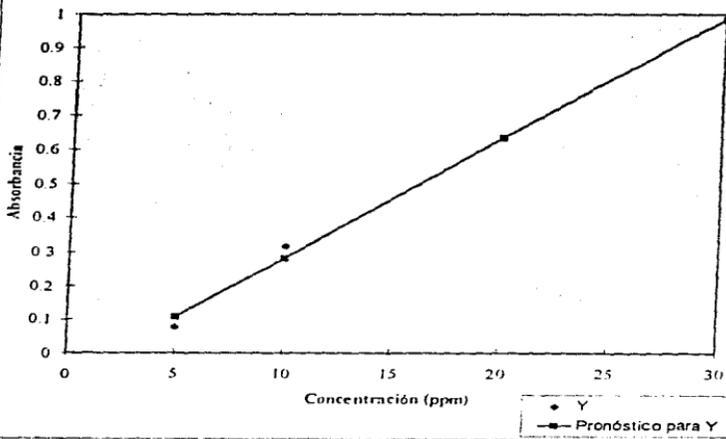
Resultados de la
regresión lineal:

$$a = -0.0687$$

$$b = 0.03515$$

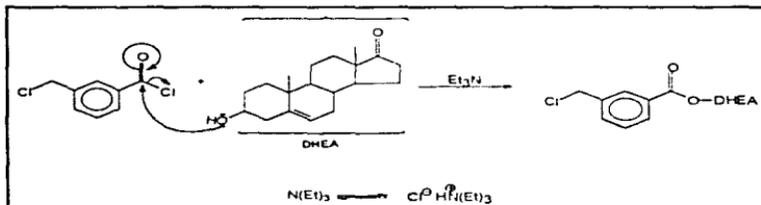
$$r = 0.9978$$

Curva de regresión ajustada

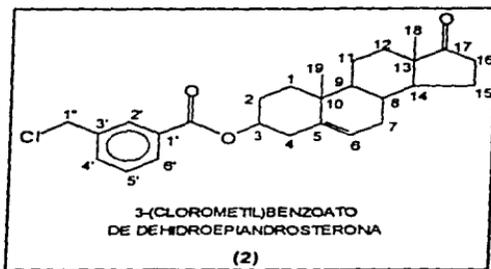


8. DISCUSIÓN

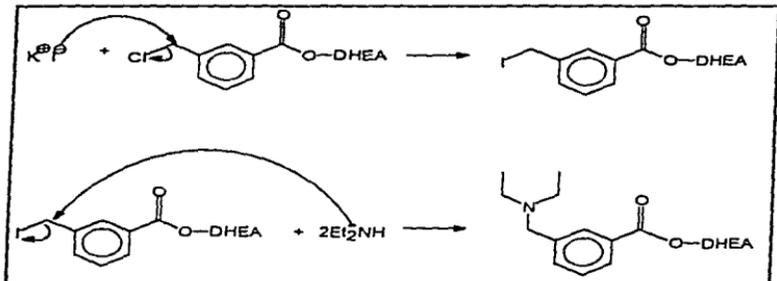
Para la síntesis del primer profármaco (3) se llevó a cabo, como primer paso, una reacción de sustitución nucleofílica por parte del grupo hidroxilo del C-3 de la dehidroepiandrosterona sobre el carbonilo del cloruro de 3-(clorometil)benzolo. Además, se utilizó trietilamina para captar el ácido clorhídrico que se forma durante la reacción, con lo que se cumplen dos objetivos: impedir una posible hidrólisis del enlace éster y promover un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de los productos.



Inicialmente la reacción se realizó con un equivalente de DHEA y un equivalente del cloruro de ácido, sin embargo, la materia prima nunca se agotó por lo que posteriormente se realizó la misma reacción con 1.5 equivalentes del cloruro de ácido. Al finalizar la reacción, la mezcla de reacción presentó un precipitado que posiblemente era el clorhidrato de la trietilamina. Por ello, se separó por filtración y en el filtrado se obtuvo el producto esperado. Se evaporó el disolvente del filtrado y el sólido obtenido se lavó varias veces con agua ácida para eliminar el exceso de cloruro de nicotinoilo y el clorhidrato de trietilamina, obteniéndose así el compuesto 2 puro.

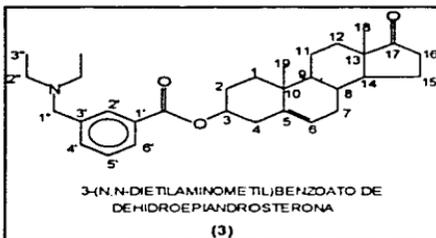


Como segundo paso, el compuesto 2 se sometió a una sustitución nucleofílica de tipo S_N2 con dietilamina anhidra, utilizando KI como catalizador nucleofílico, DMSO como disolvente, bajo atmósfera de nitrógeno y protegida la reacción de la luz para evitar la oxidación del KI. Se recurrió al uso de DMSO como disolvente por su alta polaridad que estabiliza el estado de transición, así como por la facilidad con la que disolvió al KI.

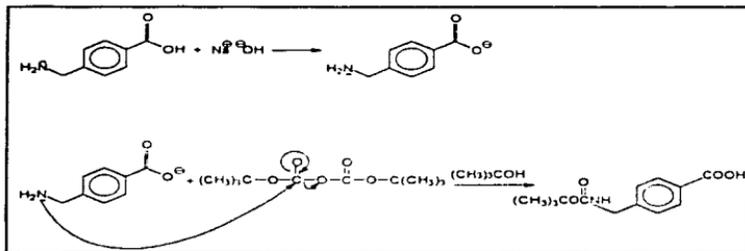


8. DISCUSIÓN

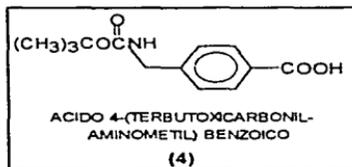
Una vez concluida la reacción, se procedió a precipitar el producto mediante la adición de agua, obteniéndose así el compuesto 3, un sólido blanco amarillento que en CCF presentó dos manchas. Se filtró y lavó con agua fría para purificarlo. El rendimiento del 84.4% pudo deberse a la formación de otro compuesto como se manifestó al realizar una CCF de la mezcla de reacción.



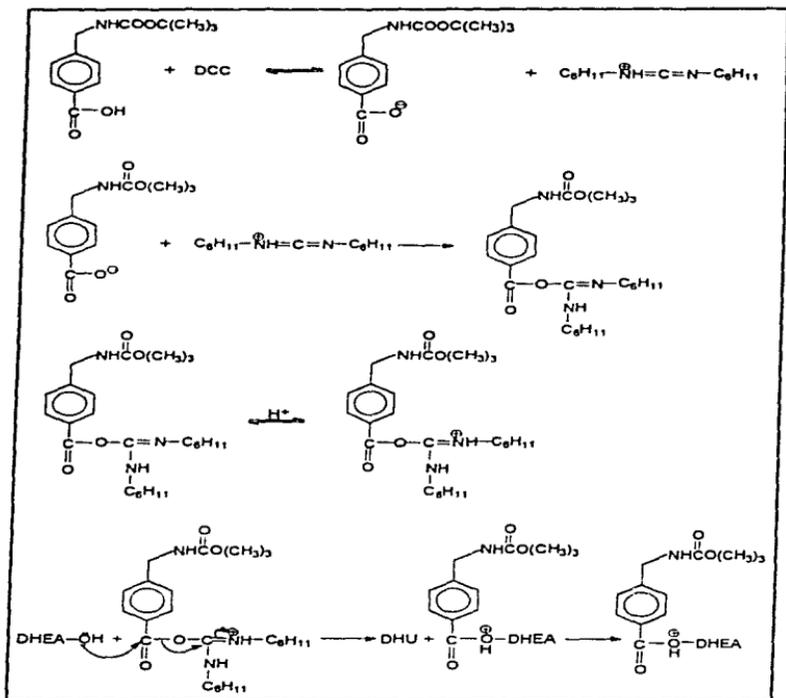
Para la síntesis del segundo prófármaco o compuesto 6 se requería el ácido 3-(aminometil)benzoico, sin embargo, el grupo amino de esta molécula debía de ser protegido antes de realizar la sustitución nucleofílica en la DHEA para evitar que interviniera en la reacción de formación de éster. Dicha protección se realizó mediante la formación de un carbamato. Para ello, se hizo reaccionar ácido 4-(aminometil)benzoico con carbonato de di-*ter*-butilo.



Como primer paso en esta reacción se suspendió el ácido en el medio de dos fases: agua con sosa y alcohol *ter*-butílico, para permitir la ionización del ácido carboxílico (y "alinearlo" hacia la fase acuosa y evitar que reaccione con el carbonato de di-*ter*-butilo en la fase orgánica). Después de 25 minutos se agregó el carbonato de di-*ter*-butilo y al verificarse el término de la reacción, se agregaron 40 mL de agua y se lavó con hexano para eliminar el alcohol *ter*-butílico con objeto de permitir una posterior precipitación del producto por acidulación de la fase acuosa con un ácido débil (ácido cítrico) que no hidrolizara el carbamato. Para una purificación final se lavó con hexano.

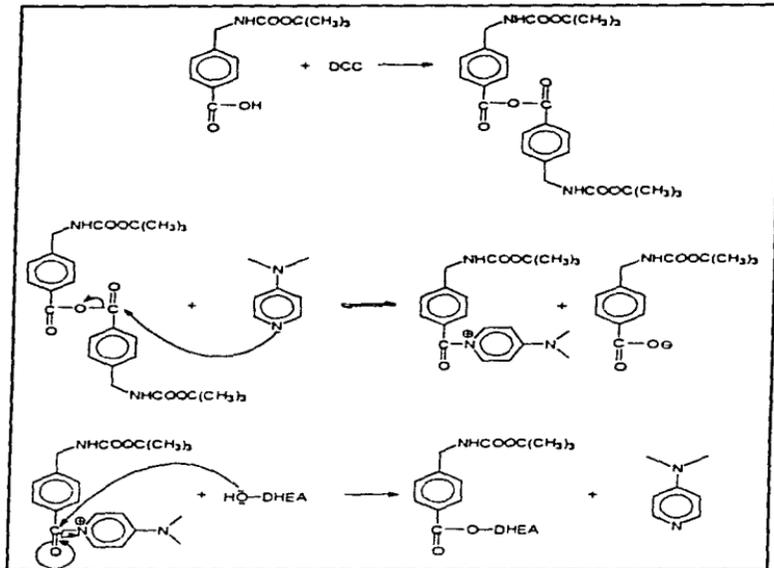


Como segundo paso se procedió a sintetizar el compuesto 5, es decir, la formación del éster. Para ello, y debido a que la reacción de un ácido carboxílico y un alcohol tiene el inconveniente de ser reversible, se recurrió a la estrategia de utilizar un agente deshidratante: la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) que en el proceso es convertida a dicitclohexilurea (DHU). Así, el ácido es convertido a un intermediario con un mejor grupo saliente lo que favorece el ataque nucleofílico del grupo OH en posición 3 de la DHEA. Además, se utilizó 4-dimetilaminopiridina (DMAP) para abstraer el hidrógeno del ácido carboxílico y convertirlo en un mejor nucleófilo que la DHEA para atacar a la DCC.



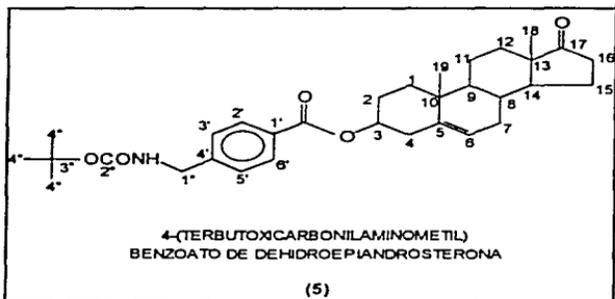
Otro mecanismo propone la formación de un anhídrido de 5 que posteriormente reacciona con DMAP para dar un intermediario con un mejor grupo saliente que facilite el ataque nucleofílico de la dehidroepiandrosterona.

8. DISCUSIÓN

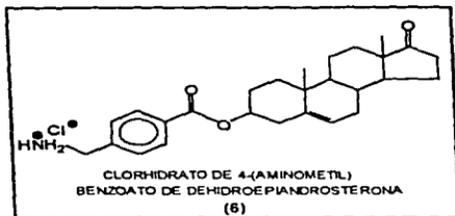


A las 24 horas se verificó la ausencia de materia prima, observándose la aparición de 4 manchas principales en la placa cromatográfica. Una de ellas correspondió a la DMAP y la otras pueden tratarse de un producto de deshidratación de la DHEA o a la formación de una N-acilurea y/o al carboxilato de 4. Se filtró la mezcla de reacción y se evaporó el disolvente. El sólido obtenido se disolvió en acetato de etilo para permitir que se hicieran lavados con agua básica y neutra que eliminaran la DMAP y alguna impureza de tipo ácido.

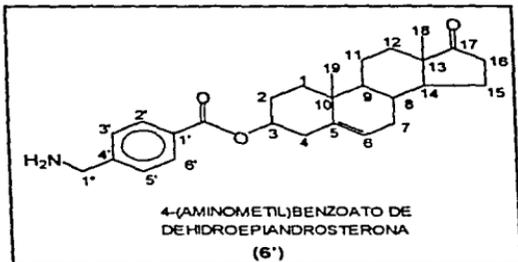
El producto obtenido presentó en una CCF tres manchas de tamaño similar. Se lavó con metanol frío eliminándose dos de las manchas (con R_f s menores), sin embargo el sólido obtenido seguía presentando una ligera impureza que se eliminó con tolueno, perdiéndose una cantidad considerable de producto. Se obtuvo un rendimiento muy bajo de 24%. que pudo deberse a la formación de otros 2 productos secundarios (de acuerdo a lo observado en la placa cromatográfica) y a los diversos pasos para su purificación.



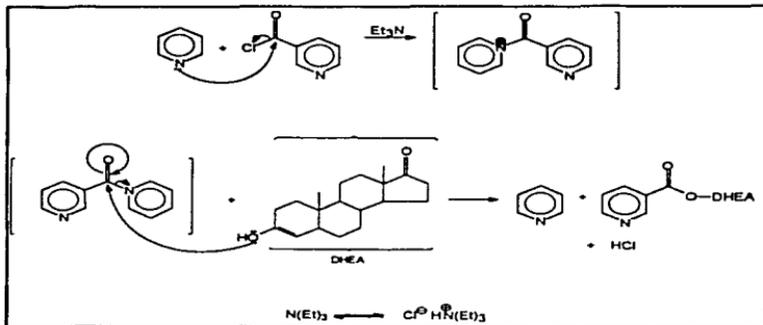
Como tercer y último paso para la síntesis del segundo profármaco, se realizó la formación del clorhidrato del compuesto anterior. Para ello se hizo reaccionar dicho compuesto con una pequeña cantidad de una solución 3N de ácido clorhídrico en metanol, utilizando acetato de etilo como disolvente y a temperatura ambiente para favorecer la hidrólisis del carbamato pero no del éster. Al finalizar la reacción se había formado un sólido blanco puro que se separó por filtración obteniéndose así el compuesto 6.



Para obtener una mejor resolución en los espectros del clorhidrato, se procedió a formar la amina libre, para lo cual se lavó una porción del producto con una solución saturada de K_2CO_3 obteniéndose un sólido blanco.

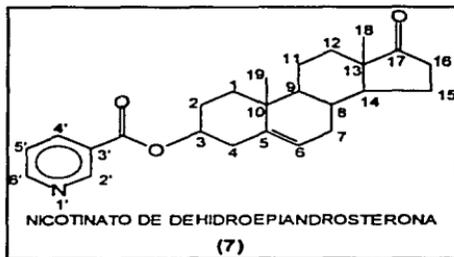


Para la síntesis del tercer profármaco (7) se llevó a cabo una sustitución nucleofílica por parte de la DHEA sobre el carbonilo del cloruro de nicotinilo, utilizando cloruro de metileno como disolvente y trietilamina para eliminar el HCl que se produce en el medio, evitando así la hidrólisis del éster y a la vez favoreciendo la formación de los productos por desplazamiento del equilibrio de la reacción

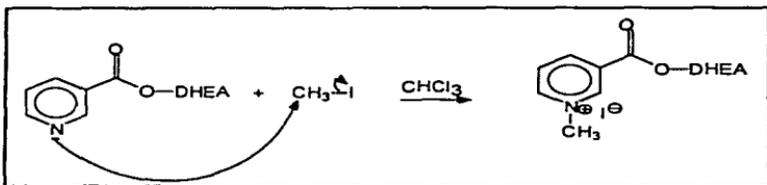


Inicialmente la reacción se realizó con un equivalente de ambos reactivos pero no se logró que la DHEA se agotara, por lo que se repitió el proceso con 1.5 equivalentes de cloruro de nicotinilo y utilizando piridina como catalizador nucleofílico. Estas variantes aceleraron en gran medida la velocidad de la reacción.

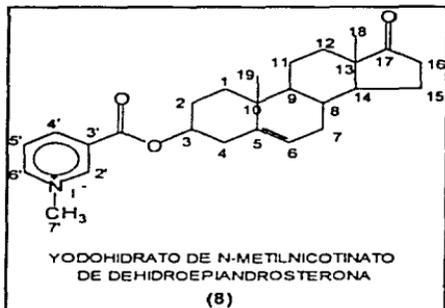
Al concluir la reacción se advirtió la presencia de un sólido blanco amarillento. Al realizar una CCF del sólido y del disolvente, se observó que el producto se encontraba en ambos, por lo que se evaporó el disolvente y el sólido obtenido se lavó con agua fría ácida, básica y neutra sucesivamente para eliminar el exceso de cloruro de nicotinilo, la piridina y la sal de la trietilamina, obteniéndose así el compuesto 7 puro. Se obtuvo un rendimiento del 96.6% perdiéndose un poco de producto durante los lavados con agua.



Por último, para la preparación del cuarto profármaco (8), se llevó a cabo una metilación del compuesto 7 con CH_3I en exceso.



El compuesto obtenido se lavó con acetona fría para su purificación, obteniéndose así un sólido amarillo claro que correspondió al compuesto 8. El rendimiento para esta reacción fue de 47.0% , pero puede ser mejorado si se optimiza el proceso de purificación ya que la acetona disuelve parte del producto.



Por lo que respecta a la interpretación de los datos espectroscópicos, en los espectros de infrarrojo de los compuestos 2, 3, 5, 6, 7 y 8 se pudieron observar las señales correspondientes al grupo funcional éster: alargamiento del C=O entre 1700 y 1732 cm^{-1} y dos bandas intensas de alargamiento del C-O entre 1120 y 1300 cm^{-1} . También se observaron las señales que corresponden al grupo carbonilo de la cetona de la porción esteroidal entre 1732 y 1738 cm^{-1} , y la ausencia del grupo hidroxilo de la dehidroepiandrosterona.

En cuanto a los espectros de ^1H RMN cabe mencionar que por el gran número de protones unidos al esqueleto del ciclopentanoperhidrofenantreno, los esteroides presentan un espectro complejo, donde las señales de los metileno y metino se registran entre 0.5 y 2.2. La DHEA no es la excepción, sin embargo, las señales para los metilos angulares, el hidrógeno del hidroxilo, el hidrógeno vinílico y el hidrógeno del C-3, se registran separadamente del resto de señales (Espectro No. 2) y son tales señales las que nos ayudan a garantizar la integridad del anillo esteroidal en cada uno de los compuestos sintetizados.

En la mayor parte de los casos, los espectros fueron realizados utilizando DMSO- d_6 con el propósito de desplazar paramagnéticamente (campos bajos) la señal del hidrógeno del hidroxilo y no tener problemas al momento de determinar su esterificación.

Como ya se mencionó anteriormente, la señal del hidrógeno metínico axial en C-3 (adyacente al grupo hidroxilo), está separado del resto del esqueleto y aparece en forma de multiplete centrado a 3.25 ppm en la DHEA. Por su posición en la molécula, está acoplado a cuatro hidrógenos, dos axiales y dos ecuatoriales, cuyas líneas se traslapan dando lugar a una señal en forma de multiplete. Por otra parte, el hidrógeno vinílico de la DHEA aparece como un doblete centrado a 5.3 ppm debido al acoplamiento con dos protones en la posición 7; dicha relación es de tipo pseudoecuatorial-axial y pseudoecuatorial-ecuatorial.

Las señales correspondientes a la porción esteroidal en los espectros de ^1H RMN de los diversos profármacos sintetizados en el presente trabajo se comparan con la DHEA en la siguiente tabla:

COMP.	C-3 H δ (ppm)	C-6 H δ (ppm)	C-10 CH ₂ δ (ppm)	C-13 CH ₂ δ (ppm)	C-3 OH δ (ppm)
1	3.25	5.30	0.99	0.80	4.60
3	4.80	5.50	1.00	0.90	-
6	4.80	5.40	1.10	0.90	-
7	4.90	5.50	1.10	0.90	-
8	4.90	5.50	1.10	0.90	-

8. DISCUSIÓN

Como puede apreciarse, la ausencia del hidrógeno hidroxilo indica la esterificación en todos los profármacos. La presencia de la señal correspondiente al doble enlace no ha sufrido modificación y se observan también los dos metilos de la porción esteroidal.

Otro aspecto que es importante destacar en los espectros de ^1H RMN de los profármacos, es el multiplete ocasionado por el hidrógeno en posición 3. En primer lugar, dicha señal se encuentra desplazada paramagnéticamente en los derivados, en un rango de 1.55 a 1.65 ppm, debido al efecto originado por el carbonilo al formarse el éster de la DHEA con cada uno de los modificadores. En segundo lugar, la amplitud del multiplete se conserva en todos los casos, por lo que nos permite deducir que dicho hidrógeno sigue conservando su posición axial; una reducción drástica en dicha amplitud nos indicaría que el hidrógeno estaría en posición ecuatorial, provocando un cambio en la configuración de la DHEA a su anómero androsterona, cuando se hidrolizara el profármaco correspondiente.

Además se observaron, para cada uno de los profármacos, las señales correspondientes a la porción estructural del modificador, y las cuales se presentaron en el capítulo de resultados.

Por lo que respecta a los espectros de ^{13}C RMN de los profármacos, las señales corresponden a las esperadas y conservan el mismo patrón de registro presentado por la DHEA en la porción esteroidal y las esperadas en las porciones estructurales de los modificadores.

En cuanto a la determinación cualitativa de su solubilidad acuosa, ésta no pudo ser cuantificada en los compuestos **3** y **6** pues las muestras de estos compuestos presentaron una absorbancia muy pequeña que no pudo ser interpolado en la curva patrón para cada compuesto. Para su determinación se necesita una técnica analítica más sensible como la cromatografía de líquidos de alta resolución y para lo cual haría falta desarrollar el proceso de validación y estandarización de las variables que influyen en este tipo de determinaciones.

Por otra parte, para el compuesto **7** se determinó una solubilidad de 8.1 ppm, siendo el de mayor interés el compuesto **8**, el cual presentó una mayor solubilidad acuosa comparada con los demás compuestos y que fue de 358 ppm (0.666 mM) y que puede deberse a que es el único compuesto que posee carga iónica. Asimismo, se observa que los que tuvieron una mayor solubilidad fueron aquellos compuesto que contenían al nitrógeno formando parte del heterociclo.

9. CONCLUSIONES

Al terminar el trabajo experimental se lograron sintetizar los cuatro profármacos propuestos inicialmente, obteniéndose productos estables mediante reacciones sencillas. Sin embargo, el profármaco que resultó de mayor interés para nuestros fines, fue el Yodohidrato de N-metilnicotinato de dehidroepiandrosterona (8), ya que presentó la mayor solubilidad acuosa. Con estos resultados se abre la posibilidad de realizar otro tipo de estudios al profármaco antes mencionado, como su comportamiento biológico en animales de experimentación, así como estudios para determinar la eficiencia farmacológica al realizar estudios comparativos de administración del profármaco y la dehidroepiandrosterona por diferentes vías de administración.

10. PARTE EXPERIMENTAL**10.1. INSTRUMENTACIÓN**

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformadas de Fourier Modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio, las señales se reportan en cm^{-1} .

El espectros de resonancia magnética protónica ($^1\text{H RMN}$) del compuesto 2 se determinó en un espectrómetro Varian EM-390 y el resto de los compuestos se determinaron en un Varian VXR-3005 de 300 MHz, usando cloroformo deuterado y dimetilsulfóxido deuterado como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se dan en ppm. Los símbolos de las señales son: s = singulete, d = doblete, m = multiplete y ma = multiplete amplio.

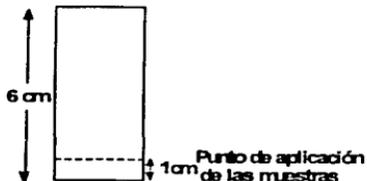
Los espectros de masas se determinaron por un sistema acoplado de Cromatografía de Gases-Espectrómetro de Masas (CG-EM) o por introducción directa de la muestra en un aparato marca Hewlett Packard 5988A.

Los espectros de ultravioleta fueron tomados en un espectrofotómetro Beckman DU-50 y celda de 3 mL de 1 cm de espesor.

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato Büchi Mod. 530 y no están corregidos. Para concentrar se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi RE 111, con vacío generado por una bomba Felisa Mod. 1600 ajustada a 55 cm de Hg y condensador de hielo seco.

10.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se usaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice GF₂₅₄ de la casa Merck y para cromatografía. Los compuestos orgánicos se revelaron con luz UV y por exposición a vapores de yodo. Las muestras para cromatografía se prepararon con aproximadamente 20 mg del compuesto a ensayar disueltas en la mínima cantidad de diclorometano y en el caso de las mezclas de reacción, para el monitoreo del avance de la reacción, éstas se aplicaron directamente sobre la placa cromatográfica.



COMPOSICIÓN DE LOS SISTEMAS DE ELUCIÓN UTILIZADOS

SISTEMA	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
a	Cloroformo-Metanol	97:3
b	Cloroformo-Metanol	90-10
c	Cloroformo-Metanol-NH ₄ OH	97:3
d	Cloroformo-Metanol	80:20

10.3. PREPARACIÓN DEL 3-(CLOROMETIL)BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA (2)

En un matraz de 100 mL de una boca (14/20) con trampa anhidra y con agitador magnético, se colocaron 2 g de DHEA (6.93 mmoles) y 20 mL de diclorometano anhidro (Merck) con baño de hielo. Después de la disolución completa de la DHEA se agregó 1.38 mL (10.39 mmoles) de trietilamina, 1.47 mL (10.39 mmoles) de cloruro de 3-(clorometil)benzoilo (Aldrich). Se dejó en agitación y en baño de hielo durante 15 minutos, después de los cuales se retiró el baño y se dejó en agitación durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) de la mezcla de reacción observándose que la materia prima había desaparecido. Se había formado un sólido, el cual se separó por filtración y las aguas madres se concentraron en el evaporador rotatorio quedando un sólido ligeramente amarillento, el cual se lavó con agua ácida y se separó por filtración, lavando con agua. Finalmente para retirar la coloración ligeramente amarillenta y purificarlo completamente se lavó con acetona fría. Se obtuvieron 2.978g (90%) de un sólido blanco, que en CCF presentó una sola mancha de $R_f = 0.57$ en el sistema de elución a y un punto de fusión de 173-174°C.

10.4. PREPARACIÓN DE 3-(N,N-DIETILAMINOMETIL)BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA (3)

En un matraz de 100 mL de una boca (14/20) con atmósfera de nitrógeno, protegido de la luz y con agitador magnético, se colocaron 2 g de 3-(clorometil)benzoato de dehidroepiandrosterona (4.53 mmoles), 0.93 mL (9.06 mmoles) de dietilamina, 200 mg de KI como catalizador y 35 mL de DMSO como disolvente, formándose una suspensión amarillenta.

A las 48 horas, una vez verificada la ausencia de materia prima por CCF, se agregaron a la mezcla de reacción 35 mL de agua con lo cual precipitó un sólido blanco amarillento que posteriormente se separó por filtración y se lavó con agua fría, obteniéndose 0.9142 g (84.4%) de producto puro blanco que presentó una sola mancha en CCF con un $R_f = 0.61$ en el sistema de elución a y un punto de fusión de 100-101°C.

10.5. PREPARACIÓN DEL ÁCIDO 4-(TERBUTOXICARBONILAMINOMETIL)-BENZOICO (4)

En un matraz de 100 mL de una boca (24/40) con agitador magnético, se colocaron 5 g (33 mmol) del ácido 4-(aminometil)benzoico (Aldrich) y 83 ml de una mezcla de 25 mL de agua, 58 mL de alcohol y 1.4 g de NaOH (35 mmol) que se dejó agitando por 5 minutos a temperatura de 30 °C antes de ser agregada al ácido.

Cuando se agregó la mezcla al ácido se formó una suspensión la cual se agitó por 25 minutos, calentando suavemente hasta que los residuos de ácido se terminaron de suspender.

Se esperó hasta que la suspensión se encontrara a temperatura ambiente para agregar 8 mL (35 mmol) de carbonato de di-*ter*-butilo (Aldrich)

Se formó un sólido blanco. La mezcla se dejó en agitación por 18 horas. Transcurrido ese tiempo se agregaron 40 mL de agua y se lavó con hexano (3x25 mL) desechando cada vez la fase orgánica. La fase acuosa se enfrió a 5°C y se aciduló con una solución concentrada de ácido cítrico hasta pH de 3. Cuando se agregaba el ácido cítrico se presentó un precipitado blanco por lo que se procedió a filtrar. El sólido blanco obtenido se lavó con hexano frío y se dejó secar al vacío. El peso del polvo fue de 7.2 g (91%) y presentó un $R_f = 0.37$ en el sistema de elución b.

10.6. PREPARACIÓN DEL 4-(*ter*-BUTOXICARBONILAMINOMETIL)BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA (5)

En un matraz de 100 mL de un boca (14/20) con trampa anhidra y con agitador magnético se colocaron 0.5 g (1.73 mmoles) de dehidroepiandrosterona, 0.62 g (2.59 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 0.9116 g (1.9 mmoles) del compuesto 5 utilizando 25 mL de dimetilformamida anhidra como disolvente. Se formó una suspensión blanca y se adicionaron 0.86g (3.46 mmoles) de diciohexilcarbodiimida. Después de 24 horas se filtró la mezcla de reacción, se concentró en el evaporador rotatorio y el sólido se disolvió en acetato de etilo. Se hicieron 7 extracciones de 10 mL con una solución de carbonato de sodio al 5% y finalmente dos últimas extracciones con agua neutra. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en el evaporador rotatorio hasta sequedad y el sólido obtenido se lavó con metanol frío quedando un sólido blanco que posteriormente se filtró. El sólido retenido se lavó con tolueno para purificarlo totalmente obteniéndose 0.2169g (24%) de producto que en CCF presentó un Rf = 0.78 en el sistema de elución b y un punto de fusión de 173°C.

10.7. PREPARACIÓN DEL CLORHIDRATO DE 4-(AMINOMETIL)BENZOATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA (6)

En un matraz de 50 mL de una boca (14/20) con agitador magnético, se colocó 1g del compuesto 5 disuelto en 35 mL de acetato de etilo y 6.7 mL de una solución 3 N de ácido clorhídrico en metanol. Se dejó toda la noche a temperatura ambiente formándose un polvo blanco. Se filtró la mezcla de reacción reteniéndose 0.8791 g (99.3%) de un polvo blanco el cual al realizarle una CCF en el sistema b no presentó movilidad y tuvo un punto de fusión mayor de 284°C.

10.8. PREPARACIÓN DEL NICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA (7)

En un matraz de 100 mL de una boca (14/20) con trampa anhidra y con agitador magnético, se colocaron 1 g (3.46 mmoles) de dehidroepiandrosterona y 0.462 g (5.19 mmoles) de cloruro de nicotinilo (Aldrich). 0.34 mL (5.19 mmoles) de trietilamina y 10 mL de diclorometano anhidro como disolvente.

A las 8 horas se verificó la ausencia de materia prima por CCF, formándose un sólido blanco amarillento. Se evaporó el disolvente en el evaporador rotatorio y el sólido se lavó con agua ligeramente ácida, posteriormente con agua ligeramente básica y finalmente con agua, obteniéndose 1.9047g (96.6%) de un polvo blanco que en CCF presentó una sola mancha con un $R_f = 0.8$ en el sistema de elución c y un punto de fusión de 264-265°C.

10.9. PREPARACIÓN DEL METILNICOTINATO DE DHEA (8)

En un matraz de 100 mL de una boca (14/20), adaptado a una columna Vigreux, protegido de la luz y bajo atmósfera de nitrógeno, se hicieron reaccionar 1g de nicotinato de dehidroepiandrosterona (11.6 mmoles) con 0.28 mL de CH_3I (23.2 mmol), utilizando 25 mL de cloroformo como disolvente y un calentamiento suave. A las 48 horas se verificó la ausencia de materia prima por CCF, el disolvente se concentró en el evaporador rotatorio hasta sequedad. El sólido se lavó con acetona fría y se separó por filtración obteniéndose 1.4417 g (47%) de un polvo ligeramente amarillo que al realizarle una CCF presentó una sola mancha con un $R_f = 0.33$ en el sistema de elución d y un punto de fusión de 265°C.

10.10. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SOLUBILIDAD

10.10.1. Preparación de buffer pH 7.4

Soluciones :

- 1) Solución de fosfato monopotásico 0.1 M (KH_2PO_4). Se disuelven 13.61 g en agua destilada y se ajusta a un litro.
- 2) Solución 0.1M de fosfato disódico (NaHPO_4). Se disuelven 14.2 g de sal anhidra en agua destilada y se ajusta a un litro.

Se tomaron 64 mL de la solución 0.1 M de fosfato monopotásico y 336 mL de la solución 0.1 M de fosfato disódico, se mezclaron y se verificó que el pH fuera de 7.4.

10.10.2. Curvas patrón

Inicialmente se hizo un barrido de soluciones en metanol de cada compuesto a ensayar para determinar su λ máxima de absorción entre 200 y 700 nm. Posteriormente se procedió a realizar las curvas patrón.

Para las curvas patrón de los compuestos 3, 6, 7 y 8 se prepararon soluciones a concentraciones de 5, 10, 20 y 30 ppm disueltas en metanol; para el compuesto 6, se prepararon soluciones de 10, 20, 50 y 100 ppm, disueltos también en metanol. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a las λ máximas para cada compuesto. A los datos obtenidos se les realizó un tratamiento estadístico de regresión lineal con lo cual se realizó el ajuste de la curva para poder posteriormente interpolar los valores obtenidos durante el ensayo de solubilidad.

10.10.3. Procedimiento para el ensayo de solubilidad

En un tubo de ensayo con tapón de rosca se colocaron 10 mL de buffer pH 7.4 y se agregaron 40 mg del compuesto a ensayar. Se prepararon muestras por triplicado. Se dejaron durante 24 horas en un baño de agua a 37 °C agitando ocasionalmente de forma manual. Al concluir las 24 horas, se centrifugaron los tubos y se separó el sobrenadante. Se leyó la absorbancia de cada tubo a la longitud de onda máxima correspondiente a cada compuesto y utilizando como blanco un buffer de pH = 7.4. En los casos que fue necesario se hizo una dilución de la muestra para obtener absorbancias que se encontraran dentro de nuestra curva patrón.

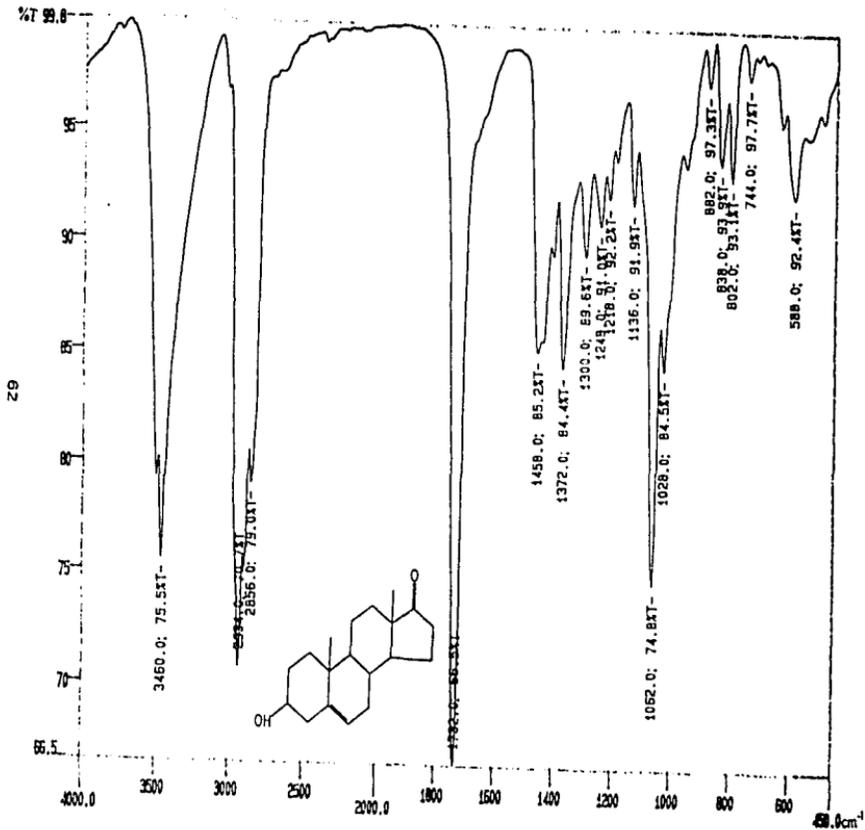
10.11. Tratamiento de los desechos

Durante el trabajo experimental se utilizaron diferentes disolventes orgánicos como diclorometano, dimetilsulfóxido, alcohol terbutílico, dimetilformamida, metanol, acetato de etilo, piridina y cloroformo.

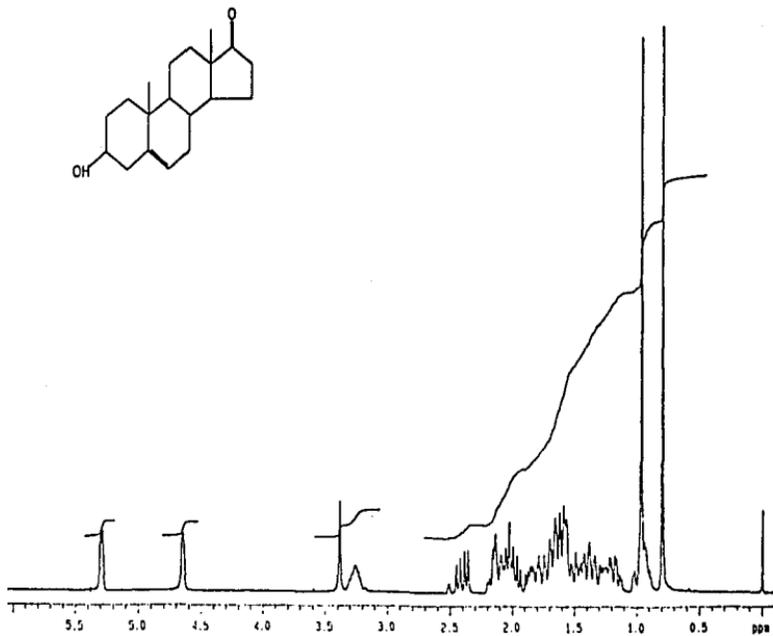
Los disolventes miscibles como el agua como el metanol, son utilizados para el lavado de material y posteriormente son destilados en el evaporador rotatorio para utilizarse nuevamente para el mismo fin.

El resto de los disolventes se deposita en contenedores especiales para luego ser mandados a un incinerador.

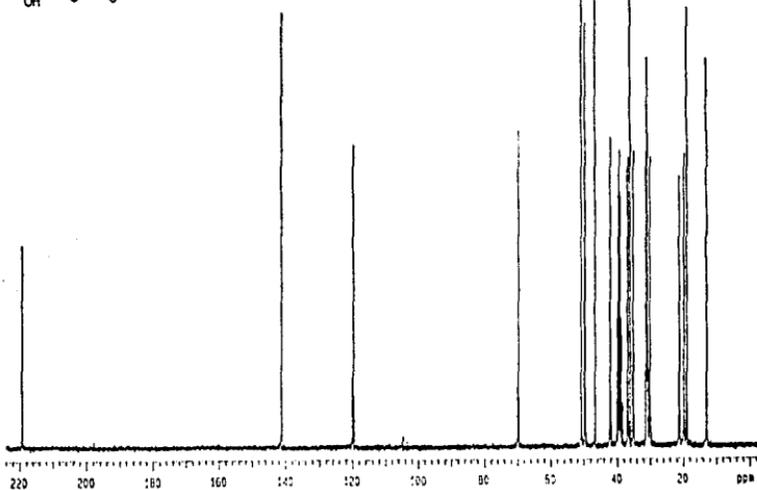
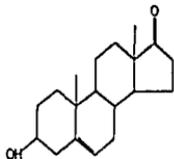
ESPECTROS



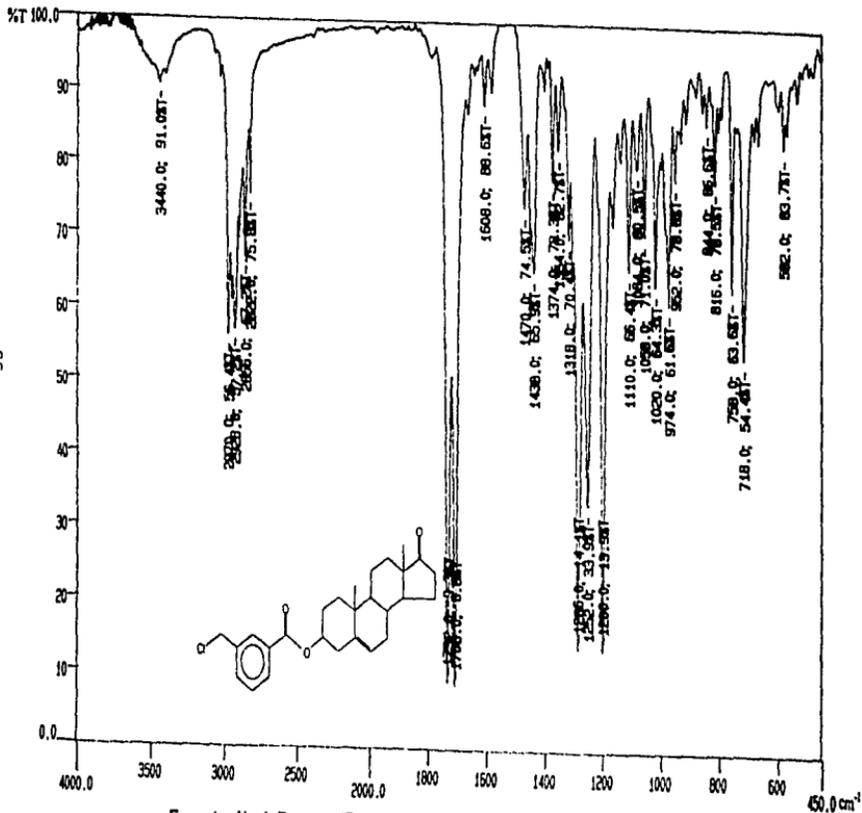
Espectro No.1 Espectro IR de la Dehidroepiandrosterona



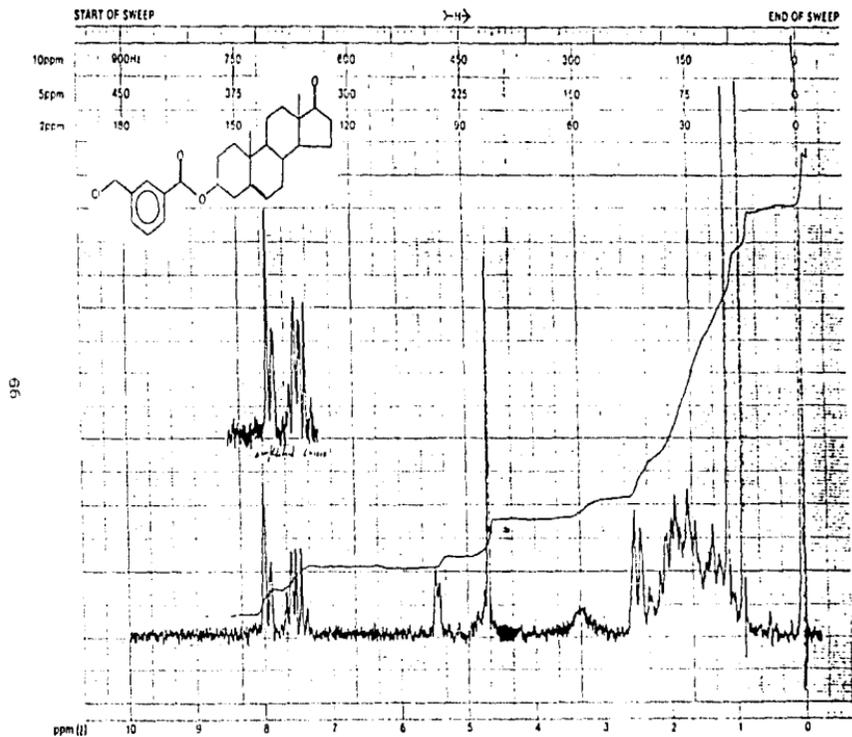
Espectro No.2. Espectro ^1H RMN de la Dehidroepiandrosterona



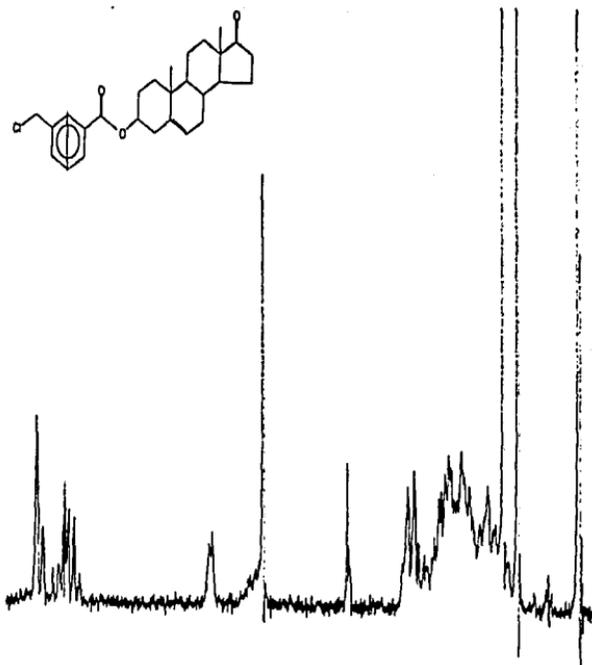
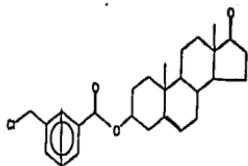
Espectro No.3. Espectro ^{13}C RMN de la Dehidroepiandrosterona



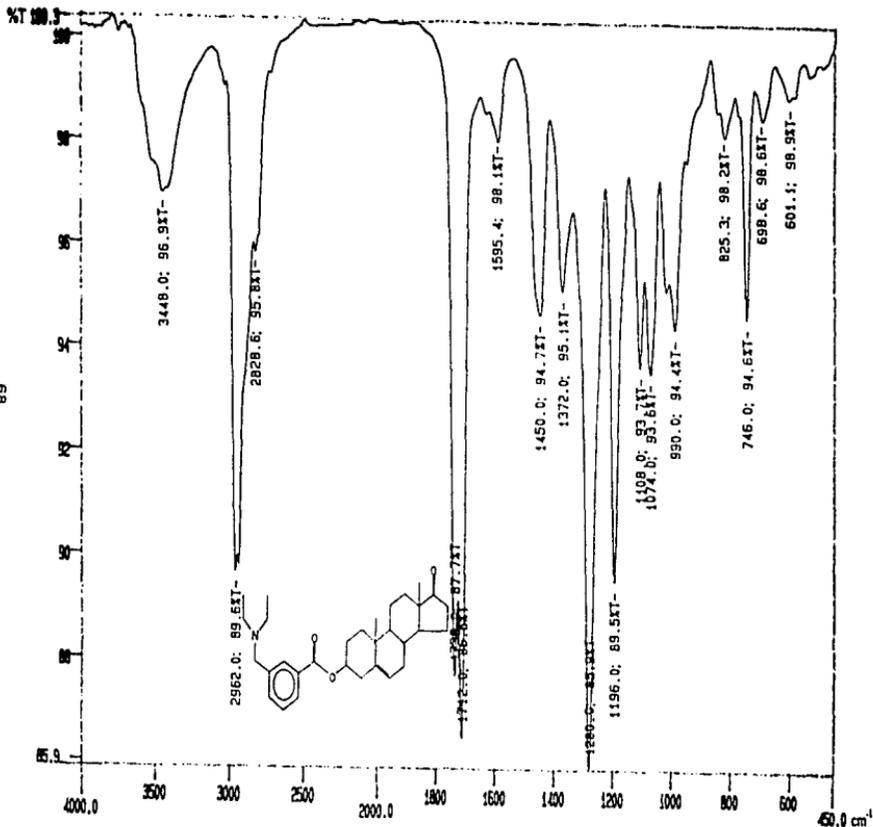
Espectro No.4 Espectro IR del 3-(Clorometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



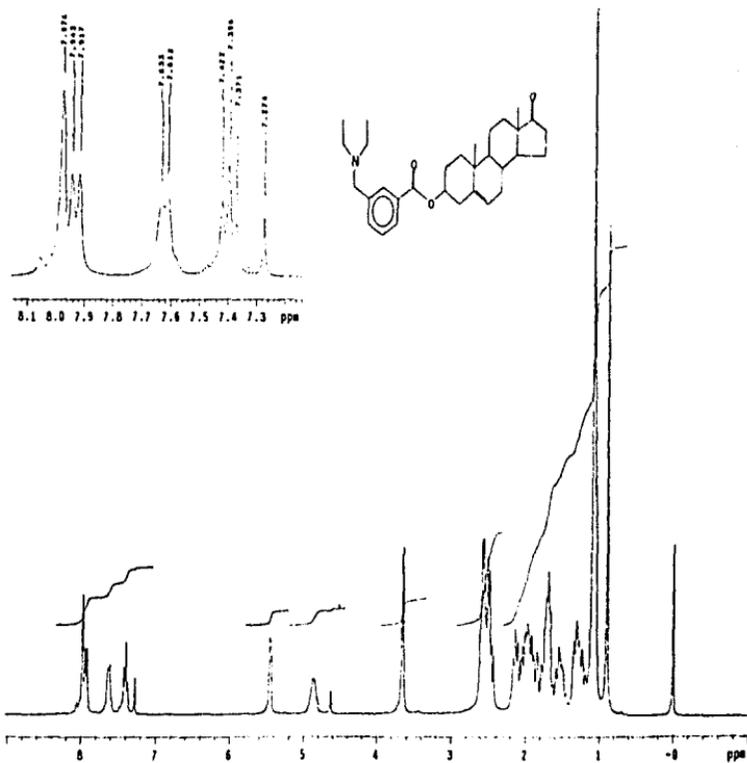
Espectro No.5a. Espectro ^1H RMN del 3-(Clorometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



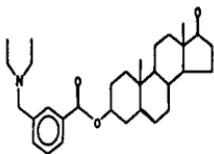
Espectro No.5b, Espectro ^1H RMN del 3-(Clorometil)benzoato de dehidropiandrosterona + D_2O



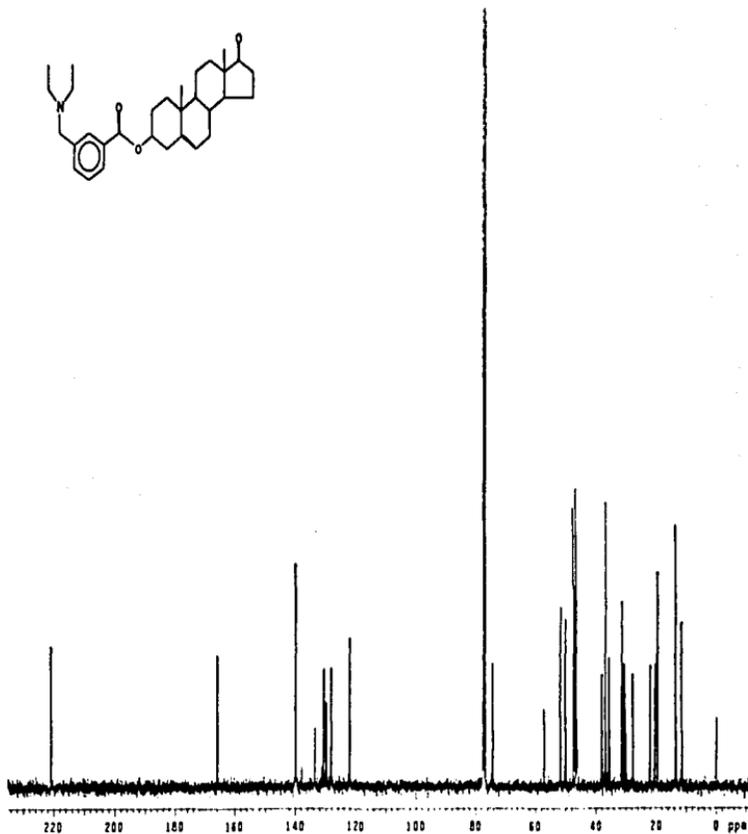
Espectro No.6. Espectro IR del 3-(N,N-Diethylaminomethyl)benzoato de dehidroepiandrosterona



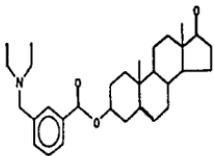
Espectro No.7a. Espectro ^1H RMN del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



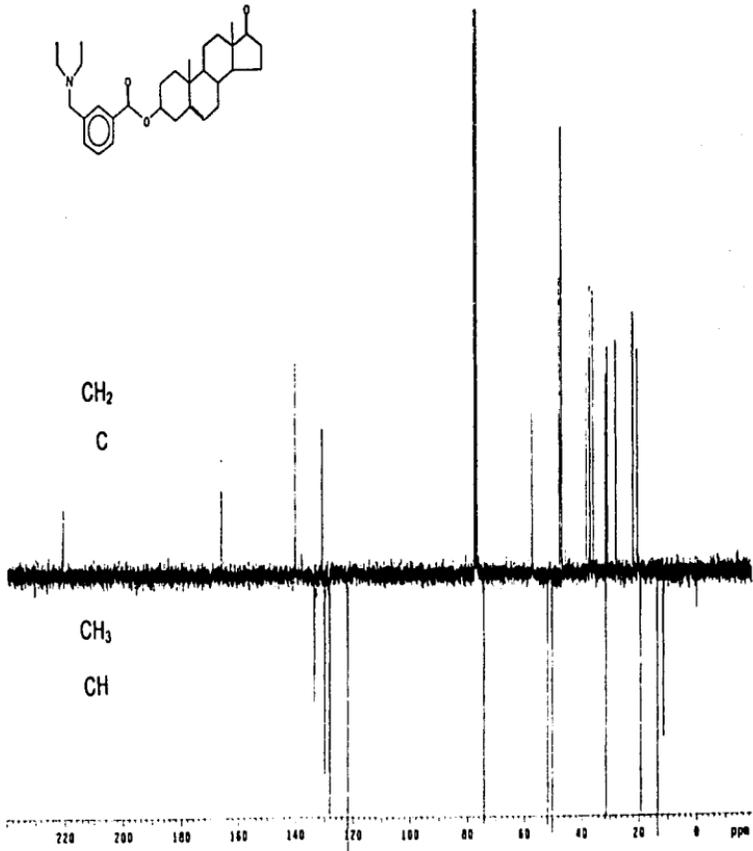
70



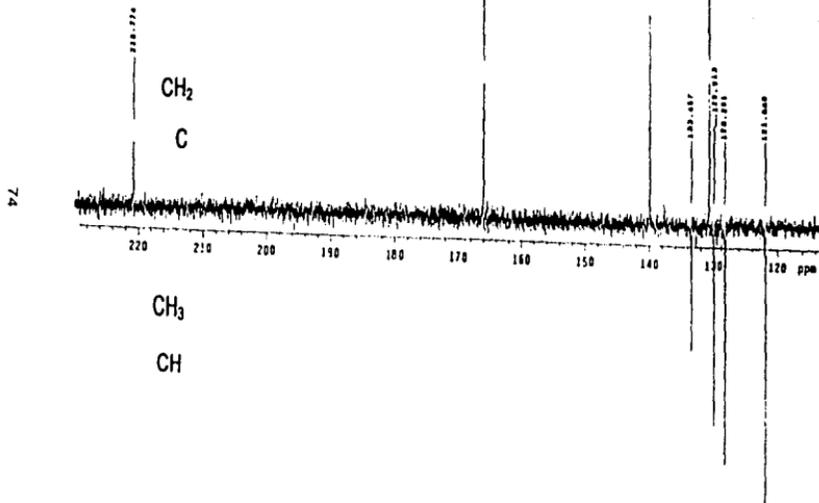
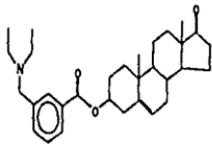
Espectro No.8a. Espectro ^{13}C RMN del 3-(N,N-Diethylaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



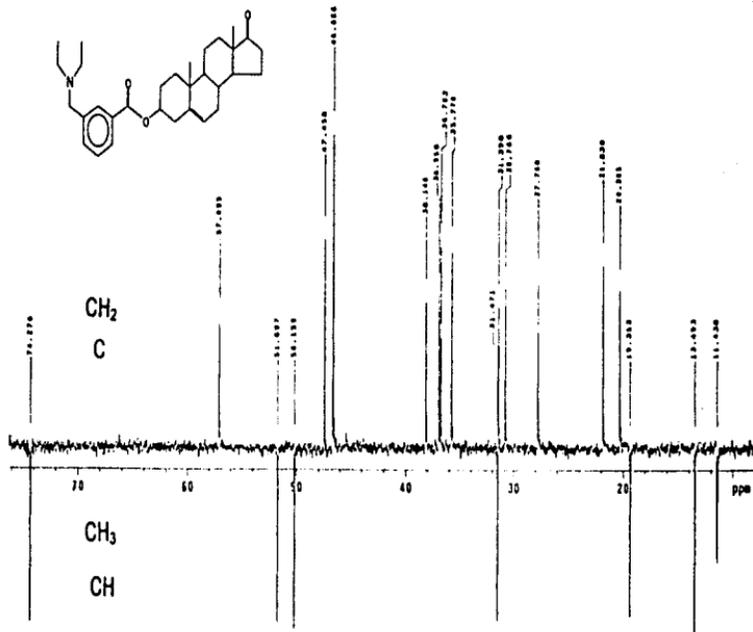
73



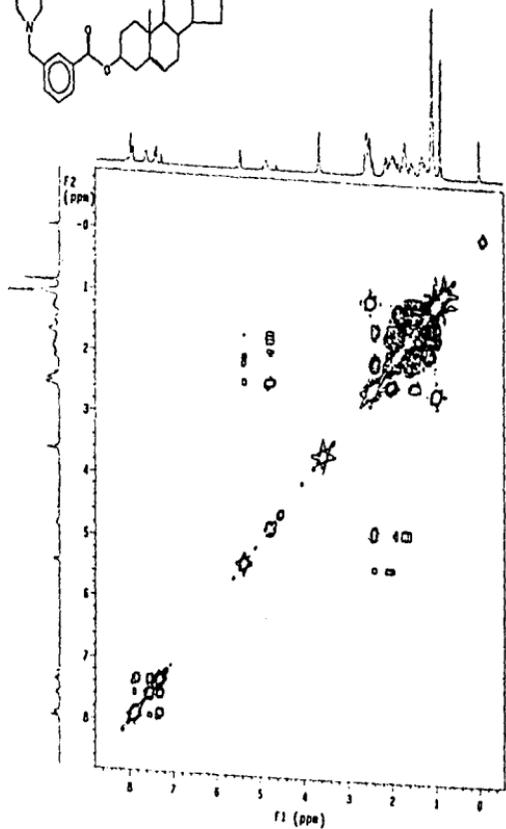
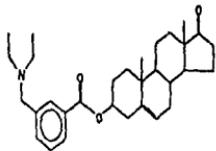
Espectro No.9a. Espectro ^{13}C APT del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



Espectro No.9b. Espectro ¹³C APT del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona

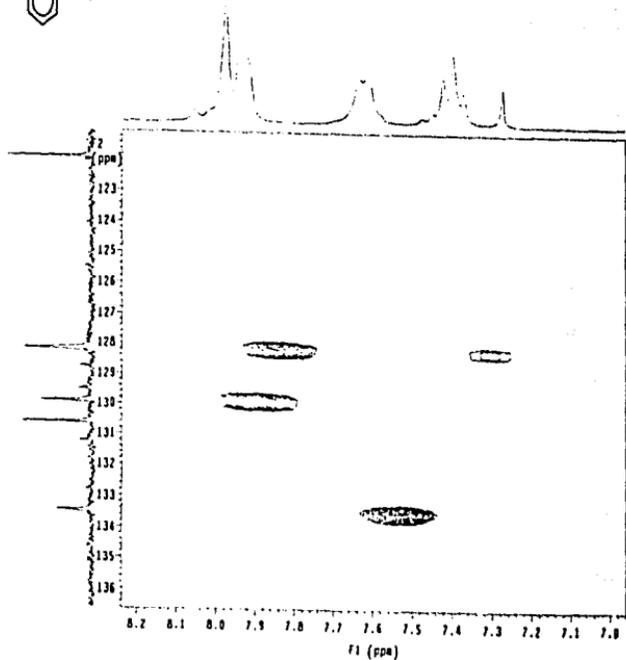
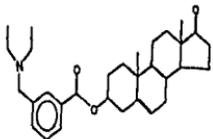


Espectro No.9c. Espectro ^{13}C APT del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



76

Espectro No.10. Espectro H H cosy del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona

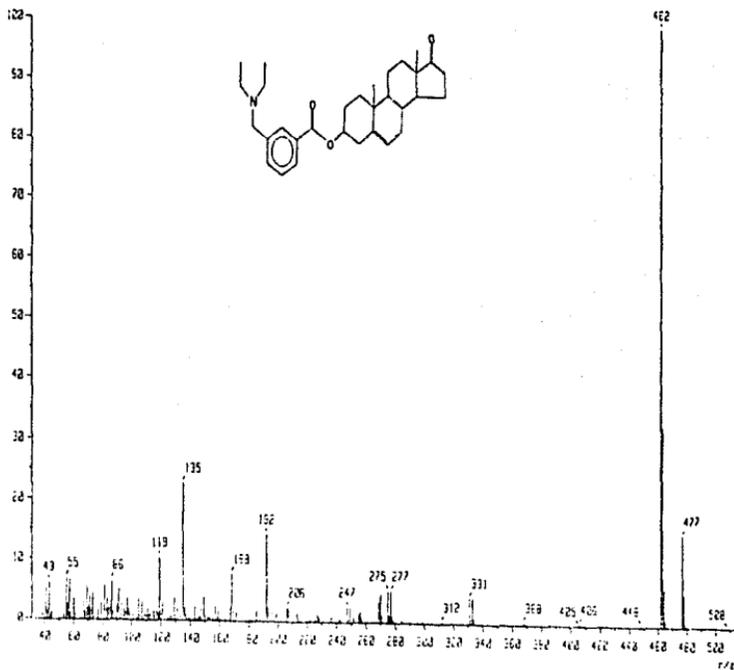


78

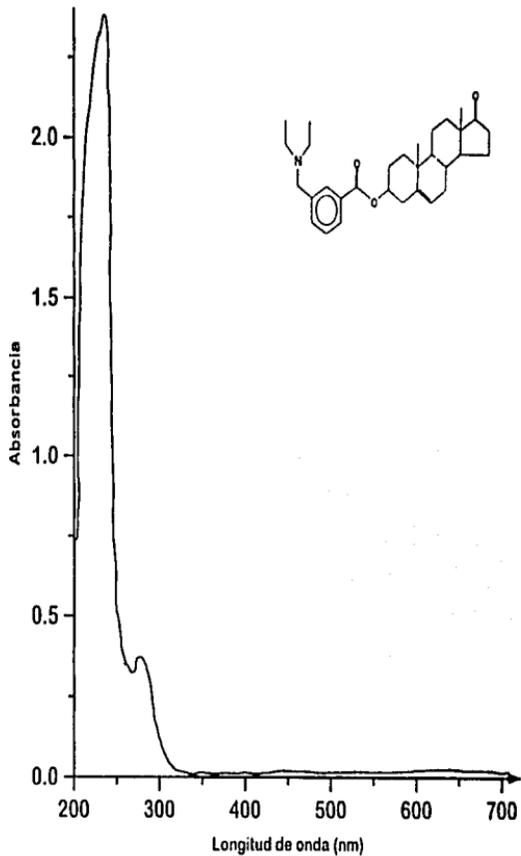
Espectro No.11b. Espectro C H cosy (helcor) del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona

ESTÁ
RESERVA
SALVO
SE EN
LA
BIBLIOTECA

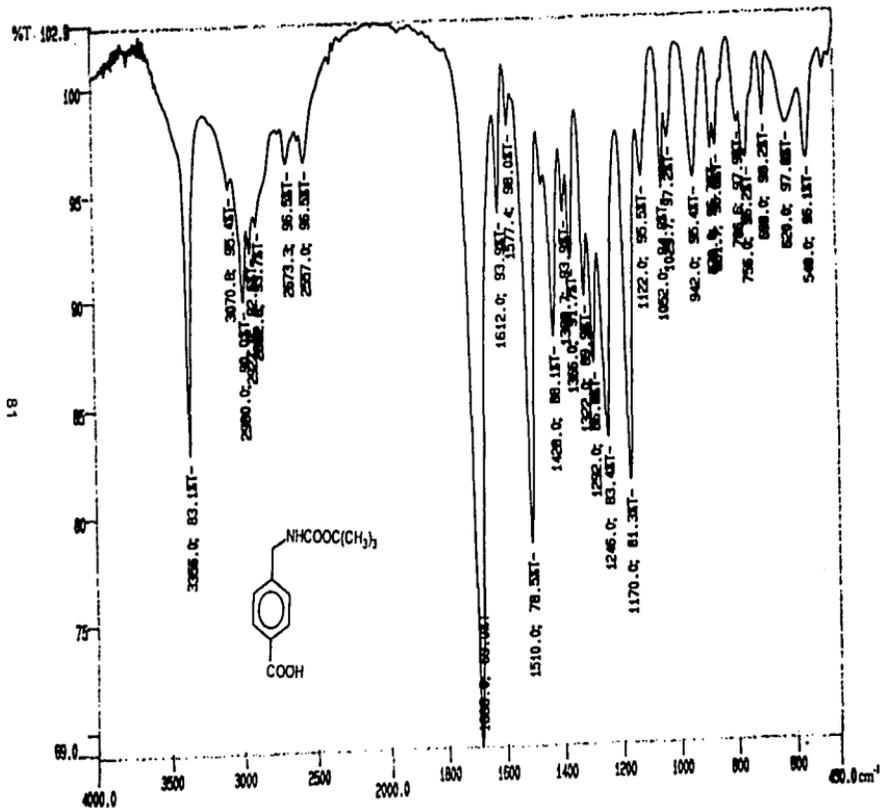
79



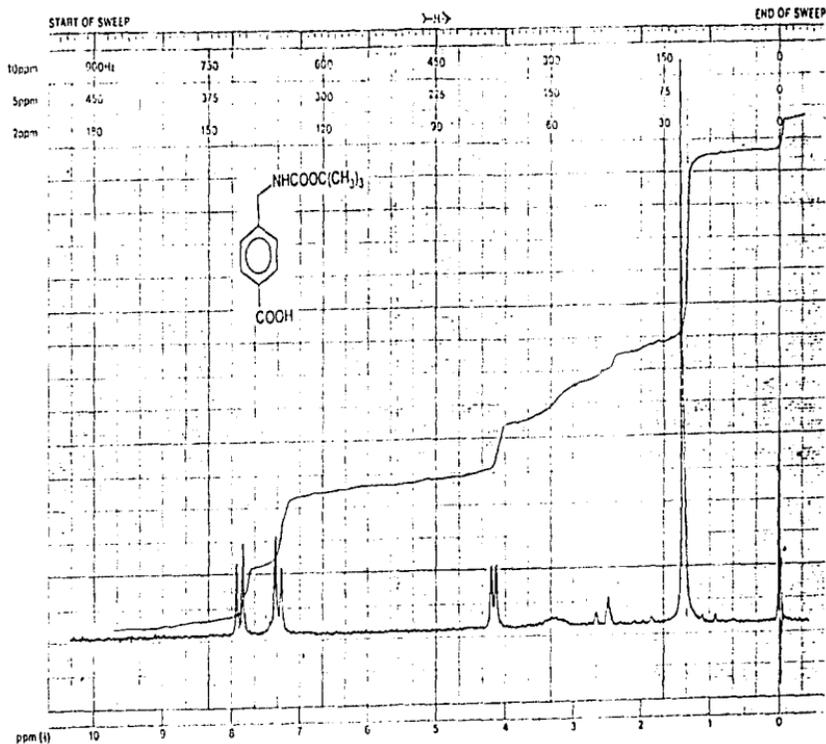
Espectro No. 12. Espectro de masas del 3-(N,N-Dietilaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona.

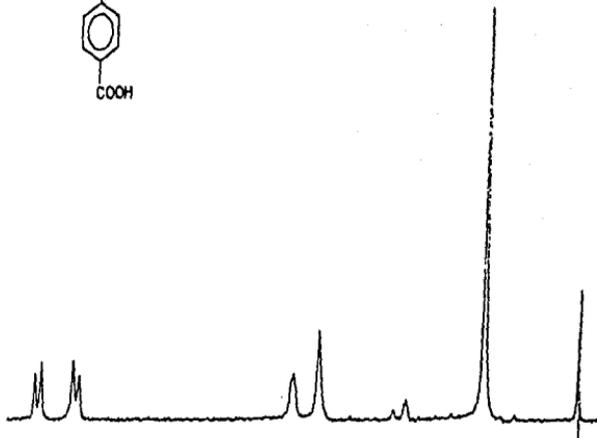
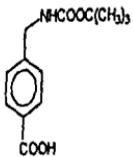


Espectro No.13. Espectro UV del 3-(N,N-Diethylaminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona

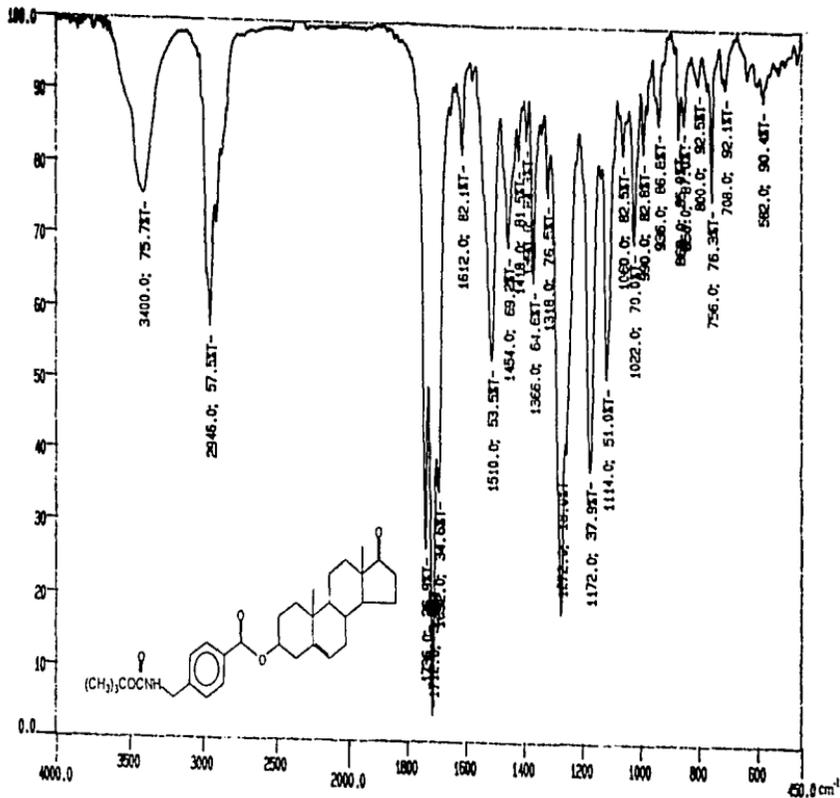


Espectro No.14. Espectro IR del ácido 4-(ter-butoxicarbonylaminoetil)benzoico

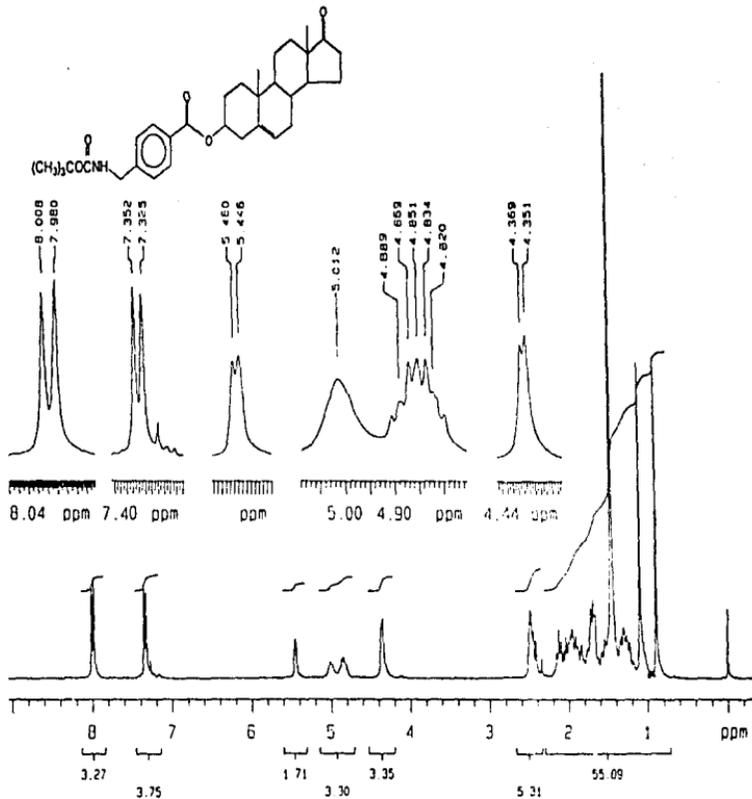
Espectro No.15a. Espectro ¹H RMN ácido 4-(ter-butoxicarbonilaminometil)benzoico



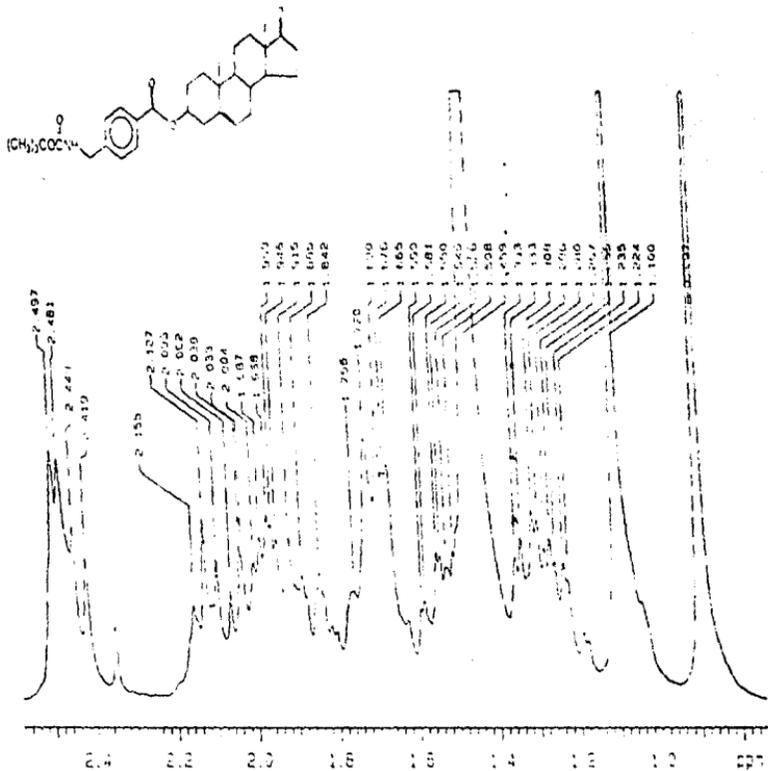
Espectro No.15b. Espectro ¹H RMN ácido 4-(ter-butoxicarbonilaminometil)benzoico +D₂O



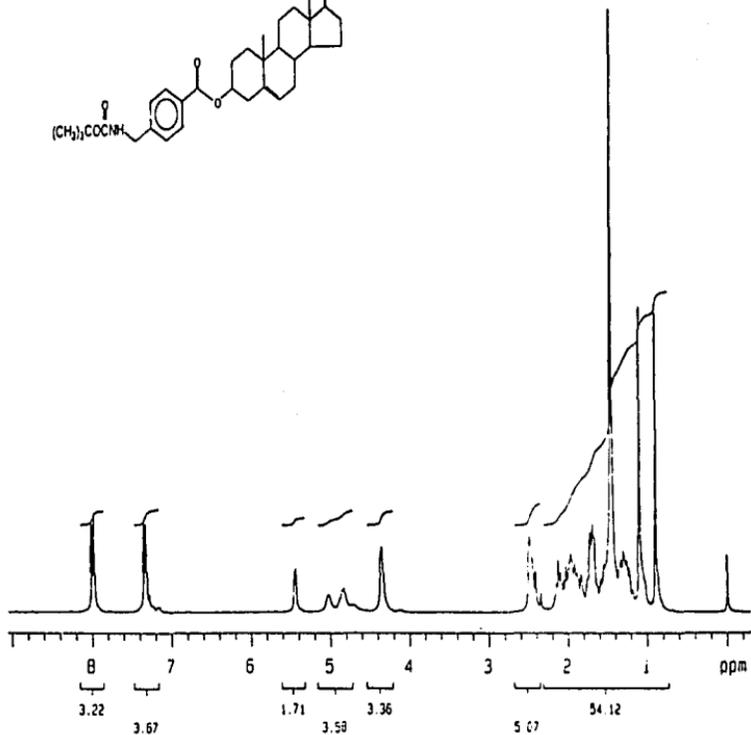
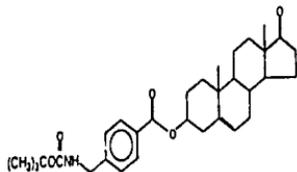
Espectro No.16. Espectro IR del ácido 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoico de dehidroepiandrosterona



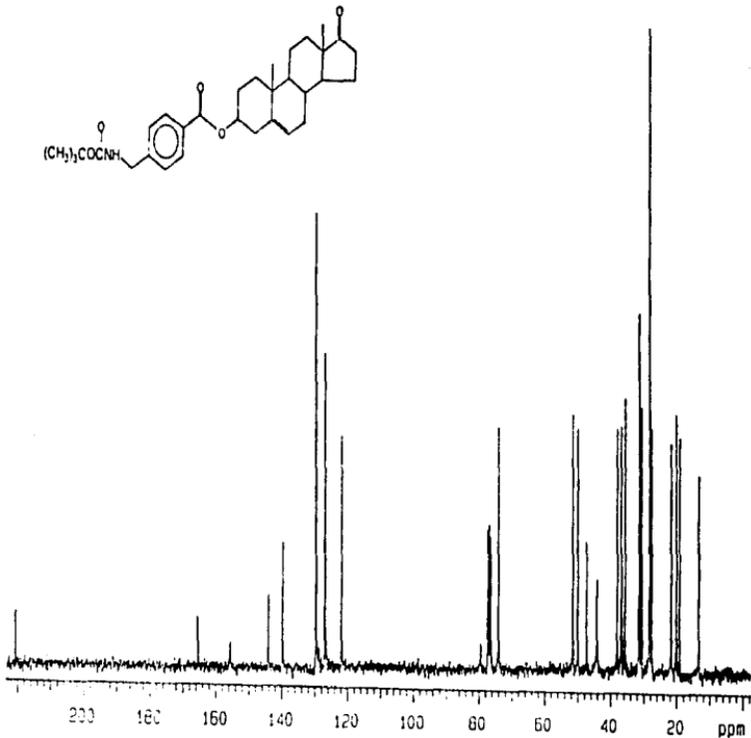
Espectro No.17a. Espectro ^1H RMN del ácido 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoico de dehidroepiandrosterona



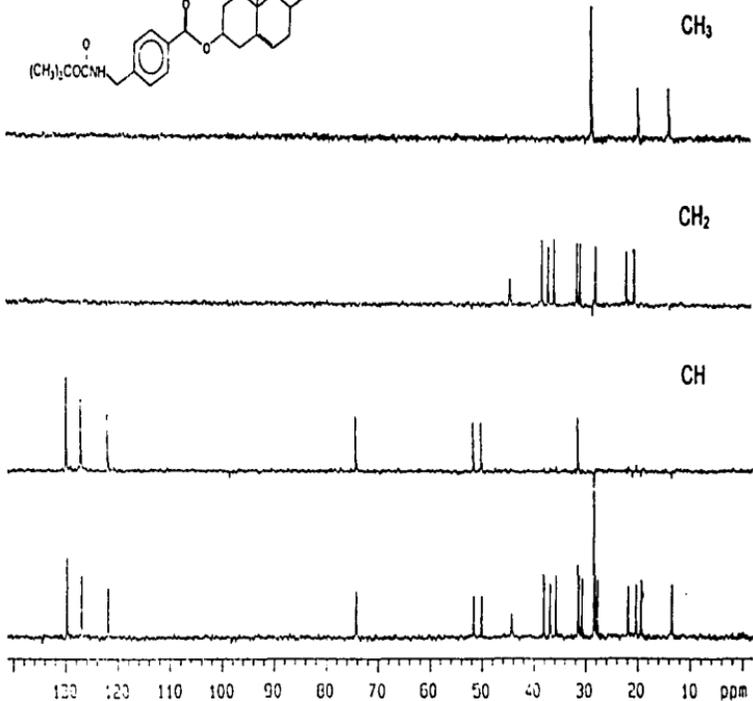
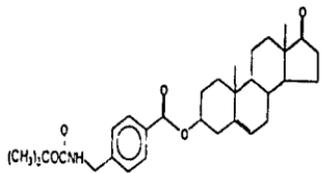
Spectro No.17b. Espectro ¹H RMN del ácido 4-(ter-butoxicarbonilaminometil)benzoico de dehidroepiandrosterona



Espectro No.17c. Espectro ^1H RMN del ácido 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoico de dehidroepiandrosterona + D_2O

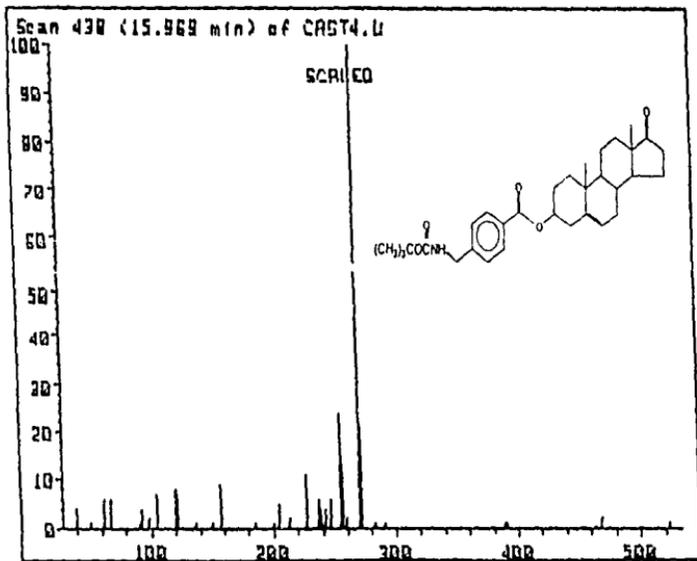


Espectro No.18. Espectro ^{13}C RMN del ácido 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoico de dehidroepiandrosterona

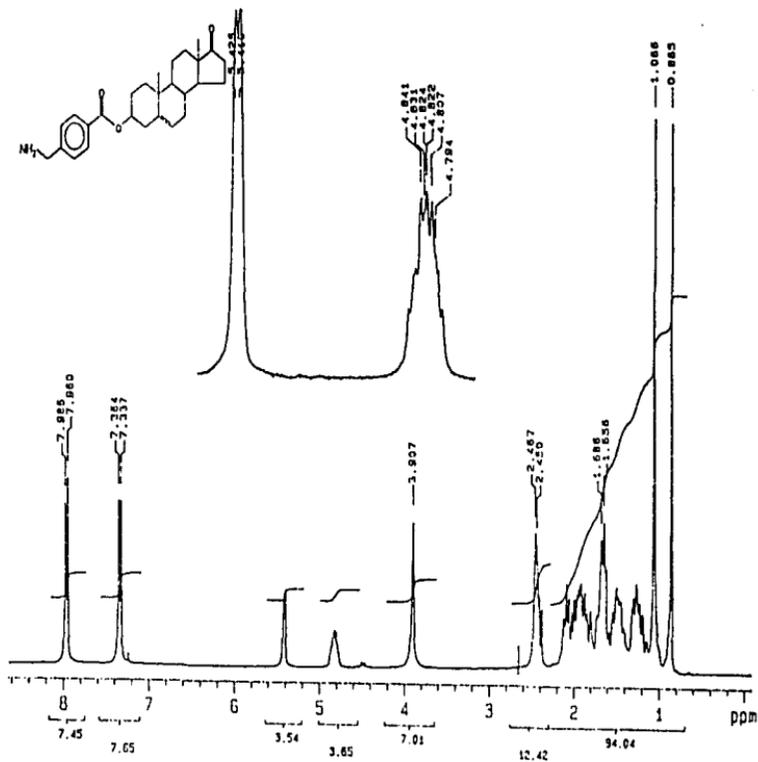


68

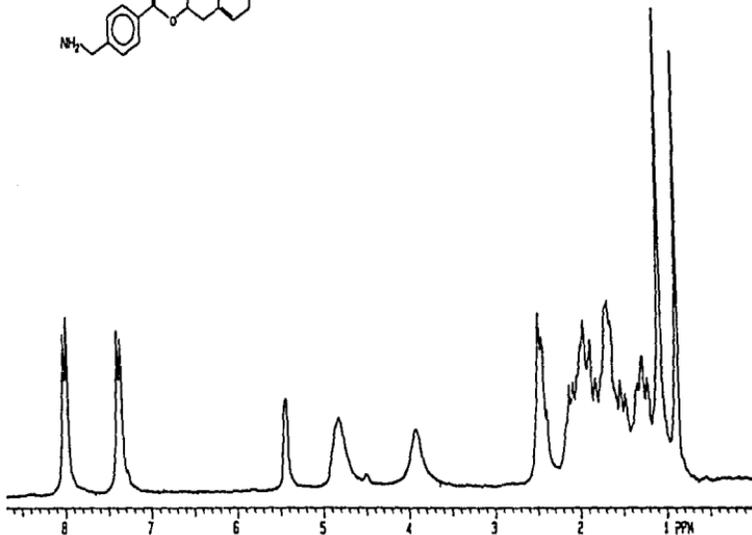
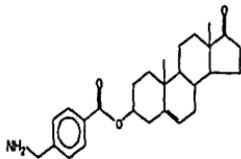
Espectro No.19. Espectro ^{13}C DEPT del ácido 4-(*ter*-butoxicarbonilaminometil)benzoico de dehidroepiandrosterona



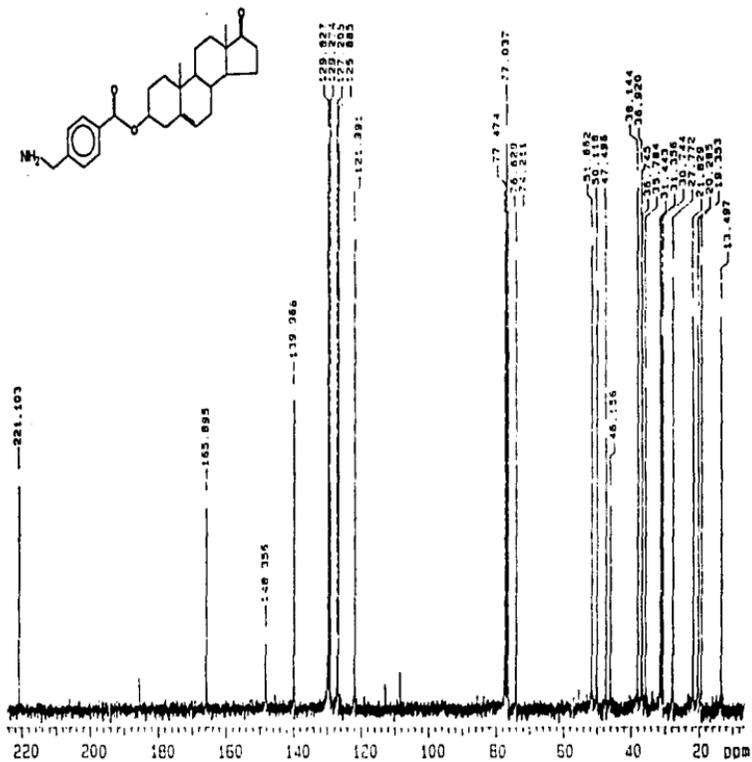
Espectro No. 20. Espectro de Masa del ácido 4-(ter-butoxicarbonilaminometil)benzoico de dehidroepiandrosterona

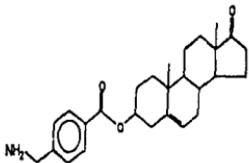


Espectro No.22a. Espectro ^1H RMN del 4-(aminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



Espectro No.22b. Espectro ¹H RMN del 4-(aminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona +D₂O

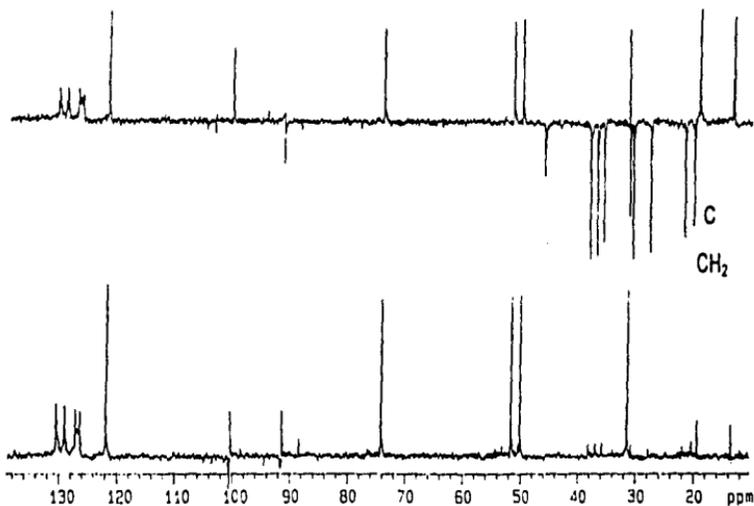




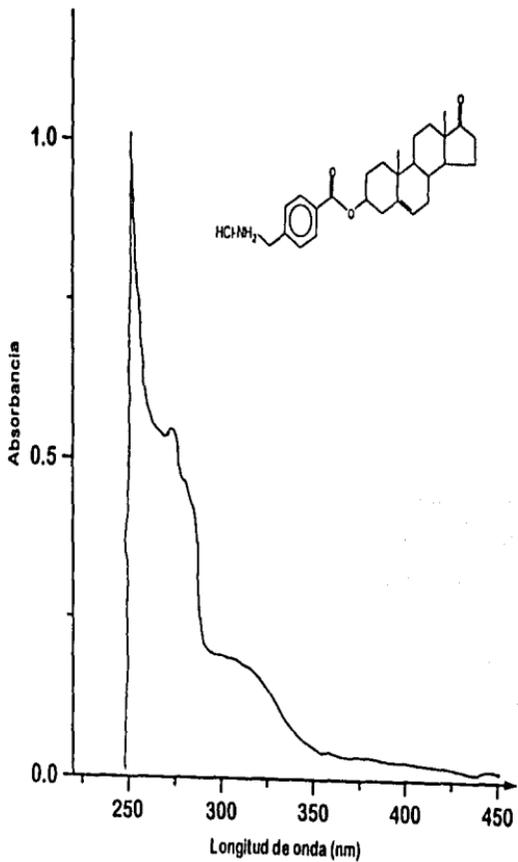
CH₃

CH

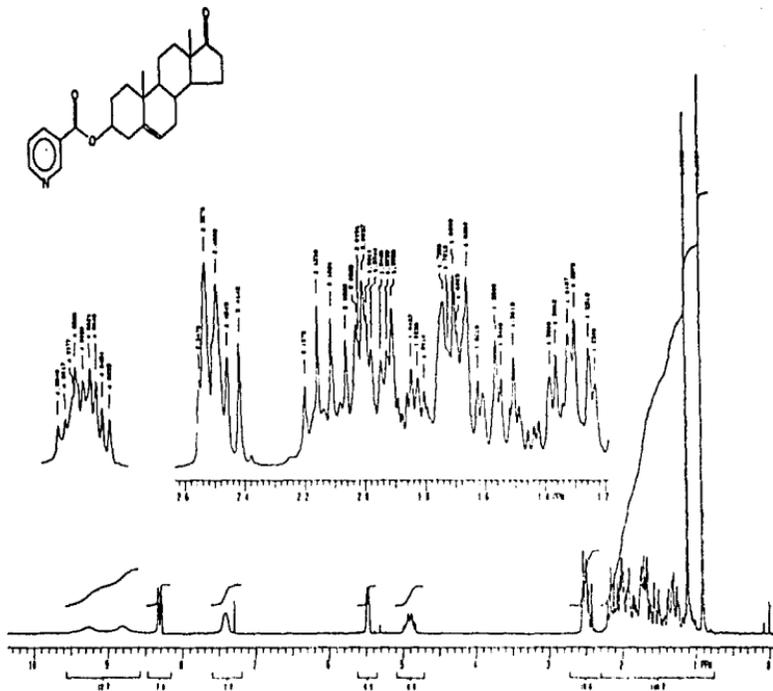
56



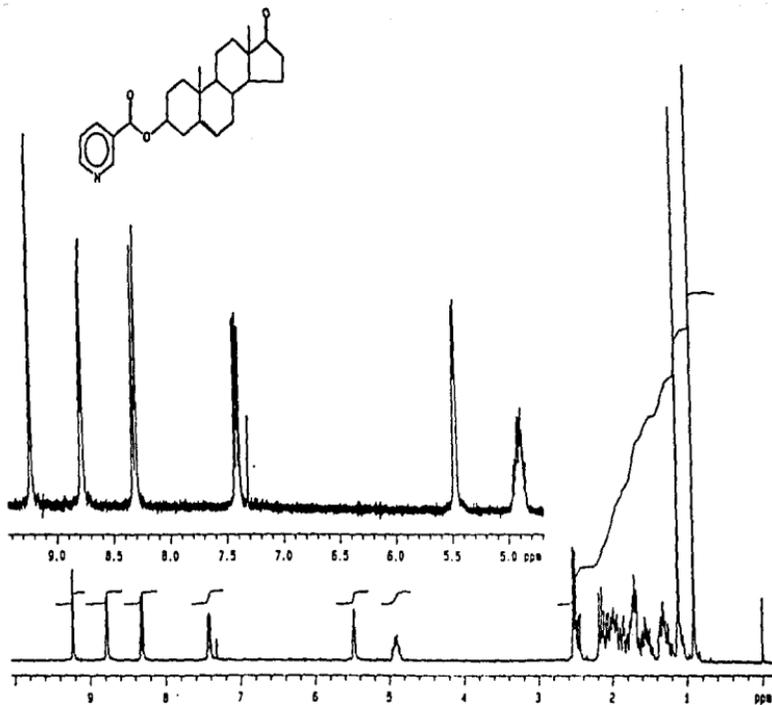
Espectro No.24. Espectro ¹³C APT del 4-(aminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



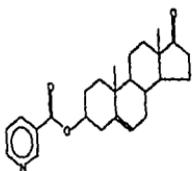
Espectro No.25. Espectro UV del Clorhidrato del 4-(aminometil)benzoato de dehidroepiandrosterona



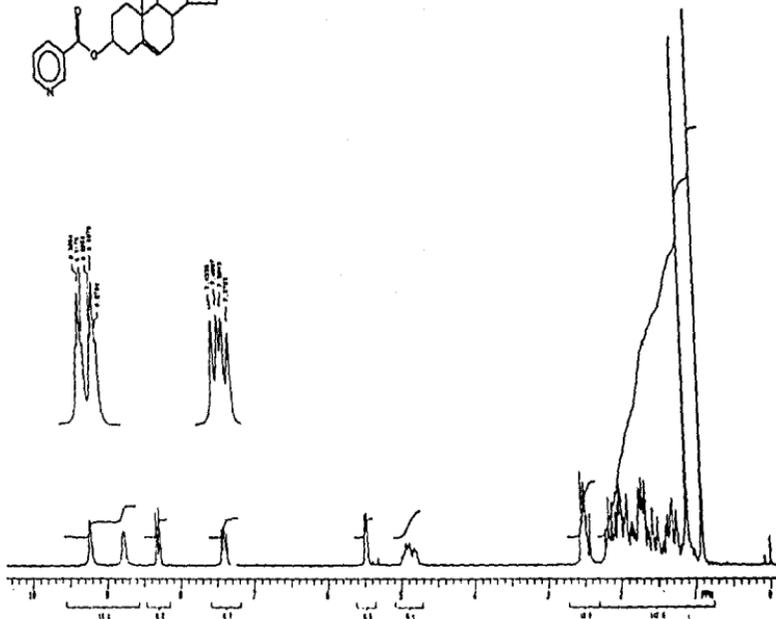
Espectro No.27a. Espectro ^1H RMN del Nicotinato de dehidroepiandrosterona



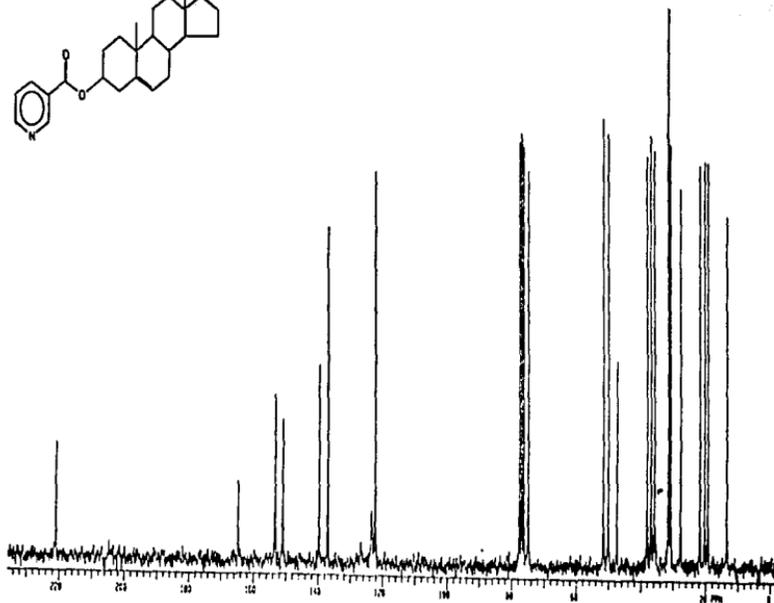
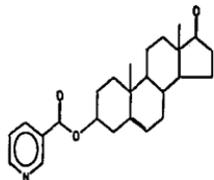
Espectro No.27b. Espectro ^1H RMN del Nicotinato de dehidroepiandrosterona



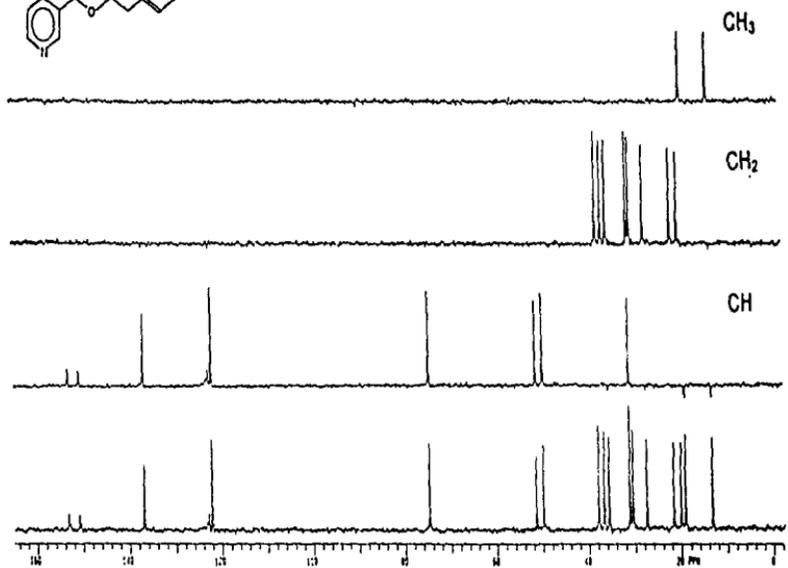
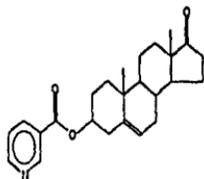
100



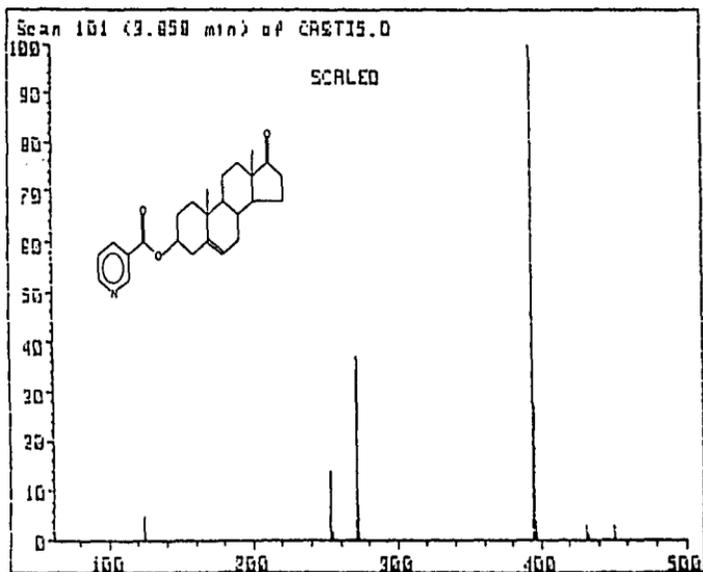
Espectro No.27c. Espectro ^1H RMN del Nicotinato de dehidroepiandrosterona + D_2O



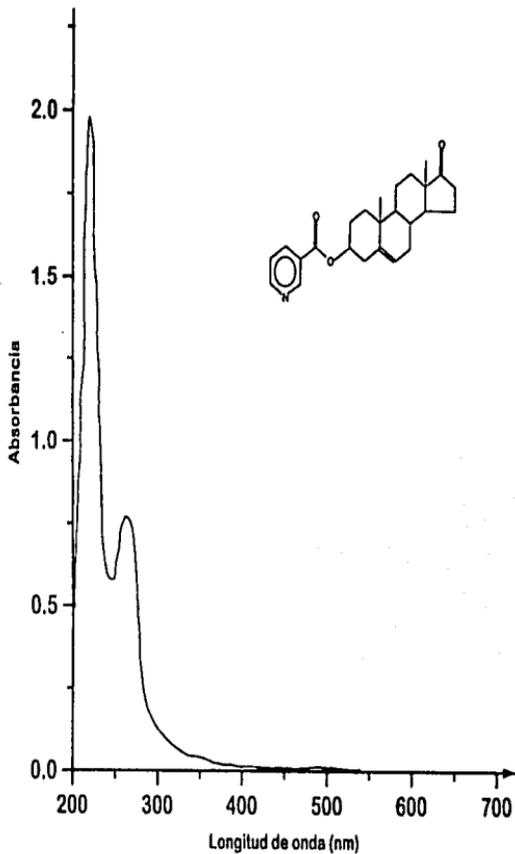
Espectro No.28. Espectro ^{13}C RMN del Nicotinato de dehidroepiandrosterona



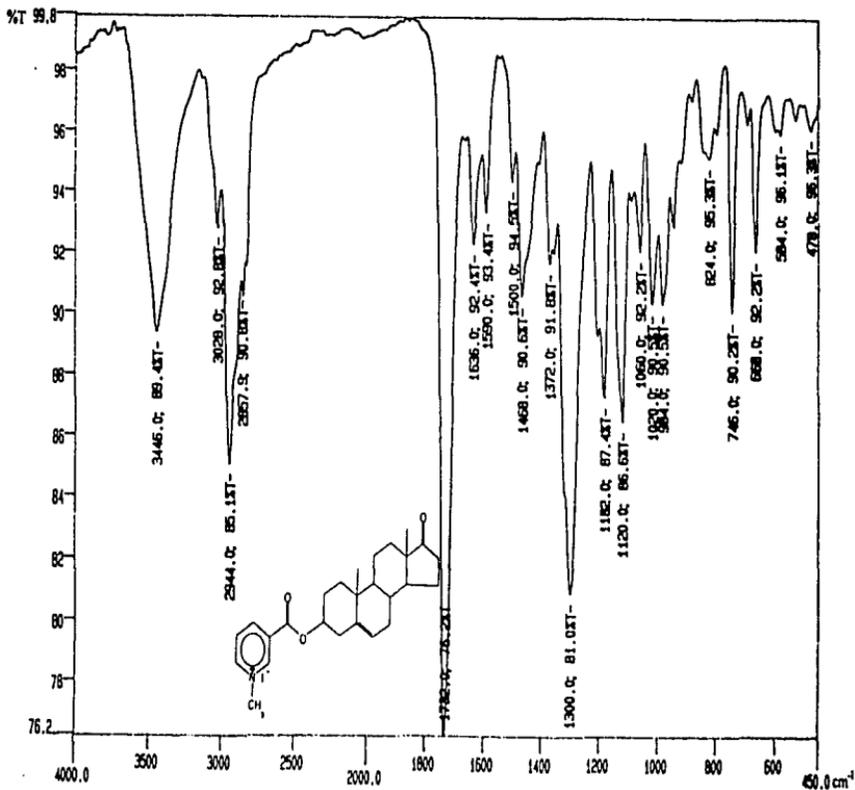
Espectro No.29. Espectro ¹³C DEPT del Nicotinato de dehidropiandrosterona



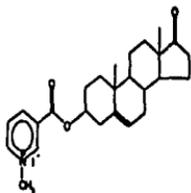
Espectro No.30. Espectro de masas del Nicotinato de dehidroepiandrosterona



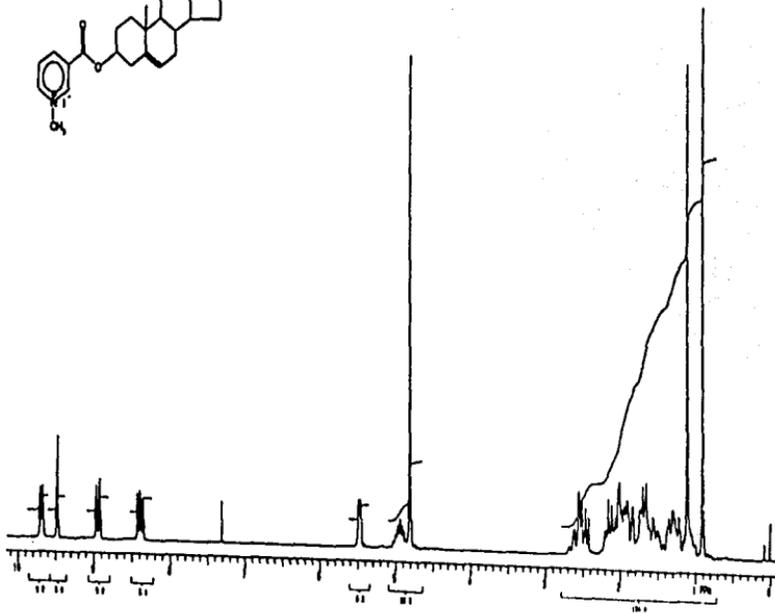
Espectro No.31. Espectro UV del Nicotinato de dehidroepiandrosterona



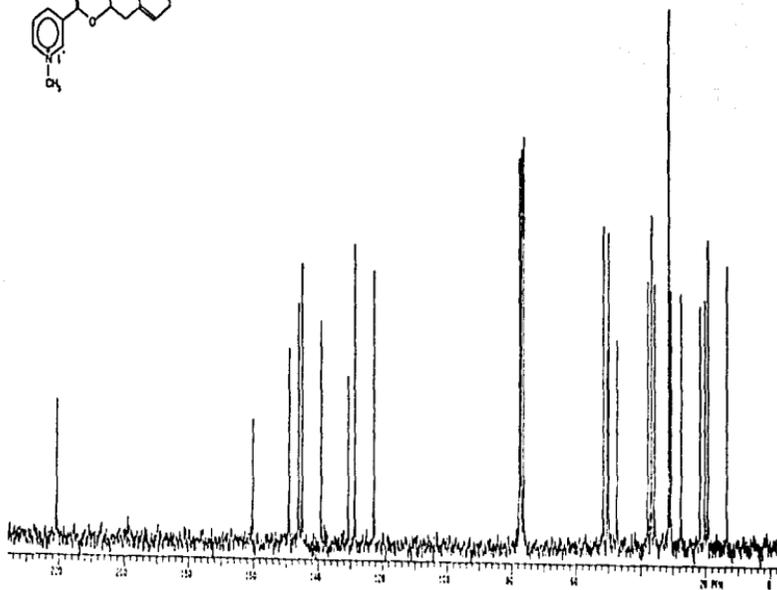
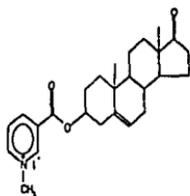
Espectro No.32. Espectro IR del Yodohidrato de N-metoprolol tartrato



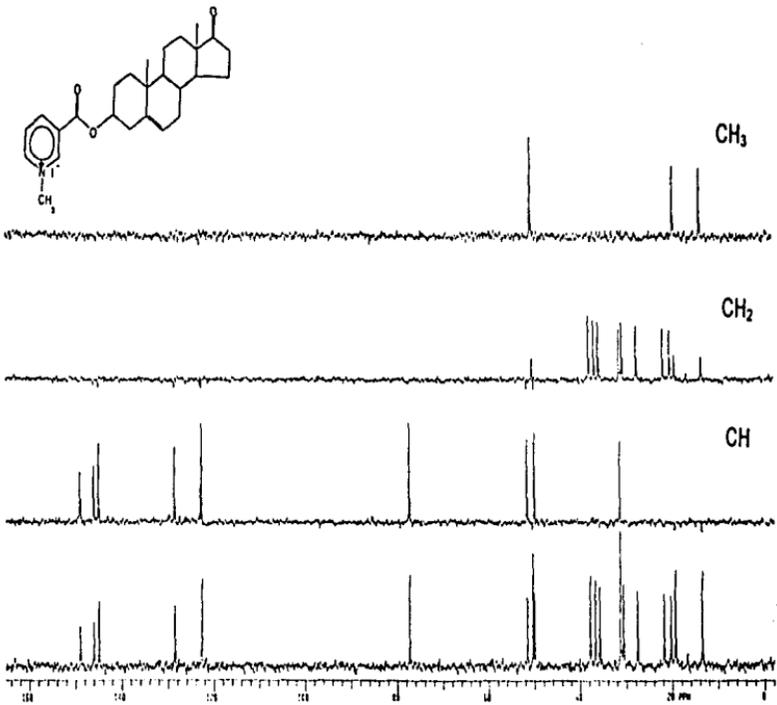
107



Espectro No.33b. Espectro ^1H RMN del Yodohidrato de N-metilnicotinato de dehidroepiandrosterona + D_2O

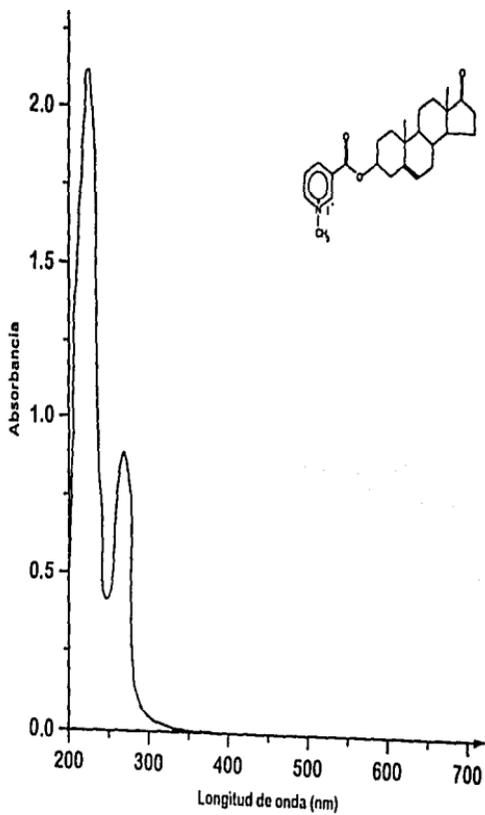


Espectro No.34. Espectro ^{13}C RMN del Yodhidrato de N-metilnicotinato de dehidroepiandrosterona



109

Espectro No.35. Espectro ^{13}C DEPT del Yodohidrato de N-metilnicotinato de dehidroepiandrosterona



Espectro No.36. Espectro UV del Yodohidrato de N-metilnicotinato de dehidroepiandrosterona

12. BIBLIOGRAFIA

1. Masoro, E.J. Food restriction in rodents: An evaluation of its role in the study of aging. *J. Gerontol.* 1988, 43: B59-64.
2. Pahlavani, M.A., Cheung, H.T., Cai, N.S. *et al.* Influence of dietary restriction and aging and gene expression in the immune system of rats. En: *Biomedical Advances in Aging*. Goldstein, A.L. (Ed). Plenum Publ. Co.: New York 1990, 259-70.
3. Schwartz, A.G. The effects of dehydroepiandrosterone on the rate of development of cancer and autoimmune processes in laboratory rodents. En: *Molecular Biology of Aging*. Woodhead, A.D. (Ed.). Plenum Publ. Co.: New York 1985, 181-91.
4. Schwartz, A. Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female (C3H-A^y/A) mice by long term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res.* 1979, 39: 1129-32.
5. Regelson, W., Loria, R., Kalimi, M. Hormonal intervention: "buffer hormones" or "state dependency." The role of dehydroepiandrosterone (DHEA), thyroid hormone, estrogen and hipophysectomy in aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988, 521:260-73.
6. Regelson, W., Kalimi, M., Loria, R. Dehydroepiandrsterone (DHEA): The precursor steroid. Introductory remarks. En: *The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Kalimi, M., Regelson, W. (EDS.). Walter de Gruyter: New Work 1990, 1-6.
7. Migeon, C.J., Keller, A.R., Lawrence, B. *et al.* Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma. Effect of age and sex, day to day and diurnal variations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1957, 17: 1051-62.
8. Vermeulen, A. Adrenal androgens and aging. En: *Adrenal Androgens*. Genazzani, A.R., Thijssen, J. H. H., Siiteri, P.K. (Eds.). Raven Press: New York 1980, 207-17.
9. Parker, L.N. *Adrenal Androgens in Clinical Medicine*. Academic Press: San Diego 1989, 118-34.
10. Roberts, E., Fitten, J. Serum steroid levels in two old men with Alzheimer's disease (AD) before, during, and after oral administration of dehydroepiandrosterone (DHEA). En: *The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Kalimi, M., Regelson, W. (Eds.). Walter de Gruyter: New York 1990, 43-53.
11. Zumoff, B., Rosenfeld, R.S., Strain, G.W. Sex differences in the twenty-four-hour mean plasma concentrations of dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and the DHEA to DHEAS ratio in normal adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980, 51: 330-3.

12. Orentreich, N., Brind, J.L., Rizaer, R.L. *et al.* Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984, 59: 551-555.
13. Montanini, V., Simoni, M., Chiossi, G. *et al.* Age related changes in plasma dehydroepiandrosterone sulfate, cortisol, testosterone and free testosterone circadian rhythms in adult men. *Horm. Res.* 1988, 29: 1-6.
14. Birkenhager-Gillesse, E.G., Derksen, J., Lagaay, A.M. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) in the oldest old, aged 85 and over. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1994, 719:543-52.
15. Deighton, C.M. Watson, M.J., Walder, D.J. Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs. *J. Rheumatol.* 1992, 19:1663-67.
16. Regelson, W., Kalimi, M., Loria, R. DHEA: Some thoughts as to its biologic and clinical action. In: *The Biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Kalimi, M., Regelson, W. (Eds.). Walter de Gruyter: New York 1990, 405-45.
17. Jacobson, M.A., Fusaro, R.E., Galmarini, M. *et al.* Decreased serum dehydroepiandrosterone is associated with an increased progression of human immunodeficiency virus infection in men with CD4 cell counts of 200-499. *J. Infect. Dis.* 1991, 164:864-68.
18. Parker, C.R. Jr., Schuster, M.W. Effects of syphilis infection on adrenocortical function in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991, 197:165-67.
19. Moolenaar, A.J., Van Seters, A.P. Gas chromatographic determination of steroids in the urine of patients with Cushing's Syndrome. *Acta Endocrinol.* 1971, 67:303-15.
20. Keutman, E.H., Mason, W.B. Individual urinary 17-ketosteroids of healthy persons determined by gas chromatograph-biochemical and clinical consideration. *J. Clin. Endocrinol.* 1967, 27:406-20.
21. Roberts, G. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEAS) ad neural facilitators: Effects on brain tissues in culture and on memory in young and old mice. A cyclic GMP hypothesis of actions of DHEA and DHEAS in nervous system an other tissues. In: *The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Kalimi, M., Regelson, W. (EDS.). Walter de Gruyter: New York 1990, 13-42.
22. Sunderland, T., Merrill, C.R., Harrington, M. G. *et al.* Reduced plasma dehydroepiandrosterone concentrations in Alzheimer's disease (letter). *Lancet* 1989, 2:570.
23. Hashimoto, S., Migita, S. Serum amyloid P component regulation by sex steroids in rats. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1990, 53:89-97.
24. Aragno-M, Tamgno-E, Poli-G, Boccuzzi-G, *et al.* Prevention of carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver microsomes from dehydroepiandrosterone-pretreated rats. *Free.Rad.Res.* 1994, 21(6):427-35.
25. Spector, T.D., Thompson, P.W., Perry, A. *et al.* The relationship between sex steroids an bone mineral content in women soon after menopause. *Clin. Endocrinol.* 1991, 34:37-41.

26. Bonnet, K. A., Brown, R.P. Cognitive effects of DHEA replacement therapy. In: The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA). Kalimi, M., Regelson, W. (Eds.). Walter de Gruyter: New York 1990, 65-79.
27. Hata-T, Hashimoto, M., Senoh-D, et al. Effect of dehydroepiandrosterone sulfate on ophthalmic artery flow velocity waveforms in fullterm pregnant women. *Am. J. Perinatol.* 1995, 12(2):135-37.
28. Yen, T.T., Allan, J.A., Pearson, D.V. et al. Prevention of obesity in A^y/A mice by dehydroepiandrosterone. *Lipid* 1987, 12:409-13.
29. Cleary, M.P. The antiobesity effect of dehydroepiandrosterone in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991, 196:8-16.
30. Mohan, P.F., Ihnen, J.S., Levin, B.E. et al. Effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats with diet-induced obesity. *J. Nutr.* 1990, 120: 1103-14.
31. Sullivan, A.C., Triscari, J. Metabolic regulation as a control for lipid disorder. I. influence of (-)-hydroxycitrate on experimentally induced obesity in the rodent. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1977, 30: 767-76.
32. Cleary, M.P., Seidenstat, R., Tannen, R.H. et al. The effect of dehydroepiandrosterone on adipose tissue cellularity in mice (41511). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1982, 171:276-84.
33. Coleman, D.L., Leiter, E.H., Schwizer, R.W. Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. *Diabetes* 1982, 31: 830-33.
34. Coleman, D.L., Lieter, E.H., Applezweig, N. Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone metabolites in diabetes mutant mice (c57BL/KsJ-db/db). *Endocrinology* 1984, 115:239-43.
35. Coleman, D.L., Schwizer, R.W., Leiter, E.H. Effect of genetic background on the therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetes-obesity mutants and in aged normal mice. *Diabetes* 1984, 33: 26-32.
36. Gordon, G.B., Helz, L., Sover, K.J. et al. Serum levels of DHEA and its sulfate, and the risk of developing bladder cancer. *Cancer Res.* 1991, 51: 1366-9.
37. Farewell, V.T., Bulbrook, R.D., Hayward, J.L. Risk factors in breast cancer: A prospective study on the Island of Guernsey. In: Early Diagnosis of Breast Cancer: Methods and Results. Anonymous (Ed.). Gustaf-Fischer Verlag: Stuttgart 1978, 43-51.
38. Schwartz, A.G., Fairman, K.K., Pashko, L.L. The biologic significance of dehydroepiandrosterone. In: The biologic role of dehydroepiandrosterone. Kalimi, M., Regelson, W. (Eds.). Walter de Gruyter: New York 1990, 7-12.
39. Moore, M.A., Thamavit, W., Ichihara, A. et al. Influence of dehydroepiandrosterone, diamino propane and butylated hydroxianisole treatment during the induction phase of rat liver nodular lesions in short term systems. *Carcinogenesis* 1986, 7:1059-63.
40. Shibata, M.A., Shirai, T., Asakawa, e. et al. Inhibition by dehydroepiandrosterone of butylated hydroxianisole (BHA) promotion of rat bladder carcinogenesis and enhancement of BHA induced forestomach hyperplasia. *Int. J. Cancer* 1993, 53:819-23.
41. Loria, R., Regelson, W., Padget, D.A. Immune response facilitation and resistance to viral and bacterial infections with DHEA. In: The biologic role of

- dehydroepiandrosterone (DHEA). Kalimi, M., Regerson, W. (Eds.) Walter de Gruyter: New York 1990, 107-30
42. Loria, R., Inge, T.H., Cook, S. *et al.* Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J. Med. Virol.* 1988, 26:301-14.
43. Araneo, B.A., Shelby, J., Li, G.Z. *et al.* Administration of dehydroepiandrosterone to burned mice preserves normal immunologic competence. *Arch. Surg.* 1993, 128: 318-15.
44. Daynes, R.A., Araneo, B.A., Dowel, T.A. Regulation of murine lymphokine production *in vivo*. III. The lymphoid microenvironment exerts regulatory influences over T helper function. *J. Exp. Med.* 1990, 171:979-96.
45. Matsunaga, A., Miller, B.C., Cottam, G.L. Dehydroepiandrosterone prevention of autoimmune disease in NZB/WF1 mice. Lack of an effect on associated immunological abnormalities. *Biochem. Biophys. Acta* 1989, 992:265-71.
46. Pahlavani, M.A. Immunological aspects of aging. *Drugs today* 1987, 23:611-24.
47. Miller, R.A. Aging and immune function. *Int. Rev. Cytol.* 1991, 124:187-215.
48. Pahlavani, M.A., Harris, M.D. Dehydroepiandrosterone does not augment lymphocyte proliferation or cytokine production in young or old F344 rats. *Immunology* 1994, submitted.
49. Daynes, R.A., Dudley, D.J., Araneo, B.A. Regulation of murine lymphokine production *in vivo* II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of IL-2 synthesis by helper T-cells. *Eur. J. Immunol.* 1990, 20:793-801.
50. Suzuki, T., Suzuki, N., Daynes, R.A. *et al.* Dehydroepiandrosterone enhances IL-2 production and cytotoxic effector function of human T-cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1991, 61:202-11.
51. Daynes, R.A., Araneo, B.A. Prevention and reversal of some age-associated changes in immunologic responses by supplemental dehydroepiandrosterone sulfate therapy. *Aging: Immunol. Infect. Dis.* 1992, 3: 135-53.
52. Riley, Thomas N. The prodrug concept and new drug design an development. *J. Chem. Education* 1988, 65 947-952
53. Korolkovas, A. *Essentials of Medicinal Chemistry* Wiley Tercscience: U.S.A. 1988, 97-112.
54. Notari, E.R. Prodrug Design. *Pharm. Therp.* 1981, 14:25-53.
55. Amidon, G.L., Leesman, G.D. Improving intestinal absorption of water insoluble compound. membrane metabolism strategy. *J. Pharm. Sci.* 1980, 69 :1363-1368.
56. Lachman, L. *et al* The theory and Practice of Industrial Pharmacy. Lea-Febiger: USA. 1986, 171-88, 457-66.
57. Charton M. *Methods Enzymology.* 1985, 112:323-359.
58. Korolkovas, A. *Essentials of Medicinal Chemistry.* Wiley-Interscience Po.: New York 1988, 101-118.
59. Bundgaard, J., Larsen, C. and Thorbek, P., Prodrugs as drug delivery systems. XXXVI. Preparation and enzymatic hidrolysis of various water-soluble amino acid esters of metronidazole. *Int. J. Pharm.* 1984, 18 :67-77.

60. Budgaard, H., Larsen, C. And Arnold. E., Prodrug as drug delivery systems. XXVII. Chemical stability and bioavailability of a water-soluble prodrug for parenteral solutions of metronidazole. *Int. J. Pharm.* 1984, 18:79-87.
61. Bruice, T.C. and Benkovic, S.J., *Biorganic Mechanisms*, Vol. I, W.A. Benjamin, New York 1968, 134-45.
62. Devlin, Thomas M. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. Wiley-Liss: USA 1992, 560-561, 1129.
63. Ruiz Lara, L. *Nuevo Diccionario Médico*, Vol. I, Planeta, Agostini. 1988, 140-142.