

00570
4
2g



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**OBTENCION DE DERIVADOS HIDROSOLUBLES DE LA
DEHIDROEPIANDROSTERONA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA - QUIMICA FARMACEUTICA)
P R E S E N T A :
Q.F.B. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

CONTENIDO

	PAG.
- RESUMEN.....	i
- ABSTRACS.....	ii
- INTRODUCCION.....	1
A).- Generalidades sobre la dehidroepiandrosterona.....	1
B).- Importancia de la solubilidad acuosa	6
- OBJETIVOS.....	9
- METODOS DE PREPARACION Y EVALUACION.....	11
A).- Preparación de dehidroepiandrosterona sulfato de sodio.....	11
B).- Obtención de dehidroepiandrosterona hemisuccinato de sodio.....	12
C).- Obtención del clorhidrato del N,N- dietilamino- acetato de dehidroepiandrosterona.....	13
D).- Obtención del clorhidrato del nicotinato de dehidroepiandrosterona.....	14
E).- Obtención del carbamato de dehidroepiandrosterona.....	15
F).- Prueba de solubilidad.....	16
G).- Prueba de hidrólisis por suero sanguíneo.....	18
- RESULTADOS Y DISCUSION.....	20
- CONCLUSIONES.....	53
- PARTE EXPERIMENTAL.....	55
- ESPECTROS.....	64
- BIBLIOGRAFIA.....	91

LISTA DE FIGURAS

Pag.

FIGURA 1 IR DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	65
FIGURA 2 E.M. DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	66
FIGURA 3 ¹ H RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	67
FIGURA 4 ¹³ C RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	68
FIGURA 5 IR DEHIDROEPIANDROSTERONA SULFATO DE SODIO.....	69
FIGURA 6 E.M. DE DHEA SULFATO DE SODIO.....	70
FIGURA 7 ¹ H RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA SULFATO DE SODIO.....	71
FIGURA 8 ¹³ C RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA SULFATO DE SODIO.....	72
FIGURA 9 IR ACIDO DEHIDROEPIANDROSTERONA HEMISUCCINICO.....	73
FIGURA 10 E.M. DEL ACIDO DHEA HEMISUCCINICO.....	74
FIGURA 11 ¹ H RMN ACIDO DHEA HEMISUCCINICO.....	75
FIGURA 12 ¹³ C RMN ACIDO DHEA HEMISUCCINICO.....	76
FIGURA 13 IR N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA.....	77
FIGURA 14 IR CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA.....	78
FIGURA 15 IR CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA.....	79
FIGURA 16 E.M. DEL N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA.....	80
FIGURA 17 ¹ H RMN N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA.....	81

FIGURA 18	^{13}C RMN N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA.....	82
FIGURA 19	IR CLORHIDRATO DEL NICOTINATO DE DHEA.....	83
FIGURA 20	E.M. DEL NICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	84
FIGURA 21	^1H RMN NICOTINATO DE DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	85
FIGURA 22	^{13}C RMN NICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	86
FIGURA 23	IR CARBAMATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	87
FIGURA 24	E.M. DEL CARBAMATO DE DHEA.....	88
FIGURA 25	^1H RMN CARBAMATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	89
FIGURA 26	^{13}C RMN CARBAMATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.....	90

RESUMEN

En esta tesis se sintetizaron cinco derivados de la dehidroepiandrosterona (3 β -hidroxiandrostan-5-en-17-ona), con el propósito de aumentar la solubilidad acuosa de esta sustancia esteroideal. Los derivados obtenidos, en la posición tres, fueron el sulfato de sodio, el hemisuccinato de sodio, el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato, el clorhidrato del nicotinato y el carbamato. La solubilidad acuosa se evaluó para diferentes valores de pH y en propilenglicol-agua. Otros parámetros determinados fueron la hidrólisis enzimática, puntos de fusión, actividad óptica y datos espectroscópicos (IR, RMN, Masas).

ABSTRACT

In this thesis is described the synthesis of five derivatives of dehydroepiandrosterone (3 β -hydroxyandrostane-5-en-17-one), with the purpose of increasing the solubility in water of this steroidal substance. The compounds prepared are esters of the C-3 hydroxyl group and a carbamate at the same position. These derivatives are sodium sulfate, sodium hemisuccinate, N,N-diethylaminoacetate chloride, nicotinate chloride, and carbamate. The water solubility has been evaluated at different values of pH and in water-propylene glycol. Other constants as enzymatic hydrolysis, melting point, optical rotation, and spectroscopic data (IR, NMR, Mass) have been determined.

INTRODUCCION.

A).- Generalidades sobre la dehidroepiandrosterona

La dehidroepiandrosterona (3 β -Hidroxiandros-5-en-17-ona, Prasterona, $C_{19}H_{28}O_2$, DHEA.), es una sustancia de naturaleza esteroidal producida principalmente por la corteza suprarrenal. Los más altos niveles sanguíneos de DHEA en el hombre son de 20 a 30mg/día entre los 20-25 años de edad y disminuyen en un 90% a los 85 años. La dehidroepiandrosterona se encuentra en plasma humano asociada con la lipoproteína de baja densidad y conjugada en forma de sulfato de sodio (DHEA-S). Los niveles de este último en suero, son mayores durante el día y disminuyen por la noche; aunque no se conoce el mecanismo exacto que regule este comportamiento, se ha encontrado que la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) juega un papel trascendental en dicho control. En los tejidos estudiados, se ha detectado la presencia de dehidroepiandrosterona sulfatasas que convierten la DHEA-S a DHEA y viceversa⁽¹⁻⁷⁾.

Por muchos años la dehidroepiandrosterona ha sido catalogada como un intermediario en la biosíntesis de las hormonas sexuales (ruta androgénica); y su aromatización en tejidos periféricos, como las grasas, es responsable de la síntesis de estrógenos en mujeres postmenopáusicas^(3,5,8). Sin embargo, la función fisiológica primaria de este esteroide aún no ha sido del todo establecida⁽⁹⁾.

Estudios recientes han mostrado que la DHEA y su sulfato de sodio (DHEA-S), tienen diversas acciones bioquímicas e inmunológicas cuando son administradas en animales de laboratorio:

- Evita el desarrollo de tumores cancerígenos espontáneos o inducidos químicamente en los pulmones, el colon y la piel; así como la unión de carcinógenos al ADN de ratas⁽¹⁰⁻¹³⁾.
- Inhibe la síntesis del ADN y la proliferación de células animales bajo condiciones basales o cuando son estimuladas por varios mitógenos⁽¹⁴⁾.
- Retarda la nefritis autoinmune y la nefrosis progresiva crónica en roedores⁽¹⁵⁻¹⁶⁾.
- Suprime la conducta agresiva en ratas castradas⁽¹⁶⁾.
- Bloquea la lisis celular del timo provocada por glucocorticoides y el daño de éstos al hipotálamo⁽¹⁷⁾.
- Mantiene y fomenta la competencia inmune de ratones infectados por virus; así como aminora el estrés provocado por los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides, estimulados por dicha infección⁽⁹⁾.
- Aumenta la retención de memoria en ratas⁽¹⁸⁾.
- Reduce la grasa corporal, sin provocar anorexia, lo que provoca efectos de antiobesidad en ratas⁽¹⁶⁾ y perros⁽¹⁹⁾.
- Presenta actividad antidiabética de tipo preventiva en ratas y ratones⁽¹²⁾.
- Previene la acumulación de placas de colesterol en aortas de conejos⁽²⁰⁾.
- Disminuye los niveles de colesterol en ratas hipotiroideas y en perros obesos^(9,20).

En los seres humanos se han detectado niveles plasmáticos disminuidos de dehidroepiandrosterona en pacientes, con insuficiencia adrenal secundaria o con estrés crónico^(17,21); provoca reducción de la grasa corporal en personas obesas, sin pérdida de peso, debido a que aumenta la masa muscular; no afecta a las células sensibles a la insulina en periodos cortos de administración⁽¹⁾. Una baja concentración sanguínea de este esteroide está relacionado con la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas⁽²²⁾. Asimismo, se han encontrado correlaciones inversas: entre DHEA-S y el complejo de lipoproteína de baja densidad-colesterol⁽¹⁾, entre DHEA-S y muertes por enfermedades cardiovasculares en hombres mayores de 50 años^(1,12,14). Estudios retrospectivos han demostrado niveles plasmáticos subnormales de DHEA y DHEA-S, así como una eliminación anormal en orina de sus metabolitos, androsterona y etioolanona, en cánceres avanzados⁽¹⁴⁾. Mujeres con concentraciones urinarias bajas de DHEA y DHEA-S, manifiestan una alta predisposición a desarrollar cancer de senos⁽¹²⁾, esto sugiere que tales irregularidades puedan ser de valor predictivo en el riesgo de presentar tal enfermedad⁽²³⁾. Del mismo modo, se han determinado niveles bajos de DHEA en el plasma de jóvenes suero positivo al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)⁽¹⁵⁾.

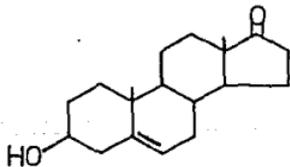
Además de la actividad benéfica de la dehidroepiandrosterona, se han presentado algunas reacciones indeseables, como son: el efecto androgénico y estrogénico, los cuales se manifiestan por un incremento en el peso de las vesículas seminales de ratas castradas y en el peso del útero de ratas en la prepubertad^(12,25); también promueve el desarrollo de ovarios poliquísticos y aumento de testosterona en ratones^(11,12).

Los estudios diseñados para definir algunos de los mecanismos básicos de la actividad biológica ejercida por este esteroide han mostrado, que la concentración de la DHEA tritiada, cuando se administra por vía oral, fue mayor en el hígado, en segundo lugar en los riñones y en tercer lugar en los testículos, formando parte de complejos con macromoléculas⁽²⁶⁾. De igual manera, se ha encontrado que el hígado sufre cambios profundos como resultado de: i) hepatomegalia; ii) proliferación e incremento en el volumen y área seccional de los peroxisomas⁽¹¹⁾; iii) incremento de la respiración mitocondrial de ratas obesas⁽¹⁶⁾; iv) inhibición no competitiva de la glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa (G-PT)⁽¹⁷⁾; v) marcada inducción de la proteína bifuncional peroxisomal enoil coenzima A hidratasa/3-hidroxiacilcoenzima A dehidrogenasa; vi) aumento de enzimas peroxisomales: catalasa, carnitin-acetilcoenzima A, urato oxidasa; vii) incremento de la actividad mitocondrial de carnitin palmitoil coenzima A transferasa^(11,27); viii) disminución de la actividad de proteína quinasa para sustratos endógenos; ix) aumento en ATPasa y GTPasa⁽²⁸⁾; x) producción de acetato de DHEA y androst-5-en-3- β -17-diol, cuando se administran concentraciones mayores a 100 micromolar de DHEA⁽²⁹⁾.

Es posible que todos estos cambios en las actividades enzimáticas antes señaladas, jueguen un papel determinante en algunos de los beneficios preventivos ejercidos por la DHEA⁽²⁷⁾.

En la clínica se ha empezado a utilizar la dehidroepiandrosterona, por vía oral, en el tratamiento de la esclerosis múltiple y en la enfermedad de Alzheimer⁽¹⁸⁾. Comercialmente se dispone de DHEA, conjuntamente con derivados de testosterona, en inyectables (STEN); en esta formulación se prescribe para aminorar el estrés en los pacientes con insuficiencia androgénica⁽²⁴⁾.

Una de las dificultades que se presentan al administrar la DHEA, es su baja solubilidad acuosa, característica de las sustancias esteroidales en general e inherente a su estructura hidrocarbonada, misma que se presenta a continuación:



DEHIDROEPIANDROSTERONA
(DHEA)

B).- Importancia de la solubilidad acuosa

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 (proceso de 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 solubles en agua (sales orgánicas); éstos se forman al unir porciones estructurales (progrupos) al principio activo, provocando una mayor hidrosolubilidad y en consecuencia una mayor velocidad de disolución del fármaco⁽³⁰⁻³²⁾.

La solubilidad acuosa es un parámetro biofarmacéutico crítico. Una solubilidad mayor al 1% (1g/100ml) a 37°C indica que no se podrán presentar problemas potenciales en la biodisponibilidad como resultado de las características de hidrosolubilidad. Es importante anotar que esto es una guía y no 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^(31,35,50).

Los datos preliminares de solubilidad no solamente proporcionan conocimientos de las propiedades biofarmacéuticas sino que también son útiles para el farmacólogo y el toxicólogo, en la administración del compuesto a probar biológicamente; con esto se pueden prevenir ambigüedades de sustancias reportadas como inactivas o no tóxicas, cuando de hecho, fueron pobremente absorbidas debido a su baja hidrosolubilidad⁽⁵⁰⁾.

Se han establecido varios lineamientos generales en el diseño de derivados hidrosolubles:

- a).- El progrupo no presentará ningún riesgo toxicológico a las concentraciones en que sea administrado⁽³²⁾.
- b).- Debe existir la posibilidad de liberar al fármaco como tal dentro del organismo ya sea por medio de reacciones enzimáticas o por reacciones intramoleculares^(33,34).
- c).- El derivado obtenido debe reunir condiciones necesarias de estabilidad ya sea en forma sólida o en solución⁽³⁴⁾.
- d).- La velocidad de recuperación del fármaco será 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⁽³⁵⁾.
- e).- El nuevo compuesto será biologicamente no activo⁽³³⁾.

Recientemente se han propuesto diversos derivados para lograr mayor solubilidad acuosa de principios activos, algunos de ellos involucran la esperada ruptura enzimática⁽³⁶⁻⁴²⁾, en otros se propone la liberación del fármaco por reacciones intramoleculares de ciclización⁽⁴³⁻⁴⁸⁾ o por reacciones de oxidación combinadas con reacciones hidrolíticas⁽⁴⁹⁾.

Como señalamos anteriormente, los esteroides son compuestos pobremente solubles en agua. Los corticosteroides adrenales tales como la dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona y la prednisolona son disponibles comercialmente como derivados solubles en agua en forma de ésteres de fosfatos y hemisuccinatos de sodio (Sigma Co). Estos derivados liberan "in vivo" a los corticosteroides vía hidrólisis enzimática por fosfatasas ácidas o por esterasas, respectivamente⁽³⁷⁾. En este trabajo se ha escogido a la dehidroepiandrosterona por el interés de su actividad biológica, antes señalada, por su disponibilidad en el laboratorio y con la perspectiva de obtenerla a partir de la Diosgenina⁽⁵²⁾.

A.- Objetivos Generales

- 1.- Se obtendrán derivados de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) con el propósito de lograr que esta sustancia presente mayor solubilidad en agua. Dicha modificación estructural se realizará en el grupo hidroxilo ubicado en el carbono número tres.

Con el fin de dar cumplimiento al objetivo antes planteado se proponen la síntesis de los siguientes derivados:

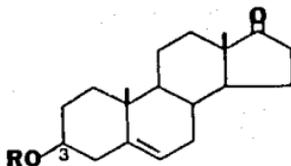


Tabla 1

DERIVADOS DE DHEA PROPUESTOS

NUM.	R	COMPUESTO
I	-H	DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)
II	$-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	DHEA-SULFATO DE SODIO
III	$-\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$	DHEA-HEMISUCCINATO DE SODIO
IV	$-\text{OCCH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{HCl}$	CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA
V	$-\text{OC}(\text{C}_5\text{H}_4)\text{NHCl}$	CLORHIDRATO DEL NICOTINATO DE DHEA
VI	$-\text{OCNH}_2$	CARBAMATO DE DHEA

- 2.- Determinar la solubilidad acuosa de los compuestos obtenidos a diferentes valores de pH, y a una misma temperatura. Así como evaluar sus solubilidades respectivas en un sistema propilenglicol-agua a diferentes proporciones.
- 3.- Evaluar cualitativamente la posibilidad de hidrólisis enzimática de los derivados, en suero sanguíneo.
- 4.- Implementar en el laboratorio, la metodología pertinente y adecuada para la obtención de derivados solubles con el propósito de aplicar la posteriormente a los principios activos que así lo requieran.

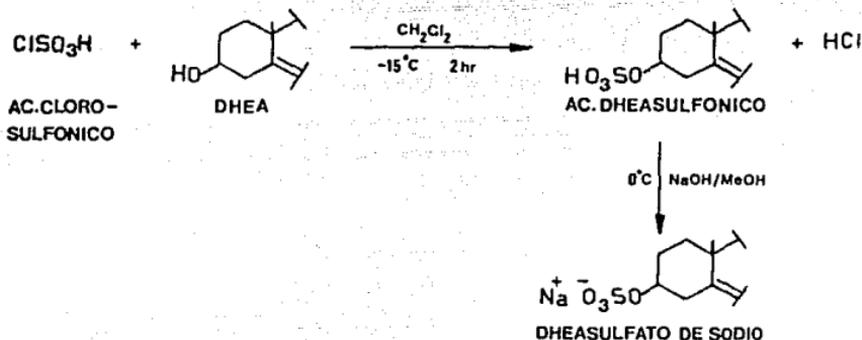
B.- Objetivos específicos

- Preparar derivados de tipo ésteres en los cuales la parte acilo será la responsable de las características de hidrosolubilidad.
- Seleccionar los grupos acilo a utilizar, bajo el criterio de evitar las posibles consecuencias toxicológicas en relación a su estructura y metabolismo.
- Caracterizar los compuestos sintetizados, mediante sus propiedades físicas: puntos de fusión, actividad óptica; así como por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

METODOS DE OBTENCION Y EVALUACION

A.- Preparación de dehidroepiandrosterona sulfato de sodio (II)

Reacción:

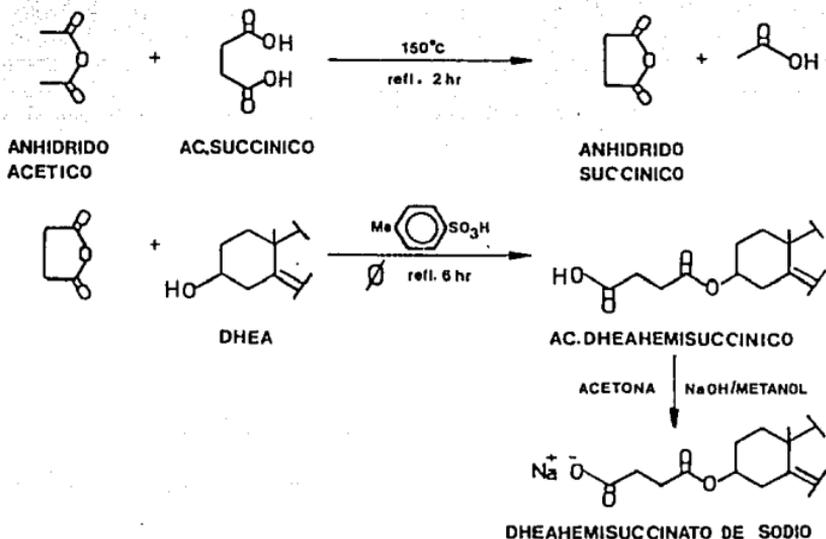


ESQUEMA 1

La dehidroepiandrosterona, disuelta en cloruro de metileno, se hizo reaccionar con el ácido clorosulfónico a bajas temperaturas. El ácido DHEAsulfónico obtenido (Rend.95%) se neutralizó con hidróxido de sodio metanólico para obtener la sal sódica correspondiente (Rend.71%) misma que se recristalizó de metanol - cloruro de metileno.

B.- Obtención de dehidroepiandrosterona hemisuccinato de sodio(III).

REACCION:

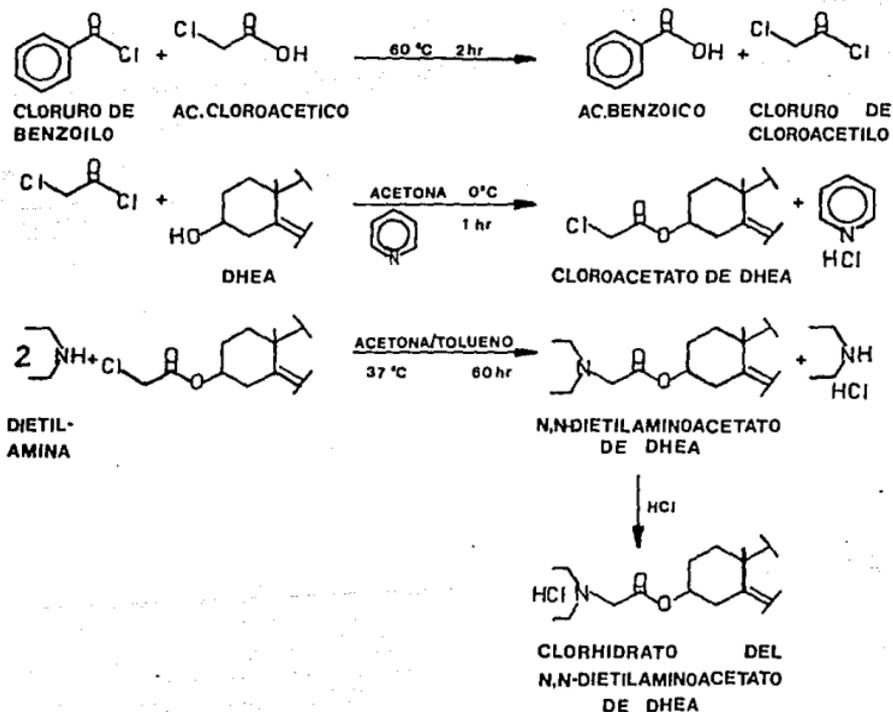


ESQUEMA 2

El ácido succínico se hizo reaccionar con un equivalente de anhídrido acético para obtener anhídrido succínico⁽⁵⁴⁾. Este último con dehidroepiandrosterona, en presencia de cantidades catalíticas de ácido p-toluensulfónico, produjo el ácido DHEA- hemisuccínico (Rend.82%), mismo que a su vez se neutralizó con hidróxido de sodio metanólico con lo cual se obtuvo la sal correspondiente (Rend.73%).

C.- Obtención del clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de dehidroepiandrosterona (IV).

REACCION:

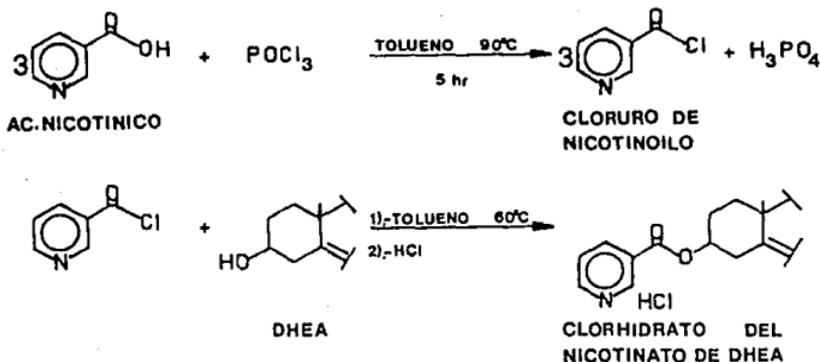


ESQUEMA 3

El ácido cloroacético tratado con dos equivalentes de cloruro de benzoilo⁽⁵⁵⁾ produjo el cloruro de cloroacetilo. (Rend.86%). Dos equivalentes de este compuesto mas un equivalente de dehidroepiandrosterona y uno de piridina anhidra, produjeron el cloroacetato de dehidroepiandrosterona (Rend.90%). A esta última sustancia, disuelta en tolueno-acetona, se le agregó dos equivalentes de dietilamina, la reacción se dejó en agitación por 60 hr, y posteriormente se le hizo pasar una corriente de cloruro de hidrógeno, dejando reposar a temperatura ambiente, para obtener el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA. (Rend. 58%).

D.- Obtención del clorhidrato de nicotinato de dehidroepiandrosterona (V)

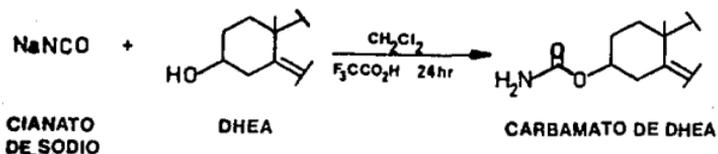
REACCION:



El cloruro de nicotinoilo se obtuvo mediante la reacción de tres equivalentes de ácido nicotínico con uno de oxiclورو de fosforo. Una vez obtenido, se hizo reaccionar con la dehidroepiandrosterona en presencia de piridina anhidra para producir el nicotinato de dehidroepiandrosterona (Rend.43%), al cual se le pasó una corriente de cloruro de hidrógeno para darnos el clorhidrato correspondiente (Rend.39%).

E.- Obtencion del carbamato de dehidroepiandrosterona (VI)

REACCION:



Tres equivalentes de cianato de sodio se hicieron reaccionar con uno de dehidroepiandrosterona y uno de ácido trifluoro acético. La reacción se dejó transcurrir por 24 hr para obtener el carbamato de dehidroepiandrosterona (Rend.85%).

F.- Pruebas solubilidad.

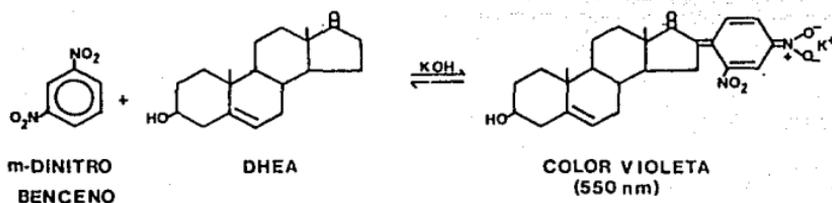
La temperatura a la cual se determinó la solubilidad fué de 25°C. Los buffer utilizados fueron el de HCl-KCl, citratos, acetatos, fosfatos, Tris [tris(hidroximetil)aminometano] y carbonatos todos con una fuerza iónica de 0.2; el procedimiento se resume en el siguiente diagrama:



El compuesto a probar se colocó en tubos de ensayo (por triplicado), se le agregó el buffer correspondiente con agitación por 30 min, se filtró para separar la parte no disuelta y se procedió a evaluar la concentración del derivado en el filtrado en la siguiente forma:

a).- dehidroepiandrosterona.

La determinación se basó en la reacción de Zimmermann y cuyo procedimiento fue descrito por Nichel⁽⁵⁷⁾:



ESQUEMA 6

b).- dehidroepiandrosterona sulfato de sodio.

La reacción de identificación se fundamenta en la formación de un complejo entre el derivado y el azul de metileno, mismo que es soluble en cloroformo y absorbe a 660 nm.⁽⁵⁸⁾

c).- dehidroepiandrosterona hemisuccinato de sodio.

Este compuesto se hizo reaccionar con hidroxilamina en medio básico, con posterior acidificación para adicionar cloruro férrico y producir un compuesto azulverdoso que absorbe a 680 nm. Con esta reacción se determina la parte acilo del éster, por lo que es una determinación indirecta⁽⁵⁹⁾.

d).- clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA.

La determinación de este derivado se realizó como lo señala la Farmacopea⁽⁵⁹⁾, y que consiste en la formación de una sal con ácido sulfúrico, en relación 1:70 v/v, de color amarillo (470nm).

e).- clorhidrato del nicotinato de dehidroepiandrosterona.

En esta determinación no se efectuó ninguna reacción coloreada, sino que se cuantificó mediante su absorción en la región del ultravioleta con una longitud de onda de 280nm.

f).- carbamato de dehidroepiandrosterona.

Su evaluación se realizó de manera semejante a la dehidroepiandrosterona.

G.- Prueba de hidrólisis por suero sanguíneo.

El suero sanguíneo utilizado fue de origen humano colectado en el momento de realizar las determinaciones. No se utilizó ningún anticoagulante. El pH de trabajo fue de 8 agregando una pequeña cantidad de metanol para acelerar la hidrólisis. La temperatura de operación fue de 37 °C y la evaluación de la actividad esterasa se realizó con el acetato de p-Nitrofenol^(60- 63).

Los derivados probados fueron el DHEAsulfato de sodio, DHEA hemisuccinato de sodio y el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA. Se tomaron muestras a tiempos fijos de 0, 5, 10, 20 y 30 min. y se evaluaron mediante los procedimientos espectrofotométricos antes descritos.

Conjuntamente a la determinación enzimática se llevó a cabo la evaluación de hidrólisis de los derivados mencionados en presencia únicamente de la solución buffer de Tris, a pH de 8 y se tomaron muestras a diferentes tiempos.

A fin de tener una idea sobre la estabilidad de los tres derivados en estudio, se realizó una evaluación cualitativa, sometiendo dichos compuestos, por separado, a calentamiento de 80°C, por cinco horas, y disueltos en los buffer donde fue mayor su solubilidad, al término de las cuales se cuantificó la concentración de los mismos, que aun quedaba en solución.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente capítulo mencionaremos las características de obtención de los diversos derivados, sus parámetros espectroscópicos y evaluación de solubilidad e hidrólisis.

En la siguiente tabla se enlistan algunas de las propiedades físicas de todos los derivados comparandolas con la DHEA.

TABLA 2

PROPIEDADES FISICAS DE LA DHEA Y LOS DERIVADOS SINTETIZADOS

COMPUESTO	P.M	FORM.MOLECULAR	P.F (°C)	$[\alpha]_D^{25}$	RED. (%)
I	288.42	$C_{19}H_{28}O_2$	140-141	+10.9 (MeOH)	--
II	390.41	$C_{19}H_{27}O_3SNa$	150-151	+11.5 (MeOH)	71
III	410.48	$C_{23}H_{31}O_5Na$	302-303	+10.5 (MeOH)	73
IV	437.91	$C_{25}H_{40}O_3NCl$	200-201	+11.5 (MeOH)	58
V	429.91	$C_{25}H_{32}O_3NCl$	270-271	+21.0 (CHCl ₃)	35
VI	331.41	$C_{20}H_{29}O_3N$	201-202	+ 6.5 (CHCl ₃)	85

I=DHEA; II=DHEA-S; III=DHEA Hemisuccinato de sodio; IV=Clorhidrato de N,N-Dietilaminoacetato de DHEA; V=Clorhidrato del Nicotinato de DHEA; VI=Carbamato de DHEA.

A.- Dehidroepiandrosterona sulfato de sodio.

El producto obtenido fue un polvo blanco hidratado, cuyo punto de fusión, actividad óptica coinciden con los reportados⁽⁶⁴⁾. El procedimiento propuesto (método A) por nuestro laboratorio difiere del indicado por la bibliografía⁽⁶⁴⁾ (método B) en los rubros que a continuación se señalan en la tabla 3.

Tabla 3

PROCEDIMIENTOS DE OBTENCION DE LA DHEA-SULFATO DE SODIO

METODO	REACTIVOS	DISOLVENTE	T °C	TIEMPO(Hr)	REND. (%)
A	ClSO ₃	CH ₂ Cl ₂	-15	2	71
B	Pir-SO ₃	CHCl ₃	25	30	73

Aunque llevamos a cabo ambos métodos, remarcamos que el propuesto por nuestro laboratorio, es de interés práctico por su menor tiempo de operación y rendimientos muy semejantes a los previamente reportados. Además en el método A, se puede obtener el ácido DHEA sulfónico con un rendimiento del 95% aunque no se puede conservar por mucho tiempo a temperatura ambiente debido a que empieza a hidrolizarse. La disminución del rendimiento surge en el momento de neutralizar y recrystalizar el producto, por lo que un proceso de optimización podría lograr un incremento mesurable en dicho parámetro.

Se han reportado otros métodos de obtención de este derivado en dos revisiones^(64,65), sin embargo, implican un mayor tiempo de reacción y rendimientos más bajos que los propuestos, por lo que decidimos no realizarlos prácticamente.

El análisis elemental de este compuesto arrojó los siguientes porcentajes: C 51%, H 6.3%, S 7.6%, Na 5.4% (teórico: C 58.4%, H 6.9%, S 7.8%, Na 5.9%); lo que indica que el compuesto está hidratado con dos moléculas de agua, aún después de secarlo al vacío (aprox. 6 mm Hg) durante 3 hr.

B.- Dehidroepiandrosterona hemisuccinato de sodio.

En la obtención de este producto se implementaron algunas variantes, fundamentalmente en el tipo de catalizador que se utilizaría en la obtención del ácido DHEA hemisuccínico.

Tabla 4

PREPARACION DEL DHEA-HEMISUCCINATO DE SODIO

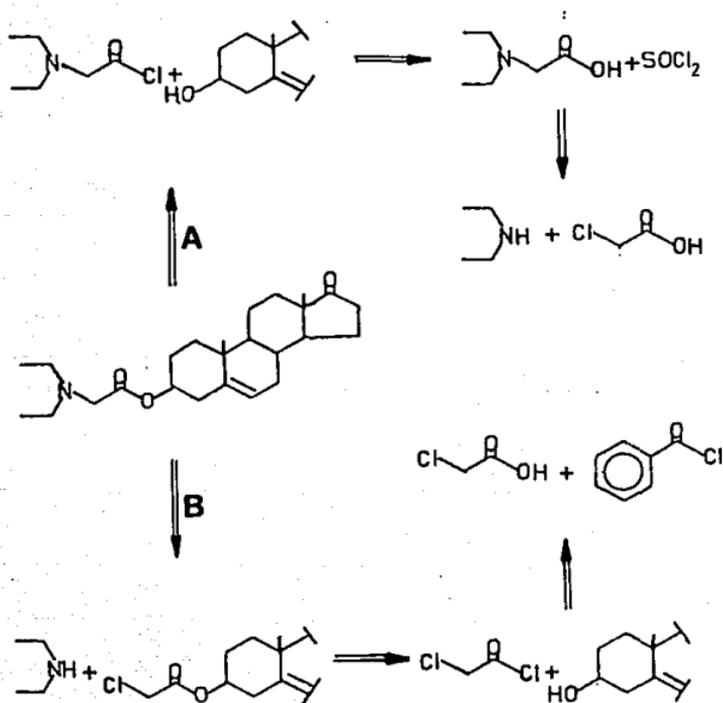
MAT.PRIMA	REACTIVO	CATALIZADOR	TIEMPO(Hr)	REND. (%)
DHEA	Anh.Succínico	Ac.p-Toluensulfónico	30	73
DHEA	Anh.Succínico	Ac.Trifluoroacético	30	62
DHEA	Anh.Succínico	Piridina	48	36

En los procedimientos de obtención cuando se utilizan los ácidos orgánicos como catalizadores, las operaciones manuales realizadas son menores en relación a las efectuadas cuando se utiliza piridina.

El ácido DHEA hemisuccínico que se obtuvo presentó problemas de solubilidad en disolventes polares, que ~~facilitaría~~ su neutralización. Por esta razón se utilizó una mezcla de cloroformo-acetona, para posteriormente agregar el hidróxido de sodio metanólico. La neutralización con carbonato de sodio no fue del todo productiva debido a los problemas de solubilidad antes señalados. Por otro lado, debido a que se ha reportado⁽³⁸⁾ que la sustitución del catión sodio por la hidroxilamina podría conferir una mayor estabilidad a los derivados de hemisuccinato al ~~mermar~~ su tendencia a reaccionar intramolecularmente y además de conservar casi sin variación su solubilidad acuosa, intentamos preparar dicha modificación para el hemisuccinato de DHEA pero los resultados no fueron del todo satisfactorios.

C.- Clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA.

Para la obtención de este compuesto se plantearon dos rutas posibles de síntesis, mismas que se muestran a continuación de manera retrospectiva:



ESQUEMA 7

La ruta propuesta en la parte superior (A) presentó dificultades, principalmente en el paso de aislamiento del ácido N,N -diethylaminoacético, con rendimientos bajos, lo mismo que la parte de obtención del derivado halogenado de acilo. Por esta razón el rendimiento total del proceso fue bastante mermado, aproximadamente de 8%.

Por otro lado, el procedimiento B presentó la mejor alternativa de operación. Los primeros pasos de esta ruta fueron breves y de aceptables rendimientos, destacando en primer lugar la reacción de esterificación, misma que ocurre con un rendimiento del 96%. La reacción más lenta de todas fue la de sustitución nucleofílica sobre el carbono alfa al carbonilo; en este paso fue necesario dejar que la reacción ocurriese por 60 horas al término de las cuales aún se podía percibir una ligera cantidad de materia prima, en la cromatoplaqa, y la cantidad del clorhidrato de dietilamina que se retiraba de la reacción no alcanzaba el valor teórico estequiométrico calculado. Con el propósito de reducir el tiempo de reacción, se agregó una pequeña cantidad de yoduro de potasio suspendido en acetona, pero el efecto esperado no fue del todo significativo ya que sólo se presentó una reducción de 3 a 4 horas.

Después de pasar la corriente de cloruro de hidrógeno, realizamos dos variaciones en la obtención del clorhidrato; en la primera enfriamos a 0°C para la obtención del producto y en la segunda, se procedió a temperatura ambiente. Con estos procedimientos se obtienen dos productos de diferentes puntos de fusión aunque con un mismo Rf en la cromatoplaqa. La espectroscopía de infrarrojo de estos dos sólidos sugiere su existencia en forma polimórfica. (FIGURA 14 y 15)

D.- Clorhidrato del nicotinato de DHEA.

Con el propósito de efectuar la obtención de este producto se probaron tres tipos de reacciones indicadas para la obtención de ésteres, con algunas variantes en cada una de ellas. No obstante los rendimientos obtenidos no fueron del todo satisfactorios como se señalan a continuación.

Tabla 5

OBTENCION DEL CLORHIDRATO DEL NICOTINATO DE DHEA

MATERIAS PRIMAS	REACTIVOS	TIEMPO(Hr)	REND. (%)	T°C
DHEA, Ac. Nicotínico	POCl_3	12	39	80
DHEA, Ac. Nicotínico	SOCl_2	8	10	65
DHEA, Ac. Nicotínico	$\phi_3\text{P}$	48	--	20

DHEA=Dehidroepiandrosterona; POCl_3 =Oxicloruro de fosforo; SOCl_2 =Cloruro de tionilo; $\phi_3\text{P}$ =Trifenilfosfina.

Uno de los problemas que presentó la obtención de este producto fue la escasa solubilidad del ácido nicotínico en los disolventes utilizados. De hecho en la reacción con oxicluro de fosforo, el ácido nicotínico se encontraba en suspensión, por lo

que la reacción se dejó llevar por 10 horas, al término de las cuales se procedió a agregar la DHEA, sin aislar el cloruro de ácido previamente formado. Este último paso de esterificación se llevó a cabo en dos horas más. Nunca se logró una verdadera solubilización de las sustancias. Otro intento se realizó relevando el ácido nicotínico por su sal sódica, pero con resultados infructuosos.

Con el propósito de utilizar el cloruro de tionilo, ya que se ha reportado la obtención del cloruro de nicotinoilo⁽⁶⁶⁾ con este reactivo; utilizamos un mayor tiempo de reacción que el señalado, pero los resultados fueron pocos favorables. Esto quizá pueda deberse a que la calidad del cloruro de tionilo utilizado no era del todo satisfactoria (aun después de una bidestilación).

Por último, con el propósito de obtener el derivado bajo condiciones de operación que no implicaran calentamiento, se recurrió a intentar la esterificación via la trifenilfosfina, en la que no interviene la formación del halogenuro de nicotinoilo; los resultados fueron no favorables ya que la DHEA y el ácido nicotínico siempre estuvieron presentes aun después de tres días en que se dejó correr la reacción.

E.- Carbamato de DHEA.

La obtención de este producto implicó realizar variaciones en el catalizador ácido a utilizar para la esterificación del cianato de sodio con la DHEA. Los mejores resultados se dieron cuando se utilizó el ácido trifluoroacético; otros catalizadores como el ácido tricloroacético o el ácido fosfórico no arrojaron los resultados esperados.

F.- Análisis de Espectros.

Primeramente iniciaremos con la evaluación de los diferentes parámetros espectroscópicos de la dehidroepiandrosterona, ya que servirán de modelo para comparar, asignar e interpretar los correspondientes a cada uno de los derivados.

1) Espectro de infrarrojo.- Los espectros infrarrojos de la DHEA y de cada uno de los derivados obtenidos indican la presencia de grupos funcionales que corresponden a los esperados:

Tabla 6

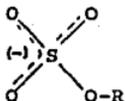
BANDAS DE IDENTIFICACION EN INFRARROJO DE LA DHEA Y DERIVADOS

COMPUESTO	C=O(C-17) cm ⁻¹	C=C cm ⁻¹	C=O(ester) cm ⁻¹	C-O(ester) cm ⁻¹	FIGURA
I	1735	1370	---	---	1
II	1742	1370	---	---	5
III	1739	1370	1744	1170	9
IVa	1739	1375	1743	1190	13
V	1737	1372	1720	1120	19
VI	1736	1374	1722	1137	23

I=DEHIDROEPIANDROSTERONA; II=DHEA-SULFATO DE SODIO; III=DHEA-HEMISUCCINATO DE SODIO; IVa=N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA; V=CLORHIDRATO DEL NICOTINATO DE DHEA; VI=CARBAMATO DE DHEA.

Las cetonas, manifiestan una banda de absorción de alargamiento C=O intensa en 1700 cm⁻¹, sin embargo en las cetonas cíclicas, por el ángulo de enlace entre C=O y C-C adyacente, se presenta un ligero movimiento de las frecuencias por la energía requerida para producir el alargamiento C=O. Para el caso de la ciclopentanona, este desplazamiento provoca una absorción a mayor frecuencia (1730 - 1750 cm⁻¹)⁽⁶⁷⁾, rango dentro del cual se encuentra la cetona del anillo D (FIGURA 1) así como la de sus derivados. Las absorciones del hidroxilo y el doble enlace fueron de 3458 y 1370 cm⁻¹ respectivamente.

En el derivado de sulfato puede apreciarse en el espectro de Infrarrojo (Figura 5), además de las antes señaladas, bandas entre 1300 a 1500 cm^{-1} , se presentó una banda intensa a 1240 cm^{-1} , otra a 1218 cm^{-1} , ambas con resolución pobre, y otra mediana a 979 cm^{-1} , estas tres señales son características de las sales de sulfato de sodio (o de potasio) y se atribuyen a las vibraciones de valencia simétricas y antisimétricas que sufre el azufre con sus tres oxígenos⁽⁶⁸⁾:



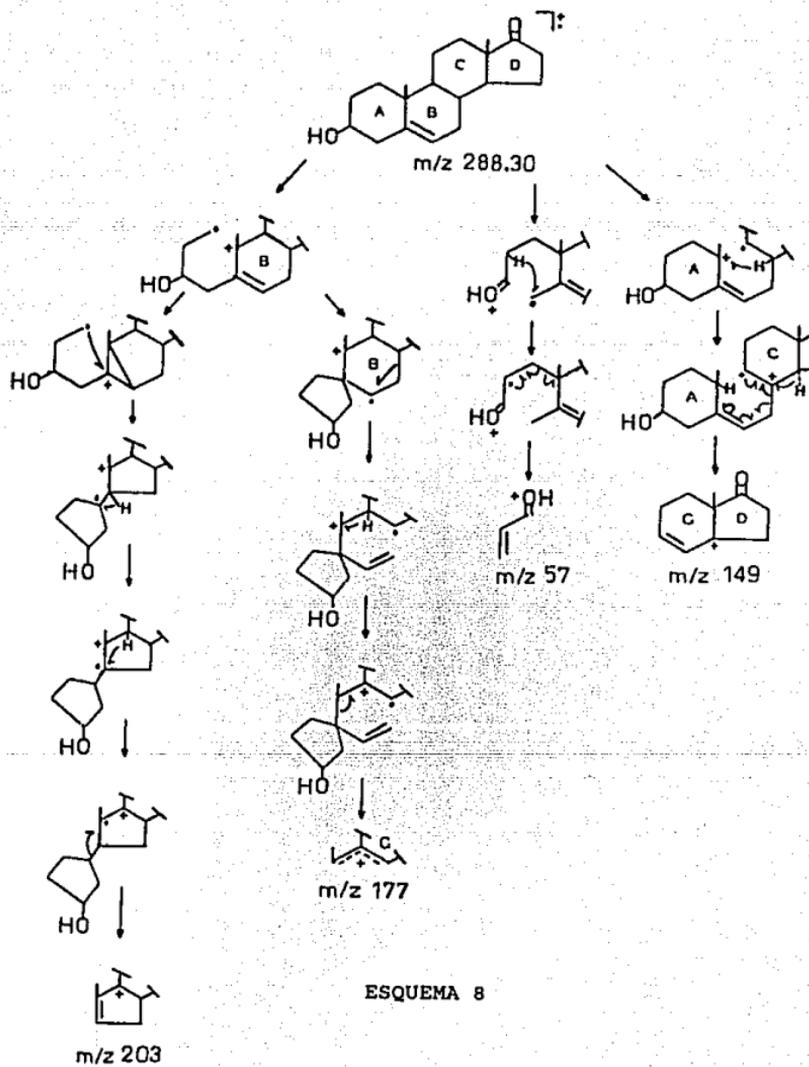
Otra serie de señales abarcan la zona de 1050 a 650 cm^{-1} . Las señales que aquí aparecen se atribuyen a las vibraciones S-O-C. Los sulfatos de hidroxisteroides ecuatoriales presentan tres bandas muy unidas entre 600-620 cm^{-1} como se observó para este compuesto (los sulfatos de 3-hidroxisteroides axiales presentan el mismo tipo de señal a 685 cm^{-1})⁽⁶⁸⁾.

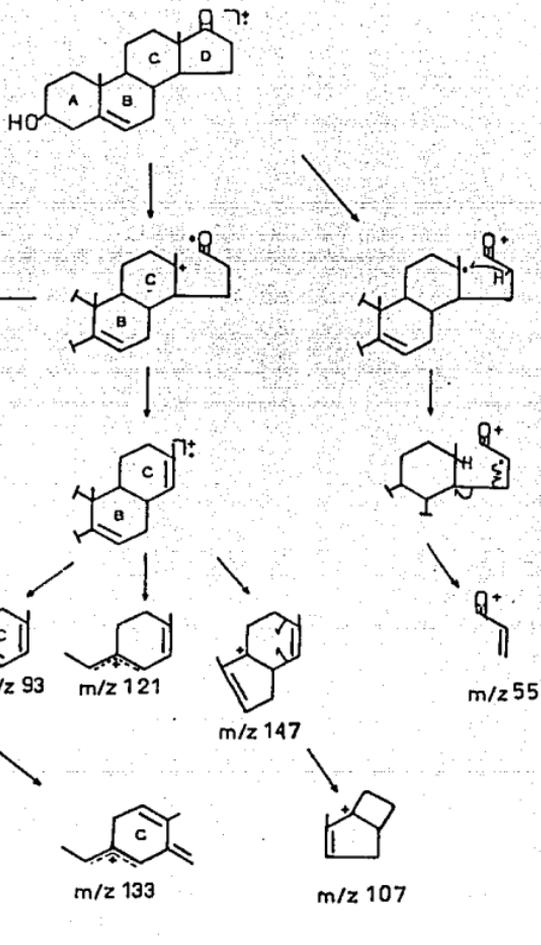
En las FIGURAS 13,14 y 15, se presentan los espectros correspondientes a la N,N-dietilaminaacetato de DHEA y su correspondiente clorhidrato. En la FIGURA 13 se pueden apreciar las señales que indican la presencia de los carbonilos a 1740 cm^{-1} y la ausencia de señales en la región 3000 a 4000 cm^{-1} que confirman la existencia de una amina terciaria. Los espectros 14

y 15 muestran la comparación realizada para dos productos clorhidratos de diferentes procedimientos de obtención, en el primero la muestra se corre en forma sólida y en el segundo en forma de solución (cloroformo); las semejanzas en este último nos sugieren la presencia de un producto polimórfico.

ii) Espectro de Masas.- El espectro de masas de la DHEA es complejo, debido al hecho que se presentan rupturas de diversos enlaces para producir los fragmentos de los anillos (FIGURA 2). Procesos de ruptura simple son asociados con pérdida del grupo metilo angular⁽⁶⁹⁾.

Hay un ion molecular (M^+) de 288.30 que corresponde al peso molecular de la DHEA . El grupo hidroxilo es relativamente inefectivo como estabilizador de carga; la pérdida de agua de los esteroides en general, ocurre con considerable facilidad tanto térmicamente como con impacto electrónico⁽⁶⁸⁾ (70eV). En este espectro se encuentra una pérdida de M^+-18 cuya intensidad en relación al M^+ es menor, lo que concuerda con la posición del hidroxilo ecuatorial⁽⁷⁰⁾. También se encuentra las pérdidas de $M^+-15-18$ (m/z 255) característica de los esteroides⁽⁷⁰⁾; esta fragmentación está incrementada por la presencia de un doble enlace en el C-5⁽⁷¹⁾. En los esquemas 8 y 9 se muestran los patrones de fragmentación para explicar las señales de algunas de las pérdidas que se presentaron en la DHEA y que más adelante servirán para corroborar el comportamiento de los derivados en este aspecto.





ESQUEMA 9

Primeramente, los picos que son originados por los anillos A y B, son m/z 203 ($M^+ - 85$), m/z 177 ($M^+ - 111$), m/z 149 ($M^+ - 139$) y m/z 57 ($M^+ - 231$)⁽⁷²⁾. (Esquema 8); en segundo término, se presentan los picos que son originados desde una fragmentación del anillo D, entre estos se encuentran: m/z 244.3 ($M^+ - 44$) y m/z 232 ($M^+ - 56$) que a su vez son los precursores de m/z 159 ($M^+ - 44 - 85$), m/z 107 ($M^+ - 44 - 111$), m/z 147 ($M^+ - 56 - 85$), m/z 55 ($M^+ - 233$) (Esquema 9).

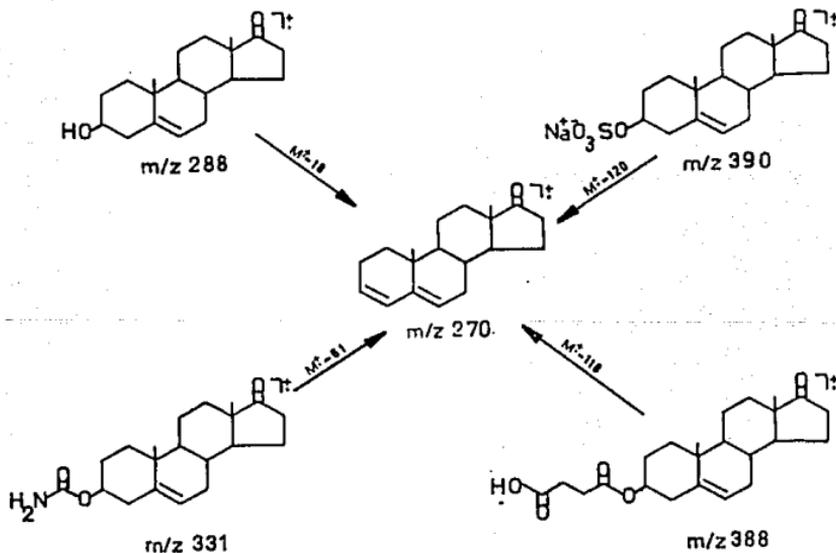
Con el propósito de comparar los fragmentos de la DHEA (FIGURA 2) con los derivados, en la tabla 7 mostramos algunos de los fragmentos más representativos del DHEA-sulfato de sodio (FIGURA 6) y del ácido DHEA-hemisuccínico (FIGURA 10). Ambos derivados presentan un patrón de fragmentación semejante al de DHEA, salvo para los fragmentos m/z 203 en el sulfato y el m/z 177 en el hemisuccínico que no aparecen en estos derivados, esta disminución en la intensidad o ausencia de ambas señales, nos indican la esterificación del hidroxilo⁽⁷¹⁾. Hay que resaltar que tanto en el sulfato como en el Hemisuccínico no aparecen sus iones moleculares, en virtud de que ambos compuestos presentan un m/z de 270 con 100% de intensidad y que corresponde a la pérdida de todo el sulfato + H (H_2SO_4) para un caso y la pérdida del ácido succínico para el otro (FIGURAS 6 y 10) (Esquema 10); por lo que el resto de fragmentos corresponden al del anillo esteroidal, excepto el m/z 101 (58%), que se presenta en el ácido DHEA-hemisuccínico y que corresponde a la parte acíclica de dicho derivado.

Tabla 7

FRAGMENTOS DE LA DHEA Y DOS DE SUS DERIVADOS (70 ev)

DHEA(I) m/z	DHEA-S(II) m/z	AC. DHEA-HEMISUCCINICO m/z
288(40%)	288(7%)	---
270(28%)	270(100%)	270(100%)
255(32%)	255(31%)	255(23%)
203(16%)	203(4%)	---
177(16%)	---	177(1%)
159(27%)	159(8%)	159(11%)
149(10%)	149(9%)	149(8%)
147(10%)	147(13%)	147(9%)
145(30%)	145(24%)	145(14%)
133(20%)	133(8%)	133(11%)
131(26%)	131(17%)	131(16%)
121(21%)	121(57%)	121(76%)
120(20%)	120(16%)	120(14%)
107(50%)	107(34%)	107(29%)
105(68%)	105(58%)	105(37%)
93(45%)	93(41%)	93(30%)
91(82%)	91(83%)	91(47%)
79(73%)	79(62%)	79(35%)
57(66%)	57(19%)	57(6%)
55(69%)	55(44%)	55(57%)
41(100%)	41(57%)	41(14%)

Una observación importante de remarcar es que los demás derivados no presentaron un comportamiento de fragmentación semejante en las mismas condiciones de trabajo (impacto electrónico 70 eV) ya que era superlativo su grado de descomposición. Por esta circunstancia se decidió evaluar las muestras por introducción directa con ionización química (I.Q.) con lo cual se logró obtener el ión molecular ($M^+ + 1$) de cada uno de ellos, como era de esperarse, ya que contienen un átomo de nitrógeno básico. Estos espectros se muestran en las FIG.16,20,24.



ESQUEMA 10

iii) $^1\text{H RMN}$.- Por el gran número de protones unidos al esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno, los esteroides presentan un espectro complejo, donde las señales para metilenos y metinos son difíciles de distinguir manifestandose como amplias absorciones entre 0.5 y 2.2 ppm. Dentro de este ámbito, para la DHEA, las señales para los metilos angulares, el protón del hidroxilo, el protón vinílico y el protón del C-3, geminal al hidroxilo, emergen separada y visiblemente del resto de señales⁽⁷³⁾ (FIGURA 3).

Con el propósito de desplazar paramagnéticamente la señal del protón del hidroxilo, el espectro fue corrido con dimetilsulfóxido con lo cual aparece a 4.5 ppm ya que con cloroformo aparece a 2.2 lo que dificultaba visualizar su desaparición cuando se forman los derivados⁽⁷⁴⁾. (Figura 3)

La señal del protón metínico axial adyacente al grupo hidroxilo está separado del resto del esqueleto. Este protón aparece en forma de un multiplete centrado a 3.25 ppm. Por su posición está acoplado a cuatro protones, dos axiales y dos ecuatoriales, cuyas líneas se traslapan y cuyas constantes de acoplamiento solo pueden ser estimadas por la amplitud de dicha señal, que es mayor a 30 Hz, lo cual indica que el H-3 se encuentra en posición axial⁽⁷⁴⁾.

La posición de los protones en C-18 y C-19, concuerdan con los valores dados en la bibliografía⁽⁷¹⁾, siendo de 0.990 y 0.800 ppm respectivamente. El protón vinílico (H-6) aparece como un doblete centrado a 5.3 ppm, con señales de base ancha, debido al acoplamiento con dos protones en la posición 7, dicha relación es de tipo pseudoecuatorial-axial y pseudoecuatorial-ecuatorial, misma que se refleja en el valor de 5Hz para la constante de acoplamiento pseudoecuatorial-axial. (Figura 3).

En los espectros de resonancia protónica las señales que presentaron los derivados se comparan con la DHEA en la siguiente tabla.

Tabla 8
RELACION DE LOS ESPECTROS DE ¹H RMN DE DHEA Y DERIVADOS

COMPUESTO	H-3 ppm	H-6 ppm	H-19 ppm	H-18 ppm	H-O ppm
I	3.28	5.3	0.99	0.8	4.66
II	3.85	5.3	0.99	0.8	--
IIIa	4.42	5.4	1.10	0.8	--
IVa	4.50	5.4	1.00	0.8	--
Va	4.90	5.4	1.10	0.9	--
VI	4.49	5.4	1.10	0.9	--

I=DEHIDROEPIANDROSTERONA; II=DHEA-SULFATO DE SODIO; IIIa=ACIDO DHEA NEMISUCCINICO; IVa=N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA; VI=CARBAMATO DE DHEA.

Como puede verse a partir de los espectros dados en las FIGURAS 7, 11, 17, 21, 25 mismos que corresponden a los derivados; la ausencia del protón del hidroxilo indica que en todos estos compuestos se ha efectuado la esterificación. La presencia de la señal correspondiente al protón vinílico nos indica que el doble enlace no ha sufrido modificación alguna durante los procedimientos de obtención.

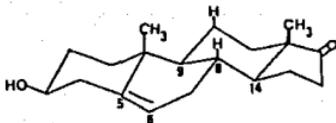
Uno de los aspectos que hay que destacar en los espectros de los derivados corresponde al multiplete ocasionado por el H-3. En primer lugar, dicha señal se encuentra desplazada paramagnéticamente en un rango de 0.6 a 1.65 ppm, lo que confirma la esterificación de la DHEA por cada uno de los progrupos. En segundo lugar, la amplitud del multiplete se conserva en todos los derivados por lo que nos permite decidir que el H-3 sigue conservando su posición axial; una reducción drástica en dicha amplitud nos indicaría que el H-3 estaría en posición ecuatorial, lo que provocaría un cambio en la configuración del compuesto pasando la DHEA a su anómero androsterona, cuando se hidrolizara el derivado correspondiente. Esta reducción en la amplitud de la señal es provocada por el cambio en el valor de las constantes de acoplamiento de H-3 con los protones metilénicos de los carbonos 2 y 4.

iv) En contraste con ^1H RMN, en el ^{13}C RMN las señales de cada carbon aparecen separadas y sus asignaciones son posibles sin dificultades particulares. Ya se ha reportado el espectro de la DHEA^(75,76) con cuyos valores hemos asignado comparativamente los obtenidos por nuestro compuesto (FIGURA 4) además de tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

-Los desplazamientos a campos altos son asignados a los metilos mientras que aquellos a campos bajos son asignados al carbono ceto, seguidos de los carbonos olefinicos.

-La señal de C-3 aparece a campos bajos debido al sustituyente hidroxilo ($\delta=69.3\text{ppm}$).

-Los carbonos terciarios C-9 y C-14 están más desprotegidos que los metilenos o los carbonos cuaternarios, de allí que aparezcan con $\delta=49.80$ y $\delta=50.93$; no obstante el carbono terciario C-8 no presenta esta desprotección debido a la interaccion 1-3 diaxial entre los dos grupos metilos y el hidrógeno correspondiente como se muestra a continuacion:



-Las señales de los carbonos cuaternarios C-10($\delta=36.24$), C-13($\delta=46.28$) y el secundario C-11($\delta=20$) aparecen a campos altos por razones similares.

Este tipo de interacciones provocan el llamado efecto gamma-gauche que surge en parte, por la interacción de electrones de grupos adyacentes, y en una menor distorsión en la geometría molecular, longitud y ángulos de enlaces. Cualitativamente este efecto puede ser interpretado como la polarización del enlace C-H lo que produce un incremento en la densidad electrónica alrededor del átomo de carbono (la expansión del orbital incrementa la protección del carbono)⁽⁷⁴⁾.

-El C-17, quien soporta la función carbonilo, presenta un desplazamiento de $\delta=219$ ppm, desplazado ligeramente hacia campo bajo por la influencia del metilo angular C-18⁽⁷⁷⁾.

-Por la presencia del doble enlace en el C-5, el metilo angular de C-19, presenta la señal de $\delta=19.5$ ppm. ubicada a campos más bajos que el correspondiente a C-18($\delta=13.16$); este desplazamiento paramagnético es debido a que la interacción syn-axial con H-6 no está presente y las restantes interacciones H-2, H-4, H-8, H-11, son también débiles debido a la mayor flexibilidad conformacional del anillo B⁽⁷⁷⁾.

Por lo que respecta a los espectros de cada uno de los derivados (FIGURAS 8, 12, 18, 22, 26) sus señales corresponden a las esperadas y conservan el mismo patrón de comportamiento que el presentado por la DHEA. Este acontecimiento nos facilitó el proceso de asignación en dichos espectros. Debemos indicar que estos espectros no corresponden a los compuestos en forma de sales, con excepción del DHEA-sulfato de sodio, con el propósito de lograr una mejor disolución en los solventes orgánicos utilizados para dicha evaluación. Las asignaciones aparecen en la Tabla 9 de manera comparativa con la DHEA, además de registrar las señales correspondientes a los carbonos que conforman la porción de los progrupos.

Como se esperaba los carbonos 1 (C-1) de cada uno de los derivados no presentaron desplazamientos diamagnéticos marcados con relación al C-1 de la DHEA, que nos indicarían cambios en la configuración del C-3. Los desplazamientos diamagnéticos de los C-2 y C-4, así como el desplazamiento paramagnético de C-3 confirman la esterificación del hidroxilo de la DHEA. Las señales de los carbonilos de la porción de los progrupos logra diferenciarse de la señal del carbonilo de la cetona por un rango de 50 a 64 ppm. El resto de las señales guarda correspondencia con sus similares en la DHEA.

Tabla 9

¹⁴ C	I	II	IIIa	IVa	Va	VI
1	36.93	36.67	36.33	36.34	36.81	36.78
2	31.41	28.62	27.22	27.35	27.66	27.83
3	69.93	75.25	73.12	72.87	74.83	74.17
4	42.21	38.72	37.54	37.63	37.99	38.24
5	141.35	140.55	139.48	139.40	139.47	139.76
6	119.90	120.63	121.55	121.60	122.10	121.63
7	31.22	31.02	31.04	31.04	31.36	31.32
8	31.02	30.81	30.80	30.80	31.30	31.26
9	49.80	49.55	49.47	49.47	50.02	49.97
10	36.24	36.09	36.16	36.15	36.67	36.54
11	20.00	19.80	19.82	19.82	20.52	20.20
12	30.27	30.11	30.13	30.13	30.62	30.62
13	46.28	46.69	46.71	46.70	47.40	47.39
14	50.93	50.69	50.72	50.72	51.57	51.53
15	21.46	21.32	21.34	21.34	21.78	21.75
16	35.27	35.19	35.18	35.18	35.73	35.76
17	219.35	219.56	219.38	219.31	220.73	220.97
18	13.16	13.06	13.07	13.07	13.47	13.43
19	19.15	18.94	18.89	18.89	19.30	19.23
1'			171.31	170.12	164.42	156.60
2'			28.59	53.55	150.66	
3'			28.84	46.83	153.05	
4'			173.19	12.35	136.90	
5'					123.47	
6'					126.39	

v) Pruebas de Solubilidad.

Los resultados de las evaluaciones para la solubilidad de cada uno de los derivados en el rango de pH 2 a 10 se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10

SOLUBILIDAD ACUOSA DE LA DHEA Y DERIVADOS A DIFERENTES pH

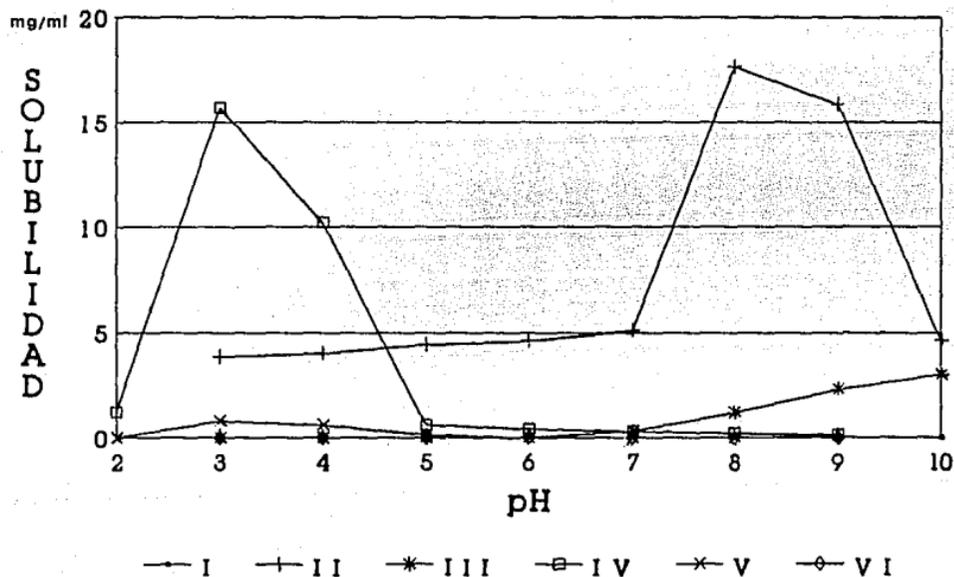
pH	SOLUBILIDAD (mg/ml)					
	I	II	III	IV	V	VI
2	--	--	--	1.25	0.01	--
3	--	3.86	0.01	15.70	0.8	0.01
4	--	4.01	0.019	10.22	0.6	0.022
5	--	4.40	0.020	0.60	0.15	0.025
6	0.001	4.59	0.028	0.43	0.03	0.026
7	0.009	5.10	0.30	0.31	0.02	0.027
8	0.007	17.64	1.2	0.22	--	0.029
9	0.005	15.84	2.3	0.12	--	0.032
10	--	4.62	3.5	--	--	--

I=DEHIDROEPIANDROSTERONA; II=DHEA-SULFATOSODIO; III=DHEA-HEMISUCCINATO DE SODIO; IV=CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA; V=CLORHIDRATO DEL NICOTINATO DE DHEA; VI=CARBAMATO DE DHEA.

En la siguiente página se presentan estos mismos resultados en forma gráfica para apreciar globalmente mejor el comportamiento de solubilidad de estos compuestos.

De los anteriores resultados sólo tres de los derivados resultan atractivos para estudios posteriores, ellos son el DHEA-sulfato de sodio (II), DHEA-hemisuccinato de sodio (III) y el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA (IV), los valores que ellos arrojan rebasan, excepto para el hemisuccinato, el parámetro del 1% de solubilidad para evitar problemas de biodisponibilidad. Tradicionalmente el hemisuccinato ha sido utilizado para incrementar la solubilidad de otros esteroides⁽⁵¹⁾, en nuestro caso, este derivado no resultó del todo atractivo aún incluso a pH básico, donde se esperaba una mayor solubilidad a la obtenida; el DHEA-sulfato es un derivado que ha sido sintetizado previamente con fines de investigación bioquímica de la DHEA⁽⁶⁴⁾, pero no se ha indicado su utilidad como recurso de interés para la preformulación de dicho esteroide; como se esperaba este derivado presentó su mayor solubilidad acuosa a pH básico (8 y 9) El resto de los derivados resultan novedosos para la administración de la dehidroepiandrosterona en particular. De estos últimos, el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA fue el que presentó mayor solubilidad acuosa sobre todo a pH de 3 y de 4.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD



Como se ha indicado anteriormente, de este último compuesto, se obtuvieron dos cristales, que por sus espectros de infrarrojo se sugiere que sean polimórficos, los resultados que en cuanto a solubilidad se refieren no fueron sustancialmente diferentes (los resultados que aquí se presentan corresponden al de mayor punto de fusión; el otro cristal presentó una solubilidad mayor en 0.5 a 0.7 mg). Se puede notar que tanto para el DHEA-sulfato de sodio como para el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de sodio, se presenta una disminución en su solubilidad, a pH más básico para el primero y a pH más ácido para el segundo, contrariamente a lo que teóricamente se esperaba; esto se explica por el hecho de que tanto a pH básico como el ácido hay un mayor efecto de ión común.

Con el propósito de utilizar a estos derivados en administraciones orales o intramusculares donde el pH que se requiera sea neutro para aminorar las molestias que causan las administraciones ácidas o extremadamente básicas; evaluamos la solubilidad de los compuestos indicados anteriormente, en un sistema binario de propilenglicol-agua y cuyos resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11
SOLUBILIDAD EN PROPILENGLICOL-AGUA DE LA DHEA Y DERIVADOS

POPILEN- GLICOL-AGUA (%)	SOLUBILIDAD (mg/ml)					
	I	II	III	IV	V	VI
100(PG)		--	--	--	--	--
90	2.1	--	--	--	--	--
80	1.9	--	--	--	--	--
70	--	--	--	--	--	--
60	--	2.9	0.36	28	--	--
50	--	4.3	0.30	26	0.03	0.042
40	--	5.6	1.2	25	0.03	0.04
30	0.009	10.3	1.3	19	0.03	0.03
20	0.007	15.0	1.0	11	0.02	0.03
10	0.009	13.3	1.0	6	0.01	0.02
0(PG)	0.009	5.10	0.3	0.43	0.01	0.02

Nuevamente los derivados que mejores resultados arrojaron fueron el DHEA-sulfato de sodio, el DHEA-hemisuccinato de sodio y el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA, la tendencia de este último a incrementar su solubilidad al aumentar la cantidad

de propilenglicol, aun mayor que la del sulfato, podria sugerir que este compuesto pudiese transportarse a traves de las membranas biológicas aún en forma de clorhidrato.

Con la intención de conocer cualitativamente la estabilidad de los tres derivados que resultaron atractivos por su mayor solubilidad acuosa se realizó una primera aproximación a su estabilidad en solución acuosa al pH óptimo de solubilidad, a la temperatura de 80°C, evaluando la cantidad del derivado que aún quedaba en solución, en forma de porcentaje, tomando como 100% la cantidad de sustancia que estaba en solución al inicio del experimento y a un tiempo determinado.

Tabla 12

ESTABILIDAD DE TRES DERIVADOS DE DHEA A 80 °C

DERIVADO	2 Hr	5 Hr
DHEA-Sulfato de Sodio (II)	40%	12%
DHEA-Hemisuccinato de Sodio (III)	12%	5%
Clorhidrato de N,N-Dietil-aminoacetato de DHEA (IV)	28%	7%

Podemos apreciar que la estabilidad en general de estos compuestos no es del todo satisfactoria, lo que implicaría dificultades para formularlos en solución acuosa con fines de comercialización. La otra alternativa de soslayar esta dificultad sería la de administrarlos en forma liofilizada aunque esto repercuta en un mayor costo en la producción.

De los resultados presentados en la tabla anterior, el menos sensible resultó el DHEA-sulfato de sodio; cabe indicar que el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA fue disuelto a pH de 3 y no de 8 y 9 como se hizo con los otros dos derivados, esto nos lleva a decir que aún a pH ácido, y a temperatura de 37°C, se hidroliza debido a que el amino protonado actúa como electroatrayente, lo que provoca que el carbono carbonílico sea más sensible al ataque nucleofílico.

vi) Hidrólisis Enzimática.

Otro de los parámetros a evaluar con el propósito de cumplir con los objetivos planteados por este trabajo, consiste en conocer cualitativamente e "in vitro" la posibilidad que presentan estos derivados de liberar a la DHEA en el torrente sanguíneo. La prueba se realizó con suero sanguíneo a una temperatura de 37° y a un pH=8, evaluando la cantidad del derivado que aun quedaba en solución; los resultados se muestran a continuación:

Tabla 13

HIDROLISIS ENZIMATICA DE TRES DERIVADOS DE DHEA

DERIVADO	TIEMPO (min.)				
	0	5	10	20	30
DHEA-Sulfato de sodio	100%	100%	99%	98%	98%
DHEA-Hemisuccinato de Sodio	100%	46%	21%	8%	6%
Clorhidrato de N,N-Dietil- aminoacetato de DHEA	100%	82%	66%	29%	17%

Con esta prueba comprobamos la sensibilidad de los tres derivados a hidrolizarse enzimáticamente. El derivado hemisuccinato sufrió la ruptura hidrolítica con mayor facilidad que los otros dos. El derivado DHEA-sulfato prácticamente no fue sensible a la acción de las esterasas del suero sanguíneo; es por esta razón que el organismo utiliza al derivado sulfato como medio de eliminación de dicho esteroide. Para estar seguros que la hidrólisis sufrida en suero fue por acción a la enzimas, se realizó otra prueba colateral con buffer de pH=8 únicamente y a la misma temperatura, los resultados mostraron (Tabla 14) que la hidrólisis no enzimática necesita mayor tiempo para realizarse. Para la evaluación se realizaron determinaciones espectrofotométricas y por cromatografía en placa fina, esta última con el fin de ir detectando la DHEA que se iba liberando.

Tabla 14

HIDROLISIS NO ENZIMATICA DE TRES DERIVADOS DE DHEA

DERIVADO	TIEMPO			
	0 min.	60min.	120min.	180min.
II	100%	92%	83%	77%
III	100%	83%	59%	48%
IV	100%	96%	66%	51%

II=DHEA-SULFATODESODIO; III=DHEA-HEXISUCCINATODE SODIO; IV=CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA

CONCLUSIONES

-De los resultados presentados podemos decir que la obtención de cinco derivados hidrosolubles de la DHEA, se ha llevado a cabo con procedimientos relativamente sencillos y con materiales accesibles a nuestro laboratorio. Los rendimientos de cada una de las reacciones pueden incrementarse mediante procesos de optimización.

-Los derivados obtenidos presentaron mayor solubilidad acuosa que la dehidroepiandrosterona, aunque los más atractivos, por rebasar el parámetro de solubilidad del 1% fueron el DHEA-sulfato de sodio y el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA; en un segundo plano el DHEA-hemisuccinato de sodio cuya solubilidad fué menor que la de los dos derivados antes mencionados. Uno de los inconvenientes que presentan los derivados obtenidos fue su escasa estabilidad en solución, apreciada a tiempos fijos. Esto nos lleva a recomendar, en un futuro, la síntesis de derivados que conserven la propiedad de hidrosolubilidad pero que puedan mantener una buena estabilidad en solución, ya que facilitaría su proceso de formulación. En este punto habría que abordar el interés por sintetizar derivados análogos al clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA, ya que este último fue más sensible a la hidrólisis enzimática, que el correspondiente sulfato.

-De la prueba de hidrólisis enzimática al parecer los derivados logran liberar a la dehidroepiandrosterona por la acción de las esterazas del suero sanguíneo; sin embargo hay que remarcar que estos resultados se llevaron a cabo "in vitro" por lo que, en una segunda etapa de la investigación se probaran estos compuestos en

organismos vivos, en donde el mayor contenido de esteroides se encuentra en el hígado.

-Es necesario continuar la investigación sobre los derivados hidrosolubles de DHEA, ahora en una etapa de desarrollo analítico, para cuantificar por métodos más precisos los valores que en este trabajo hemos presentado; así como desarrollar investigaciones biofarmacéuticas para estudiar el comportamiento de dichas sustancias dentro del organismo.

-Por último, la continuidad en el desarrollo de métodos de obtención de derivados hidrosolubles, es importante para nuestro laboratorio debido a la posibilidad de aplicarlos a otras sustancias activas que así lo requieran. La implementación de toda esta área de trabajo resulta prioritaria ya que actualmente no se cultiva en nuestro país.

PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se tomaron por capilar en un Buchi 530; la actividad óptica en un polarímetro Perkin Elmer 241; el análisis elemental se realizó en un Perkin Elmer 240-B; los espectros de infrarrojo(IR)se obtuvieron de un Perkin Elmer 599-B. Los espectros de masas por impacto electrónico (70eV) e ionización química (isobutano) fueron producidos por un espectrometro/cromatografo de gases Hewlett Packard 5988A; los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN se corrieron en un Varian VXR-300S utilizando como disolventes al dimetilsulfóxido-d para la DHEA, DHEA-sulfato de sodio, ácido DHEA-hemisuccínico y el N,N-dietilaminoacetato de DHEA, el cloroformo-d para el nicotinato de DHEA y el carbamato de DHEA, con tetrametil silano (TMS) como estandar interno. Las evaluaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un Beckman DU 50.

La autenticidad de la dehidroepiandrosterona (DHEA) que se utilizò en este estudio se confirmò por su punto de fusión, actividad óptica, espectro de infrarrojo, espectros de resonancia magnética de protones y de carbono-13.

A.- Obtención del DHEA-sulfato de sodio.-

En un matr az de tres bocas, se colocó 5.77g(0.02mol) de DHEA y se le agregaron 30 ml de cloruro de metileno(Baker Co). Esta disolución se enfrió a -15°C con baño de hielo seco-isopropanol. A esta temperatura, se le añadió 1.3 ml de ácido clorosulfónico destilado($d=1.68\text{g/ml}$), previamente disuelto en 4 veces su volumen de cloruro de metileno; la adición se realizó gota a gota durante 30 min. Se dejó en agitación por dos horas a temperatura ambiente, apareció un precipitado morado que se separa por filtración y se lavó con cloruro de metileno frio. El sólido obtenido correspondió al  cido DHEA-sulfónico, con un rendimiento del 95%(p.f. 117°C , $[\alpha]=+65$ en acetona). Dicho compuesto se disolvió en acetona anhidra (Merck) a 0°C y posteriormente se neutralizó con un equivalente de hidróxido de sodio en metanol(Backer). En seguida se eliminaron los disolventes por rotavapor, a presión reducida, sin calentamiento. El sólido crema obtenido se recrystalizó en metanol-cloruro de metileno(2:1) para darnos un polvo blanco con un rendimiento global del 71%(p.f. $150-151^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]=+11.5$ en metanol). Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{SNa}$ C(58%), H(6.9%); Obtenido C(51.57%), H(6.3%).

B.- Obtención de DHEA-hemisuccinato de sodio.-

En un matraz de 1000 ml se colocaron 118g(1mol)de ácido succinico al cual se le agregaron 189 ml(2mol) de anhídrido acético. El matraz se colocó en un baño de aceite, primero sin agitación y con calentamiento suave hasta disolución; posteriormente se llevó a reflujo con agitación por 2 horas. Se dejó enfriar por 12 horas, dando 79g de anhídrido succínico, con rendimiento de 78.3%.

A 1.44g de DHEA(0.005mol) se le agregaron 10 ml de benceno anhidro(Baker), 0.5g de anhídrido succínico(0.14mol) y 0.19g de ácido p-toluensulfónico(0.0007mol) (no especificado). La mezcla se colocó en baño de aceite a reflujo por 6 hr y luego sin él con agitación por 24 hr, se presentó un precipitado blanco; a dicha mezcla se le agregó eter dietílico anhidro (Baker) y posteriormente se filtró. La cantidad de producto obtenido, ácido DHEA-Hemisuccinico fue de 1.6g, rendimiento del 85%(p.f.259-260°C, $[\alpha]_D^{25} = +10.5$ en metanol). Este compuesto se disolvió en acetona-cloroformo(1-2) calentando a 60°C, para adicionarle un equivalente de hidróxido de sodio en metanol; en seguida se eliminaron los disolventes por rotavapor, a presión reducida, sin calentamiento. El sólido obtenido de color blanco, se dejó secar por 24 hr, se recrystalizó de metanol-cloruro de metileno(3:1). El producto fue

el DHEA-Hemisuccinato de sodio con un rendimiento global del 73% (p.f. 302-303°C, $[\alpha]_D^{25} = +10.5$ en metanol). Análisis Elemental calculado para $C_{23}H_{31}O_5Na$ C(70.3%), H(7.9%); obtenido C(70.52%), H(8.3%).

C.- Obtención del Clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA.-

En un matraz de 100ml se colocaron 12.5g(0.13mol)de ácido cloroacético (Merck) y 30.9ml(0.25mol) de cloruro de benzoilo (Merck)(Relación 1:2). El matraz de reacción se colocó en baño de aceite y se calentó a 60°C con lo cual empezó a destilar el cloruro de cloroacetilo; el procedimiento duró 2 horas al término del cual se colectaron 10 ml(0.12mol)del producto, el rendimiento fue de 86%.El derivado halogenado colectado se guardó conjuntamente con sulfato de sodio anhidro.

A 1.5g(0.005mol)de DHEA se le agregaron 15 ml de acetona anhidra y 0.6 ml(0.0073mol)de piridina anhidra. A esta mezcla se le adicionó gota a gota durante 20 min, 1.3 ml(0.016mol) de cloruro de cloroacetilo en 2 ml de acetona anhidra, a una temperatura de 0°C. Después de agitar por 30min, a temperatura ambiente, apareció un precipitado blanco, en seguida se agregaron

100ml de agua fria para lograr filtrar y obtener el producto. El sólido se secó a 80°C por dos días; la cantidad de producto recolectado, cloroacetato de DHEA fue de 1.87g, que corresponde a un rendimiento de 96% (p.f. 161-162°C, $[\alpha] = +9$ en eter dietílico).

A una mezcla formada por 0.75g (0.002mol) de cloroacetato de DHEA, 5 ml de tolueno anhidro y 5 ml de acetona anhidra se le agregó 0.9 ml (0.008mol) de dietilamina destilada, y se dejó en agitación por 60 hr a 37°C. Concluido el tiempo se hicieron tres extracciones con agua fria. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se le pasó una corriente de cloruro de hidrógeno, por 15 min, al término del cual se obtuvo un precipitado blanco que correspondió al clorhidrato de N,N- dietilaminoacetato de DHEA con un peso de 0.90g, y un rendimiento del 58% (p.f. 200-201°C $[\alpha] = +11.5$ en metanol). Análisis elemental calculado para $C_{25}H_{40}O_3NCl$, C(68.5%), H(9.1%), N(3.1%); obtenido C(66.9%), H(8.59%), N(2.51%).

D.- Obtención del Clorhidrato del Nicotinato de DHEA.

En un matríz de 100 ml se colocaron 0.43g (0.0035mol) de ácido nicotínico con 20 ml de tolueno anhidro. A esta mezcla se le agregaron 0.2 ml (0.0022mol) de oxicleoruro de fósforo disueltos en

1 ml de tolueno anhidro. Se dejó en agitación con calentamiento a 80°C por 10 hr al término del cual se presentó un precipitado blanco a quien se le agregó 0.5 ml de piridina anhidra y posteriormente 1g (0.003mol) de DHEA y se dejó en reposo por 6 horas en refrigeración. Posteriormente se extrajo con agua fría, ligeramente acidulada. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y luego se le pasó una corriente de cloruro de hidrógeno, durante 45 min, para obtener un precipitado blanco, el clorhidrato del nicotinato de DHEA, con un rendimiento del 39% (p.f. 270-271 °C, $[\alpha]_D^{25} = +21$ en cloroformo). Análisis elemental calculado para $C_{25}H_{32}O_3N$, C(76%), H(8%), N(3.5%); obtenido C(73.37%), H(7.92%), N(3.16%).

E.- Obtención del Carbamato de DHEA.

En un matraz de 100 ml se colocaron 0.6g de cianato de sodio (0.010 mol) junto con 1g (0.0035 mol) de DHEA (relación 3:1) y 20 ml de cloruro de metileno (Baker). La mezcla se calentó a 50°C y se le agregó, gota a gota, 1 ml de ácido trifluoroacético en 2 ml de cloruro de metileno. El sistema se llevó a reflujo por 6 hr y luego se dejó en agitación a temperatura ambiente por 18 hr. Posteriormente se extrajo con una solución acuosa de carbonato de sodio al 0.5%. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y luego se eliminó el disolvente por rotavapor, a presión

reducida, para obtener un polvo crema, el cual se disolvió en acetona caliente y luego se le agregó el mismo volumen de hexano. El producto obtenido fue de color blanco, que corresponde al carbamato de DHEA con un rendimiento del 85% (p.f. 201-202°C, $[\alpha] = +6.5$ en cloroformo). Análisis elemental calculado para $C_{20}H_{29}O_3N$, C(72.4%), H(8.7%), N(4.2%); obtenido C(72.29%), H(9.08%), N(3.72%).

F.- Pruebas de solubilidad.

Las determinaciones se realizaron sobre soluciones saturadas de cada uno de los derivados, inclusive la DHEA, a diferentes pH a la temperatura de 25 °C y con agitación durante 15 min. Las evaluaciones espectrofotométricas siguieron los procedimientos descritos para la DHEA⁽⁵⁷⁾, el DHEA-sulfato de sodio⁽⁵⁸⁾, en particular y para el DHEA-Hemisuccinato de sodio, para esteres en general⁽⁵⁹⁾, el clorhidrato de N,N-dietilaminoacetato de DHEA para clorhidratos en general⁽⁵⁹⁾, el clorhidrato del Nicotinato de DHEA por su absorción en el U.V.(280nm), y la evaluación del carbamato de DHEA se realizó de manera semejante a la DHEA.

Los pH utilizados fueron los siguientes:

pH	Buffer	Concentración
2	HCl - KCl	0.2
3	Citratos	0.2
4	Acetatos	0.2
5	Acetatos	0.2
6	Fosfatos	0.2
7	Fosfatos	0.2
8	Tris[tris(hidroximetileno)aminometano]	0.2
9	Tris	0.2
10	Carbonato-Bicarbonato	0.2

La preparación de los Buffer siguió los procedimientos descritos⁽⁵⁶⁾. La prueba de solubilidad con propilenglicol, se realizó de manera semejante, solo que en lugar de diferentes buffer se utilizaron mezclas de esta sustancia con buffer a pH=7.

G.- Prueba de Hidrólisis Enzimática.

Los recipientes de vidrio que se utilizan se sumergen durante toda la noche en una solución de sulfito de sodio ligeramente

acidulada con HCl, posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se secaron en la estufa a 120°C. Este procedimiento se realizó con el propósito de eliminar los metales pesados que pudiesen intervenir en la actividad enzimática⁽⁶⁰⁾.

La muestra de sangre se tomó por punción intravenosa, sin usar anticoagulante; se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min a fin de obtener el suero. Se realizó la prueba para esterasas de la siguiente manera: 10mg de acetato de p-nitrofenol (Sigma Co) se disolvieron en 0.5 ml de metanol, a la solución se le añadieron 0.5 ml de suero, completando el volumen a 3 ml con buffer de pH=8 (Tris); se calentó a 37°C por 5 min. y se leyó a 400 nm.

Para realizar la prueba de hidrólisis, se tomaron 0.5 ml de suero y se colocaron en tubos de ensayo, luego se agregaron 2 ml de cada uno de los derivados disueltos en buffer de pH=8 y 0.1 ml de metanol, la prueba se realizó por triplicado, se calentaron los tubos en baño maria a 37°C, dejando un blanco de cada uno de los derivados sin el suero. Se tomaron muestras de 0.5 ml a tiempos fijos de 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min, a los cuales se les agregó 1 ml de etanol absoluto para precipitar las proteínas y se evaluaron tanto por cromatoplaaca como espectrofotométricamente, tomando como referencia a los derivados disueltos en buffer únicamente y una muestra de suero sin ningún compuesto adicionado.

ESPECTROS

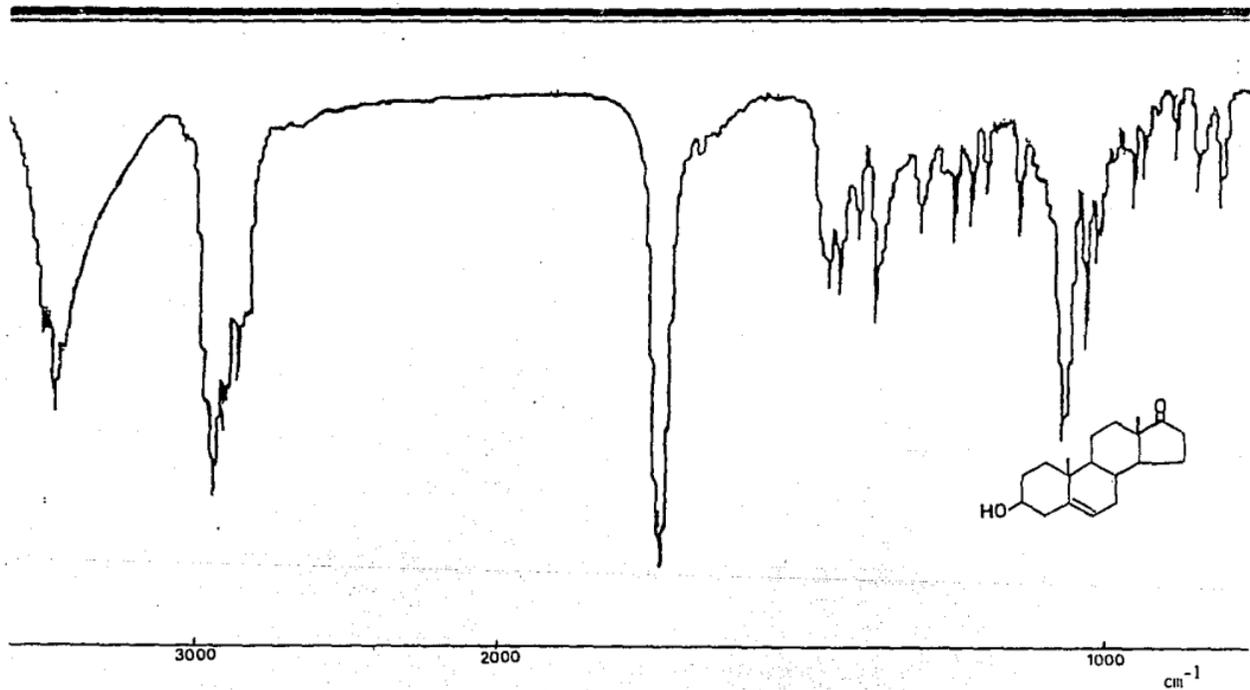


FIGURA 1

IR DEHIDROEPIANDROSTERONA

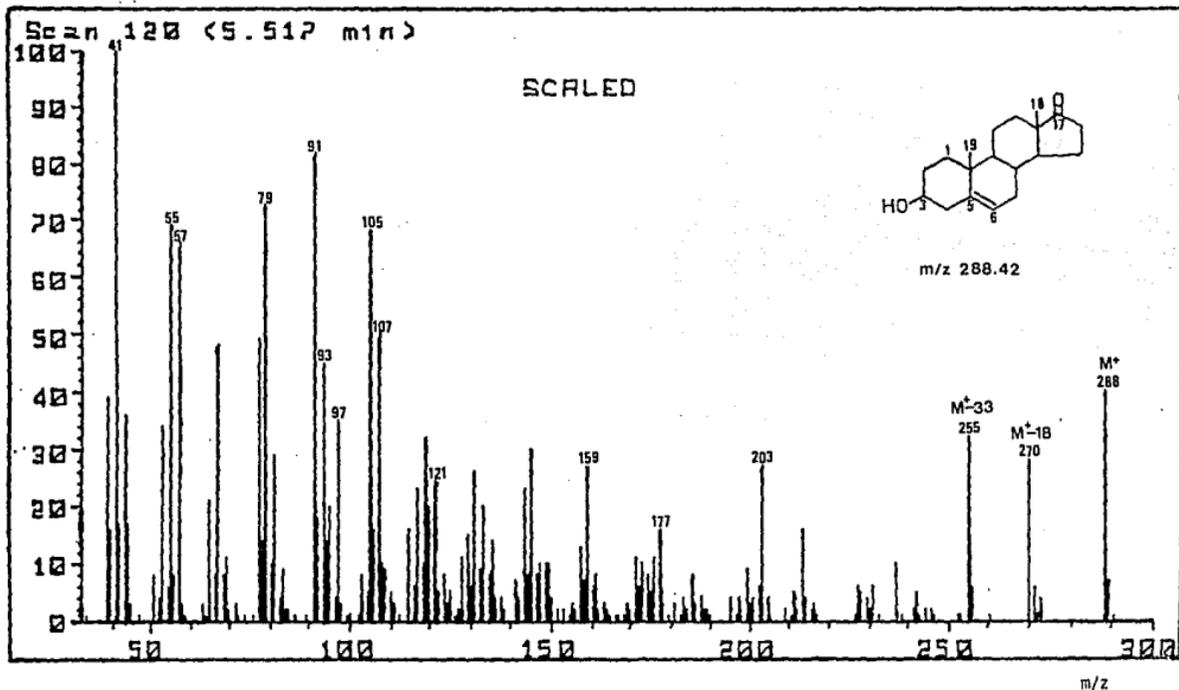


FIGURA 2

E.M. DE DEHIDROEPIANDROSTERONA
(Impacto Electrónico)

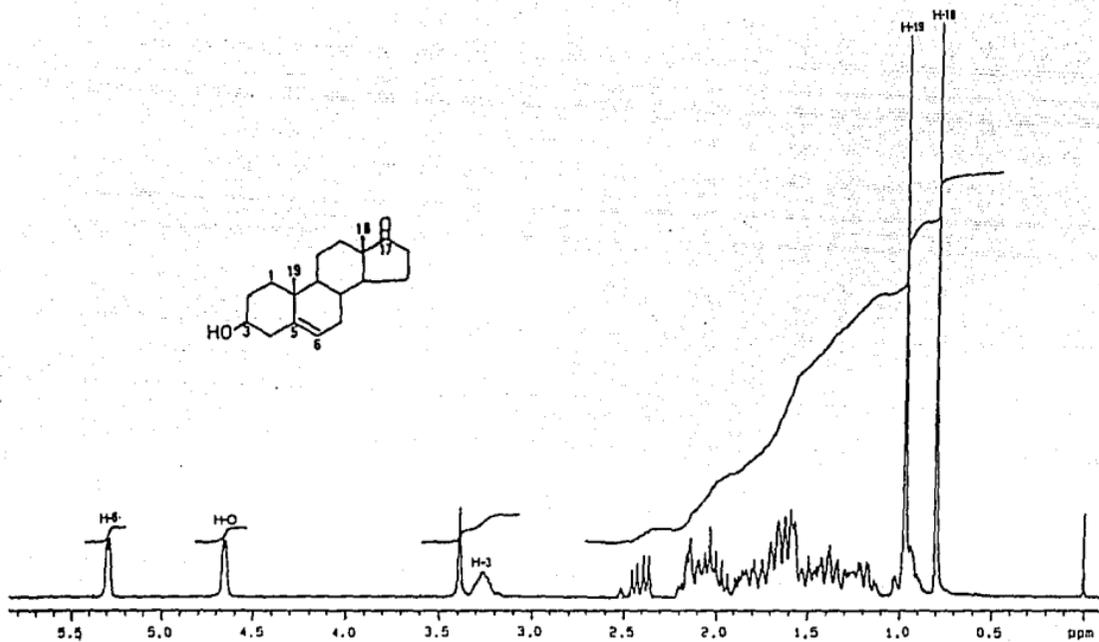


FIGURA 3

^1H RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA

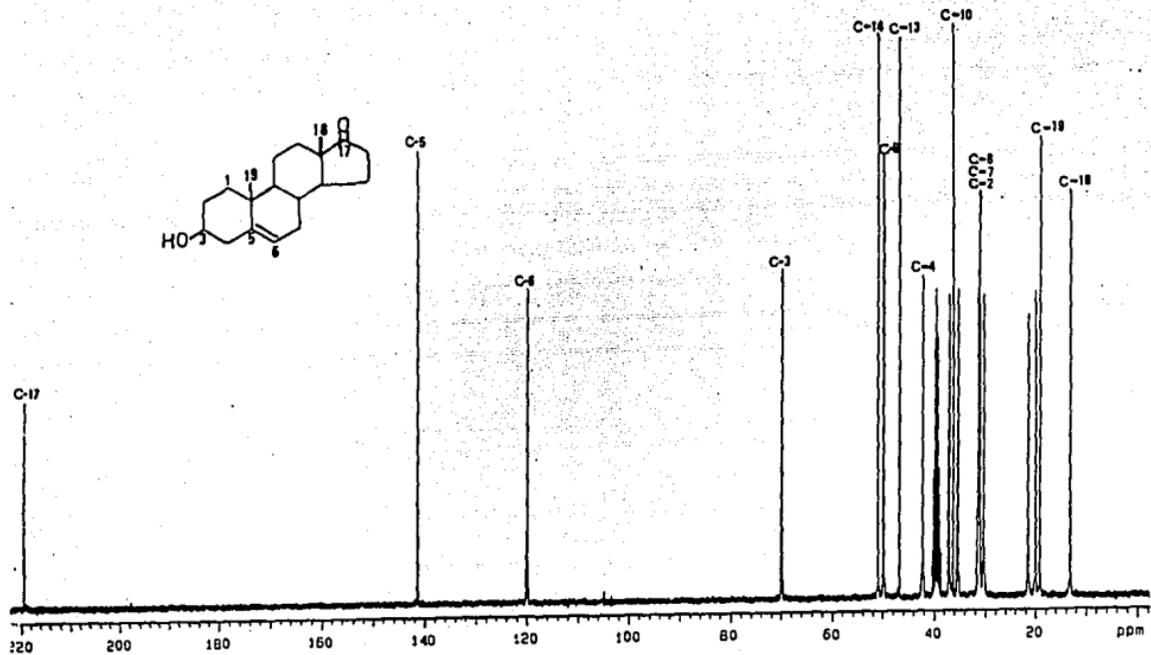


FIGURA 4

^{13}C RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA

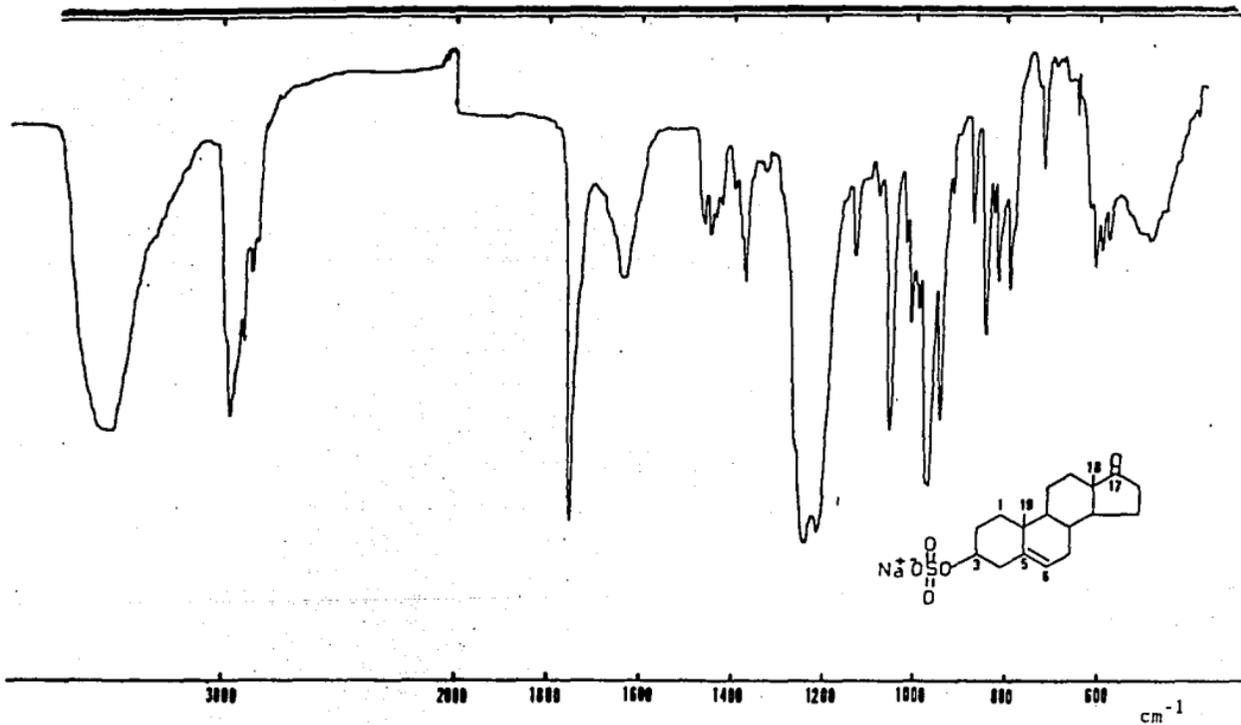


FIGURA 5

IR. DEHIDROEPIANDROSTERONA SULFATO DE SODIO

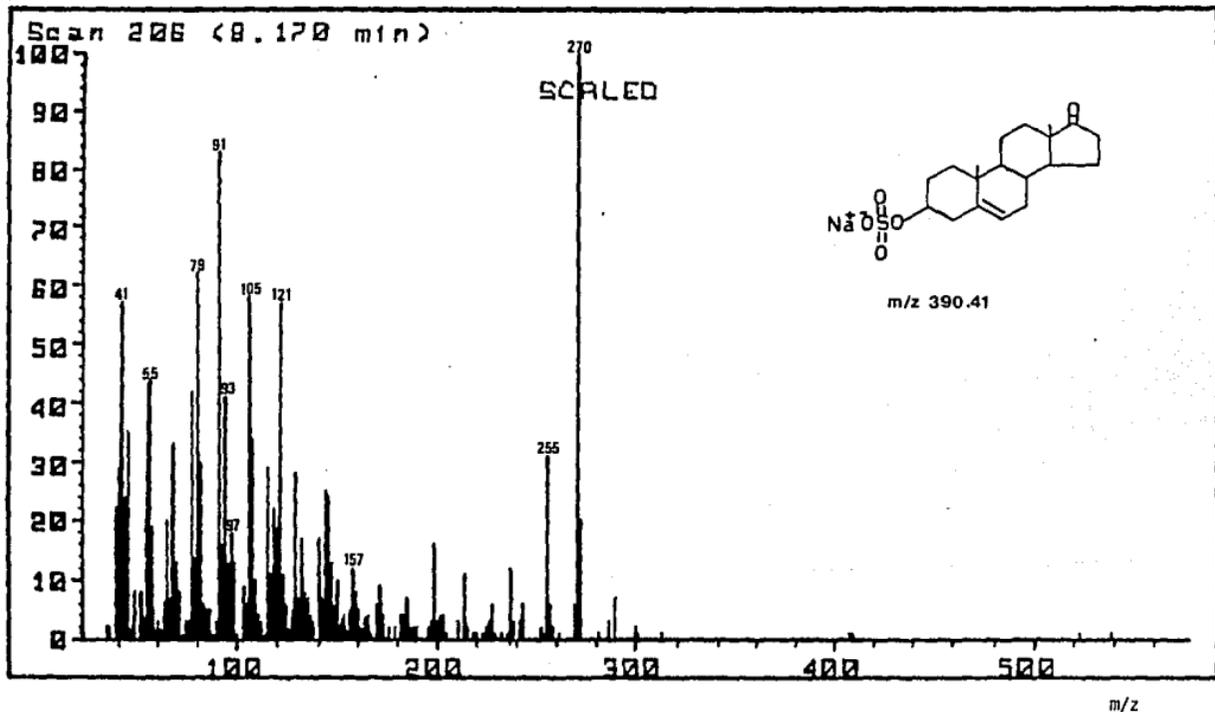


FIGURA 6

E.M. DE DHEA-SULFATO DE SODIO
(Impacto Electrónico)

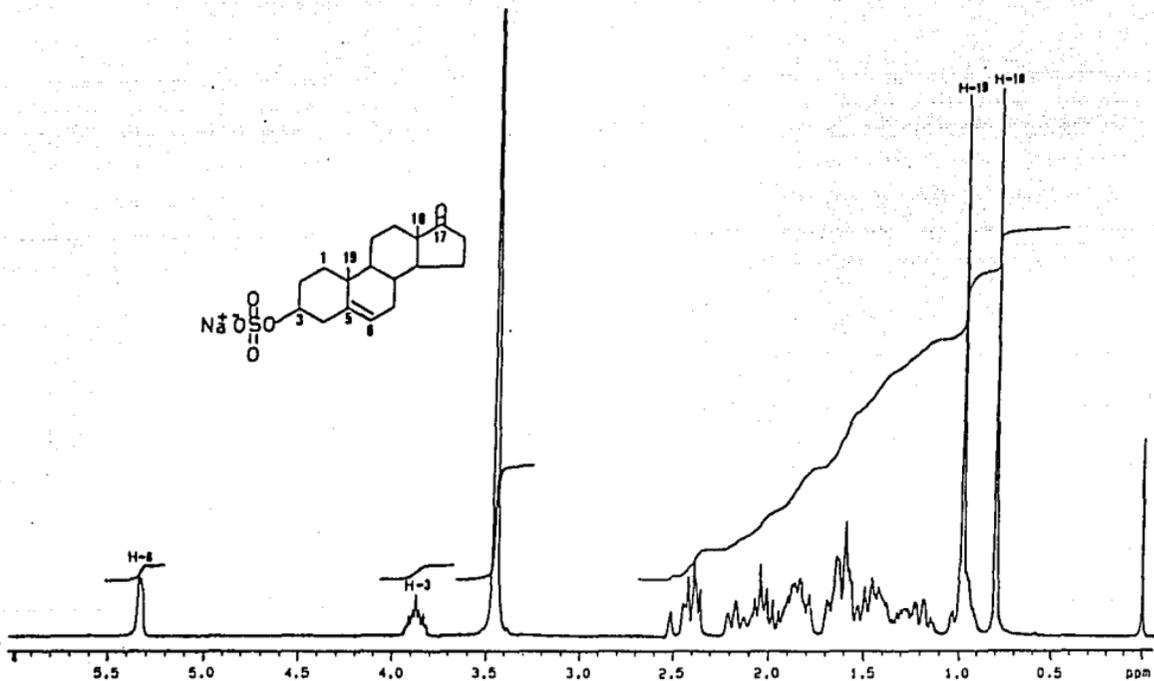
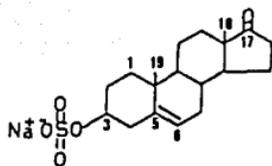


FIGURA 7

^1H RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA SULFATO DE SODIO

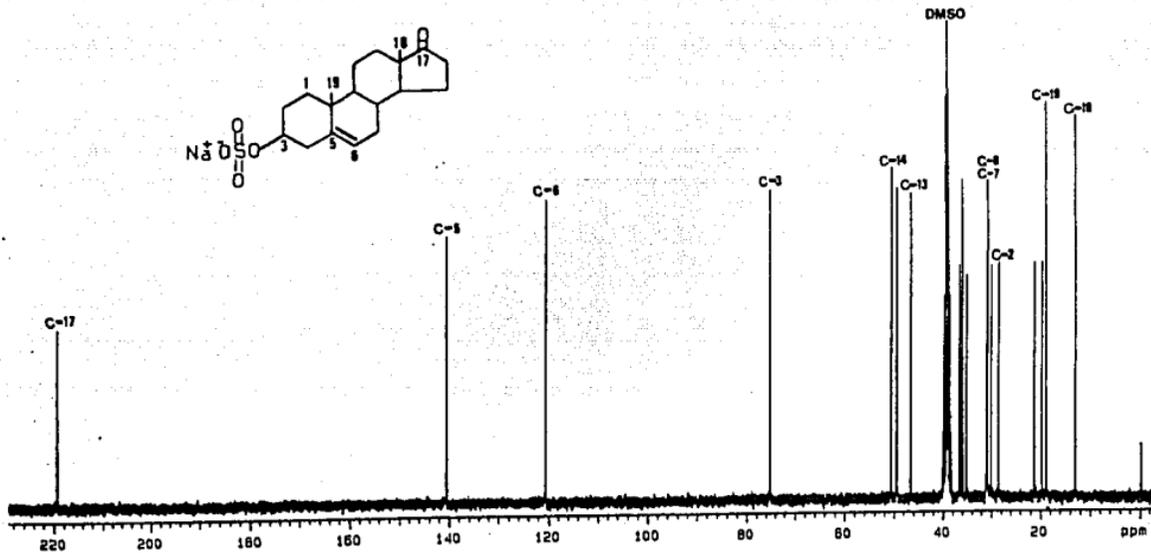


FIGURA 8

^{13}C RMN DEHIDROEPIANDROSTERONA SULFATO DE SODIO

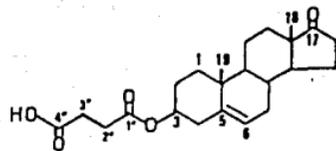
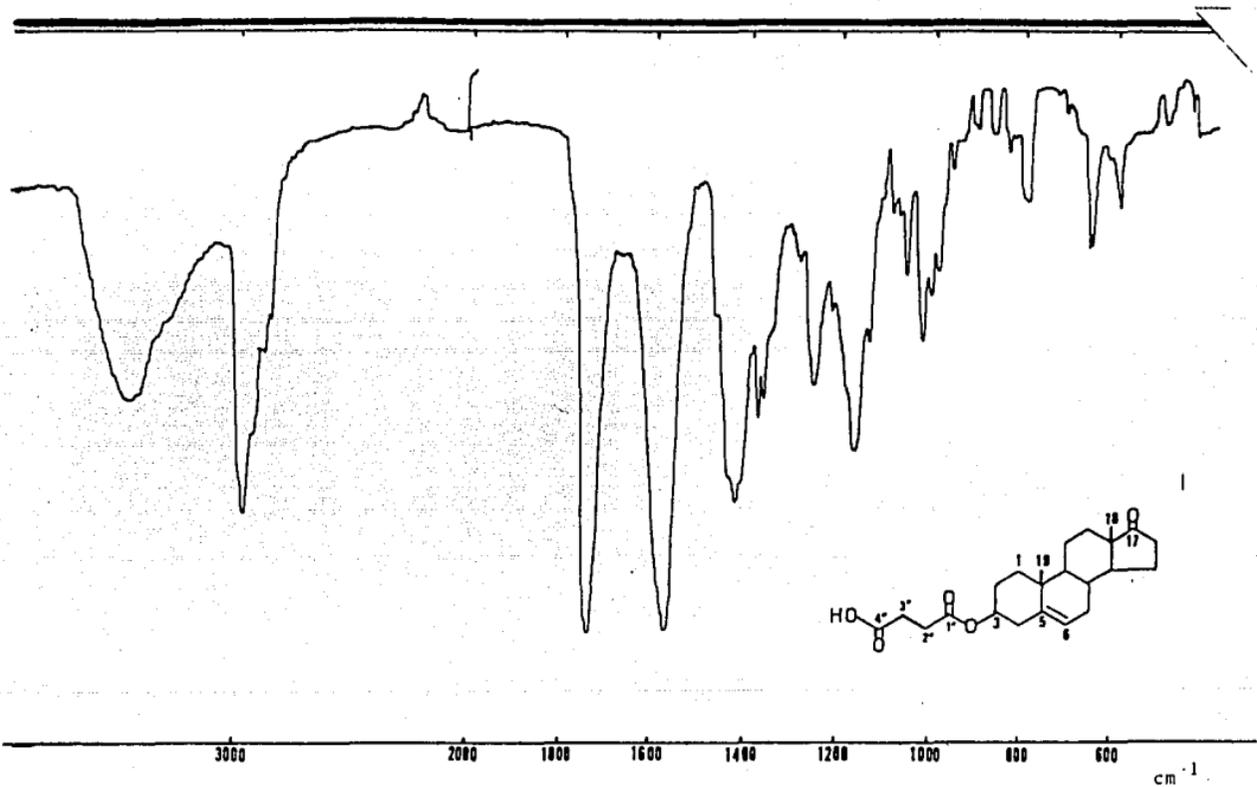


FIGURA 9

IR ACIDO DEHIDROEPIANDROSTERONA HEMISUCCINICO

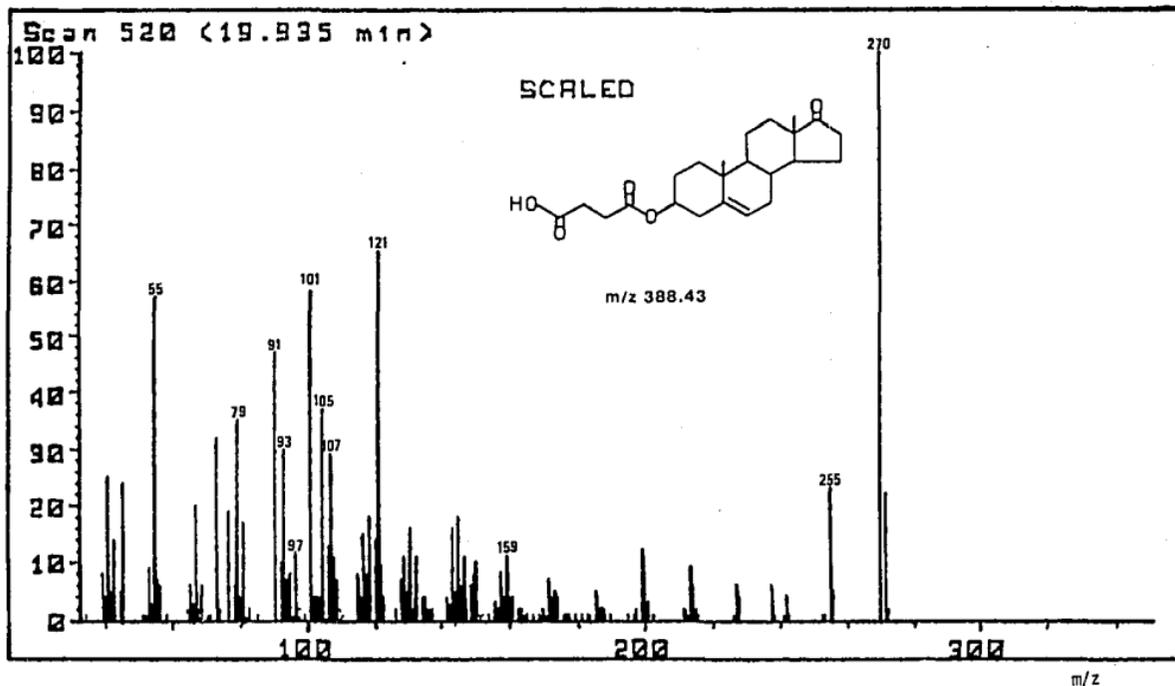


FIGURA 10

E.M. DEL ACIDO DHEA-HEMISUCCINICO
(Impacto Electrónico)

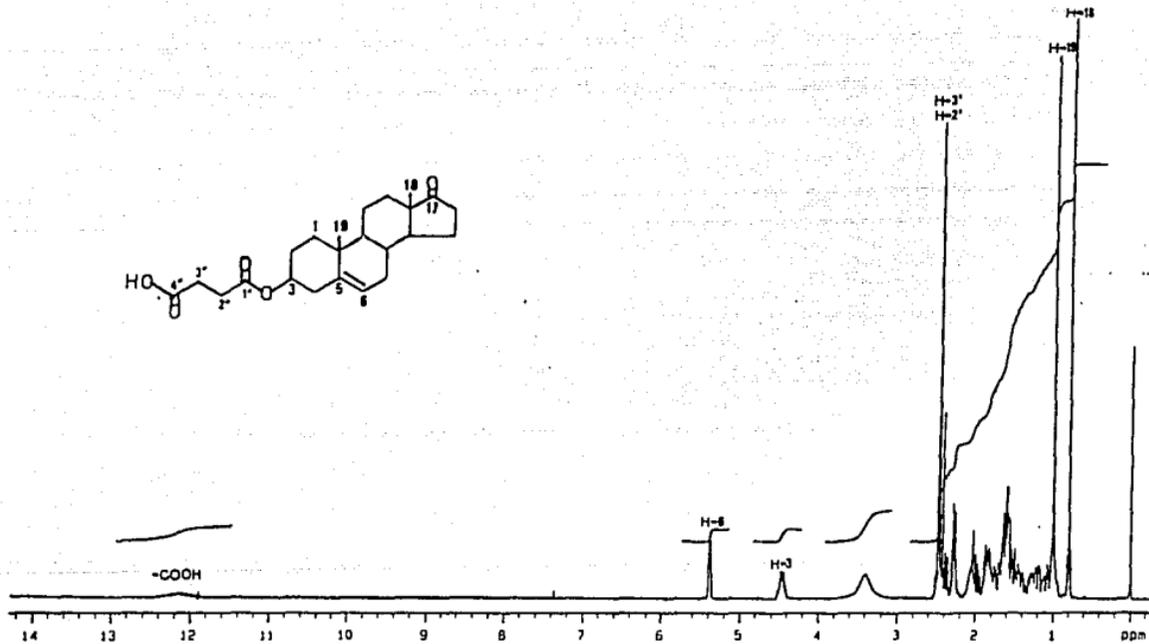


FIGURA 11 ¹H RMN ACIDO DEHIDROEPIANDROSTERONA HEMISUCCINICO

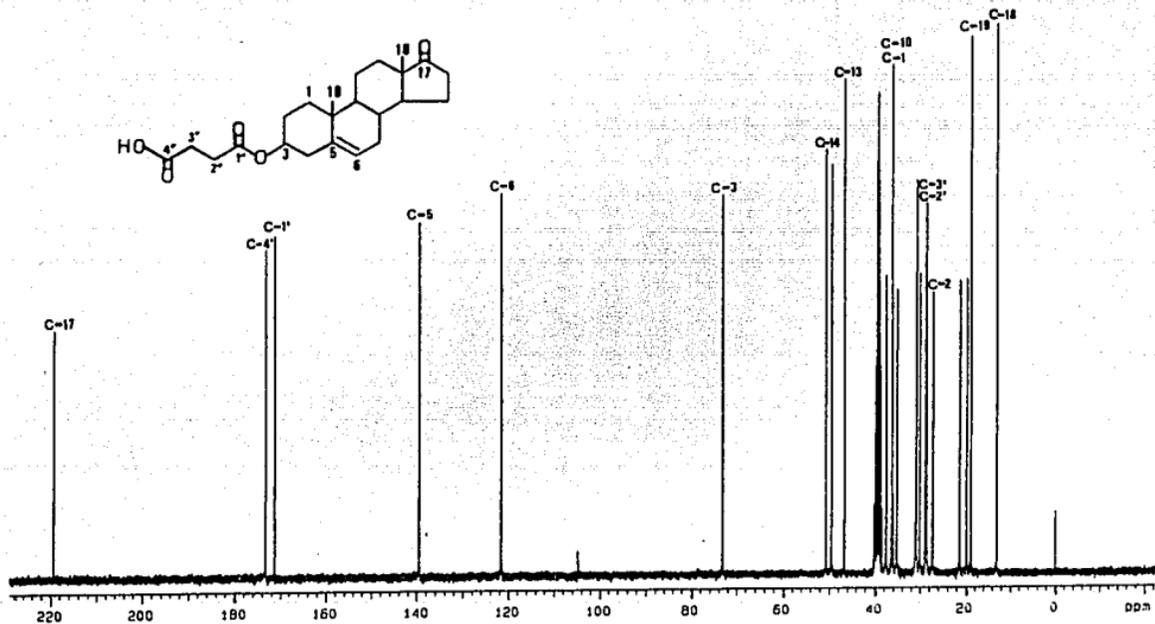
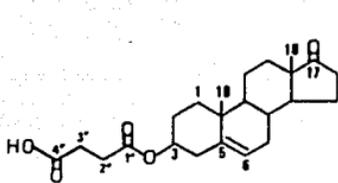


FIGURA 12

^{13}C RMN ACIDO DEHIDROEPIANDROSTERONA HEMISUCCINICO

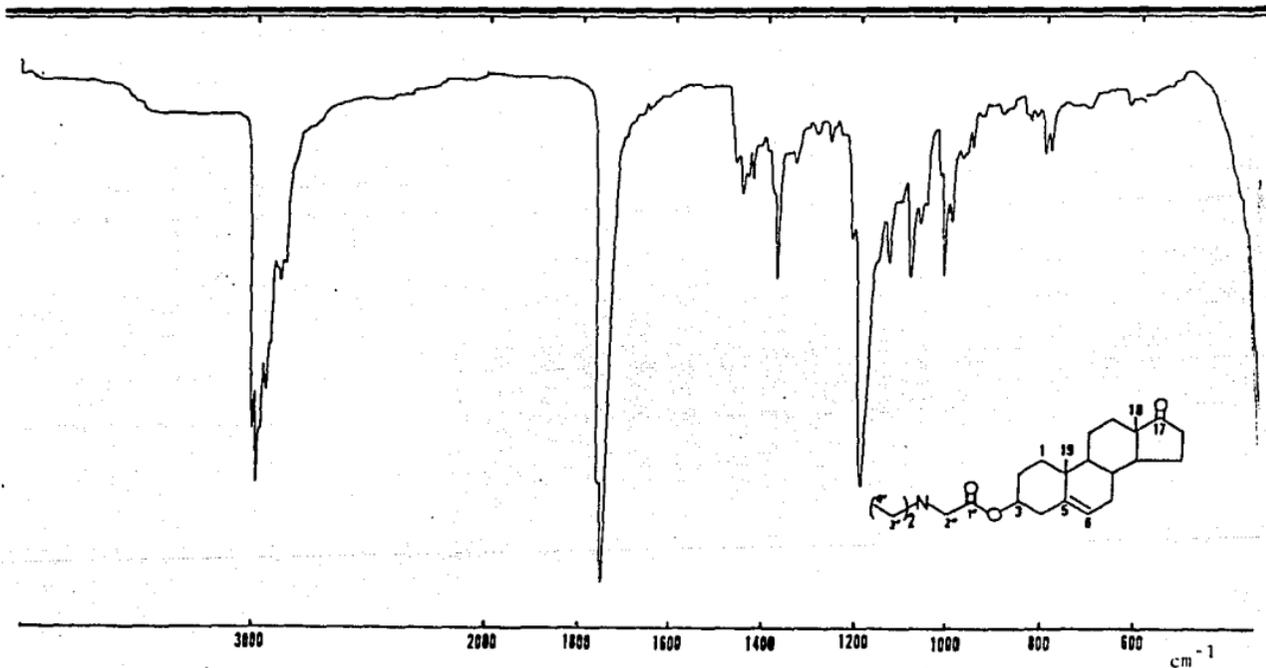
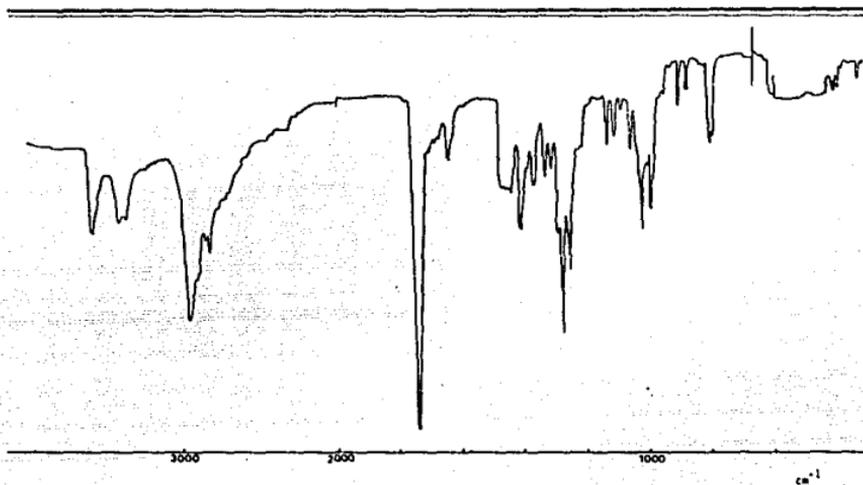
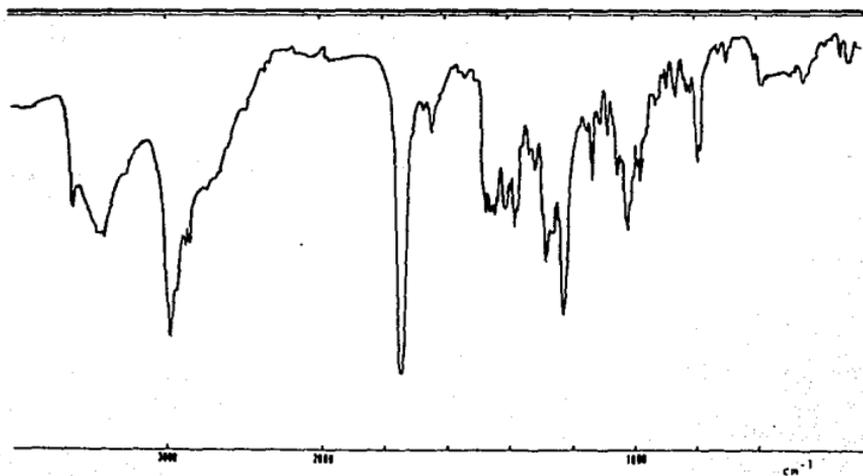


FIGURA 13

IR N,N-DIETILAMINOACETATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

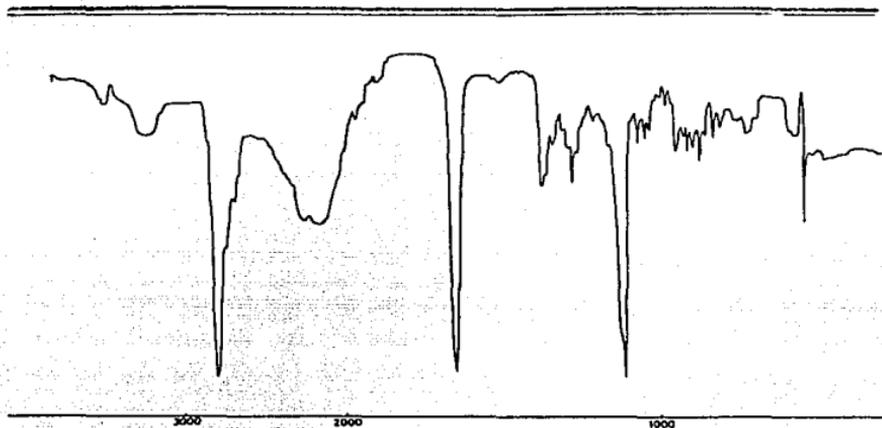


IR CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA
(p.f. 190°C; pastilla KBr)



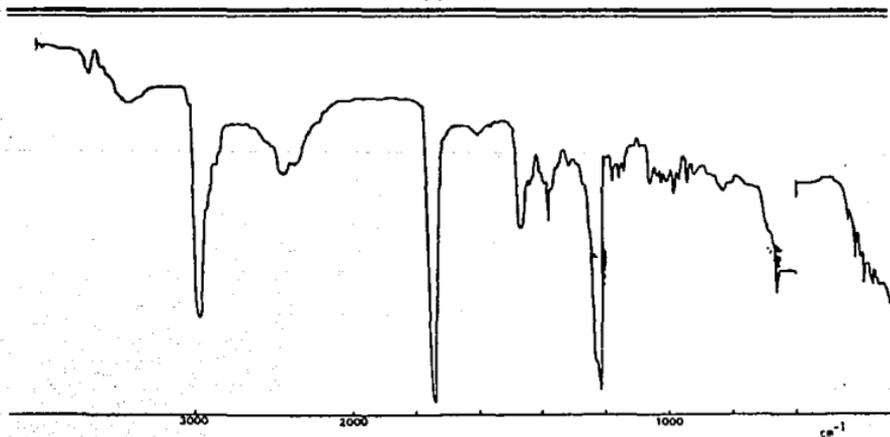
IR CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA
(p.f. 201°C; pastilla KBr)

FIGURA 14



IR CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA
(p.f. 201 °C; Solvente Cloroformo)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



IR CLORHIDRATO DE N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA
(p.f. 190 °C; Solvente Cloroformo)

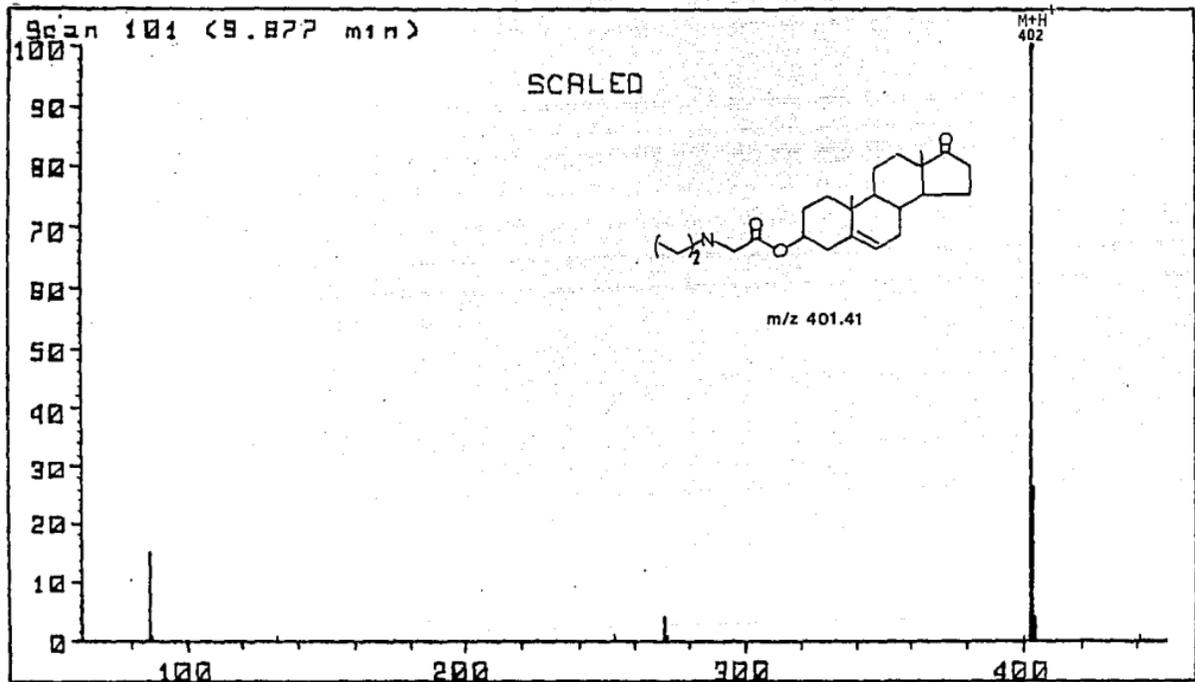


FIGURA 16

E.M. DEL N,N-DIETILAMINOACETATO DE DHEA
(Ionización Química)

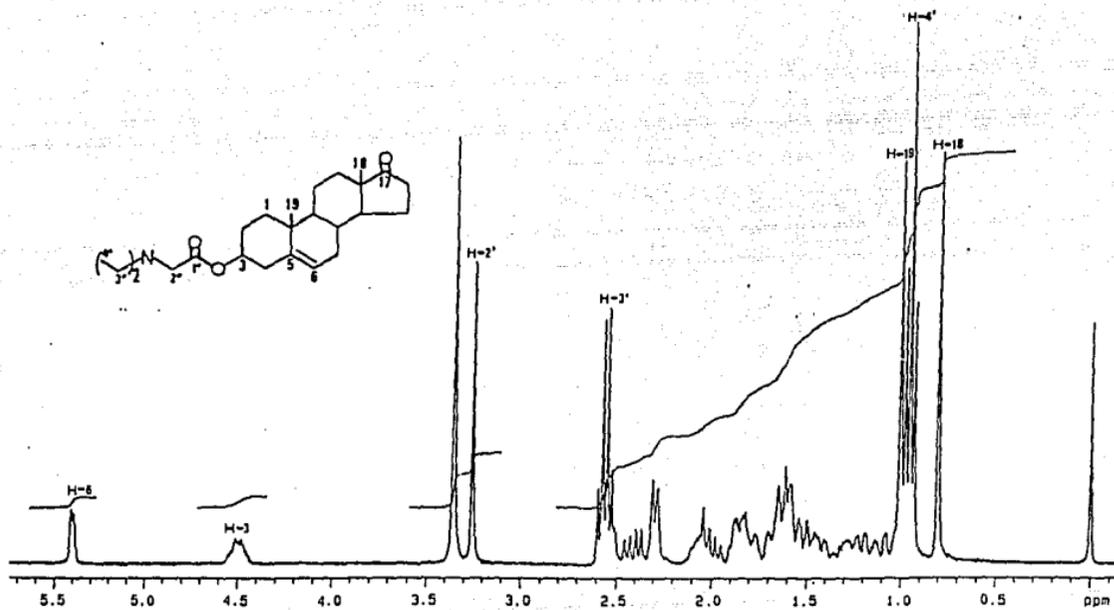


FIGURA 17

^1H RMN N,N-DIETILAMINOACETATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

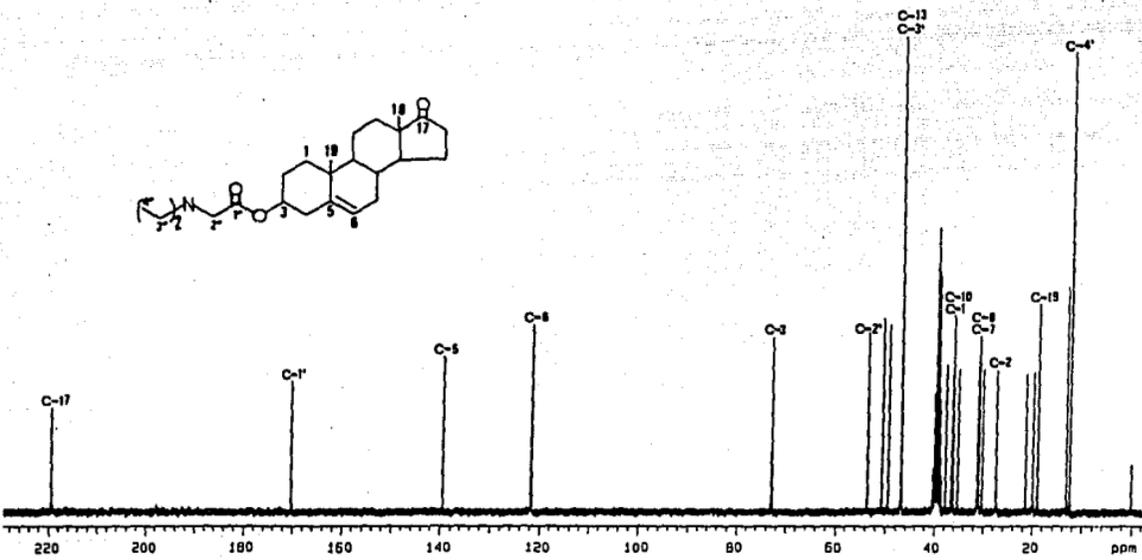


FIGURA 18

^{13}C RMN N,N-DIETILAMINOACETATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

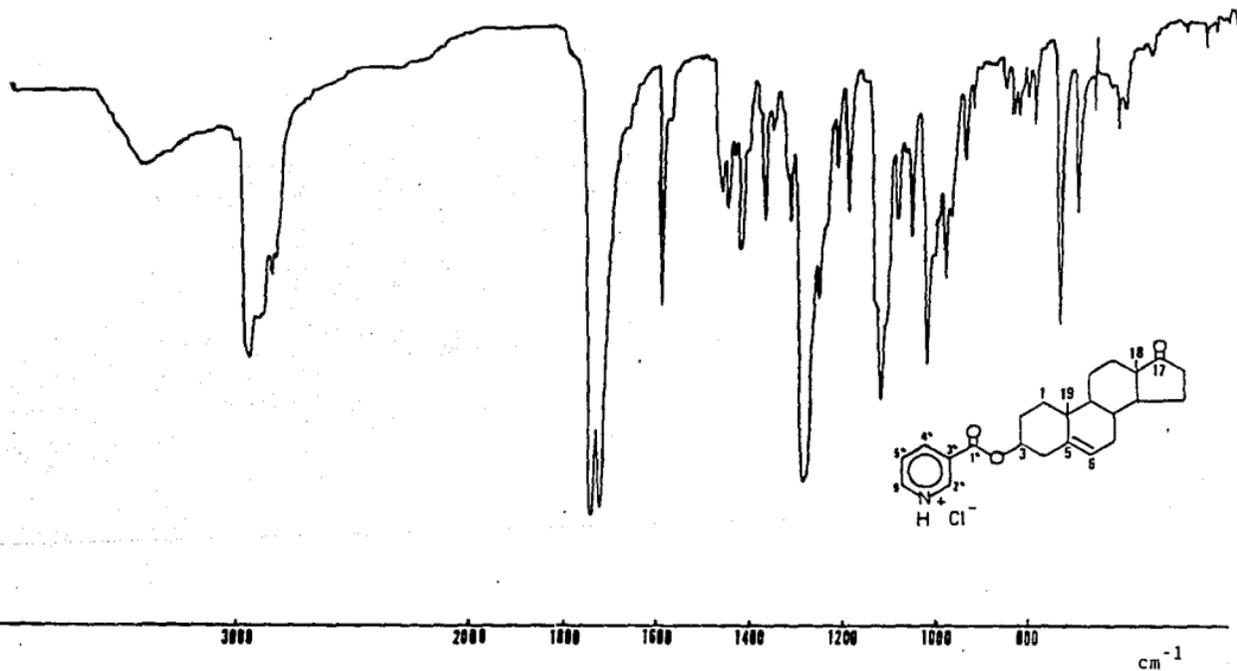


FIGURA 19

IR CLORHIDRATO DEL NICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

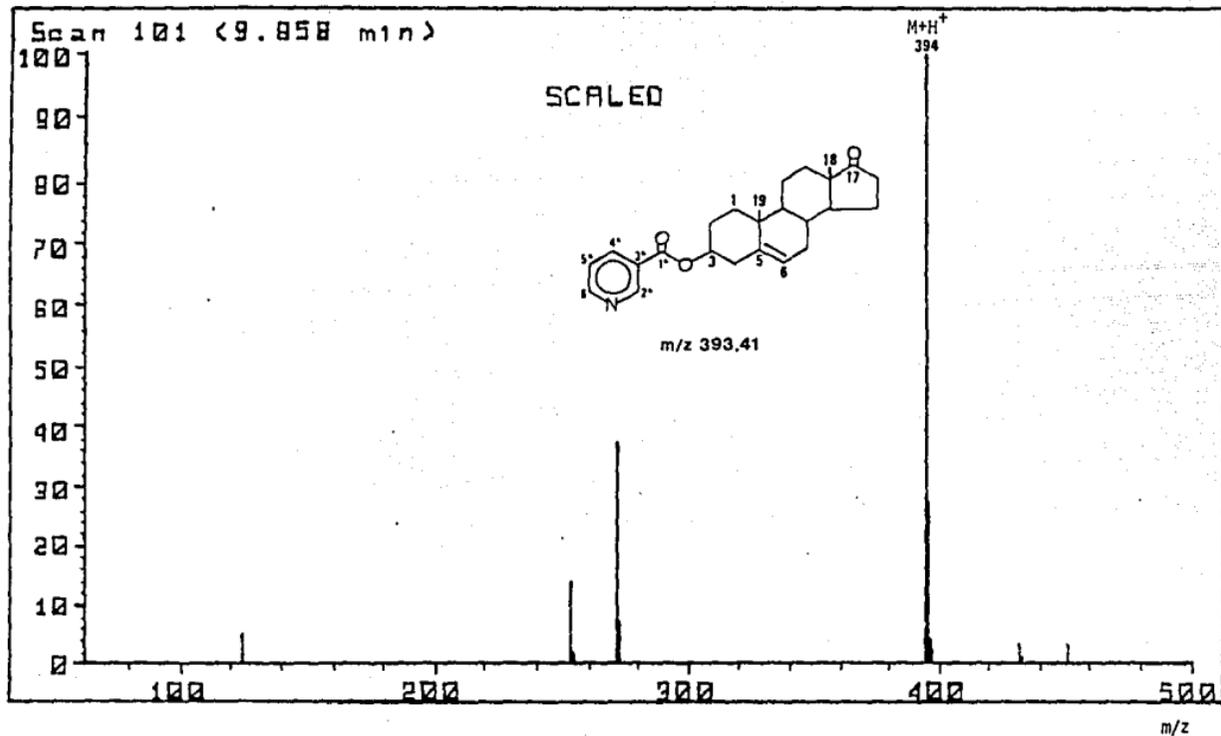


FIGURA 20

E.M. DEL NICOTINATO DE DHEA
(Ionización Química)

m/z

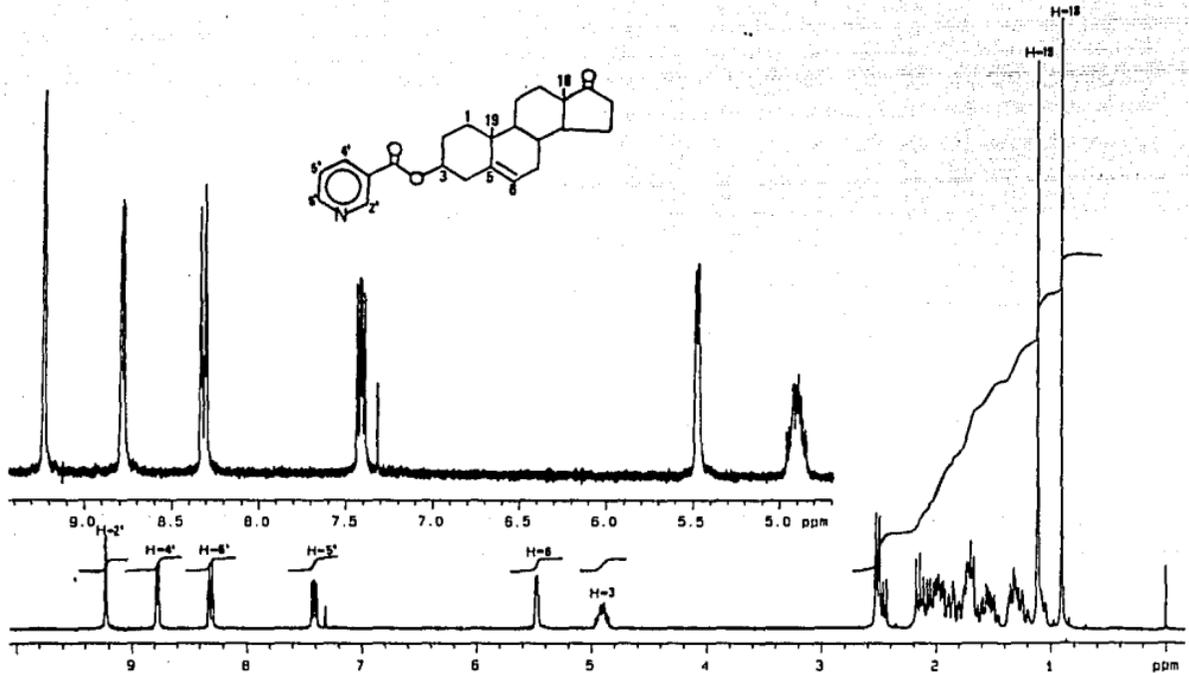


FIGURA 21

^1H RMN NICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

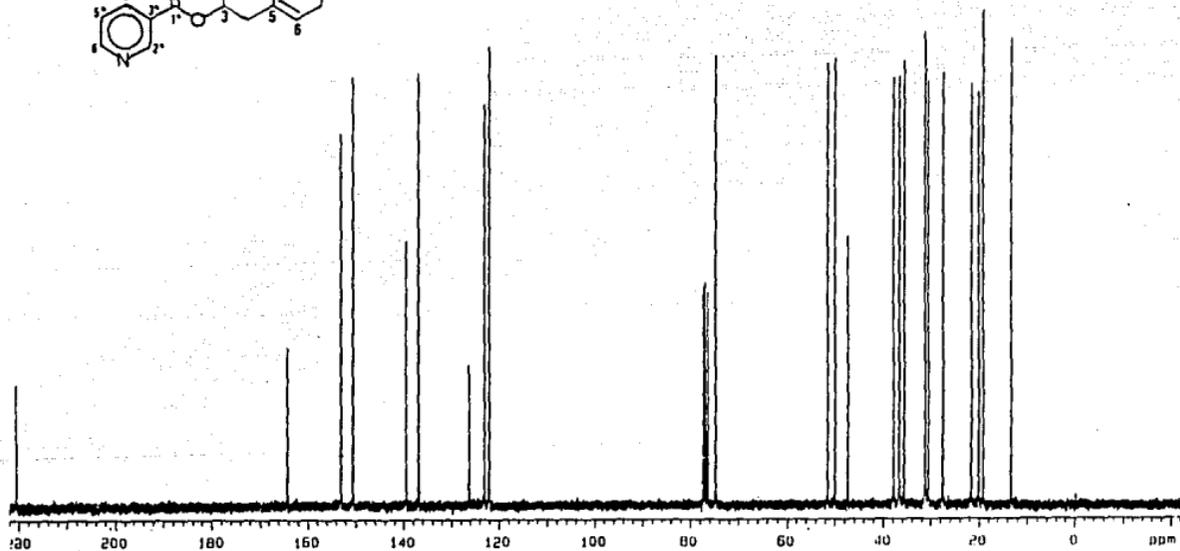
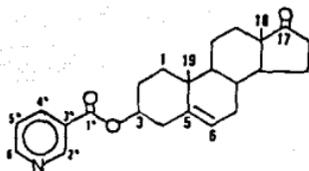


FIGURA 22

^{13}C RMN NICOTINATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

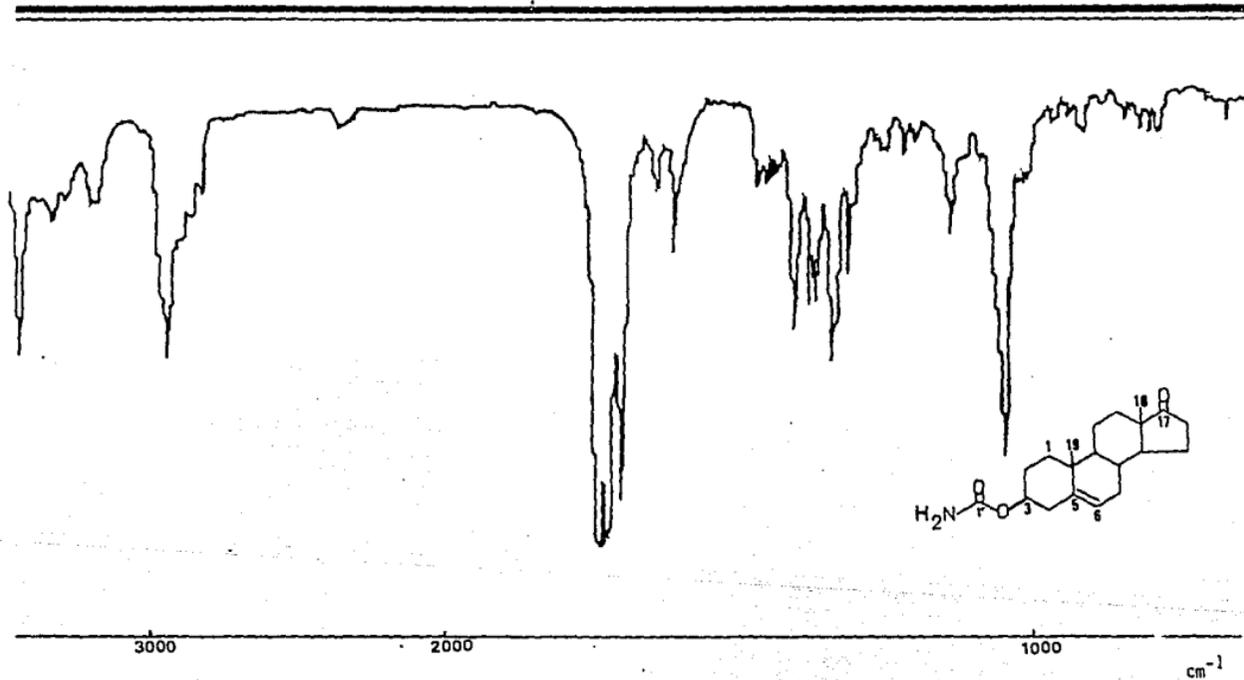


FIGURA 23

IR CARBAMATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

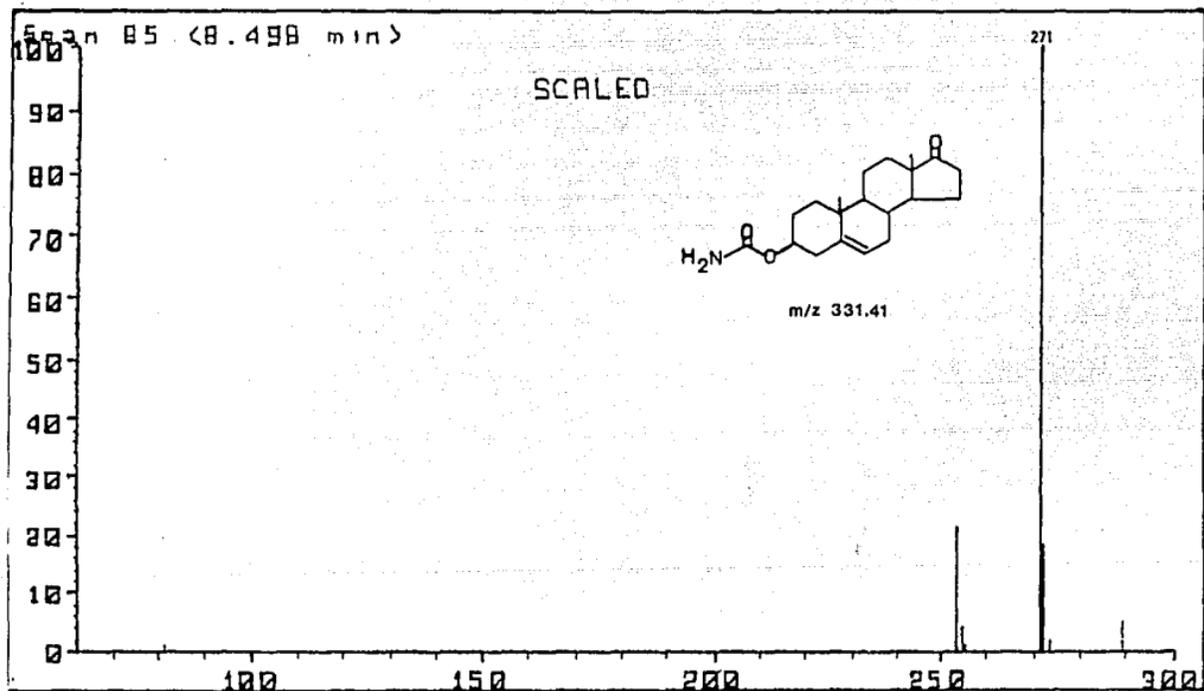


FIGURA 24

E.M. DEL CARBAMATO DE DHEA
(Ionización Química)

m/z

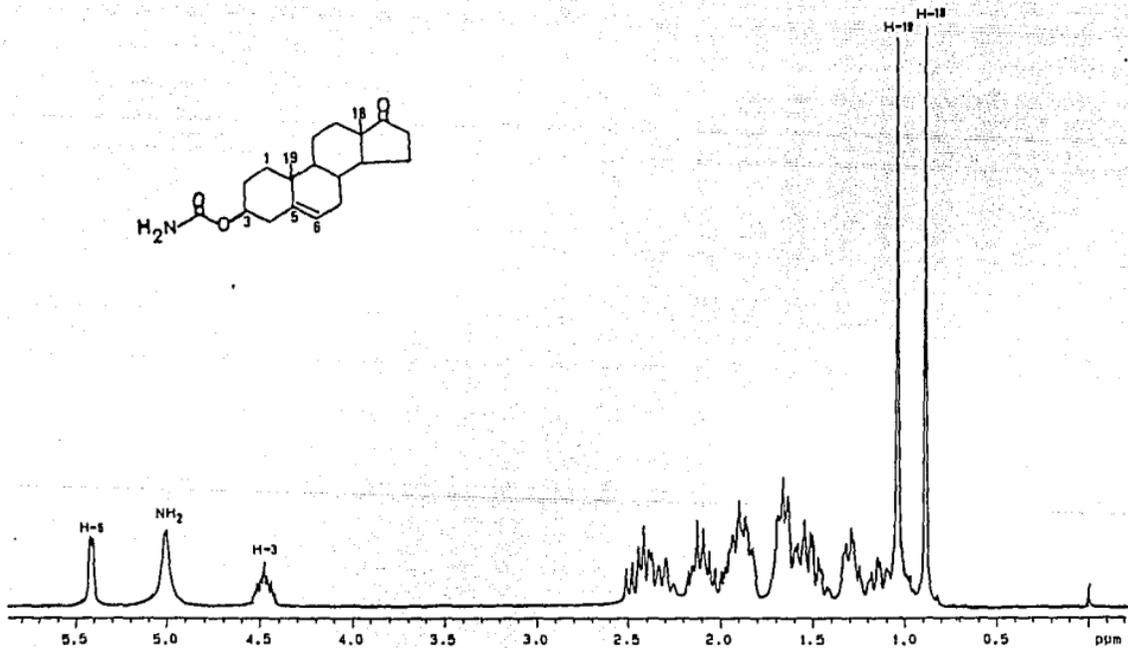
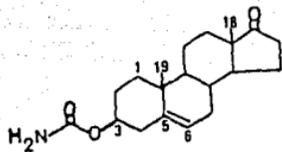


FIGURA 25

¹H RMN CARBAMATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

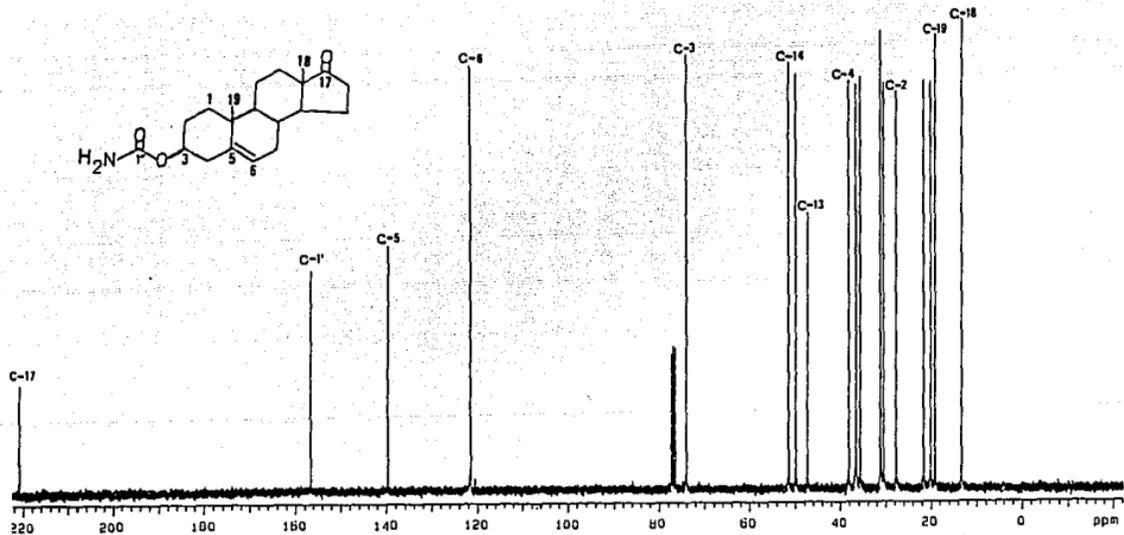


FIGURA 26

^{13}C RMN CARBAMATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA

BIBLIOGRAFIA

- (1) .- Nestler J.E., Cornelius O.P. J.Clin.Endocrinol.Metab. 1988 66 pp. 57-61.
- (2) .- Jones D.L., James H.T. J.Steroid.Biochem. 1987 26 pp. 151-159.
- (3) .- Oventreich N., et al. J.Clin.Endocrinol.Metab. 1984 59 pp.551-555.
- (4) .- Roy R., Belanger A. J.Steroid.Biochem. 1989 34 pp.559-561.
- (5) .- Nieshlag E., Loriaux D.L. J.Endocrinol. 1973 57 pp.123-126.
- (6) .- Rosenfeld R.S., Hellman L., Gallagher T.F. J.Clin.Endocrinol. Metab. 1972 35 pp.187-190.
- (7) .- Fenske A., et al. Life Sci. 1989 45 pp .1177 - 1184.
- (8) .- Newsholme E.A. Biochemistry for the Medical Sciences. Edit. John Wiley-Sons. England. 1984 pp.710-769.
- (9) .- Loria R.M., et al. J.Med.Virology. 1988 26 pp .301 - 314.
- (10) .- Prasana H.R., Magee P.N. J.Toxicol.Environ.Hlth. 1989 27 pp.467-475.
- (11) .- Frenkel R.A., et al. J.Steroid.Biochem. 1990 35 pp.333-342.
- (12) .- Schwartz A.G., et al. Cancer Res. 1988 48 pp. 4817-4822.
- (13) .- Prasana H.R., et al. Carcinogenesis. 1989 10 pp.2197-2200.
- (14) .- Gordon G.B., Shantz L.M., Talay P. Adv.Enz.Regul. 1987 26 pp. 355-382.
- (15) .- Mervil C.R., et al. J.A.M.A. 1989 261 pp. 1149-1150.
- (16) .- Mohan P.F., Cleary M.P. American J.Physiol.Endocrinol.Metab. 1988 18 E 1-8.
- (17) .- May M., et al. Life Sci. 1990 46 pp .1627 - 1631.
- (18) .- Flood J.F., Smith G.E., Roberts E. Brain Res. 1988 447 pp. 269-278.

- (19).- Kurzman I.D., et .al. Int.J.Obesity 1990 14 p.p. 95-101.
- (20).- Arad Y., et.al. Aterioclerosis 1989 9 p.p. 159 - 166.
- (21).- Tohru Yamji, et.al. J.Clin.Endocrinol.Metab. 198765pp.448-451.
- (22).- Nordin B.B., et.al. J.Clin.Endocrinol.Metab.198560pp.651-57
- (23).- Zumoff B., et .al. Cancer Res. 1981 41 pp. 3360 - 3363.
- (24).- Rosentein E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edit. Gerardo García B. 35 Edic.PLM S.A.1989p.908.
- (25).- Schwartz A.G., et al. Adv.Cancer Res. 1988 51 pp. 391-424.
- (26).- Kalimi M.,Regelson W. Biochem.Biophys.Res.Commun.1988447 pp.269-278.
- (27).- Cleary M. Int. J. Biochemistry. 1990 22 p.p. 101-145.
- (28).- Marrero A. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1990 193 pp .110 - 117.
- (29).- Casey M.l., et al. J.Steroid Biochem. 1988 30 pp.149-154.
- (30).- Amidon G.L., Leesman G.D. J.Pharm.Sci. 198069 pp.1363-1368.
- (31).- Lachman L., et al. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Lea-Febiger.USA.Third Edit.1986pp.171-88,457-66.
- (32).- Charton M. Methods Enzymology. 1985 112 pp. 323 - 359.
- (33).- Sinkula A.A.,Yalkowsky S.H. J.Pharm.Sci.197564pp.181-210.
- (34).- Riley T. N. J.Chem.Educt. 1988 65 p.p. 947 - 953.
- (35).- Notari E. R. Pharm. Therp. 1981 14 p.p. 25 - 53.
- (36).- Aggarwal S.K., et al. J.Med.Chem. 1990 33 pp. 1505-1510.
- (37).- Alexander J., et al. J.Med.Chem. 1988 31 pp. 318- 322.
- (38).- Bundgaard H.,Nielsen N.M. J.Pharm.Sci.198877 pp. 285-298.
- (39).- Bundgaard H.,Nielsen N.M. J.Med.Chem. 1989 32 pp.727-734.
- (40).- Bundgaard H.,Falch E. J.Med.Chem. 1989 32 pp. 2503-2507.
- (41).- Bundgaard H. Advanced Drug Delivery Rev. 19891 pp.39-65.
- (42).- Farrow S.N., et al. J.Med.Chem. 1990 33 pp. 1400 - 1406.

- (43).- Springer C.J., et al. J.Med.Chem. 1990 33 p.p. 677 - 681.
- (44).- Kondo H., et al. J.Med.Chem. 1989 32 p.p. 671 - 674.
- (45).- Kondo H., et al. J.Med.Chem. 1989 32 p.p. 679 - 682.
- (46).- Lane S., Johnson D.C. J.Org.Chem. 1988 53 pp. 5130-5139.
- (47).- Norbeck D.W., et al. J.Med.Chem. 1989 32 pp. 625 - 629.
- (48).- Rosernberg S.H., et al. J.Med.Chem. 1990 33 pp. 1962-1969.
- (49).- Saari W.S., et al. J.Med.Chem. 1990 33 pp. 97 - 101.
- (50).- Palomino E., et al. J.Med.Chem. 1989 32 pp. 622 - 625.
- (51).- Stella V. Prodrug as Novel Drug Delivery System. Edit. Higuchi-Stella. ACS Symposium Ser. 14. American Chemical Society.U.S.A. 1975 pp. 1-115.
- (52).- Applezweug N. Steroid Drug. McGraw Hill Book Co. U.S.A. 1962 p.p. 53-78.
- (53).- Yalkowski S. et al. Phuyical Chemical Properties of Drug. Marcel Dekkel Inc. U.S.A. 1981 p.p. 202-263.
- (54).- Vogel A. Practical Organic Chemistry. Third Edit. Longman. England. 1972 p.p 375-376.
- (55).- Brown H.C. J.A.C.S. 1938 60 p.p 1325-1328.
- (56).- Kaplan Lawrence A.,Pesce A.J. Clinical Chemistry.Theory Analysis and Correlation. The C.V. Mosby Co. U.S.A. 1984 p.p. 1409-1411.
- (57).- Pesce J.A.,Kaplan L.A. Methods in Clinical Chemistry. Edit. Mosby U.S.A. 1987 p.p. 248-252.
- (58).- Sandberg F.C.,Clifton R.J. Methods Enzymology. Academic Press. U.S.A. 1973 86 p.p. 684-687.
- (59).- Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos. Quinta Edición. México. 1988 p.p. 189,239.

- (60).- Mc.Allister R.A. Enzimas y Determinación de la Actividad Enzimática. Edit. Manual Moderno. México. 1975 p.p.40 -41
- (61).- Dixon,Webb E. Enzymes. Third Edit. Ed. Longman. England. 1979 p.p. 225,251-253.
- (62).- Junge W. Methods of Enzymatic Analysis.Third Edition. Ed. Jurgen-Bermeyer. Fed.Rep.Germany. 1984 4 p.p 1-8.
- (63).- Rahim M.A. Si H.C.T. Methods Enzymology. Academic Press. 1969 15 p.675.
- (64).- Jenkins C.R. Methods Enzymology. Academic Press. U.S.A. 1969 15 p.p. 351-359.
- (65).- Dusza J.P. et al. Steroid. 1985 45 p.p.303-322
- (66).- Rabjohn. Organic Synthesis. U.S.A. 1963 4 pp. 88-89.
- (67).- Kemp W. Organic Spectroscopy. Second Edit.1987 Macmillan. Hong Kong
- (68).- Balieu E. et al. Bull Soc. Chim. Biol. 1962 44 pp. 823-39.
- (69).- Mc.Closkey J.A. Methods Enzymology. Academic Press. U.S.A. 1969 14 pp. 137-148.
- (70).- Zaretskii V.I. Tetrahedron 1966 22 pp. 1399-1405.
- (71).- Nes W.R. Methods Enzymology. Academic Press. U.S.A. 1985 111 pp. 27 - 34.
- (72).- Wyllie S.G. J.O.C. 1977 42 pp. 725-731.
- (73).- Tôkes L.,Djerassi C. J.O.C. 1967 32 pp.1012-1018.
- (74).- Pál Sohár. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. C.R.C. Press Inc. U.S.A. 1983 1 2.
- (75).- Hammann P.E,et al. Magnetic Res.Chem.(1988) 26 pp.85-88.
- (76).- Breitmaier E. Voelter W. Carbon 13 NMR Spectroscopy. Third Edition. V.C.H. Germany. 1985 pp. 337-340.
- (77).- Stothers A. Org. Magn. Reson. 1977 9 pp. 439-455.