

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA



**SINTESIS DE DERIVADOS DE ERGOSTEROL COMO POSIBLES DROGAS CON
ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIOS (*Trypanosoma cruzi*)**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Williams J. Colina G.,
para optar al título de Licenciado
en Química. Opción Básica.
Tutor: Dr. Masahisa Hasegawa.

Caracas, Octubre 2008.

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA**



**SINTESIS DE DERIVADOS DE ERGOSTEROL COMO POSIBLES DROGAS CON
ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIOS (*Trypanosoma cruzi*)**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Williams J. Colina G.,
para optar al título de Licenciado
en Química. Opción Básica.
Tutor: Dr. Masahisa Hasegawa.

Caracas, Octubre 2008.

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: SINTESIS DE DERIVADOS DE ERGOSTEROL COMO POSIBLES DROGAS CON ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIOS (*Trypanosoma cruzi*). Presentado por el Br. Williams José colina González, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por el reglamento de Trabajo Especial de Grado de la Escuela de Química.

Dr. Masahisa Hasegawa
(Director)

Dra. Alírica Suárez
(Jurado)

Dr. Gustavo Cabrera
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Mirian y a mis tíos Zulay y Oscar por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera y en toda mi vida. Sin ellos no hubiese sido posible este logro. Gracias.

A mi novia, Maria Eugenia por su compañía incondicional durante todo momento y por su comprensión en los tiempos difíciles.

Al Prof. Masahisa Hasegawa, por brindarme sus conocimientos y por la oportunidad de realizar este trabajo que me llena de orgullo.

A todos mis compañeros de los laboratorios 316 y 321, Luís Daniel, Jairo, Diana, Luís Canino, Gaby y Elsy que de alguna u otra forma me ayudaron durante mi estancia en los mismos.

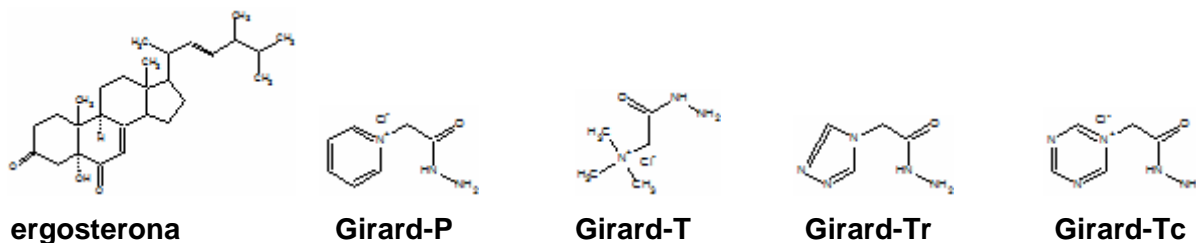
A la profesora Lola de Lima, por su ayuda y haber realizado los análisis de IR y RMN para este trabajo.

Por ultimo, pero no menos importantes a todos los compañeros de clases y a los profesores, con los que compartí en las distintas materias durante todos estos años de carrera.

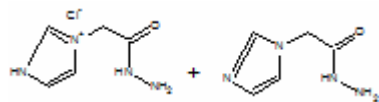
RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis es sintetizar derivados de ergosterol como posibles drogas con actividad antiprotozoarios, específicamente contra *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Basándose en el hecho que el ergosterol forma parte de la membrana celular de estos protozoarios, la modificación de ergosterol realizando su oxidación y utilizando reactivos de Girard nos genera una vía para introducir a estos microorganismos compuestos tipo azoles, los cuales se consideran como un tipo de drogas de uso terapéutico que han presentado actividad contra *Trypanosoma cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo* en distintos modelos de la enfermedad de Chagas.

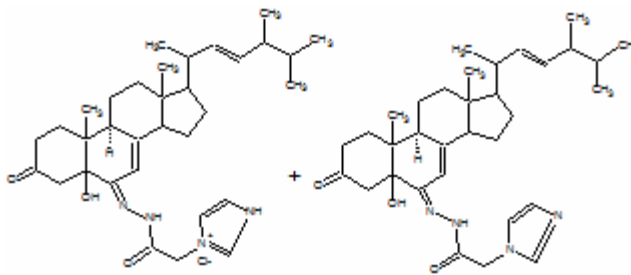
Para lograr esto se siguió la siguiente metodología: se realizó la oxidación de ergosterol utilizando el reactivo de Jones, resultando como producto, ergosta-7,22-dieno-5 α -ol-3,6-diona (ergosterona) con un rendimiento del 54%. Se sintetizaron diferentes reactivos del tipo Girard (GX): GI (58%), GTr (67%) y GTc (68%) y luego se obtuvieron las hidrazonas respectivas a partir de ergosterona y los distintos reactivos de Girard. También se utilizó Girard-P y Girard-T, los cuales son de procedencia comercial.



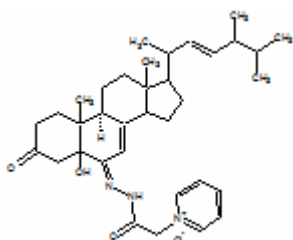
Las hidrazonas obtenidas a partir de ergosterona y los distintos reactivos de Girard fueron: ergosterona-GT₂ (84%), ergosterona-GP (91%), ergosterona-GP₂ (84%), ergosterona-GI (85%), ergosterona-GTc (83%), ergosterona-GTr (91%).



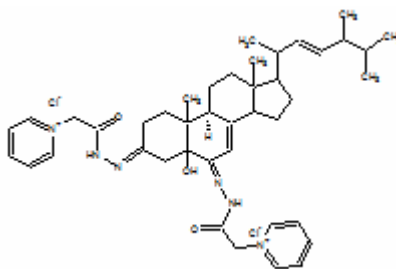
Girard-I



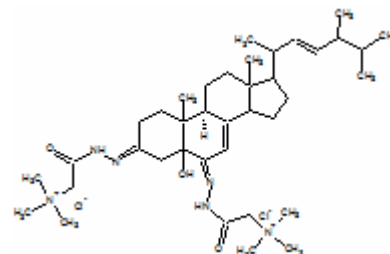
ergosterona-GI



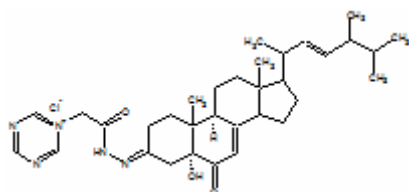
ergosterona-GP



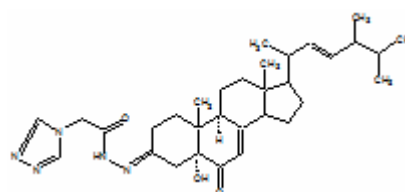
ergosterona-GP2



ergosterona-GT2



ergosterona-GTc



ergosterona-GTr

INDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	I
Indice de espectros	ii
Indice de figuras	iv
Indice de tablas	vi
INTRODUCCION	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1. Enfermedad de Chagas: Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.2. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas	6
1.2.1. Drogas y sus mecanismos de acción	6
1.2.1.1. Inhibidores de la biosíntesis de ergosterol	7
1.2.1.2. Inhibidores de cisteína-proteasa	11
1.2.1.3. Inhibidores del metabolismo de pirofosfato	12
1.2.1.4. Inhibidores de la captura de purinas	13
1.2.1.5. Inhibidores de la síntesis de fosfolípidos	14
1.3. Blancos quimioterapéuticos bioquímicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.3.1. Superficie celular	16
1.3.1.1. El glicocáliz	16
1.3.1.2. La bicapa lipídica	16
1.3.1.3. El citoesqueleto	17
1.3.2. La vía endocítica	17
1.3.3. El complejo cinetoplasto-mitocondria	17
1.3.4. El glicosoma	18
1.3.5. El flagelo	18
1.3.6. El núcleo	18
1.3.7. Metabolismo del tripanotión	18

1.4. Esteroides y esteroles	19
1.4.1. Ergosterol: Biosíntesis y relación con la enfermedad de Chagas	20
1.4.2. Colesterol	28
1.5. Reacciones de oxidación	30
1.5.1. Oxidación de alcoholes	30
1.6. Adición al doble enlace carbono-carbono	32
1.6.1 Adiciones electrófilas a los alquenos: adición de ácidos	33
1.7. Reactivos de Girard	33
2. ANTECEDENTES	35
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo General	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	43
4.1. Solventes y reactivos	43
4.2. Soportes cromatográficos	44
4.3. Equipos utilizados	45
4.4. Derivados de colesterol	46
4.4.1. Oxidación de colesterol, obtención de colest-4-eno-3,6-diona	46
4.4.2. Síntesis de colest-5-eno-3,7-diona	47
4.4.2.1. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato	47
4.4.2.2. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato-7-ona	48
4.4.2.3. Obtención de colest-5-eno-3 β -ol-7-ona	50
4.5. Oxidación de ergosterol utilizando el reactivo de Jones	51
4.6. Síntesis del reactivo de Girard-Imidazol	52
4.7. Síntesis del reactivo de Girard-Triazol	53
4.8. Síntesis del reactivo de Girard-Triacina	54
4.9. Reacción entre Girard-T y ergosterona	55
4.10. Reacción entre Girard-P y ergosterona	56

4.11. Reacción entre Girard-I y ergosterona	58
4.12. Reacción entre Girard-Tc y ergosterona	59
4.13. Reacción entre Girard-Tr y ergosterona	60
5. RESULTADOS Y DISCUSION	61
5.1. Derivados de colesterol	63
5.1.1. Oxidación de colesterol, obtención de colest-4-eno-3,6-diona	66
5.1.2. Síntesis de colest-5-eno-3,7-diona	73
5.1.2.1. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato	73
5.1.2.2. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato-7-ona	76
5.1.2.3. Obtención de colest-5-eno-3 β -ol-7-ona	80
5.2. Oxidación de ergosterol utilizando el reactivo de Jones	83
5.3. Síntesis del reactivo Girard-Imidazol	94
5.4. Síntesis del reactivo Girard-Triazol	96
5.5. Síntesis del reactivo Girard-Triacina	98
5.6. Reacción entre Girard-T y ergosterona	100
5.7. Reacción entre Girard-P y ergosterona	104
5.8. Reacción entre Girard-I y ergosterona	111
5.9. Reacción entre Girard-Tc y ergosterona	114
5.10. Reacción entre Girard-Tr y ergosterona	116
6. CONCLUSIONES	118
7. RECOMENDACIONES	119
BIBLIOGRAFIA	120

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucléico

ARN: ácido resoxirribonucléico

CCF: cromatografía de capa fina

CDCl₃: cloroformo deuterado

CoA: Coenzima A

DMDO: dimetildoxirano

GP: glicoproteínas

GI: reactivo de Girard-Imidazol

GP. reactivo de Girard-Piridina

GTc: reactivo de Girard-Triacina

GTr: reactivo de Girard-Triazol

GT: reactivo de Girard-Trimetilamina

HGPRT: hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa

HMPT: hexametilfosfotriamida

HPLC: cromatografía líquida de alta presión (high performance liquid chromatography)

IR: infrarrojo

MeOD: metanol deuterado

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

RMN ¹³C: resonancia magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H: resonancia magnética nuclear de protones

TBME: terbutil metil éter

THF: tetrahidrofurano

Espectro N° 26. RMN ^{13}C de ergosterona-GP	107
Espectro N° 27. RMN ^{13}C de ergosterona-GP ₂	110
Espectro N° 28. RMN ^{13}C del producto entre ergosterona y Girard-I	113
Espectro N° 29. IR de ergosterona-GTc	115
Espectro N° 30. IR de ergosterona-GTr	117

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Triatoma infestans</i> , vector de la enfermedad de Chagas	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 3. Estructura química de las drogas actualmente disponibles para la enfermedad de Chagas	7
Figura 4. Estructura química de los compuestos inhibidores de la biosíntesis de ergosterol: (a) Ketoconazol, (b) Itraconazol, (c) TAK-187, (d) Ravuconazol, (e) UR-9825, (f) E5700, (g) ER119884	10
Figura 5. Estructura química de K-777, inhibidor de cisteína-proteasa	11
Figura 6. Estructura química de inhibidores del metabolismo de pirofosfato. (a) Risedronato, (b) Pamidronato	13
Figura 7. Estructura química de Alopurinol, inhibidor de la captura de purinas	14
Figura 8. Estructura química de inhibidores de la síntesis de fosfolípidos. (a) Edelfosfina, (b) Miltefosfina, (c) Ilmofosfina	15
Figura 9. Núcleo de ciclopentano-perhidrofenantreno	19
Figura 10. Estereoquímica del ergosterol	20
Figura 11. Formación del ácido mevalónico	21
Figura 12. Obtención de isopentil pirofosfato a partir de ácido mevalónico	22
Figura 13. Formación de escualeno	23
Figura 14. Conversión de escualeno a lanosterol	24
Figura 15. Ciclación postulada de (3S)-2,3-oxidoescualeno a lanosterol	25
Figura 16. Conversión de lanosterol a ergosterol	27
Figura 17. Estructura química del colesterol	28
Figura 18. Obtención de colesterol a partir de lanosterol	29
Figura 19. Estructura de los reactivos de Girard: (a) Girard-P, (b) Girard-T	33
Figura 20. Obtención del reactivo de Girard-Triacina	34
Figura 21. Oxidación de ergosterol a ergosterona	35

Figura 22. Oxidación de alcoholes arílicos con anhídrido crómico y HMPT	36
Figura 23. Oxidación selectiva de esteroides polifuncionales con DMDO	37
Figura 24. Obtención de ergosterona a partir de ergosterol	38
Figura 25. Obtención de la hidrazona ergosterol-Girard I	39
Figura 26. Reducción de 19-norandrost-4-eno-3,17-diona con Li/NH ₃	39
Figura 27. Reducción de 5 ξ -androst-1-eno-3,17-diona con K-selectride	40
Figura 28. Síntesis de derivados esteroidales de piridina	41

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ¹³ C de colest-4-eno-3,6-diona y estigmast-4-eno-3,6-diona	68
Tabla N° 2. Comparación de los datos espectroscópicos RMN ¹³ C de los distintos derivados obtenidos	85
Tabla N° 3. Asignación de los desplazamientos mas característicos de RMN ¹³ C obtenidos para ergosterona-GT ₂	101
Tabla N° 4. Asignación de los desplazamientos mas característicos de RMN ¹³ C obtenidos para ergosterona-GP	105
Tabla N° 5. Asignación de los desplazamientos mas característicos de RMN ¹³ C obtenidos para ergosterona-GP ₂	109
Tabla N° 6. Desplazamientos más característicos de RMN ¹³ C obtenidos para la mezcla 14	112

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas, descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, es una zoonosis producida por el protozoo flagelado, *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad afecta de 16 a 18 millones de habitantes del continente americano y ha sido descrita como una dolencia crónica, debilitante e incapacitante, que se manifiesta con cuadros clínicos variados, en ocasiones muy severos y fatales. ^[1]

Esta enfermedad es especialmente endémica en latino América y su distribución geográfica a lo largo del continente va desde el norte de México hasta el sur de Argentina. ^[2] No obstante, la distribución del agente etiológico (*Trypanosoma cruzi*), de los vectores que la transmiten (*Reduviidae triatominae*) y de los mamíferos silvestres que fungen como reservorios. Es mucho más extensa. En efecto, el ciclo silvestre formado por el parásito, el vector y los reservorios, se extiende desde 42° latitud norte (Estados Unidos) hasta 49° latitud sur (Argentina y Chile). ^[3]

Los primeros compuestos ensayados experimentalmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, fueron Atoxil (arsénico) y cloruro de mercurio (1912-1914), luego se emplearon para combatir esta enfermedad, derivados de quinoleína, arsenobenzoles y sales de oro, bismuto, plomo y cobre sin resultados plenamente satisfactorios. ^[4] En la actualidad hay disponible tratamiento farmacológico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (incluso para la transmisión congénita o por transfusión de sangre) y para la reactivación de infección crónica. ^[5] Nifurtimox y Benznidazol, sin embargo estas drogas tienen una toxicidad potencial. Los efectos secundarios de Nifurtimox incluyen, náuseas y vómito, anorexia y pérdida de peso. Por parte del Benznidazol los efectos secundarios son: fiebre, dermatitis, linfadenopatía, agranulocitosis y polineuritis tóxica. ^[6]

La falta de resultados efectivos y confiables de estos tratamientos se debe al hecho de que el parasito crea resistencia a estos, conllevando a que los pacientes deban tomar mayores dosis y en consecuencia los efectos secundarios aumentan, obligando al paciente a abandonar el tratamiento. Las nuevas ideas sobre tratamientos para la enfermedad de Chagas apuntan a introducir una molécula conocida por el microorganismo, que se pueda insertar dentro de un proceso vital para este y así causar algún daño. Se ha determinado que el *Trypanosoma cruzi* emplea en sus procesos metabólicos el ergosterol como componente de la membrana celular, por lo cual se puede emplear este como vehiculo para introducir algún posible agente antiprotozoarios en dicho proceso, [7] cabe destacar que el ergosterol no es componente del ser humano. Esto vía la creación de una droga con posible actividad antiprotozoarios mediante la síntesis de derivados del ergosterol, que sea capaz de disminuir los efectos secundarios de los tratamientos conocidos o empleados hasta la actualidad.



Figura 1. *Triatoma infestans*, vector de *Trypanosoma cruzi*. [8]

1. MARCO TEORICO

1.1 Enfermedad de Chagas: Biología de *Trypanosoma cruzi*

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas en el hombre, es una zoonosis silvestre transmitida por la contaminación con la excreta de los vectores, principalmente los *Reduviidae* (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*) con consecuencias patológicas para los mamíferos infectados, sin excluir otras formas de transmisión como la transmisión transfusional, transmisión congénita y transmisión por trasplante de órganos ^[9]. El agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo del orden de los flagelados (*Trypanosoma cruzi*), descubierto por el Dr. Carlos Chagas en 1909, en Lassance, Estado de Minas Geraes, Brasil, examinando el contenido del intestino posterior de un insecto hematófago, conocido por los naturales con el nombre de "barbeiro". ^[10]

Taxonomicamente el *Trypanosoma cruzi* tiene la siguiente clasificación ^[11]:

- **Reino:** Protista
- **Subreino:** Protozoa
- **Filo:** Sarcomastigófora
- **Subfilo:** Mastigófora
- **Clase:** Zoomastigófora
- **Orden:** Cinetoplastida
- **Familia:** Trypanosomatidae
- **Sección:** Estercoraria
- **Genero:** *Trypanosoma*
- **Especie:** *cruzi*

La complejidad de los mecanismos de invasión de *Trypanosoma cruzi* ha dificultado el desarrollo de drogas y vacunas. El éxito de un tratamiento o mecanismos de inmunización eficaces, van a depender de la cepa del parásito. Esta complejidad la podemos justificar por los diferentes microambientes a los cuales el *Trypanosoma cruzi* se tiene que enfrentar para cumplir su ciclo biológico. ^[9] Dicho ciclo biológico, se produce en dos etapas, una etapa ocurre dentro del mamífero que sirve como hospedador, seguido por una que se lleva a cabo dentro del insecto que funciona como vector o viceversa.

- **Mamífero hospedador:**

- a. Los tripomastigotes metacíclicos (forma infectante) de *Trypanosoma cruzi* son liberados con las heces cuando el insecto succiona sangre del hospedador. Los tripomastigotes (de 15 a 25 micras de largo, poseen un flagelo unido a una membrana ondulada) entran al hospedador a través de pequeñas heridas o membrana mucosa como la conjuntiva.
- b. Los tripomastigotes penetran las células fagocíticas y no fagocíticas, normalmente alrededor de heridas, una vez dentro del citoplasma de la célula hospedadora los tripomastigotes pierden su flagelo y se transforman en amastigotes (forma reproductiva intracelular de 2 a 5 micras de largo de forma redondeada).
- c. Los amastigotes se dividen por escisión binaria con el citoplasma de la célula hospedadora y se multiplican para formar un pseudo quiste.
- d. Luego de 5 días los amastigotes se transforman en pequeños tripomastigotes en forma de "C", finalmente los pseudo quistes se rompen liberando los tripomastigotes.
- e. Algunos tripomastigotes circulan en la sangre e infectan más células hospedadoras, otros tripomastigotes circulando en la sangre pueden ser tomados cuando el insecto vector succiona sangre de un humano para continuar el ciclo.

- **Insecto vector:**

- f. El insecto vector se infecta por la alimentación con sangre que contiene circulando tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los tripomastigotes son ingestados y se mueven hacia la mitad del intestino del insecto.
- g. Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes (forma intravectorial replicativa de unas 20 micras de largo, poseen un largo flagelo) en el lumen del intestino del insecto. Los epimastigotes normalmente pasan desde la mitad del intestino hacia el final del mismo.
- h. Los epimastigotes se reproducen asexualmente por escisión binaria y migran hacia el recto del insecto donde une a la pared celular usando su flagelo.
- i. Los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos mientras están unidos a la pared celular del recto del insecto. Los tripomastigotes permanecen en la parte posterior del recto hasta que el insecto succione sangre de algún humano.
- j. Mientras el insecto succiona sangre de un humano, deposita las heces infectadas con tripomastigotes y estos entran al hospedador a través de pequeñas heridas o por las membranas mucosas. [9], [12], [13]

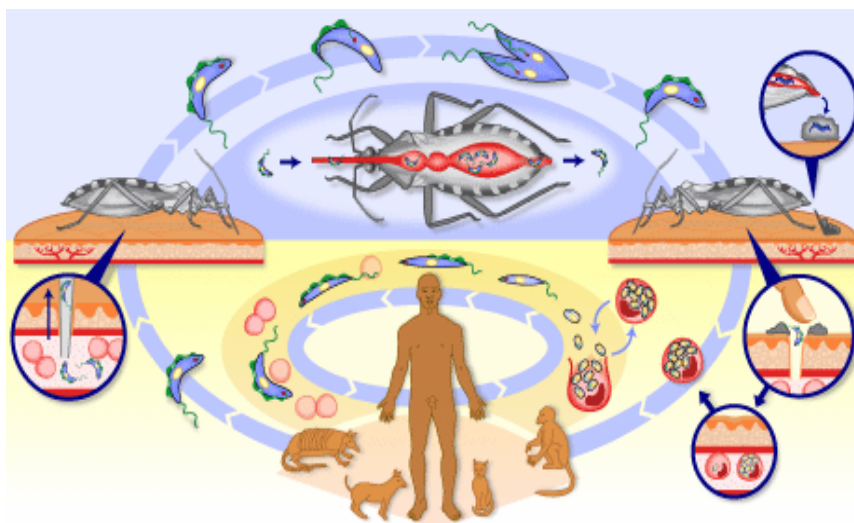


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. [13]

1.2 Quimioterapia de la enfermedad de Chagas:

Recientes estudios sobre la patogénesis de esta enfermedad han llevado a un consenso creciente en el sentido de que la eliminación del agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, de los pacientes infectados sería un requisito necesario y suficiente para frenar la evolución de la enfermedad en todas sus fases y evitar sus serias consecuencias a largo plazo. ^[14]

Desafortunadamente, los tratamientos específicos actualmente disponibles para el tratamiento de esta parasitosis poseen una eficacia limitada en la fase crónica y frecuentes efectos colaterales indeseables que pueden llevar a la interrupción del tratamiento. ^[14] Las drogas actualmente utilizadas para el tratamiento de la enfermedad son Nifurtimox (3-metil-N-[(5-nitro-2-furfuril)metilen]-4-tiomorfolinoamina-1,1-dióxido) derivado del Nitrofurano y Benznidazol (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida) un derivado de Nitroimidazol. La dosis recomendada en la fase aguda es de 8-10 mg/Kg/día para el Nifurtimox y 5 mg/Kg/día para Benznidazol, el promedio de duración del tratamiento está sobre los 60 días. Nifurtimox y Benznidazol son tripanocidas para todas las formas del parásito. Sin embargo, ellos causan efectos adversos que incluyen anorexia, náuseas, vómitos, síntomas maniacos o depresión del sistema nervioso central, vértigo y dermatitis. ^[15]

1.2.1 Drogas y sus mecanismos de acción:

La actividad anti *Trypanosoma cruzi* de ambos compuestos (Nifurtimox y Benznidazol) fue descubierta empíricamente hace como tres décadas. Nifurtimox actúa vía la reducción del grupo nitro para formar un radical nitro aniónico inestable, el cual reacciona para producir metabolitos oxigenados altamente tóxicos (anión superóxido, peróxido e hidroxilo). *Trypanosoma cruzi* ha mostrado ser deficiente en mecanismos de detoxificación para metabolitos oxigenados, particularmente para peróxido de

hidrogeno, y son así mas sensibles al estrés oxidativo de lo que lo son las células de vertebrados. Benznidazol muestra actuar por un mecanismo diferente (estrés reductivo), el cual envuelve la modificación covalente de macromoléculas como ADN, ARN, proteínas y posibles lípidos insaturados involucrando intermediarios de nitro reducción. Estos resultados indican que la actividad antiparasítica de estos compuestos esta sumamente ligada a su toxicidad hacia el vertebrado hospedador. ^{[14], [16]}

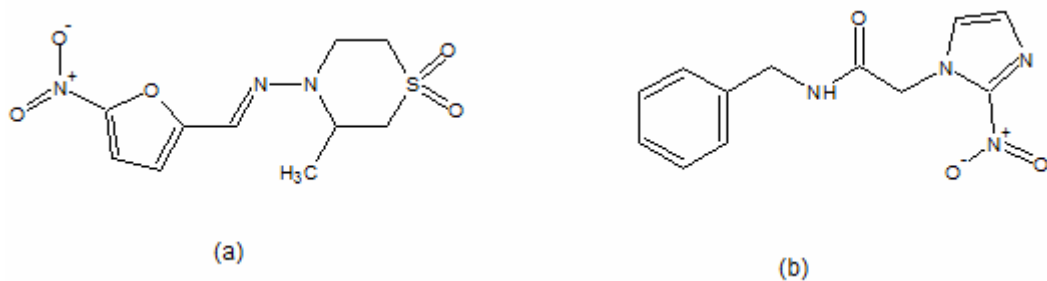


Figura 3. Estructura química de las drogas actualmente disponibles para la enfermedad de Chagas. (a) Nifurtimox, (b) Benznidazol. ^[16]

Ante la expectativa de una quimioterapia verdaderamente eficiente para combatir la enfermedad de Chagas, se han desarrollado compuestos que podrían convertirse en un tratamiento efectivo de esta enfermedad en un periodo de mediano a largo plazo (10 a 15 años). ^[14] Dentro de los nuevos enfoques para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se encuentran:

1.2.1.1 Inhibidores de la biosíntesis de Ergosterol:

Estudios llevados a cabo en las dos ultimas décadas han demostrado consistentemente que el *Trypanosoma cruzi*, como la mayoría de los hongos y levaduras patógenas, requieren de esterol para mantener su viabilidad y capacidad de proliferación a lo largo de todo su ciclo de vida, además los inhibidores específicos

de la biosíntesis de ergosterol son potentes agentes antiproliferativos contra este parásito, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, varios estudios han conseguido que dichos inhibidores comercialmente disponibles, como el Ketoconazol e Itraconazol, son incapaces de erradicar el *Trypanosoma cruzi* de humanos o animales con infecciones crónicas o detener el progreso de la dolencia, indicando que su actividad *in vivo* es tripanostática, no tripanocida.

Otros triazoles como TAK-187 y Ravuconazol, también han demostrado ser tripanocidas, tanto *in vitro* como *in vivo*. TAK-187 es un triazol con largos tiempos de vida media en varios mamíferos y una actividad antimicótica de amplio espectro, que tiene una potente actividad anti *Trypanosoma cruzi* *in vitro*, es capaz de curar infecciones agudas y crónicas en ratones, aun cuando la cepa infectante es refractaria al tratamiento con Nifurtimox o Benznidazol.

Ravuconazol es un triazol desarrollado como antimicótico sistémico con una muy potente actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro*, pero su actividad *in vivo* en modelos murinos fue limitada debido a inadecuadas propiedades farmacocinéticas de la droga en ratones, sin embargo, tales resultados no niegan su potencial utilidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas humana, pues la concentración mínima inhibidora del crecimiento de los amastigotes intracelulares por este compuesto es de 1.000 a 5.000 veces mas baja que los niveles obtenidos en plasmas a dosis terapéuticas contra hongos en humanos.

UR-9825 es otro potente inhibidor de la C14 α demetilasa de esteroides en hongos y protozoarios y tiene una notable actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro*. Aunque su corto tiempo de vida media (< 0,5 h) en ratones no permitió evaluar su actividad en modelos murinos de la enfermedad. La mayoría de estos compuestos han completado estudios de farmacocinética y seguridad en humanos, como paso previo a su desarrollo clínico como antimicóticos. ^[14]

Un reciente desarrollo asociado a esta línea, es el descubrimiento del anti arrítmico Amiodarona, la droga mas frecuentemente usada para el tratamiento sintomático de pacientes crónicos de enfermedad de Chagas con compromiso cardiaco, tiene acción directa contra *Trypanosoma cruzi* y actúa sinérgicamente con inhibidores de biosíntesis de ergosterol. Estudios sobre el mecanismo de acción de la droga indicaron que la Amiodarona afecta la homeostasis de calcio del parasito, pero también inhibe la síntesis de ergosterol a nivel de la lanosterol sintetasa (oxidescualeno ciclasa).
[14]

Otro prometedor grupo de inhibidores de la biosíntesis de ergosterol, son los inhibidores de la escualeno sintetasa. Esta enzima cataliza el primer paso específico para la síntesis de esteroides y ha sido el objeto de un gran número de estudios, como un potencial blanco para nuevos agentes hipocolesterolémicos.

Ulteriores estudios demostraron que los compuestos E5700 y ER-119884, dos nuevos derivados quinuclidínicos inhibidores de la escualeno sintetasa que están siendo desarrollados como agentes reductores de colesterol y triglicéridos en humanos. Tienen muy potente y selectiva actividad anti *Trypanosoma cruzi* in vitro y uno de ellos (E5700), administrado por vía oral, fue capaz de inducir supresión completa de la parasitemia y conferir protección total contra la muerte en un modelo murino de enfermedad de Chagas fulminante. [14]

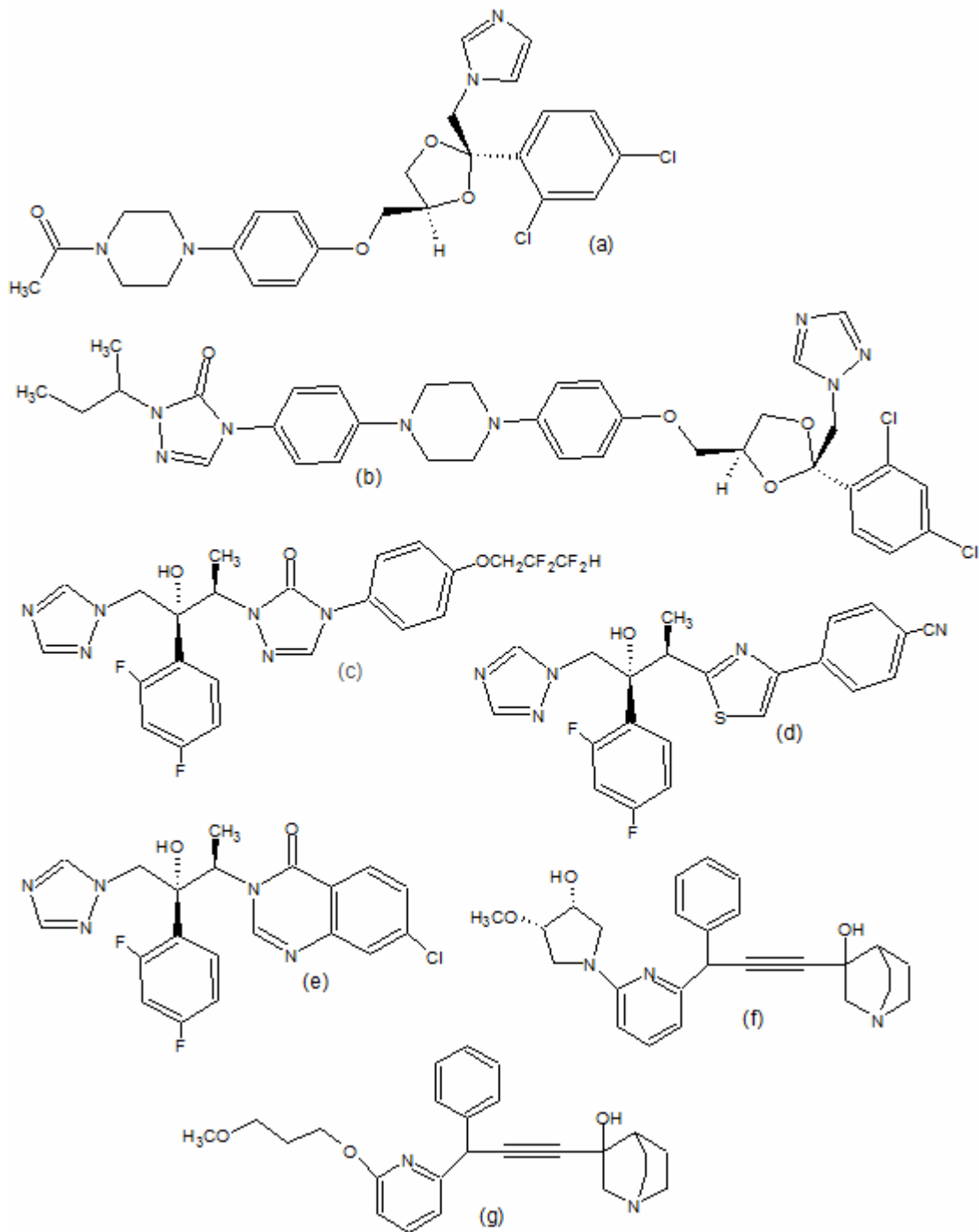


Figura 4. Estructura química de los compuestos inhibidores de la biosíntesis de ergosterol. (a) Ketoconazol, (b) Itraconazol, (c) TAK-187, (d) Ravuconazol, (e) UR-9825, (f) E5700, (g) ER-119884. ^[14]

1.2.1.2 Inhibidores de cisteína-proteasa:

Trypanosoma cruzi contiene elevadas cantidades de una cisteína-proteasa análoga a la cathepsina L, que ha sido denominada cruzipaina y es responsable de la mayor parte de la actividad proteolítica de este parásito en todos los estados de su ciclo de vida. Inhibidores selectivos de esta proteasa son capaces de bloquear la proliferación tanto de la forma extracelular (epimastigotes) como de los amastigotes intracelulares, así como de impedir la metacicloogénesis (transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos), lo que indica que la proteína tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del parásito. La estructura tridimensional de la proteína recombinante, en ausencia y presencia de inhibidores, ha sido determinada usando cristalografía de rayos X y a partir de la misma y de consideraciones sobre el mecanismo de la enzima, se han desarrollado inhibidores específicos como la N-metil-piperazina-urea-F-hF-vinyl-sulfona-fenil, también conocida como K-777. [14]

Este compuesto es capaz de reducir dramáticamente la parasitemia e incrementar la supervivencia en modelos murinos de la enfermedad de Chagas, con baja toxicidad. Sin embargo, no se han publicado hasta ahora reportes que demuestren que este tipo de compuestos sean capaces de inducir cura parasitológica radical en modelos animales. [14]

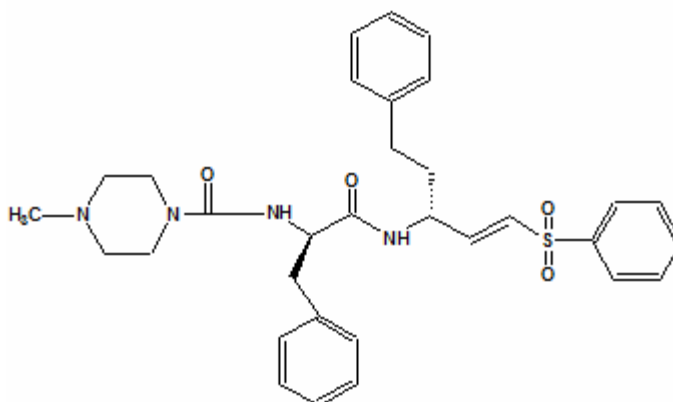


Figura 5. Estructura química de K-777, inhibidor de cisteína-proteasa. [14]

1.2.1.3 Inhibidores del metabolismo de pirofosfato:

Los parásitos del orden Cinetoplastida, contienen organelas especializadas en el almacenamiento de calcio y polifosfatos, denominados acidocalcisosmas, no presentes en la mayoría de las células de vertebrados. ^[14]

La toma y descarga de Ca^{2+} hacia y desde la matriz del acidocalcisoma es controlada por una serie de mecanismos, que incluyen una Ca^{2+} ATPasa, un intercambiador Na^+/H^+ , bombas de protones energizadas por ATP y pirofosfato inorgánico, así como por pirofosfatasas específicas. Polifosfatos de cadena corta, están involucrados en la respuesta de este organismo al stress osmótico, así como en el mantenimiento del status energético del parásito. Los bisfosfonatos, análogos metabólicamente inertes del pirofosfato inorgánico, se acumulan selectivamente en *Trypanosoma cruzi* y otros tripanosomatídeos y pueden inhibir enzimas esenciales del parásito involucradas en el metabolismo de pirofosfato inorgánico y orgánico, como la farnesil-difosfato sintetasa, escualeno sintetasa o bombas de protones dependientes de pirofosfato inorgánico. ^[14]

Entre esos compuestos, los N-alquil-bisfosfonatos, inhibidores específicos de la farnesil-difosfato sintetasa que son ampliamente usados actualmente en humanos para el manejo de problemas de resorción ósea como la osteoporosis y la enfermedad de Paget, tienen también una potente y selectiva acción contra *Trypanosoma cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, aunque se ha reportado que el Pamidronato puede inducir cura parasitológica radical en un modelo murino de leishmaniasis cutánea, no se reportaron curas parasitológicas completas en un estudio con Risedronato en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda. ^[14]

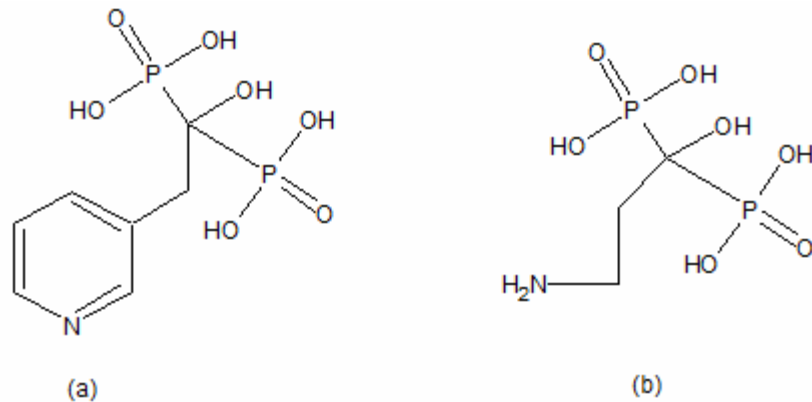


Figura 6. Inhibidores del metabolismo de pirofosfatos. (a) Risedronato, (b) Pamidronato. ^[14]

1.2.1.4 Inhibidores de la captura de purinas:

Los parásitos tripanosomatídeos son organismos absolutamente deficientes en la síntesis de novo de las purinas, por lo que deben obtener estos compuestos esenciales del hospedero o medios de cultivo. Una enzima esencial en este proceso es la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), un blanco bioquímico validado en estos organismos. El alopurinol (4-hidroxi-pyrazol-(3,4d)-pirimidina) ha sido usado por décadas en humanos para el tratamiento de la gota, pues es transformado en vertebrados al oxipurinol, que es un potente inhibidor de la xantina oxidasa. En Tripanosomatídeos, que no tienen xantina oxidasa, el alopurinol actúa como un análogo de purinas y es incorporado, vía HGPRT, a los ácidos nucleicos, lo que conlleva a un bloqueo secuencial en la síntesis de ADN, ARN y proteínas. ^[14]

Se ha demostrado que este compuesto es un potente inhibidor del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* in vitro, pero in vivo se ha encontrado que hay fuertes diferencias en la susceptibilidad de diferentes cepas del parásito a la droga. La eficacia del alopurinol en el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas en humanos ha sido controversial. ^[14]

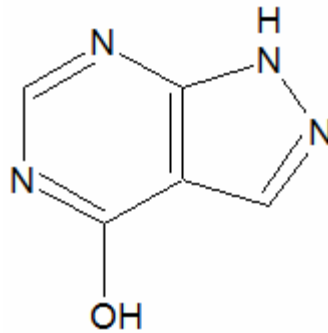
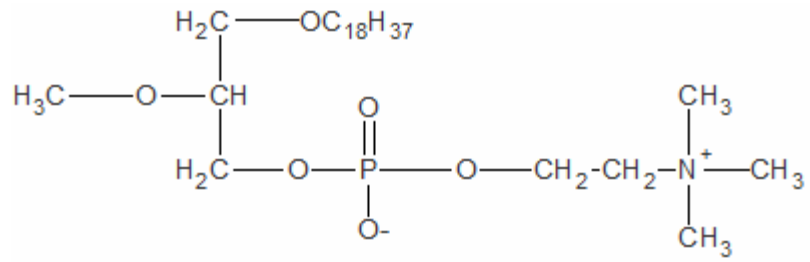


Figura 7. Estructura química de Alopurinol, inhibidor de la captura de purinas. ^[16]

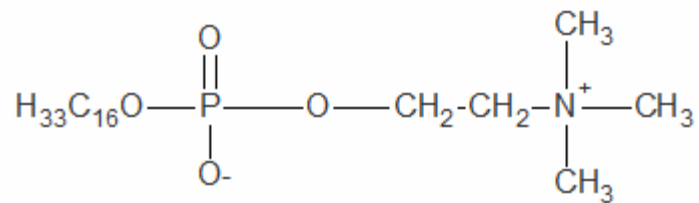
1.2.1.5 Inhibidores de la síntesis de fosfolípidos:

Los análogos de lisofosfolípidos (ALP) incluyen una amplia gama de compuestos metabólicamente estables, entre los cuales se encuentran alquil-fosfocolinas como la hexadecil-fosfocolina (miltefosina) y alquil-glicero-fosfocolinas como el ET-18-OCH₃ (edelfosina) y la ilmofosina. Estos compuestos han estado en desarrollo por 25 años como agentes anticancerosos, pero también han demostrado ser potentes y específicos agentes antiparasitarios, particularmente contra tripanosomatídeos como *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*, in vitro e in vivo. ^[14]

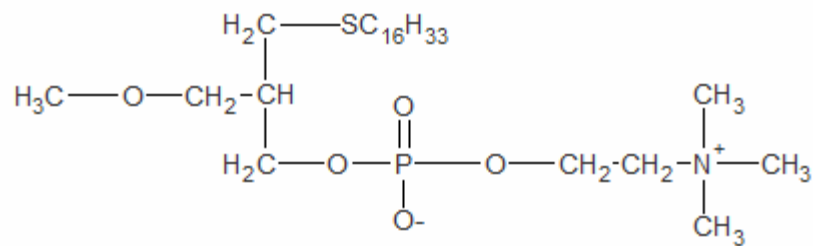
El mecanismo de acción de estos compuestos es complejo, pero la información disponible indica que un mecanismo primario es la inhibición selectiva de la síntesis de fosfatidil-colina, que en estos organismos ocurre por una vía metabólica (N metilación de la fosfatidil-etanolamina o ruta de Brenner-Greenberg) diferente a la usada en mamíferos, donde el precursor es CDP-colina (ruta de Kennedy). ^[14]



(a)



(b)



(c)

Figura 8. Estructura química de inhibidores de la síntesis de fosfolípidos.

(a) Edelfosfina, (b) Miltefosfina, (c) Ilmofosfina. ^[14]

1.3 Blancos quimioterapéuticos bioquímicos de *Trypanosoma cruzi*:

Para lograr el desarrollo de una quimioterapia efectiva contra la enfermedad de Chagas se necesita conocer la bioquímica y la ultraestructura de *Trypanosoma cruzi* y del hospedador, para así señalar actividades metabólicas que puedan ser inhibidas y constituirse en blancos quimioterapéuticos. ^[9]

1.3.1 **Superficie celular:** en la superficie celular de los tripanosomatides se consideran tres estructuras fundamentales: el glicocálz, la bicapa lipídica y el citoesqueleto. ^[9]

1.3.1.1 **El glicocáliz:** se encuentra como una capa fina que recubre los parásitos que esta compuesta por glicoconjugados uniformemente distribuidos en el cuerpo basal y el flagelo. Los glicoconjugados gp90 y gp82 constituyen antígenos de superficie que por sus características estructurales pueden ser consideradas miembros de gp85, familia sialidasa que son expresadas genéticamente en las formas tripomastigotes metacíclicos presentes en el tracto digestivo del insecto vector. Las glicoproteínas gp90 y gp82 están involucradas en la penetración del parásito en las células hospedadoras y tiene importancia inmunológica. ^[9]

1.3.1.2 **La bicapa lipídica:** es la estructura del parásito de mayor interés para la búsqueda de blancos quimioterapéuticos, ya que poseen los blancos potenciales proteicos intercalados que están presentes en todas las formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*, dichas proteínas se encuentran distribuidas uniformemente en la membrana plasmática. ^[9]

Otros blancos potenciales serían los esteroides, los cuales se ubican en la parte externa de la membrana. Esta estructura esteroidea se inserta en la bicapa de fosfolípidos, con el hidroxilo libre interactuando con las cabezas polares de los fosfolípidos. En los organismos que poseen esteroides como el ergosterol y el sitosterol

con la cadena lateral alquilada, se asocia con la fluidez de la bicapa y la permeabilidad de algunos metabolitos de la misma. ^[9]

1.3.1.3 El citoesqueleto: el citoesqueleto de los tripanosomatides esta formado por una capa de microtúbulos localizados por debajo de la membrana plasmática (microtúbulos subpeliculares), cuyo estudio realizado por diferentes técnicas micrográficas muestran puentes de uniones entre los microtúbulos presentes en la membrana plasmática y en las cisternas del retículo endoplasmático. De manera que el citoesqueleto de los tripanosomatides es muy particular, sus componentes presentan cierta similitud con los del hospedador mamífero cuyo citoesqueleto posee filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. ^[9]

1.3.2 La vía endocítica: el *Trypanosoma cruzi* posee la capacidad de tomar y almacenar proteínas exógenas en organelos especiales: los reservosomas, los cuales son movilizados bajo condiciones de estrés nutricional. La alta actividad de las hidrolasas y particularmente de las proteasas como la cruzipaína que se encuentra en el reservosoma, cuando estas son inhibidas bloquean la diferenciación de los epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos y la invasión de los parásitos a la célula hospedadora. ^[9]

1.3.3 El complejo cinetoplasto-mitocondria (K-M): el cinetoplasto tiene una forma redondeada por debajo de la base del flagelo y corresponde a un ADN extranuclear condensado dentro de una región bien definida de la mitocondria. El cinetoplasto constituye el 30% del ADN total de la célula, constituido por maxicírculos de ADN que se presentan como una malla característica de la mitocondria y minicírculos de ADN. Estos minicírculos de ADN son altamente heterogéneos en secuencias de pares de bases, permitiendo distinguir diferentes cepas y clones de las especies. ^[9]

1.3.4 **El glicosoma:** la vía glicolítica no está regulada en los puntos de control clásicos (hexoquinasa y fosfofructoquinasa) por los intermediarios de enzimas glicolíticas y efectores, si no por la enzima fosfoglicerato quinasa contenida en el glicosoma. El glicosoma es un organelo que puede ser redondeado con un diámetro de 0,3 μm o alargado de 2,8 μm , pertenece al grupo de los peroxisomas presentando catalasa en algunas especies y enzimas involucradas en la oxidación de los aminoácidos y lípidos. [9]

1.3.5 **El flagelo:** el flagelo de los tripanosomatídeos está involucrado en dos funciones biológicas importantes: movimiento celular y unión del protozoario a la superficie celular del hospedador vertebrado y al intestino del hospedador invertebrado. Además está presente el cuerpo paraflagelar como una estructura axial con un complejo arreglo de estructura filamentosa de mayor naturaleza proteica. [9]

1.3.6 **El núcleo:** el núcleo en estos organismos no ha sido estudiado con detalle. Usando microscopía electrónica de transmisión se ha observado que en células en interfase presenta cromatina localizada en la periferia nuclear y un nucleolo localizado al centro. Al comienzo de la división la cromatina se dispersa y el nucleolo desaparece, apareciendo el núcleo menos denso y de apariencia homogénea. [9]

1.3.7 **El metabolismo del tripanotión:** el glutatión, L- γ -glutamilcisteinil-glicina, un tripéptido conteniendo un grupo sulfhídrico, está presente en altas concentraciones (5 mM) en todas las células eucariotas, donde una de las principales funciones es la de proteger contra los daños resultantes del estrés oxidativo característicos del metabolismo aeróbico. El metabolismo del glutatión en tripanosomas varía significativamente con respecto a las células de los mamíferos, en los tripanomastídeos, del 10% al 30% del mismo se encuentra como péptido libre, siendo el resto conjugado mediante dos reacciones ATP dependientes, formando los isómeros N¹-glutathionil espermidina y N⁸-glutathionil espermidina, denominado tripanotión. [9]

1.4 Esteroides y Esteroles:

Con el termino "esteroides", se denomina a un grupo de sustancias que poseen el núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno, que puede o no presentar una cadena lateral en C-17, así como los metilos angulares en C-10 y C-13. Aunque esta clasificación puede traer confusiones en cuanto al tipo de sustancias presentes, pues no indica diferencias estereoquímicas en la fusión de los anillos o en la cadena lateral. Se designa con este término a los derivados al menos en principio, del lanosterol y por ello es frecuente encontrar incluidos en este grupo a los ácidos cólicos, espirostanos, bufanólidos y cardanólidos, así como otros esteroides: furostanos, ergostanos y estigmastanos. Sin embargo, se prefiere designar como esteroides a los derivados de pregnano, androstano, estrano y gonano, y a los restantes como "esteroles". ^[18]

Debido a la importancia farmacológica de estos compuestos, pues comprenden sustancias vitales: hormonas sexuales, vitamina D, hormonas corticoides, compuestos cardiotónicos, antibióticos y toxinas, se han desarrollado un gran numero de análogos sintéticos con intenciones, entre otras cosas, suplantar, modificar o comprobar la estructura de aquellos aislados de la naturaleza. ^[18]

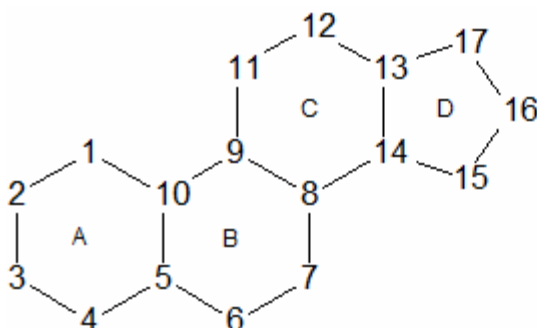


Figura 9. Núcleo de ciclopentano-perhidrofenantreno. ^[19]

1.4.1 Ergosterol: Biosíntesis y relación con la enfermedad de Chagas.

El ergosterol es un esteroles perteneciente a la familia de los micosteroles, de fórmula molecular $C_{28}H_{44}O$, de peso molecular 369,66 g/mol y de punto de fusión 170 °C, es soluble en alcoholes, éter y acetona e insoluble en agua. [20]

Es un componente lipídico de la membrana sobre el cual actúa la mayoría de los fármacos antimicóticos. Es el esteroles que predomina en las células fúngicas y de protozoarios, entre sus funciones, da fluidez e integridad a la membrana, permite la función apropiada de muchas enzimas unidas a ella y, al favorecer la función de la quitina sintetasa, permite el crecimiento y la división celular. Las levaduras y los hongos filamentosos presentan, generalmente células hijas, por lo que es preciso que la membrana sea bastante dinámica. [21]

Los compuestos inhibidores de la biosíntesis de ergosterol son los más prometedores enfoques para el desarrollo de más potentes y seguras drogas anti *Trypanosoma cruzi*, al igual que muchos hongos y levaduras, estos protozoarios requieren específicos esteroides 24-alquilados para la viabilidad y proliferación de las células en todas las etapas de su ciclo de vida y no pueden usar el abundante suministro de colesterol presente en los mamíferos hospedadores. [22] Por esta razón la alteración o deficiencia de ergosterol en la membrana celular traería como consecuencia problemas en las funciones metabólicas y por consiguiente en la sobrevivencia de los protozoarios.

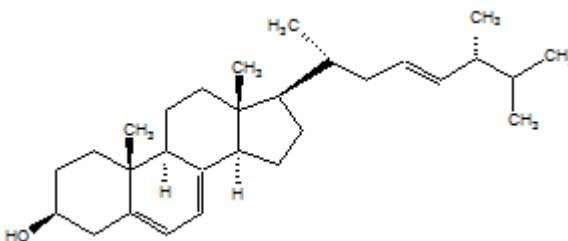


Figura 10. Estereoquímica del ergosterol. [23]

La biosíntesis del ergosterol esta compuesta por una serie de etapas, el primer paso es la síntesis del ácido mevalónico (4) a partir de Acetil-CoA (1), esta es una condensación del tipo Claisen, la cual ocurre entre dos moléculas de Acetil-CoA para formar una molécula de Acetoacetyl-CoA (2) mediada por la enzima Acetoacetyl-CoA tiolasa (i). Esto es seguido por la incorporación de una segunda molécula de Acetil-CoA en un proceso del tipo aldol para producir (S)-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (3), bajo el control de Hidroxi-metilglutaril-CoA sintasa (ii). Luego ocurre la reducción de Hidroxi-metilglutaril-CoA por medio de (S)-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (iii) para así formar el ácido mevalónico (4). Esta reacción es irreversible en condiciones fisiológicas y así constituye una clave en la biosíntesis de esteroides. [24]

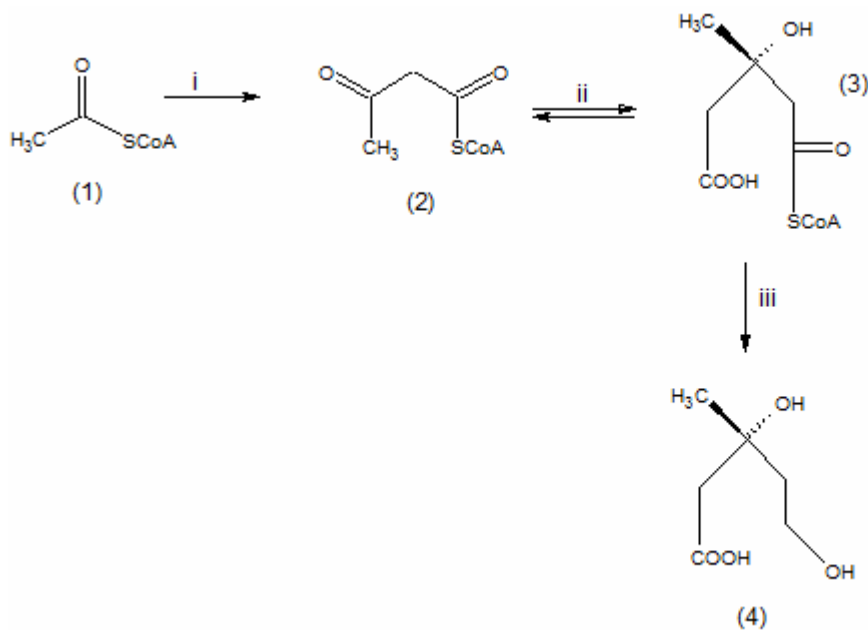


Figura 11. Formación del ácido mevalónico. [24]

El Segundo paso es la conversión del ácido (R)-mevalónico en isopentil pirofosfato (7), donde el alcohol primario en el carbono 5 requiere de tres reacciones de fosforilación consecutivas, las cuales proceden de la siguiente manera; obtención del ácido (3R)-mevalónico-5-fosfato (5) y luego el ácido (3R)-mevalónico-5-pirofosfato (6),

los cuales son catalizados por las enzimas mevalonato quinasa (iv), mevalonato-5-fosfato quinasa (v) y mevalonato-5-pirofosfato descarboxilasa (vi), para así formar el isopentil pirofosfato (7). [24]

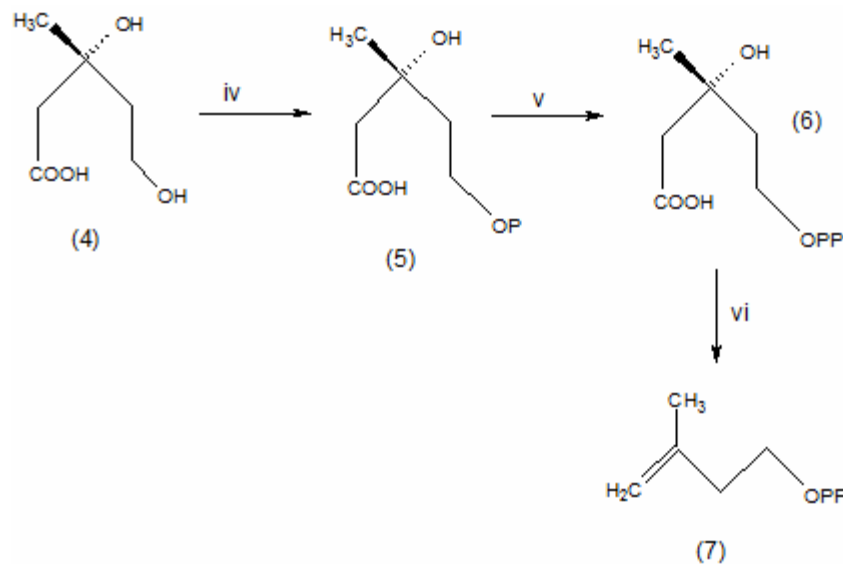


Figura 12. Obtención de isopentil pirofosfato a partir de ácido mevalónico. [24]

El tercer paso es la formación de escualeno epóxido a partir de isopentil pirofosfato, la enzima dimetilalil difosfato isomerasa (vii) cataliza el rearrreglo reversible 1,3-alílico antara facial del sustrato homoalílico (7) a su isomero alílico, dimetilalil pirofosfato (8). Luego la enzima farnesil pirofosfato sintasa (viii y ix) cataliza la biosíntesis de farnesil pirofosfato (11), primero ocurre la condensación de la cabeza de isopentil pirofosfato (7) con la cola de dimetilalil pirofosfato (8) para formar un compuesto C₁₀, geranil pirofosfato (9) el cual sirve como sustrato alílico para una segunda condensación con isopentil pirofosfato (7) para producir un compuesto C₁₅, farnesil pirofosfato (10). Seguidamente se produce la síntesis del escualeno (12), este se produce en dos etapas, primero la condensación de dos moléculas de farnesil pirofosfato (10), (cabeza con cabeza) para formar preescualeno pirofosfato (11) el cual

seguidamente sufre un rearrreglo reductivo, requiriendo para esto una molécula de NADPH. Ambos pasos ocurren bajo la dirección de la enzima escualeno sintasa (x y xi).

[24]

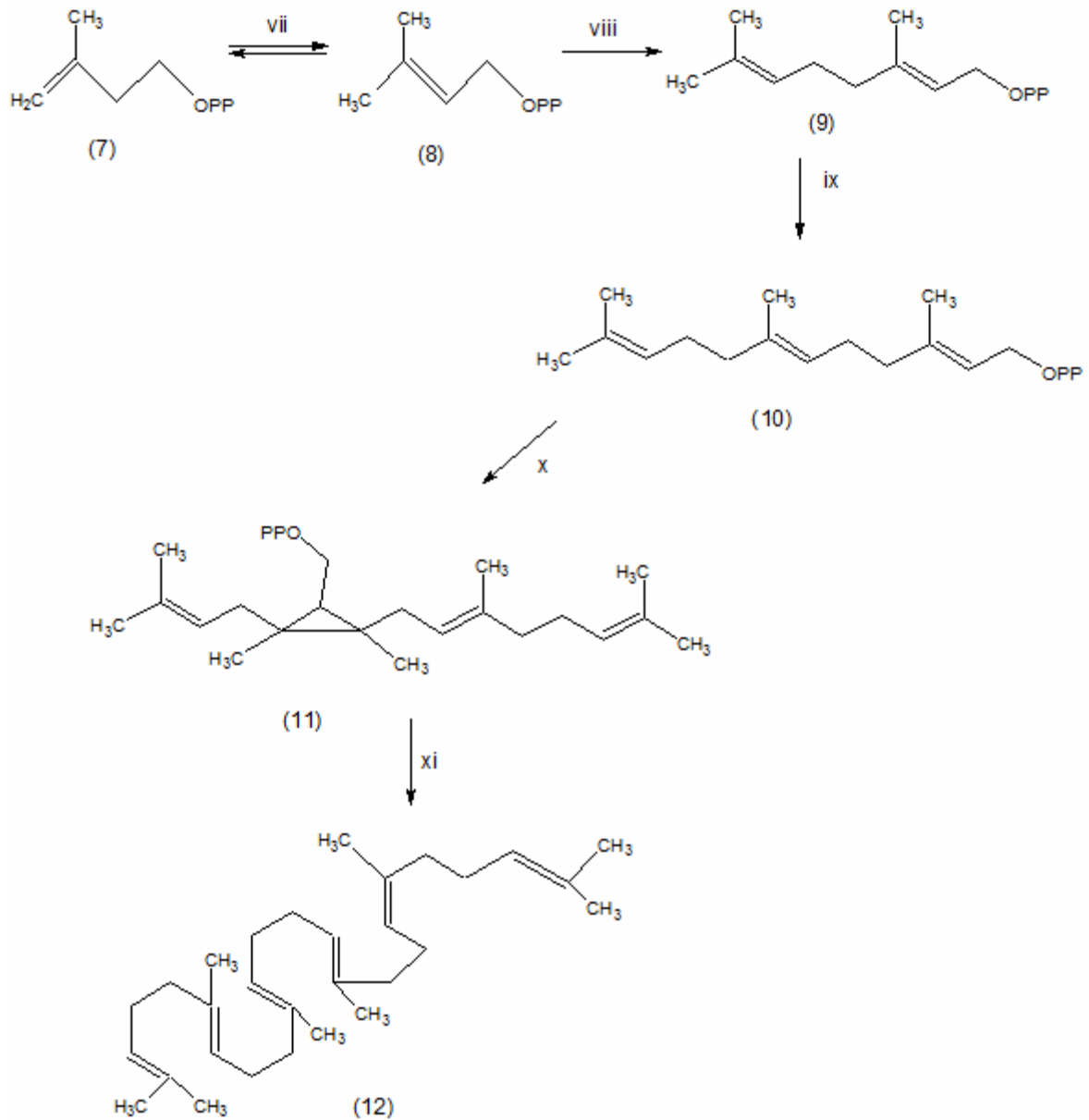


Figura 13. Formación de escualeno. [24]

El cuarto paso es la conversión de escualeno a lanosterol, donde inicialmente el escualeno pasa a (3S)-2,3-oxidoescualeno (13) catalizado por la enzima escualeno monooxigenasa (xii) donde seguidamente ocurre la ciclación de este último mediante la enzima oxidoescualeno-lanosterol ciclasa (xiii) para producir el lanosterol (14). [24]

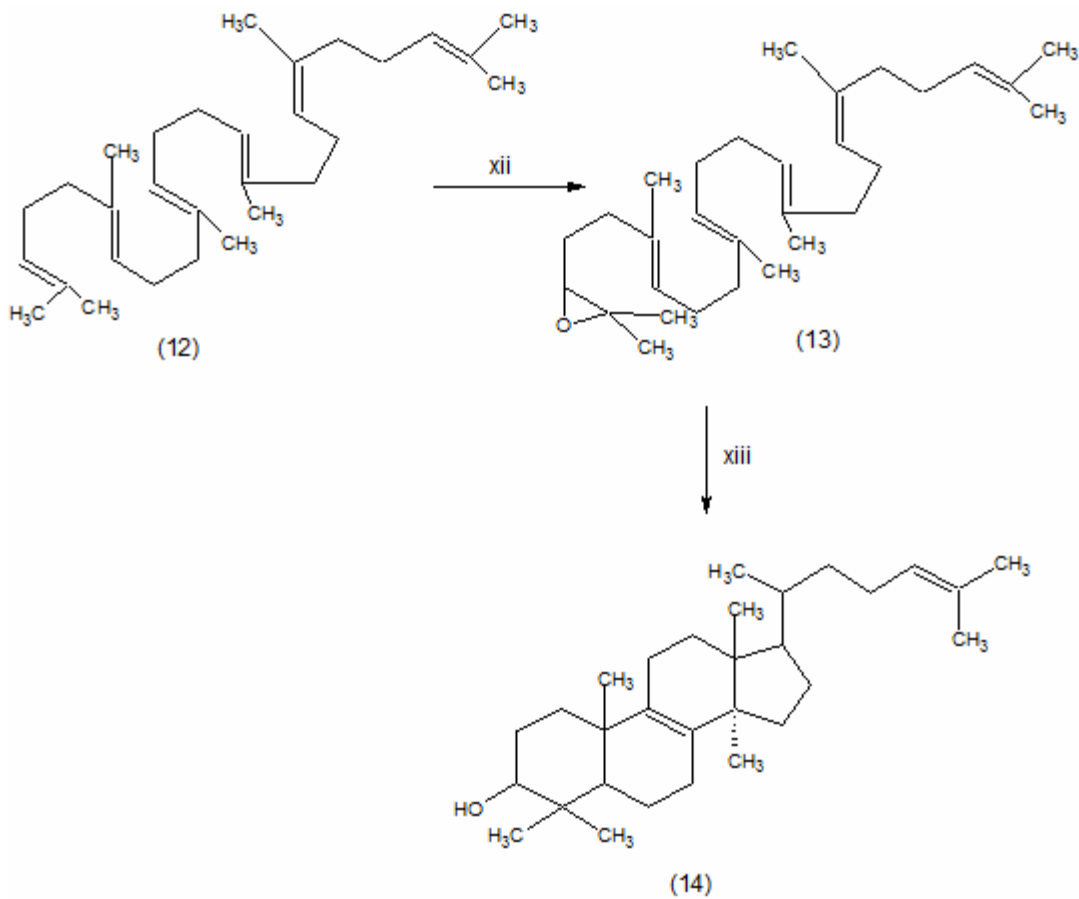


Figura 14. Conversión de escualeno a lanosterol. [24]

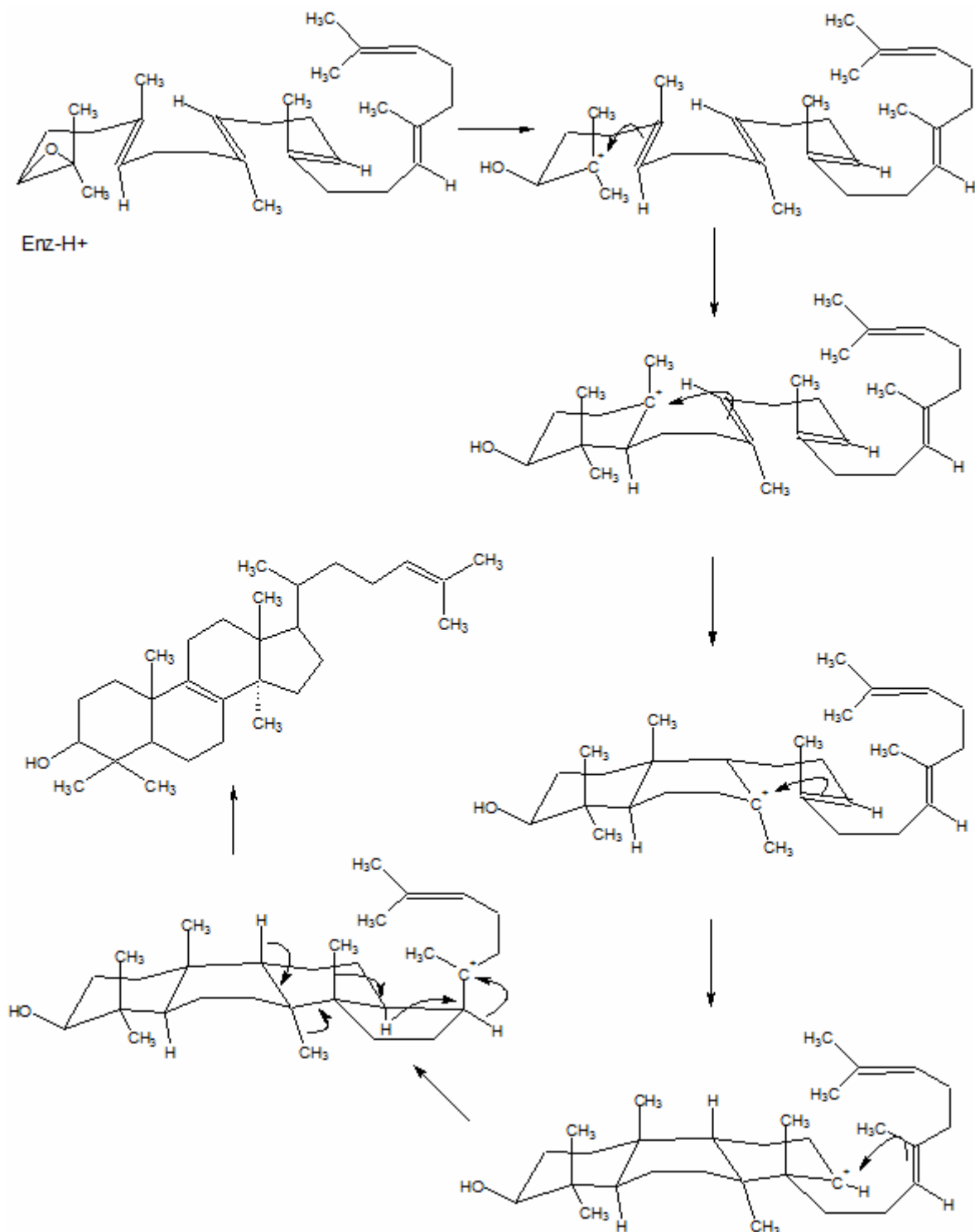


Figura 15. Ciclación postulada de (3S)-2,3-oxidoesqualeno a lanosterol. [24]

En el último paso interviene la enzima lanosterol 14 α -demetilasa (xiv), es la primera enzima encontrada en la transformación del lanosterol (14) para obtener (15), luego ocurre la reducción del enlace Δ^{14} para así formar el 4,4-dimetilzimosterol (16) mediante la enzima Δ^{14} -reductasa (xv), posteriormente por medio de la enzima C-4 esterol metil oxidasa (xvi y xvii) se produce el 4-dimetilzimosterol (17) y el zimosterol (18), este último es transformado por $\Delta^{24(25)}$ -esterol metil-transferasa (xviii) a fecosterol (19) e inmediatamente ocurre una isomerización por medio de $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomerasa (xix) para producir (20). El Δ^7 doble enlace es convertido a $\Delta^{5,7}$ sistema dieno en el anillo B por medio de Δ^7 -esterol 5-desaturasa (xx) para formar (21). Los dos últimos pasos en la biosíntesis del ergosterol son mediados por las enzimas Δ^{22} -desaturasa (xxi) y por $\Delta^{24(28)}$ -esterol reductasa (xxii), las cuales entre ellas primero introducen un nuevo enlace en la cadena para formar (22) y luego remueven el $\Delta^{24(28)}$ doble enlace para así producir ergosterol (23).^[24]

La mayoría de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (ver figura 4), incluyendo Benznidazol (ver figura 3) contienen los anillos imidazol o/y triazol y se clasifican como las drogas azoles. El principal modo de acción de estas drogas como agentes antiprotozoarios y antifúngicos se considera que son inhibidores de las enzimas esterol C-24 metil-transferasa o C-14 α desmetilasa, inhibiendo así la biosíntesis del ergosterol.

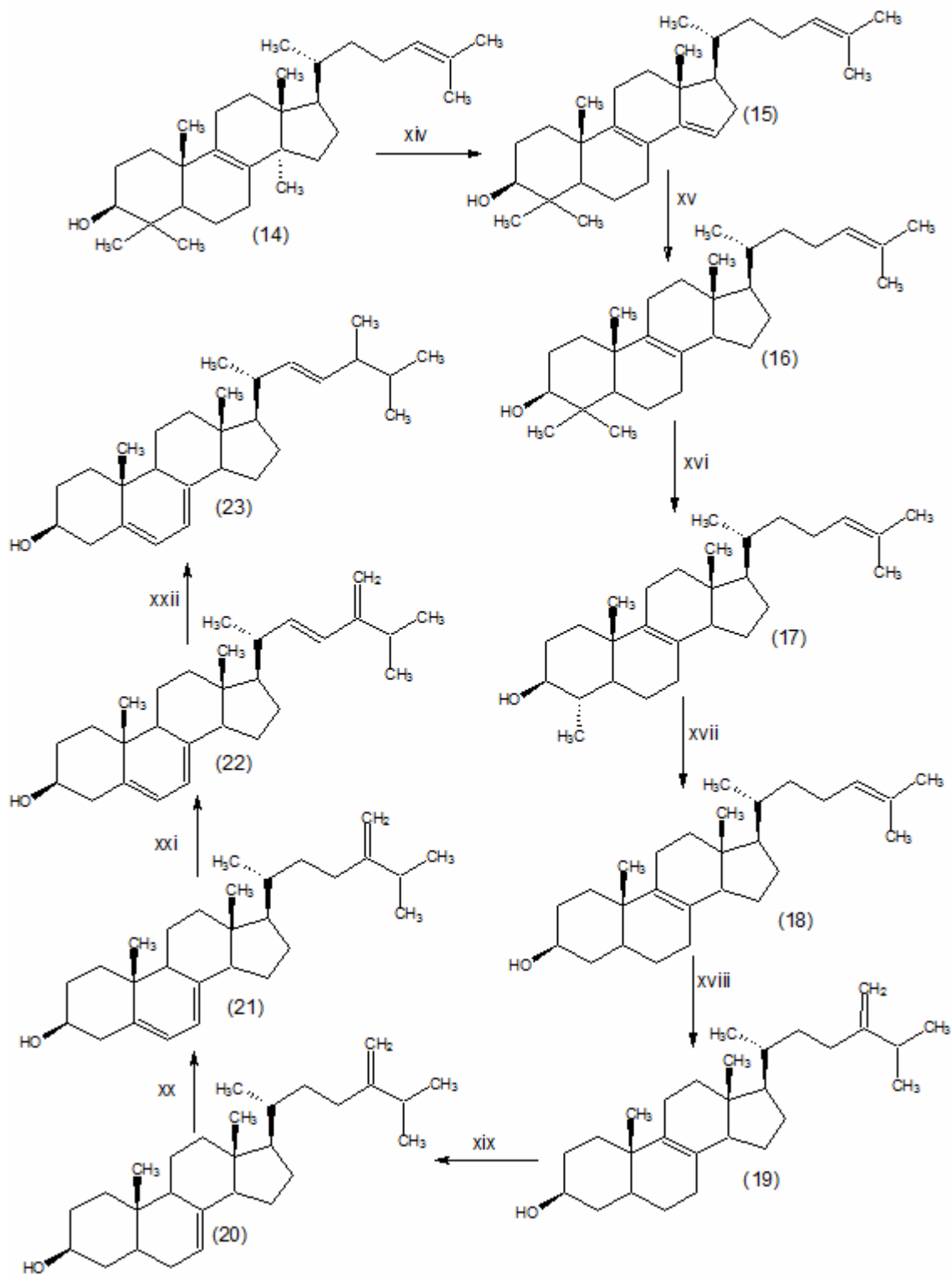


Figura 16. Conversión de lanosterol a ergosterol. [24]

1.4.2. Colesterol:

Su estructura fue definitivamente establecida por difracción de rayos X en 1952. Se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos animales, especialmente en el tejido nervioso, glándulas suprarrenales, yema de huevo y es el componente principal de los cálculos biliares. ^[18] El nombre de colesterol proviene del griego *kole* (bilis) y *stereos* (sólido), por haberse identificado por primera vez en los cálculos de la vesícula biliar por Michel Eugène Chevreul quien le dio el nombre de "colesterina". ^[25]

El colesterol está constituido por un núcleo esteroidal de ciclopentano-perhidrofenantreno, que presentan varias sustituciones:

1. Dos radicales metilos en las posiciones C-10 y C-13.
2. Una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17.
3. Un grupo hidroxilo en la posición C-3.
4. Una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6. ^[25]

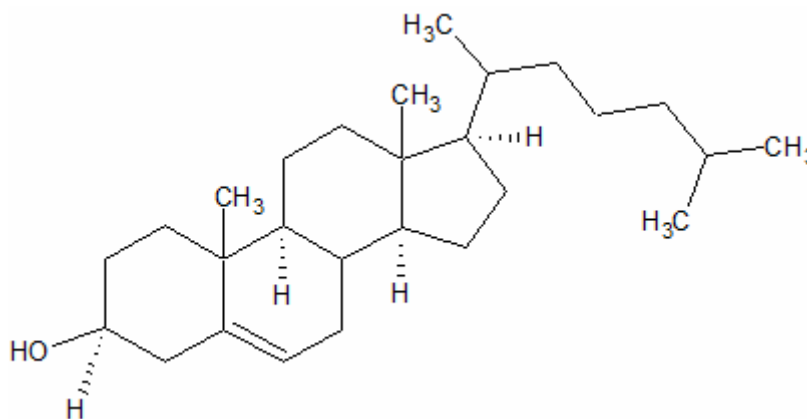


Figura 17. Estructura química del colesterol. ^[18]

El colesterol es imprescindible para la vida por sus numerosas funciones: Precursor de la vitamina D, Precursor de las hormonas sexuales, Precursor de las hormonas corticoesteroidales, Precursor de las sales biliares, Precursor de las balsas de lípidos y función estructural: el colesterol es un componente muy importante de las membranas plasmáticas de los animales (en general, no existe en los vegetales). Aunque el colesterol se encuentra en pequeña cantidad en las membranas celulares, en la membrana citoplasmática lo hallamos en una proporción molar 1:1 con relación a los fosfolípidos, regulando sus propiedades físico-químicas, en particular la fluidez. Sin embargo, el colesterol se encuentra en muy baja proporción o está prácticamente ausente en las membranas subcelulares. [25]

El colesterol que su vez es el precursor de los demás esteroides fisiológicamente importantes, es biosintetizado a partir de lanosterol, mediante la pérdida de los dos metilos en C-4, pérdida del metilo en C-14, reducción del doble enlace de la cadena lateral y migración del doble enlace endocíclico. [18]

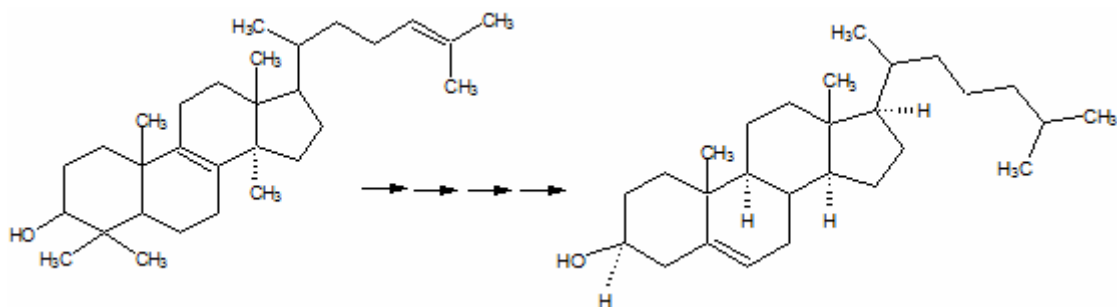


Figura 18. Obtención de colesterol a partir de lanosterol. [18]

1.5. Reacciones de Oxidación:

Los químicos orgánicos asocian la oxidación con la separación de hidrogeno y con la formación de un nuevo enlace, bien entre dos átomos ya presentes o entre un átomo inicial y un átomo de oxígeno. Otra manera de enfocar la oxidación se basa en la perdida de electrones. ^[26] Sin embargo, en las moléculas orgánicas resulta a veces complicado establecer si un carbono gana o pierde electrones en los productos finales de una reacción, por ello se prefiere determinar si la molécula cambia su estado de oxidación. ^[27]

En las reacciones de oxidación de rompen dos enlaces: X-H y C α -H y se forman enlaces múltiples entre C α y X. Estas reacciones son típicas de alcoholes, tioles y fenoles. ^[27]



1.5.1 Oxidación de alcoholes:

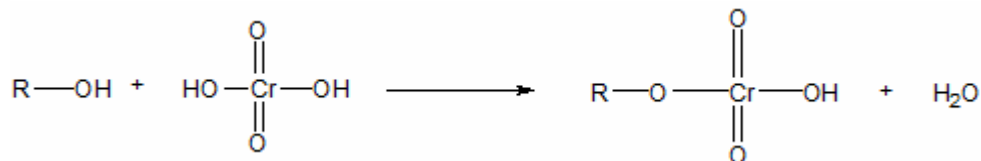
Los alcoholes pueden ser oxidados a compuestos carbonílicos: un alcohol secundario dará una cetona y uno primario, un aldehído. Con la mayoría de los agentes oxidantes los aldehídos son mas reactivos que los alcoholes hacia la oxidación por lo que usualmente, cuando se oxida un alcohol primario la oxidación procede hasta la formación del acido carboxílico. Los alcoholes terciarios no reaccionan, a menos que en condiciones extremas se rompa un enlace C-C. ^[27]

Los agentes oxidantes de alcoholes mas frecuentemente utilizados son los derivados de Cr^{VI} , Mn^{VII} o Mn^{IV} . El cromo hexavalente se reduce a Cr^{III} mientras que el manganeso heptavalente se reduce a Mn^{II} en disolución ácida o a MnO_2 en medios neutros o básicos. Las fuentes de Cr^{VI} son el dicromato de sodio dihidratado en disolución ácida o el anhídrido crómico en una gran variedad de disolventes (reactivo de Sarett si es piridina, reactivo de Jones si es una mezcla de acetona y acido sulfúrico acuoso).^[26]

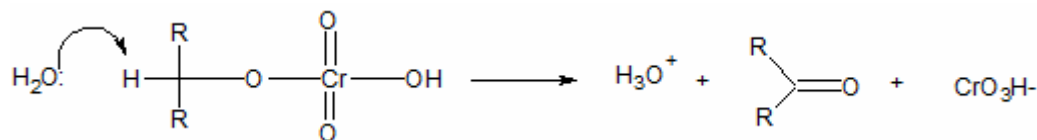
La oxidación de los alcoholes suele realizarse con acido crómico:



La primera etapa de la reacción es la formación de un ester crómico:



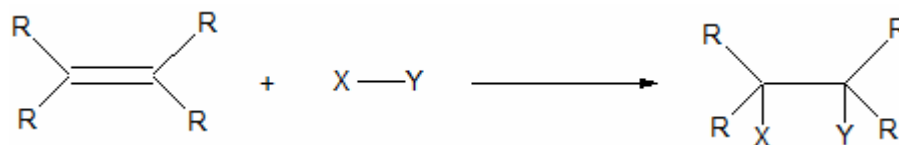
Si el ester posee un átomo de hidrogeno en α , puede ocurrir una eliminación:



El cromo se reduce desde un número de oxidación +6 a +4. El H_2CrO_3 no es estable por lo que se desproporciona con un Cr^{VI} para dar dos moléculas con Cr^{V} . Cada una de estas últimas oxida a una molécula de alcohol y se convierte durante este proceso en Cr^{III} . El átomo de carbono en α respecto al alcohol queda oxidado por la separación del átomo de hidrógeno y por la formación de un nuevo enlace C-O. ^[26]

1.6. Adición al doble enlace carbono-carbono:

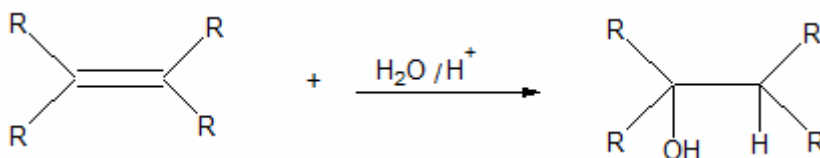
La química de los alquenos es, principalmente la química del doble enlace carbono-carbono, este enlace consta de un enlace σ fuerte y de un enlace π más débil. Desde un punto de vista termodinámico, podemos esperar que los alquenos den lugar a un tipo de reacciones en la que se rompa el enlace π y se formen dos enlaces σ mucho más fuertes. La geometría de un alqueno es tal que permite un acceso fácil a los electrones π desde un punto de vista estérico, por lo que sus reducciones también resultan cinéticamente favorables. Esta clase de reacciones se denominan reacciones de adición: ^[26]



En una reacción de adición, una molécula insaturada y un reactivo se combinan para dar un único compuesto saturado. La molécula del producto contiene dos nuevos enlaces σ , mientras que la de los reactivos poseían un enlace π (el alqueno) y un enlace σ (el reactivo $\text{X}-\text{Y}$). ^[26]

1.6.1. Adiciones electrófilas a los alquenos: adición de ácidos

Los ácidos protónicos, se adicionan a los alquenos como reactivos electrófilos típicos. En medios adecuados, los ácidos protónicos suficientemente fuertes, como el ácido sulfúrico, halogenuros de hidrogeno y el ácido trifluoracético, reaccionan rápidamente con los alquenos. Ácidos más débiles, como el agua y el ácido acético, no se adicionan por si solos pero las adiciones se catalizan mediante trazas de un ácido fuerte. La más importante de estas reacciones desde el punto de vista de su interés como método de síntesis, es la hidratación de alquenos para obtener alcoholes. [26]



1.7. Reactivos de Girard:

El reactivo de Girard fue introducido por primera vez por Girard y Sandulesco en 1936, donde implantaron un método de separación de cetonas y aldehídos de una mezcla utilizando este tipo de reactivos. Específicamente solo utilizaron dos reactivos llamados: Girard-T (trimetilamina) y Girard-P (piridina). [28]

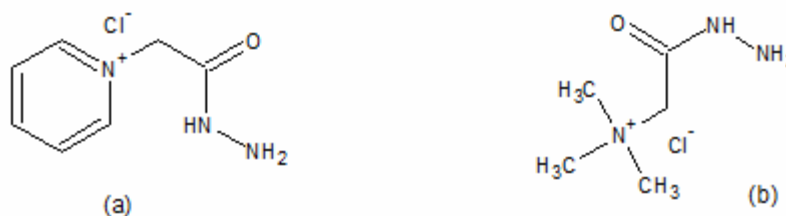
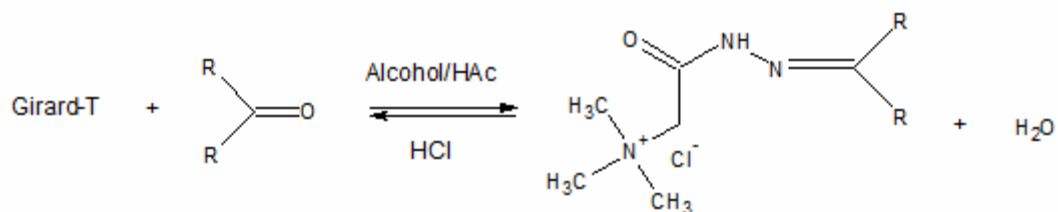


Figura 19. Estructura de los reactivos de Girard: (a) Girard-P, (b) Girard-T. [28]

El uso principal de estos reactivos es el aislamiento de pequeñas cantidades de cetonas de mezclas de otras materias orgánicas, que están contenidas en productos naturales. El compuesto cetónico es disuelto en alcohol que contiene 10% de ácido acético, la mezcla es calentada por 30-60 minutos con el reactivo de Girard en un pequeño exceso. La solución es enfriada y se diluye con agua que contiene suficiente cantidad de NaOH para neutralizar el ácido acético. Se realizan extracciones con éter para remover los compuestos no cetónicos, los derivados de hidrazona solubles en agua son revertidos por la adición de algún ácido mineral con una concentración 0,5 N y luego de reposo por una hora a temperatura ambiente, los compuestos cetónicos liberados son extraídos con éter. [29]



Los reactivos de Girard son preparados por la reacción de hidracina hidratada con sales cuaternarias de nitrógeno, estas sales se forman a partir de cloroacetato de etilo y sustratos que contenga nitrógeno capaz de formar sales cuaternarias. Por ejemplo: trimetilamina, piridina, imidazol, derivados de imidazol, triazol, triacina.

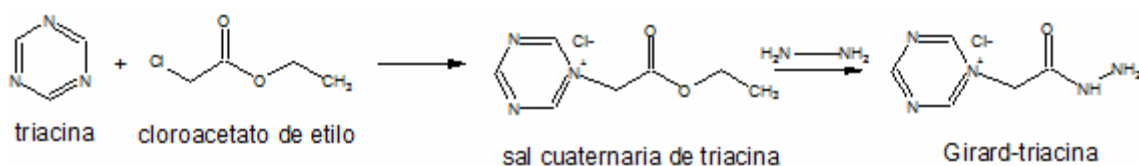


Figura 20. Obtención del reactivo Girard-Triacina.

2. ANTECEDENTES

Shepherd y colaboradores (1955) obtuvieron 4,7,22-ergostatrieno-3-ona (ergosterona) con un rendimiento del 77%, mediante la oxidación de Oppenauer de ergosterol utilizando ciclohexanona e isopropóxido de aluminio en tolueno a temperatura de ebullición. El transcurso de la reacción se midió aislando muestras de la mezcla de reacción y midiendo la desaparición del máximo del ergosterol (282 nm) y la aparición del máximo de Δ^4 -3-cetona (242 nm) del respectivo espectro ultravioleta. ^[30]

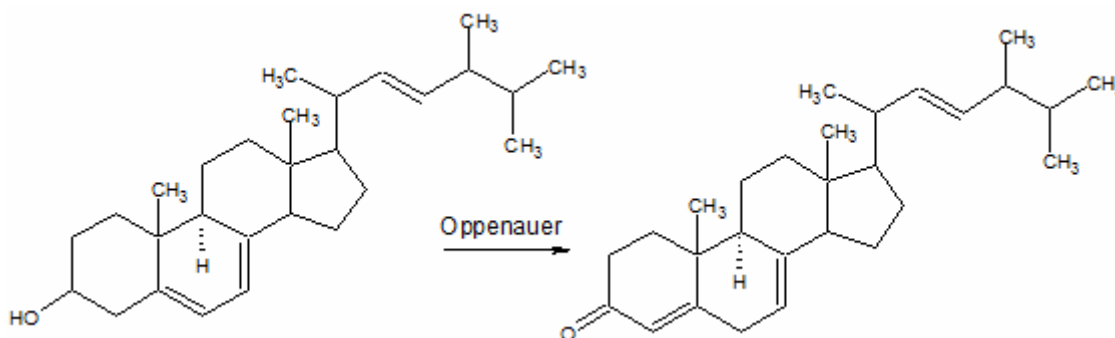


Figura 21. Oxidación de ergosterol a ergosterona. ^[30]

Beugelmans (1969) estudió la oxidación de alcoholes alílicos con anhídrido crómico y hexametilfosfortriamida (HMPT) obteniendo resultados muy favorables, observando que la reacción de oxidación es lenta, la cual logró acelerar al aumentar la temperatura hasta 50° C. Algunos de los sustratos estudiados fueron: 3 β - Δ^4 -colesterol (a) y 3 α - Δ^4 -colesterol (b), 3 β ,20 β -dihidroxi- Δ^4 -pregnano (c). [31]

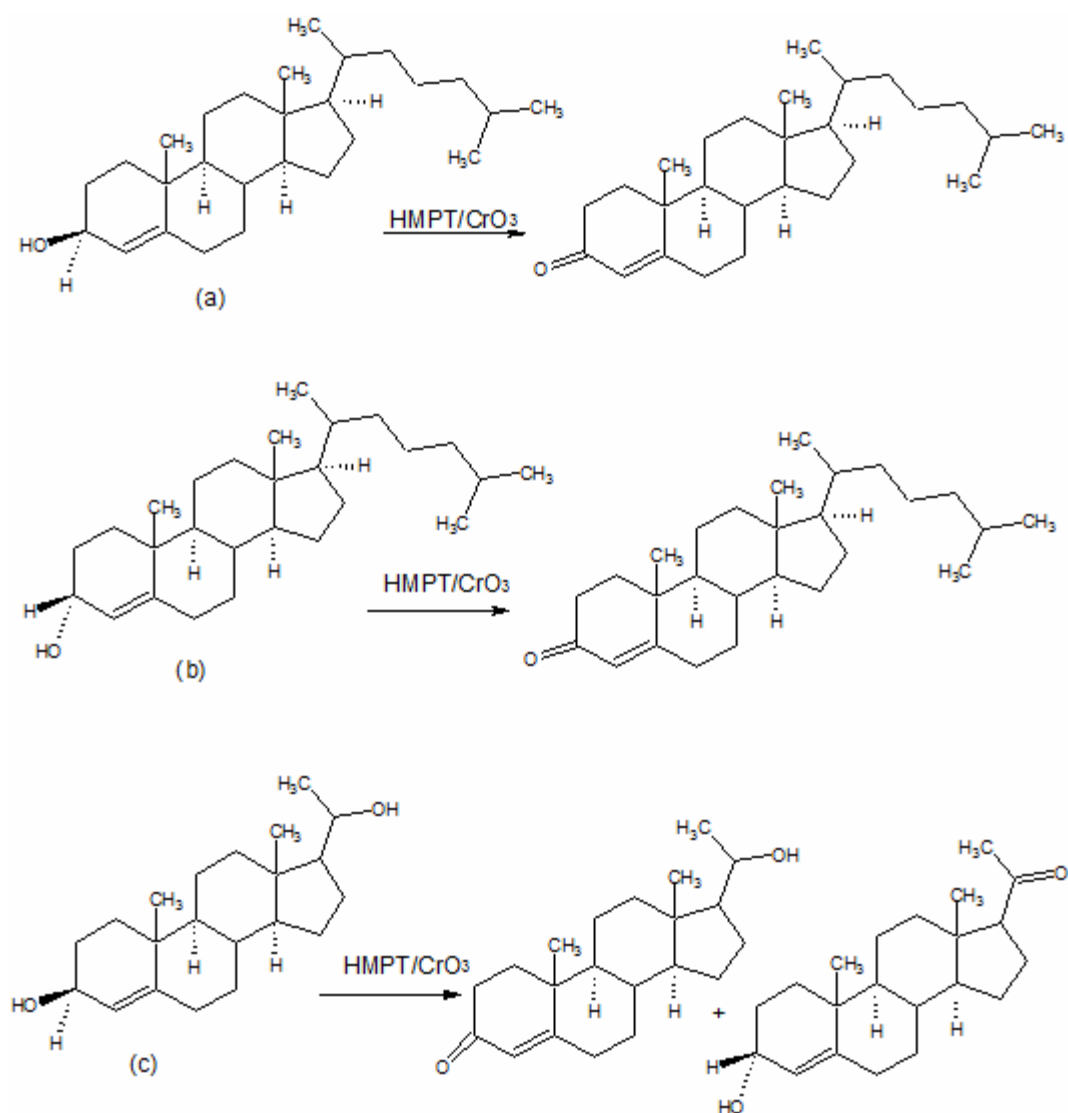


Figura 22. Oxidación de alcoholes alílicos con anhídrido crómico y HMPT. [31]

Sasaki y colaboradores (2001) utilizaron el dimetildioxirano (DMDO) para la oxidación selectiva de esteroides polifuncionales, este reactivo es capaz de realizar varias transformaciones químicas que dependerán del tiempo de reacción, debido a que el es un fuerte oxidante, entre las reacciones principales se encuentran la de alcoholes primarios a ácidos carboxílicos, alcoholes secundarios a cetonas, alquenos a epóxidos, aminas a compuestos nitrados, entre otros. [32]

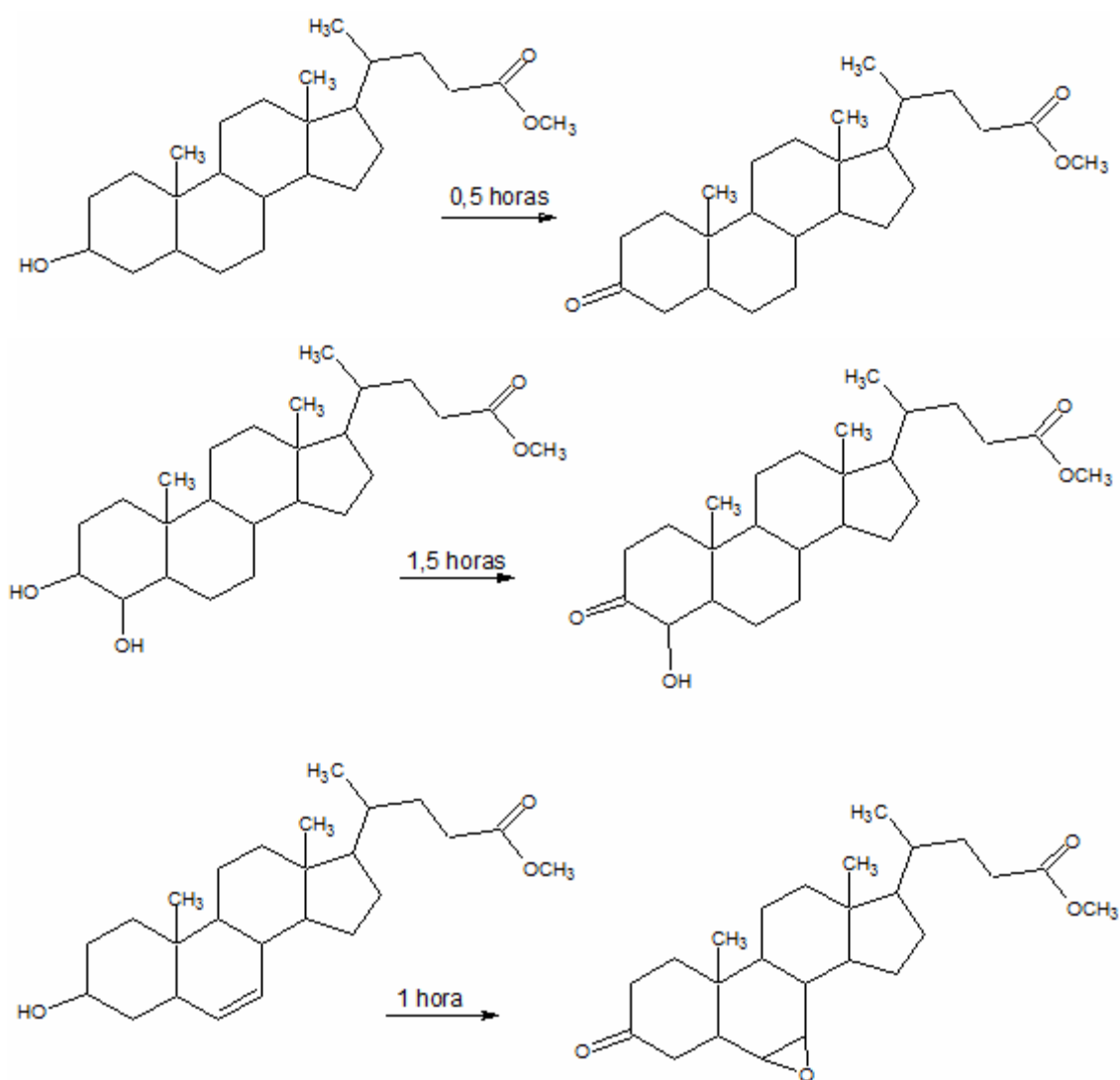


Figura 23. Oxidación selectiva de esteroides polifuncionales con DMDO. [32]

Pérez (2004) estudio la actividad biológica de derivados de ergosterol sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Para dicho estudio realizo la reducción de ergosterol utilizando el reactivo de Jones (trióxido de cromo en ácido sulfúrico y agua) obteniendo un rendimiento del 80%, cabe destacar que la estructura de la ergosterona en este trabajo no está establecida, o más bien está equivocada en base a los resultados obtenidos posteriormente, pues el espectro IR mostró dos bandas carbonílicas, mientras que el espectro RMN ^1H evidenció que el doble enlace en $\text{C}_{22}\text{-C}_{23}$ estaba intacto. Luego hizo reaccionar el producto (ergosterona) con el reactivo de Girard-I (el cual se obtuvo por la reacción de imidazol, cloroacetato de etilo y hidracina con un 30% de rendimiento) para obtener una hidrazona (ergosterona-Girard-I) con un rendimiento del 4%. [33]

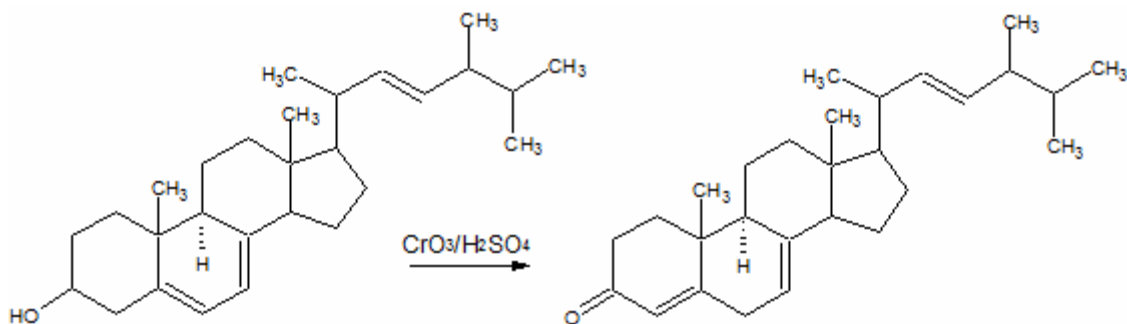


Figura 24. Obtención de ergosterona a partir de ergosterol. [33]

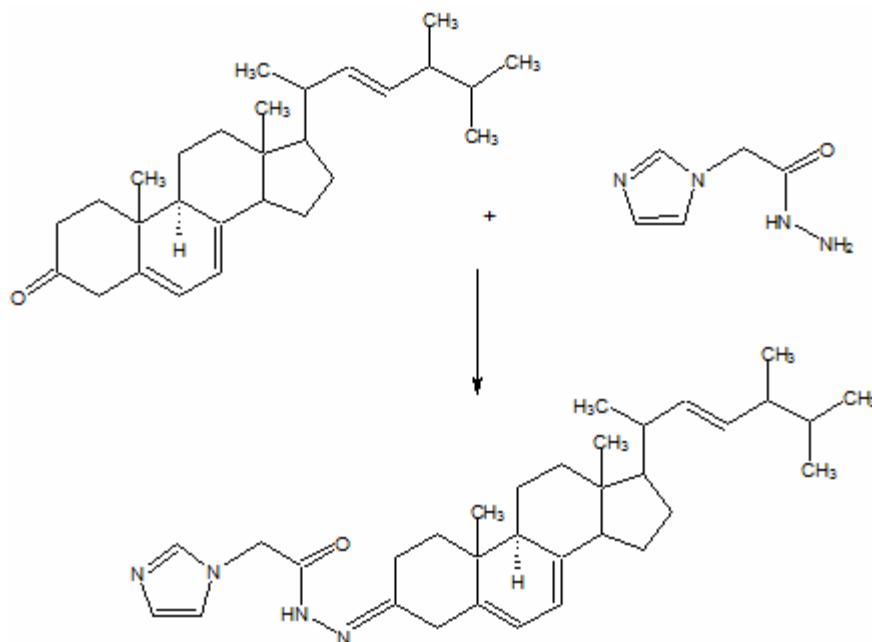


Figura 25. Obtención de la hidrazona ergosterol-Girard I. [33]

Gaertner y colaboradores (2007) obtuvieron 17-hidroxi-5 α -estran-3-ona a partir de 19-norandrost-4-eno-3,17-diona en solución de terbutanol y THF, agitando durante 90 min. y agregando gota a gota una solución de amonio que contenía pequeñas piezas de litio hasta que la solución se tornara de color amarillo claro. [34]

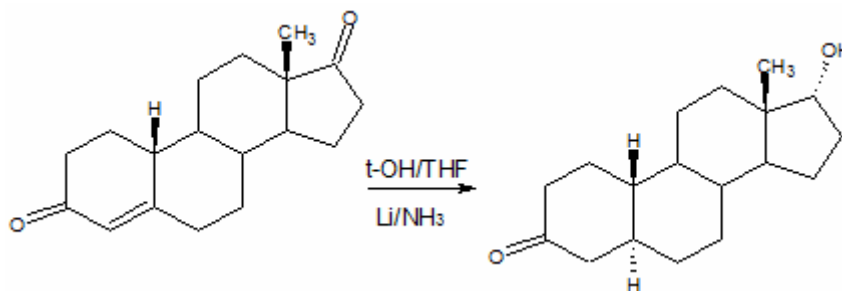


Figura 26. Reducción de 19-norandrost-4-eno-3,17-diona con Li/NH₃. [34]

Parr y colaboradores (2007) realizaron la reducción con K-selectride (tri-2-butilborohidruro de potasio, en THF 1M) de 5 ξ -androst-1-eno-3,17-diona para obtener una mezcla de 5 ξ -androstano-3 ξ , 17 ξ -diol. La reducción se detuvo luego de una hora agregando agua y los productos fueron extraídos con TBME, separados por HPLC e identificados por un detector de UV a 200 nm. [35]

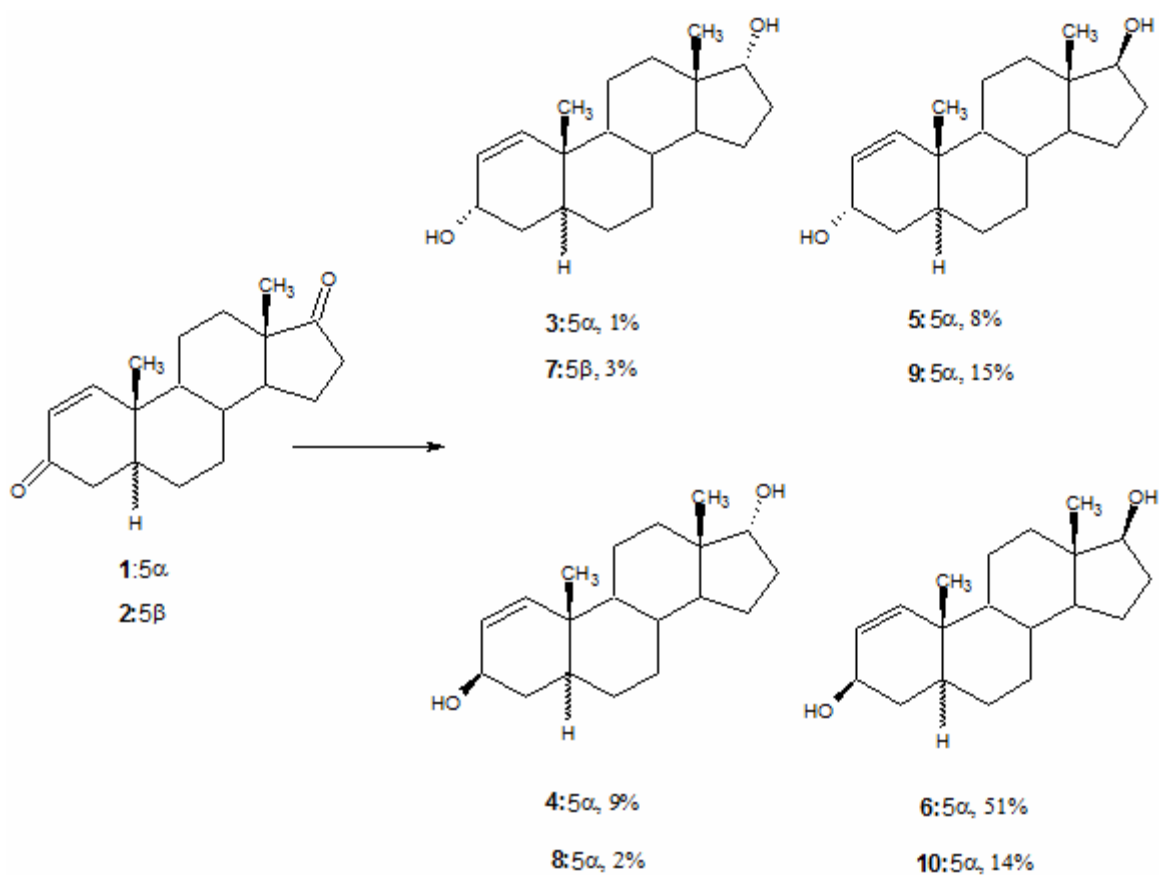


Figura 27. Reducción de 5 ξ -androst-1-eno-3,17-diona con K-selectride. [35]

Ji-Zhong y colaboradores (2007) trataron 17 β -hidroxiandrost-4-eno-3-ona, 17 α -metil-17 β -hidroxiandrost-4-eno-3-ona y 17 β -hidroxiestr-4-eno-3-ona en una mezcla de etanol y Nitrato de cobre dihidratado con propargilamina (CH₂CH₂C≡CH). La mezcla de los reactivos se llevo bajo control atmosférico a temperatura ambiente, luego la reacción se llevo a cabo en reflujo con agitación continua por 12 horas, se deajo enfriar y se filtro para remover el catalizador. El producto fue purificado por cromatografía utilizando silica gel y una mezcla éter de petróleo-dietil éter (6:1). [36]

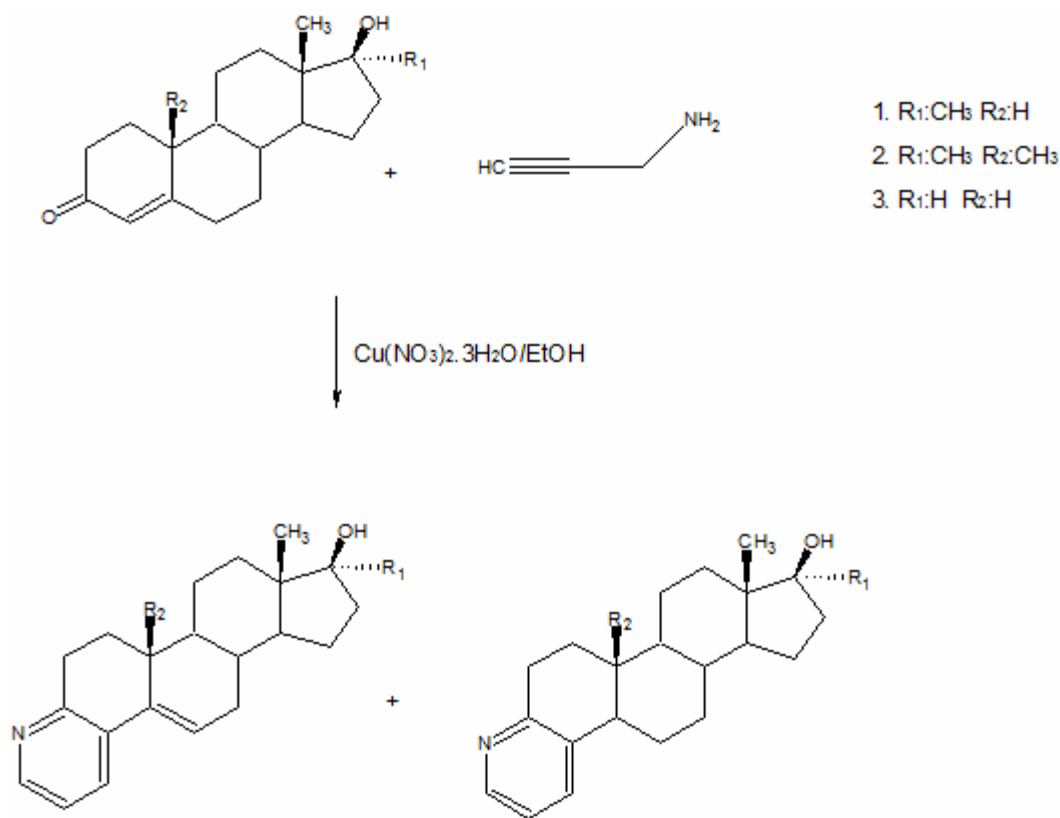


Figura 28. Síntesis de derivados esteroidales de piridina. [36]

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- Sintetizar derivados de ergosterol como posibles drogas con actividad antiprotozoarios (*Trypanosoma cruzi*).

3.2. Objetivos Específicos:

- Realizar la oxidación de ergosterol utilizando el reactivo de Jones y establecer plenamente su estructura.
- Sintetizar los reactivos: Girard-Imidazol, Girard-Triacina y Girard-Triazol.
- Obtener las hidrazonas respectivas al hacer reaccionar el producto de oxidación del ergosterol con los reactivos: Girard-I, Girard-Tr, Girard-P, Girard-T y Girard-Tc.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL:

4.1. Solventes y reactivos:

Se emplearon reactivos de las marcas: Aldrich, BDH Biochemicals, MERCK y Riedel de Haën, su pureza fue verificada por CCF. En algunos casos fueron purificados mediante las técnicas apropiadas.

Los solventes utilizados son de grado técnico, previamente destilados, sin embargo en ocasiones que lo ameritaban se utilizaron solventes de grado PA*.

- Acetona* (CH_3COCH_3)
- Acido acético (CH_3COOH)
- Acido clorhídrico (HCl)
- Acido oxálico (COOHCOOH)
- Acido sulfúrico (H_2SO_4)
- Alcohol isopropílico ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$)
- Agua destilada (H_2O)
- Anhídrido acético ($\text{CH}_3\text{COOCOCH}_3$)
- Anhídrido crómico (CrO_3)
- Cloroacetato de etilo ($\text{ClCH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)
- Colesterol ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$)
- Diclorometano (CH_2Cl_2)
- Ergosterol ($\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$)
- Etanol* ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)
- Hidracina hidratada (NH_2NH_2)

- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Imidazol (C₃H₄N₂)
- Metanol (CH₃OH)
- Piridina (C₅H₅N)
- Reactivo de Girard-P (C₇H₁₀CIN₃O)
- Reactivo de Girard-T (C₅H₁₄CIN₃O)
- Sulfato de sodio (Na₂SO₄)
- Terbutanol ((CH₃)₃COH)
- Tetracloruro de carbono (CCl₄)
- Triacina (C₃H₃N₃)
- Triazol (C₂H₃N₃)

4.2. Soportes cromatográficos:

- **Cromatografía de columna:** se empleó como adsorbente óxido de aluminio (alúmina) MERCK, estandarizado para análisis cromatográficos por adsorción seg. Brockmann.
- **Cromatografía de capa fina:** se empleó como adsorbente óxido de aluminio (alúmina) Machery-Nagel, de dimensiones 20 x 20 cm. y espesor de 0,2 mm. con indicador de fluorescencia UV₂₅₄.

4.3. Equipos utilizados:

- Equipo de resonancia magnética nuclear, marca JEOL, modelo Eclipse 270: campo de aplicación 270 MHz para ^1H y 67,5 MHz para ^{13}C .

- Equipo infrarrojo, modelo Espectrómetro IR 200 con las siguientes características:

Fuente: Láser de Diodo

Detector: Estado Solidó (DTGS) LiTaO_3

Celdas: NaCl

- Espectrómetro de absorción molecular (UV), marca THERMO electrón, modelo Nicolet evolution 300 con las siguientes características:

Fuente: Lámpara de arco de Xenón

Cubetas: 1 cm.

Selector de longitud de onda: Monocromador

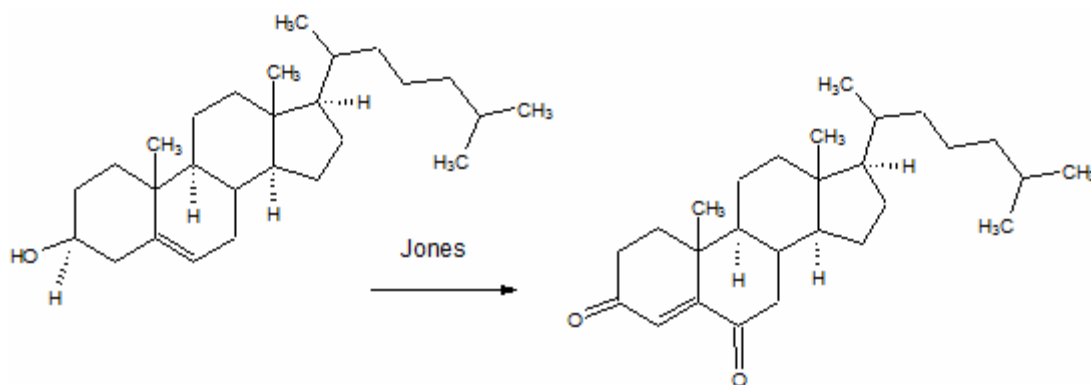
Elemento dispersante: Red

Detector: Fotomultiplicador

- Fusiometro de marca SYBRON-Thermolyne, modelo MP-12615.
- Lámpara UV multibanda UV-254/365, modelo UVGL-25 de marca Entela.
- Rotavapor modelo RE 200 de marca Yamato con baño de agua modelo BM 100.

4.4. Derivados de colesterol:

4.4.1. Oxidación de colesterol, obtención de 4-colestan-3,6-diona:



Se disolvió 0,50112 g ($1,30 \times 10^{-3}$ mol) de colesterol en 100,00 mL de acetona, seguidamente se agregó gota a gota una solución de reactivo de Jones ^[37], que consistía en 0,31045 g ($3,11 \times 10^{-3}$ mol) de anhídrido crómico y 1,00 mL de ácido sulfúrico en 5,00 mL de agua destilada. La solución final se agitó a temperatura ambiente por 12 horas. El transcurso de la reacción fue seguido por CCF.

Luego de completarse la reacción se agregaron 200,00 mL de agua destilada y se realizaron sucesivas extracciones con diclorometano, la capa orgánica fue secada con sulfato de sodio, luego filtrada por pliegues y el solvente se dejó evaporar. El sólido obtenido se recristalizó con una mezcla 9,5-0,5 metanol-agua. Se obtuvo un sólido amarillo claro.

Cantidad de producto obtenido: 0,26015 g

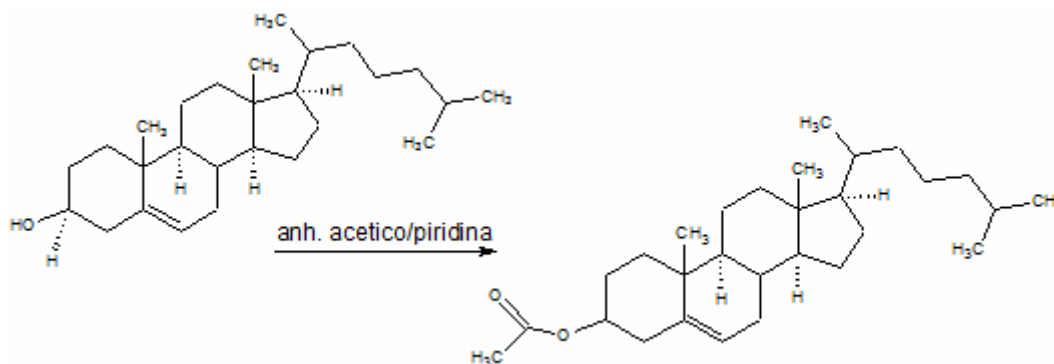
Rendimiento de la reacción: 50 %

Punto de fusión: 118-119 °C

Punto de fusión reportado: 119 °C ^[38]

4.4.2. Síntesis de colest-5-eno-3,7-diona:

4.4.2.1. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato:



Se hizo reaccionar 1,38830 g ($3,59 \times 10^{-3}$ mol) de colesterol con 8,00 mL ($8,38 \times 10^{-2}$ mol) de anhídrido acético y 5,00 mL de piridina ^[39]. La mezcla de agito a temperatura ambiente por 18 horas.

Se agregaron 200,00 mL de agua helada y se filtró por pliegues, el filtrado fue lavado con una solución de HCl al 10%, resultando un sólido de color blanco finamente dividido.

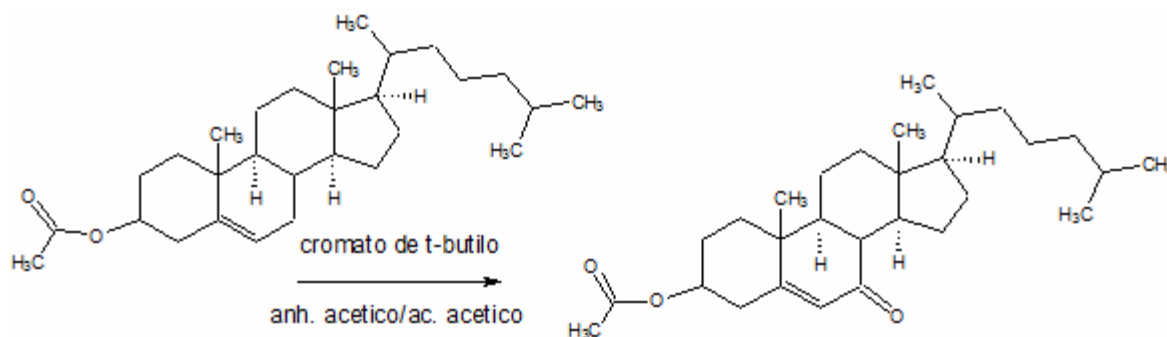
Cantidad de producto obtenido: 1,25380 g

Rendimiento de la reacción: 82 %

Punto de fusión: 112-114 °C

Punto de fusión reportado: 112 °C ^[39]

4.4.2.2. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato-7-ona:



Se preparó una solución de cromato de terbutilo agregando 19,0014 g de anhídrido crómico con agitación en 50,00 mL de terbutanol, luego se agregaron 150,00 mL de CCl₄, se colocó en un embudo de separación para eliminar la capa acuosa y la capa orgánica se secó con sulfato de sodio. La misma se evaporó a presión reducida hasta obtener un volumen de 100,00 mL ^[40].

Se mezclaron 1,15590 g ($2,70 \times 10^{-3}$ mol) de colest-5-eno-3 β -O-acetato, 10,00 mL de CCl₄, 3,00 mL de ácido acético y 1,00 mL de anh. Acético. La mezcla se agitó por 2 horas a 55 °C. Luego se añadió 45,00 mL de la solución de cromato de terbutilo preparada anteriormente, 3,00 mL de ácido acético y 1,00 mL de anh. Acético. La mezcla se colocó en agitación nuevamente durante 24 horas a una temperatura de 60-65 °C. ^[41].

La mezcla se hidrolizó con 100,00 mL de una solución de ácido oxálico al 10% y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Se colocó en un embudo de separación y

se extrajo sucesivas veces con diclorometano, la capa orgánica fue secada con sulfato de sodio, luego filtrada por pliegues y el solvente se dejó evaporar. El sólido obtenido se recrystalizó con una mezcla 9,5-0,5 metanol-agua. Se obtuvo un sólido de color blanco de aspecto cristalino.

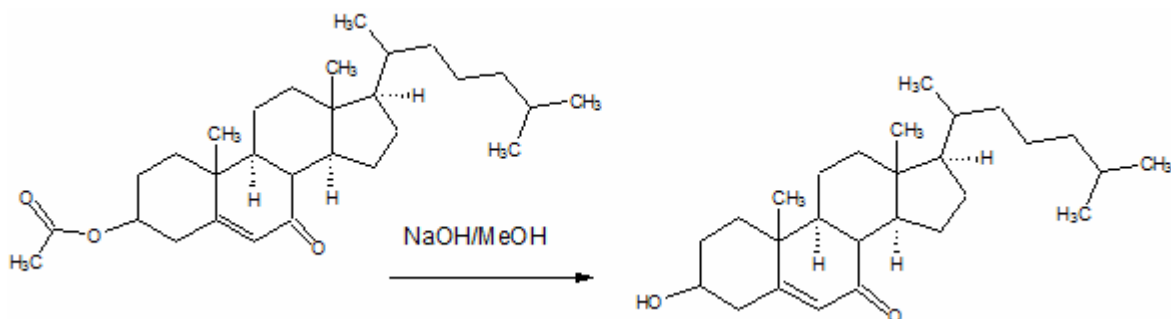
Cantidad de producto obtenido: 0,59535 g

Rendimiento de la reacción: 50 %

Punto de fusión: 152-154 °C

Punto de fusión reportado: 155-156 °C ^[41]

4.4.2.3. Obtención de colest-5-eno-3 β -ol-7-ona:



La hidrólisis se realizó disolviendo 0,58740 g ($1,33 \times 10^{-3}$ mol) de colest-5-eno-3 β -O-acetato-7-ona y 0,15923 g ($3,98 \times 10^{-3}$) de NaOH en 20,00 mL de metanol. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El transcurso de la reacción fue seguido por CCF.

Luego de completarse la reacción se dejó evaporar el solvente y se lavó el sólido remanente con 100,00 mL de una solución de HCl al 5% y se filtró por pliegues. Se obtuvo un sólido de color blanco.

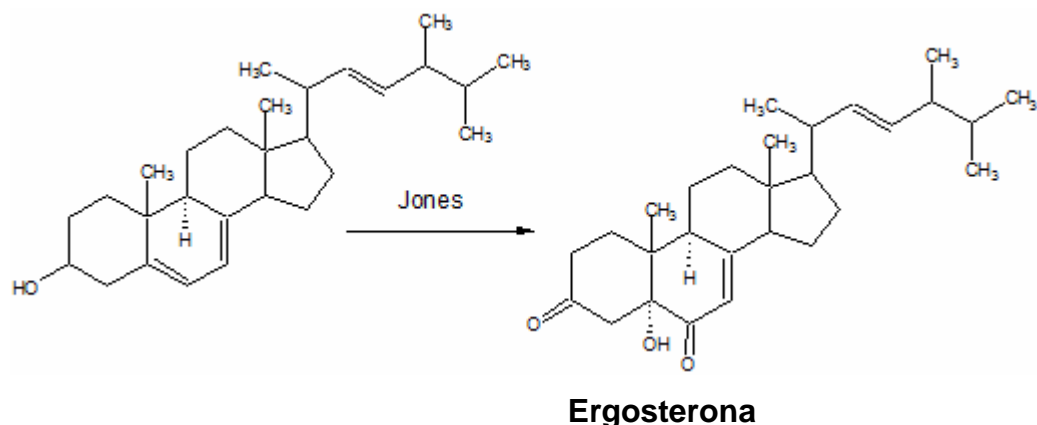
Cantidad de producto obtenido: 0,27989 g

Rendimiento de la reacción: 53 %

Punto de fusión: 116-118 °C.

Punto de fusión reportado: 116 °C ^[38]

4.5. Oxidación de ergosterol utilizando el reactivo de Jones:



Se disolvió 0,10098 g ($2,55 \times 10^{-4}$ mol) de ergosterol en 50,00 mL de acetona, seguidamente se agregó gota a gota una solución de reactivo de Jones, que consistía en 0,15321 g ($1,53 \times 10^{-3}$ mol) de anhídrido crómico y 1,00 mL de ácido sulfúrico en 5,00 mL de agua destilada. La solución final se agitó a temperatura ambiente por 12 horas. El transcurso de la reacción fue seguido por CCF.

Luego de completarse la reacción se agregó 2,00 mL de alcohol isopropílico y se agitó nuevamente por 2 horas. Se filtró la solución para eliminar el sulfato de cromo (III) y se dejó evaporar el solvente.

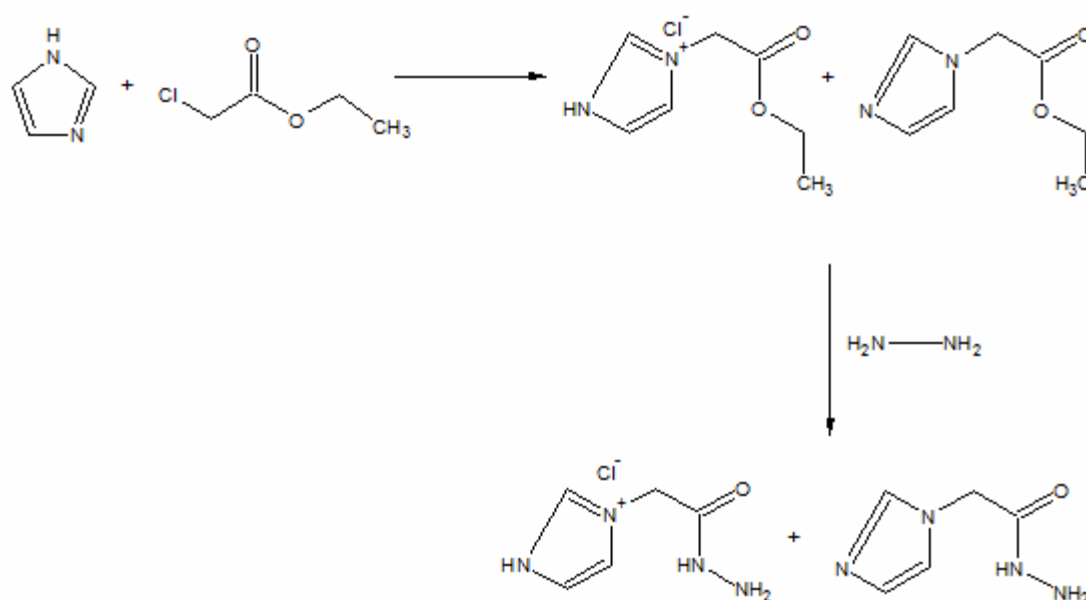
El crudo de reacción se purificó por cromatografía de columna, utilizando 10,00 g de alúmina como adsorbente en una bureta de 25,00 mL y una mezcla de relación 9,7:0,3 diclorometano-metanol.

Cantidad de producto obtenido: 0,05861 g

Rendimiento de la reacción: 54 %

Punto de fusión: 266-268 °C

4.6. Síntesis del reactivo de Girard-Imidazol:



Se disolvió 0,50145 g ($7,37 \times 10^{-3}$ mol) de imidazol en 20,00 mL de etanol, se agregaron 1,00 mL ($9,39 \times 10^{-3}$ mol) de cloroacetato de etilo y la mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 72 horas.

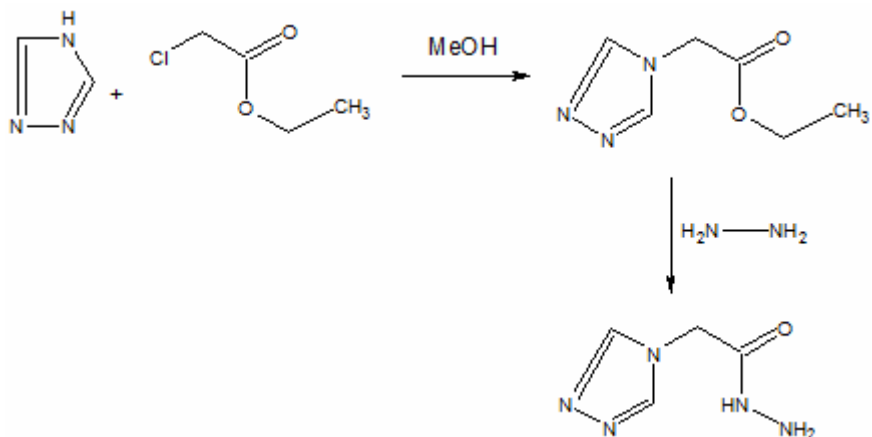
Luego de retirar el reflujo, se colocó la mezcla en un baño de hielo y se agregó 1,50 mL ($2,86 \times 10^{-2}$ mol) de Hidracina hidratada con agitación, se continuó la agitación por 20 minutos y se colocó la mezcla en un baño de hielo y sal por 12 horas. El sólido obtenido fue recristalizado con metanol.

Cantidad de producto obtenido: 0,74512 g

Rendimiento de la reacción: 58 %

Punto de fusión: 90-92 °C

4.7. Síntesis del reactivo de Girard-Triazol:



Se disolvió 0,52071 g ($7,54 \times 10^{-3}$ mol) de triazol en 20,00 mL de etanol, se agregaron 1,00 mL ($9,39 \times 10^{-3}$ mol) de cloroacetato de etilo y la mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 72 horas.

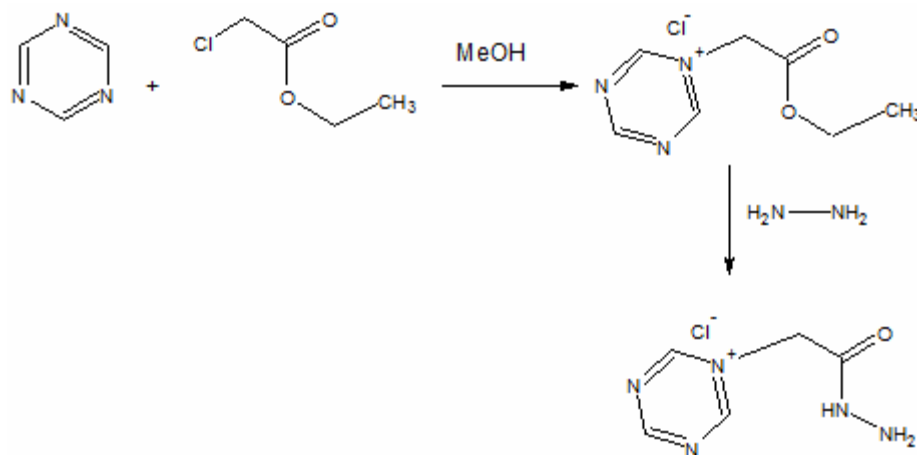
Luego de retirar el reflujo, se colocó la mezcla en un baño de hielo y se agregó 1,50 mL ($2,86 \times 10^{-2}$ mol) de Hidracina hidratada con agitación, se continuó la agitación por 20 minutos y se colocó la mezcla en un baño de hielo y sal por 12 horas. El sólido obtenido fue recristalizado con metanol.

Cantidad de producto obtenido: 0,89760 g

Rendimiento de la reacción: 67 %

Punto de fusión: 84-86 °C

4.8. Síntesis del reactivo de Girard-Triacina:



Se disolvió 0,50200 g ($6,19 \times 10^{-3}$ mol) de triazol en 20,00 mL de etanol, se agregaron 1,00 mL ($9,39 \times 10^{-3}$ mol) de cloroacetato de etilo y la mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 72 horas.

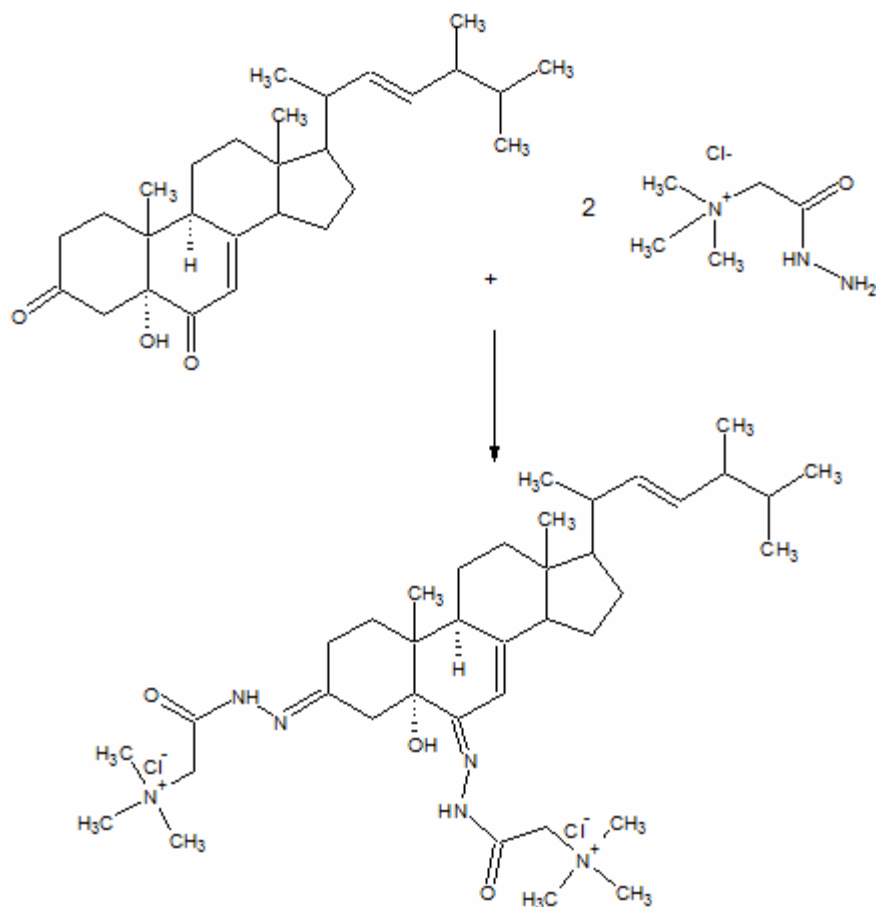
Luego de retirar el reflujo, se colocó la mezcla en un baño de hielo y se agregó 1,50 mL ($2,86 \times 10^{-2}$ mol) de Hidracina hidratada con agitación, se continuó la agitación por 20 minutos y se colocó la mezcla en un baño de hielo y sal por 12 horas. El sólido obtenido fue recristalizado con metanol.

Cantidad de producto obtenido: 0,80243 g

Rendimiento de la reacción: 68 %

Punto de fusión: 118-119 °C

4.9. Reacción entre Girard-T y ergosterona:



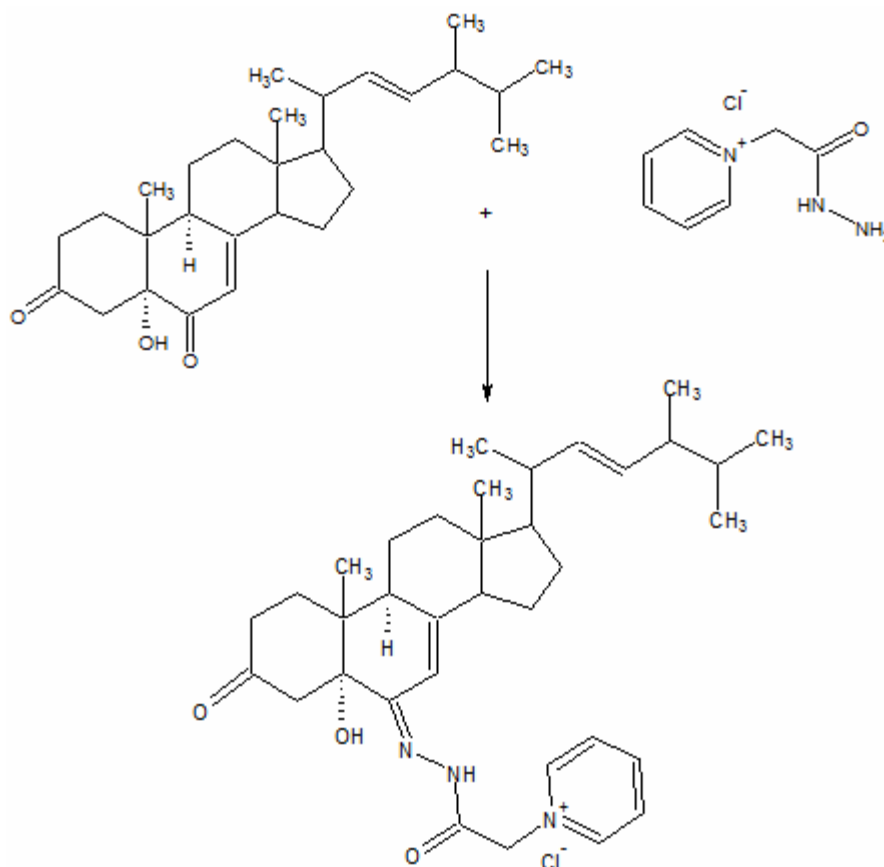
Se mezclaron 0,02531 g ($5,93 \times 10^{-5}$ mol) de ergosterona y 0,02070 g ($1,24 \times 10^{-4}$ mol) del reactivo de Girard-T en 20,00 mL de metanol. La mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 20 horas.

Luego de retirar el reflujo se dejó evaporar el solvente, se lavó el residuo con acetona y se filtró por pliegues. Se dejó evaporar el solvente nuevamente.

Cantidad de producto obtenido: 0,03618 g

Rendimiento de la reacción: 84%

4.10. Reacción entre Girard-P y ergosterona:

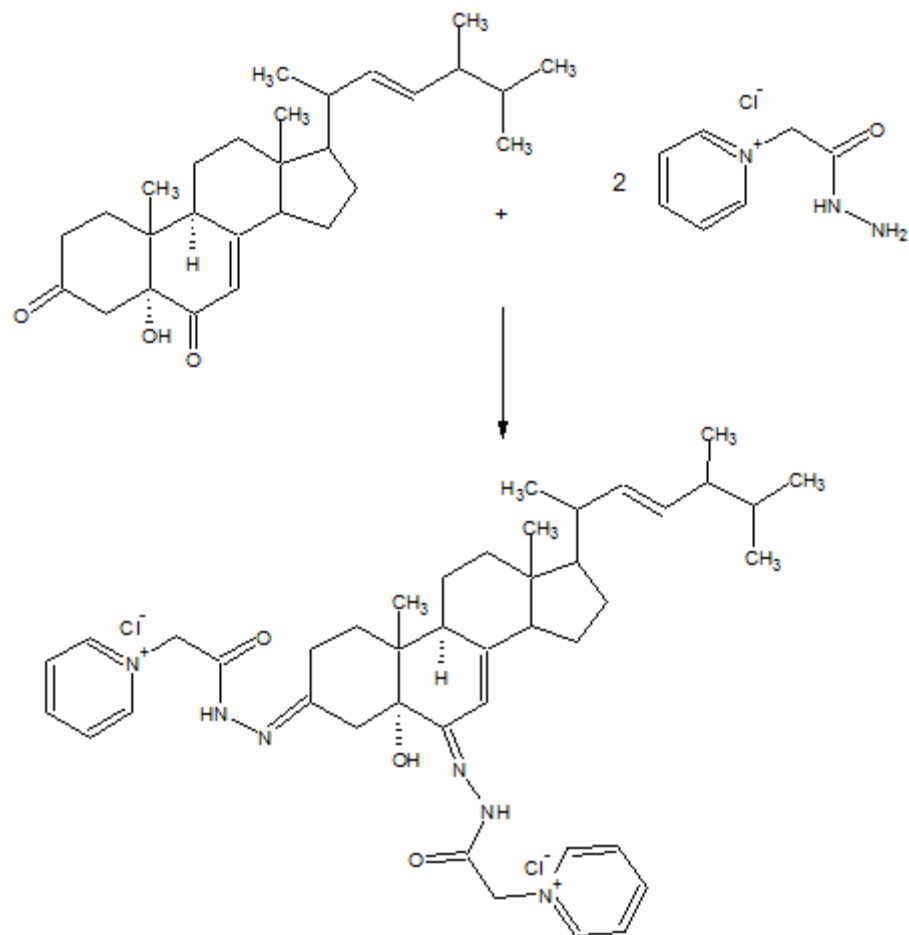


Se mezclaron 0,02418 g ($5,67 \times 10^{-5}$ mol) de ergosterona y 0,01022 g ($5,45 \times 10^{-5}$ mol) del reactivo de Girard-P en 20,00 mL de metanol. La mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 15 horas.

Luego de retirar el reflujo se dejó evaporar el solvente, se lavó el residuo con acetona y se filtró por pliegues. Se dejó evaporar el solvente nuevamente.

Cantidad de producto obtenido: 0,03057 g

Rendimiento de la reacción: 91%



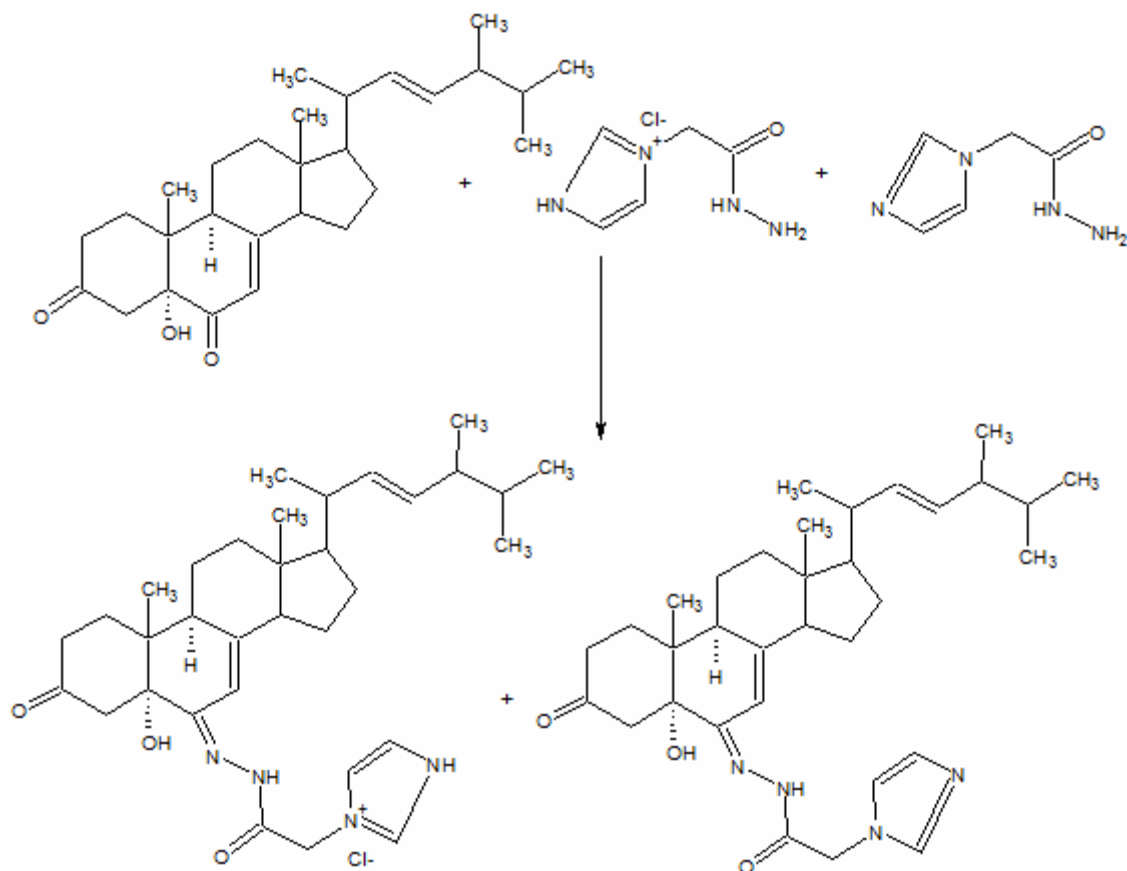
Se mezclaron 0,02405 g ($5,64 \times 10^{-5}$ mol) de ergosterona y 0,02087g ($1,11 \times 10^{-4}$ mol) del reactivo de Girard-P en 20,00 mL de metanol. La mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 20 horas.

Luego de retirar el reflujo se dejó evaporar el solvente, se lavó el residuo con acetona y se filtró por pliegues. Se dejó evaporar el solvente nuevamente.

Cantidad de producto obtenido: 0,03618 g

Rendimiento de la reacción: 84%

4.11. Reacción entre Girard-I y ergosterona:



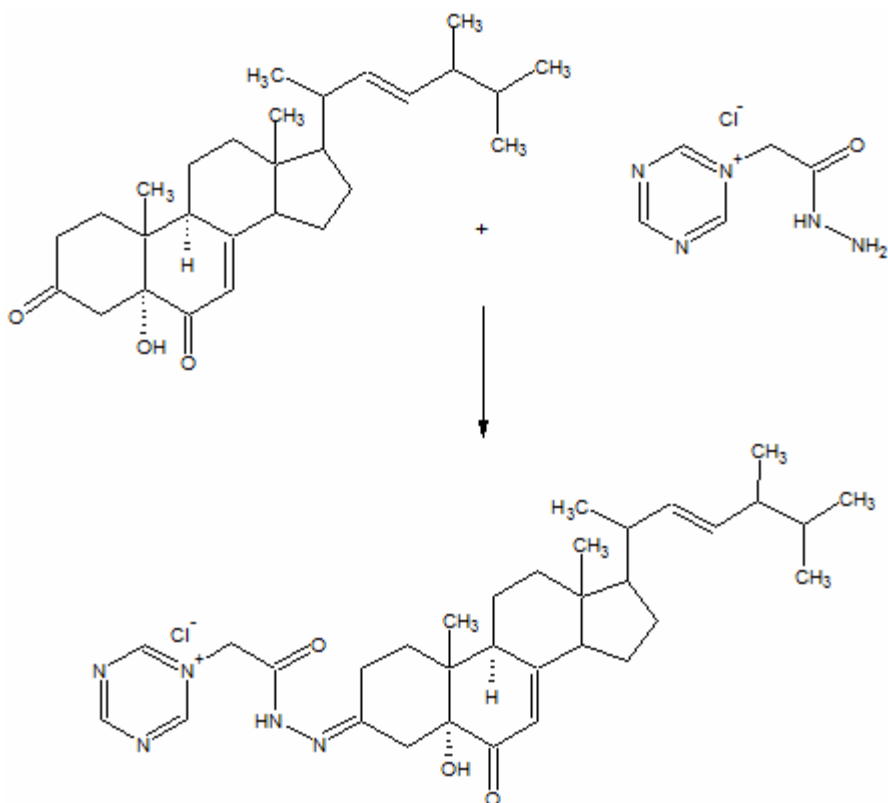
Se mezclaron 0,02304 g ($5,40 \times 10^{-5}$ mol) de ergosterona y 0,00982 g ($5,56 \times 10^{-5}$ mol) del reactivo de Girard-I en 20,00 mL de metanol. La mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 15 horas.

Luego de retirar el reflujo se dejó evaporar el solvente, se lavó el residuo con acetona y se filtró por pliegues. Se dejó evaporar el solvente nuevamente.

Cantidad de producto obtenido: 0,02536 g

Rendimiento de la reacción: 85%

4.12. Reacción entre Girard-Tc y ergosterona:



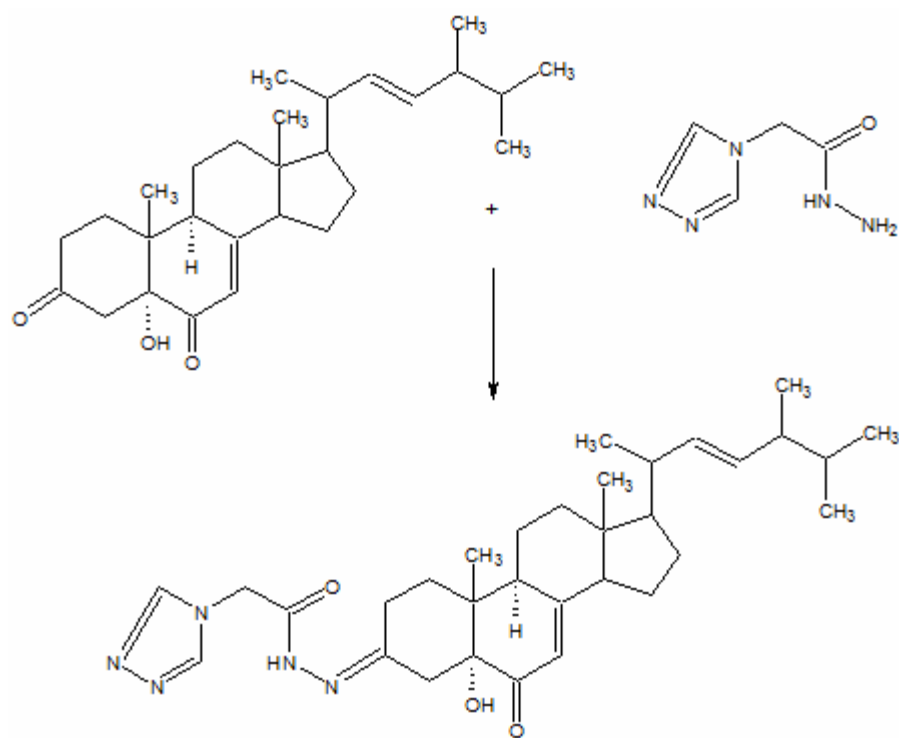
Se mezclaron 0,02268 g ($5,32 \times 10^{-5}$ mol) de ergosterona y 0,01085 g ($5,72 \times 10^{-5}$ mol) del reactivo de Girard-Tc en 20,00 mL de metanol, la mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 15 horas.

Luego de retirar el reflujo se dejó evaporar el solvente, se lavó el residuo con acetona y se filtró por pliegues. Se dejó evaporar el solvente nuevamente.

Cantidad de producto obtenido: 0,02484 g

Rendimiento de la reacción: 83%

4.13. Reacción entre Girard-Tr y ergosterona:



Se mezclaron 0,02125 g ($4,98 \times 10^{-5}$ mol) de ergosterona y 0,00715 g ($5,07 \times 10^{-5}$ mol) del reactivo de Girard-Tr en 20,00 mL de metanol, la mezcla se colocó en reflujo a 90 °C por 15 horas.

Luego de retirar el reflujo se dejó evaporar el solvente, se lavó el residuo con acetona y se filtró por pliegues. Se dejó evaporar el solvente nuevamente.

Cantidad de producto obtenido: 0,02500 g

Rendimiento de la reacción: 91%

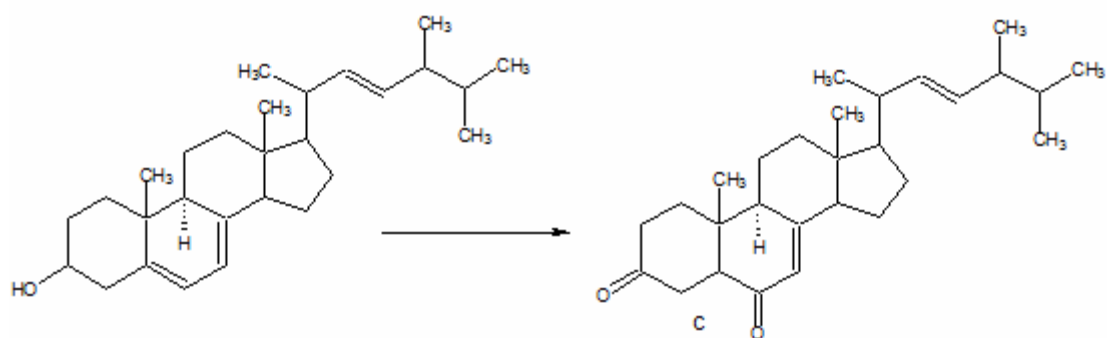
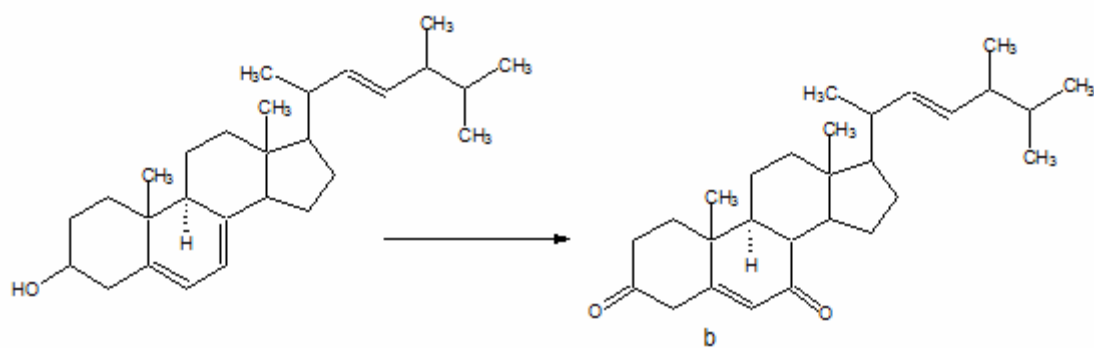
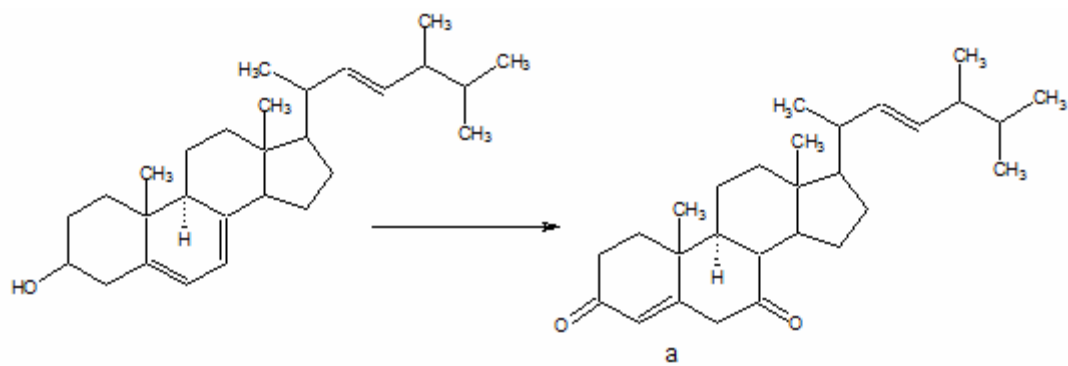
5. RESULTADOS Y DISCUSION:

El objetivo general de la presente tesis es el de preparar derivados de ergosterona (producto de oxidación de ergosterol) con diferentes reactivos de Girard. Anterior a la presente tesis, se inicio la investigación sobre este tema sin poder determinar con plenitud la estructura de ergosterona.

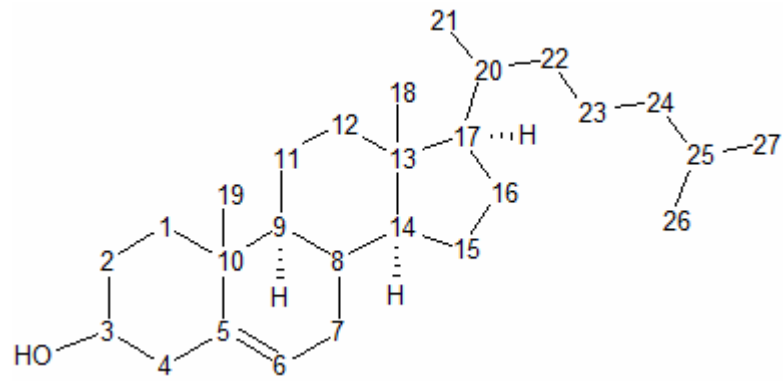
El primer objetivo específico de esta tesis es el de realizar la oxidación de ergosterol con el reactivo de Jones y establecer plenamente la estructura del producto. Según un trabajo anterior ^[33], el producto de oxidación tiene dos grupos carbonilos, uno de los cuales es una cetona α , β -insaturada, ya que el producto de oxidación de ergosterol mostró dos bandas carbonílicas en 1716 y 1664 cm^{-1} , en el espectro de IR y un máximo de absorción a 243 nm en el espectro UV, por otro lado, no se pudo obtener espectros RMN confiables de dicho compuesto, posiblemente por contener residuos contaminantes de cromo, el cual es paramagnético.

Para cumplir este objetivo se planteó la obtención de derivados similares, a partir de colesterol a fin de obtener datos espectroscópicos; RMN ^{13}C , RMN ^1H , IR y UV, que ayudarán a la elucidación de la estructura de ergosterona.

En el presente trabajo se plantean para el producto de oxidación tres estructuras posibles (a, b y c), presentadas a continuación, las cuales son consistentes con los datos espectroscópicos tanto de IR como UV observados.

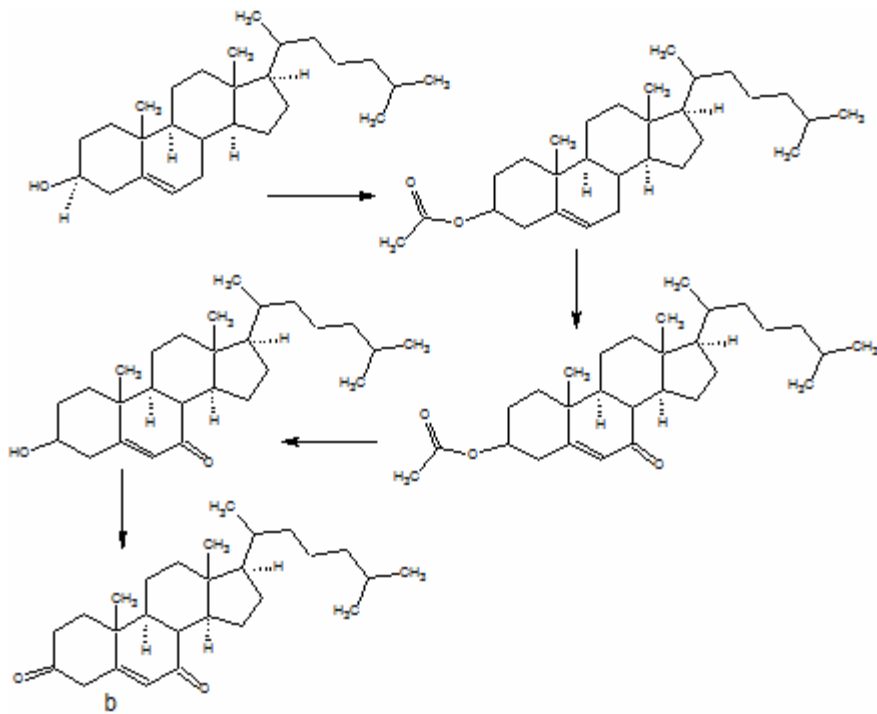


5.1. Derivados de colesterol:

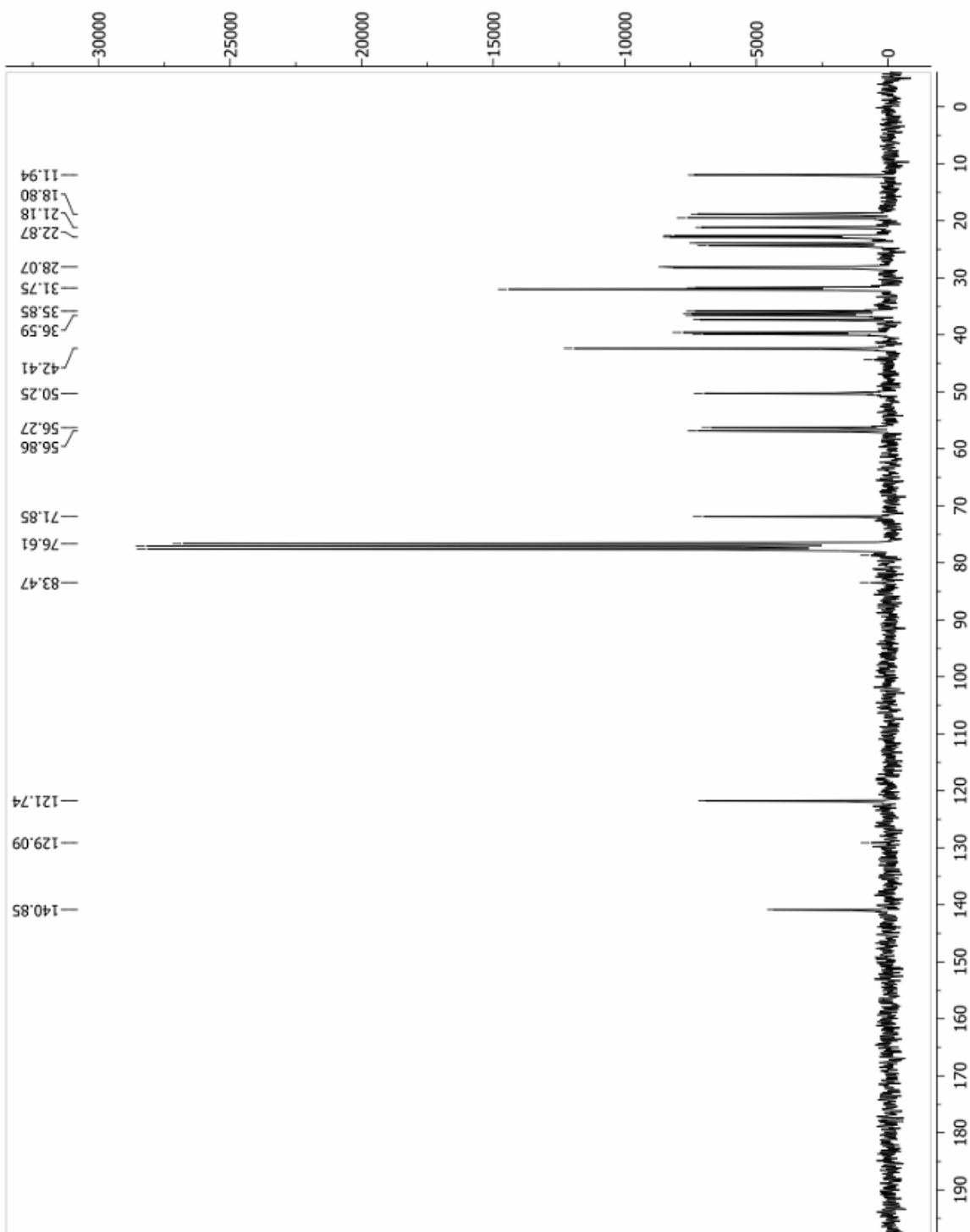


Colesterol

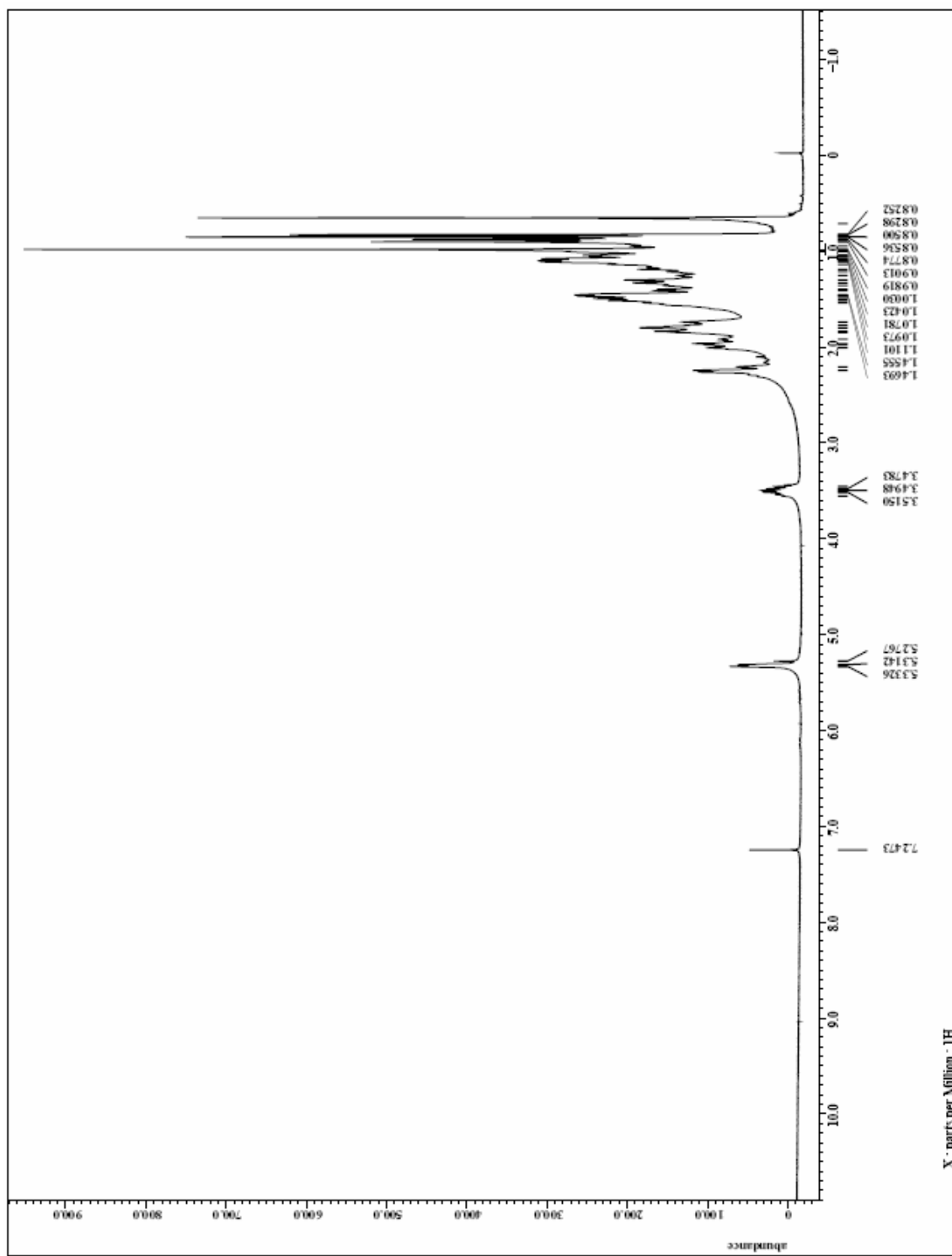
Para obtener el derivado de colesterol con una estructura similar a la estructura a se realizo la oxidación de colesterol con el reactivo de Jones y para obtener una estructura similar a la estructura planteada b, se planteó la siguiente serie de reacciones:



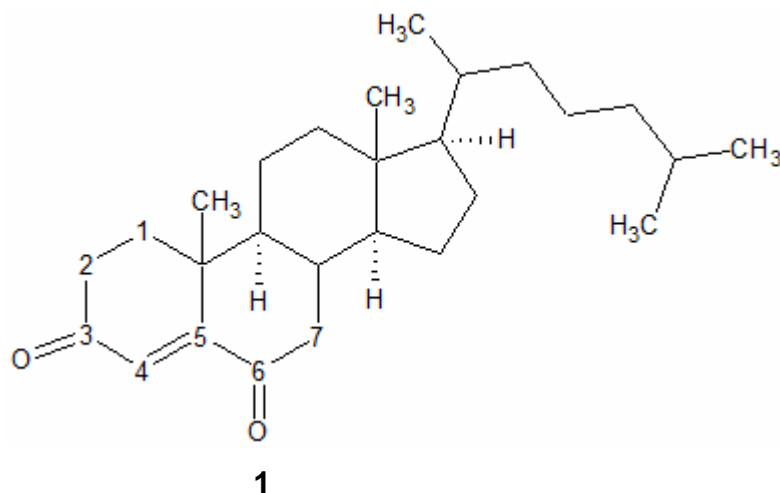
Espectro N° 1. RMN ¹³C de colesterol.



Espectro N° 2. RMN ¹H de colesterol.



5.1.1. Oxidación de colesterol, obtención de Colesta-4-eno-3,6-diona:



El primer derivado de colesterol, fue el producto de la oxidación del mismo empleando el reactivo de Jones (1).

En el espectro RMN ^{13}C (espectro N° 3) tomado en CDCl_3 de este producto, se observan dos señales en 202, 37 ppm y 199,53 ppm, características de grupos carbonilos; señales en 161,13 y 125,48 ppm que pertenecen a los carbonos olefínicos conjugados al grupo carbonilo en la posición 3, siendo el primero el Carbono β . También presenta una serie de señales entre 60 y 10 ppm que corresponden a los CH , CH_2 y CH_3 que presenta la molécula. Estas últimas señales son características de los esteroides en general.

Por otro lado no está presente la señal en 71,85 ppm que corresponde al C-OH que se observa en el espectro del colesterol (espectro N° 1), lo que afirma la oxidación de dicho grupo.

El espectro RMN ^1H (espectro N° 4) tomado en CDCl_3 del producto, presenta como única señal característica, un singlete en 6,12 ppm perteneciente al protón olefínico (C4-H).

En el espectro RMN ^1H (espectro N° 2) tomado en CDCl_3 del colesterol, este protón olefínico se presenta como un triplete en 5,31 ppm ya que está acoplado con los protones del Carbono 7 (CH_2).

En el espectro IR del compuesto (espectro N° 5) tomado en una película líquida de CH_2Cl_2 , se observa una señal a $1603,8\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al stretching del doble enlace Δ^4 y una señal en $1687,0\text{ cm}^{-1}$ que pertenece al stretching del enlace $\text{C}=\text{O}$ de las cetonas α,β conjugadas (C3 y C6).

En el espectro UV (espectro N° 6) del producto, se observa un máximo de absorción a 246 nm, característico de una cetona α,β -conjugada.

Como dato de interés, se ha reportado la transformación de colesterol a colestano-4-eno-3,6-diona en una pre-columna HPLC/UV, esto es utilizado para el análisis de colesterol en sistemas biológicos, ya que el producto de oxidación tiene una absorbancia intensa a 250 nm. ^[42]

Otra evidencia para la elucidación de este producto es la comparación de los datos espectroscópicos experimentales con datos espectroscópicos reportados para estigmasta-4-eno-3,6-diona (24-etil-colesta-4-eno-3,6-diona). ^[43]

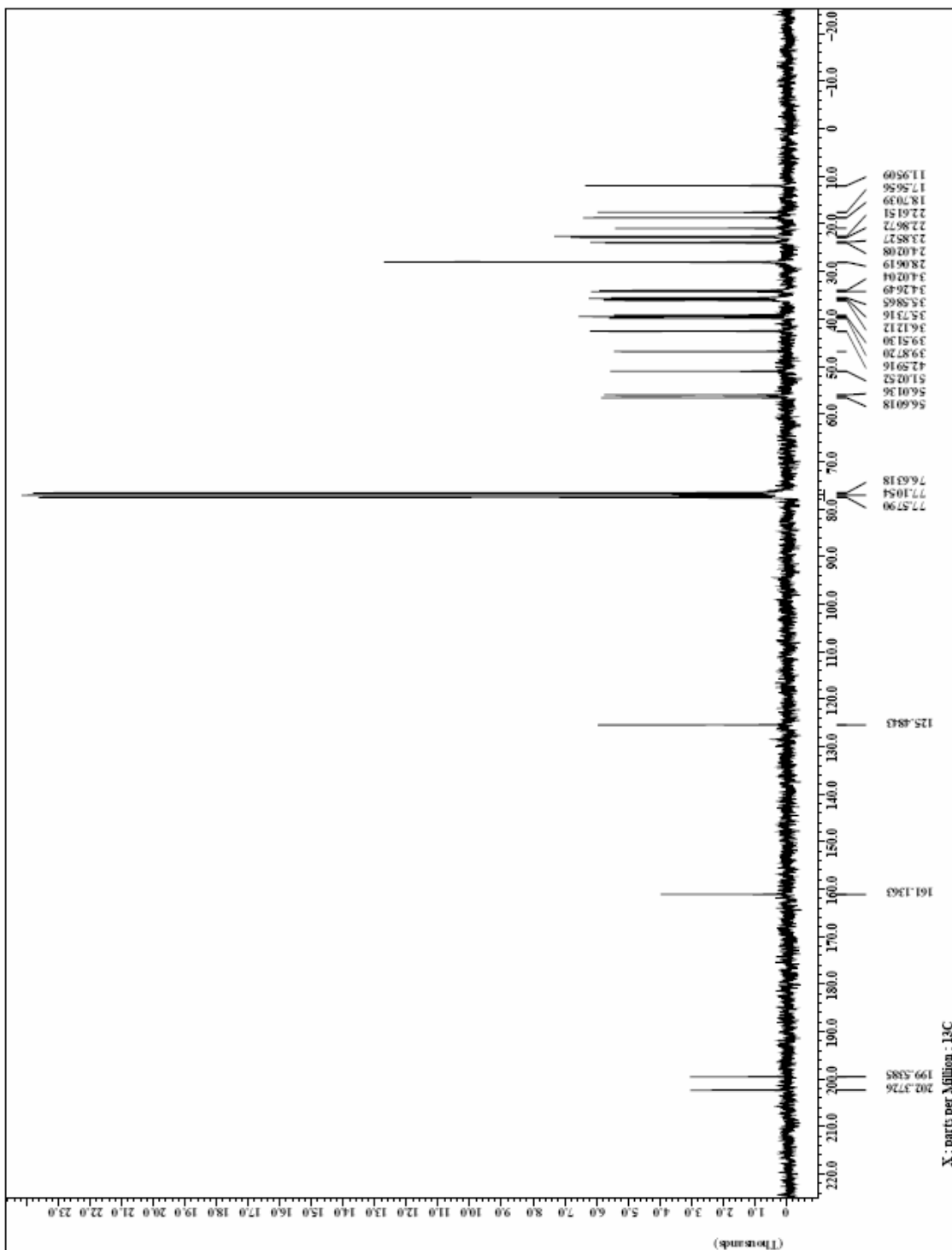
Tabla Nº 1. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de colest-4-eno-3,6-diona y estigmasta-4-eno-3,6-diona.

Nº Carbono	δ_c reportado* ^[43]	δ_c experimental*
1 CH ₂	35,6	35,58
2 CH ₂	34,0	34,02
3 C=O	202,3	202,37
4 CH	125,5	125,48
5 C	161,1	161,13
6 C=O	199,5	199,53
7 CH ₂	46,8	46,86
8 CH	34,2	34,26
9 CH	51,0	51,02
10 C	39,8	39,87
11 CH ₂	20,9	20,93
12 CH ₂	39,2	39,19
13 C	42,6	42,59
14 CH	56,6	56,60
15 CH ₂	24,0	24,02
16 CH ₂	28,0	28,06
17 CH	55,9	56,01
18 CH ₃	12,0	11,95
19 CH ₃	17,5	17,56
20 CH	36,1	35,73
21 CH ₃	18,7	18,7
22 CH ₂	33,8	36,12
23 CH ₂	26,1	23,85
24 CH ₂	45,8 [#]	39,51
25 CH	29,2	28,06
26 CH ₃	19,0	22,61
27 CH ₃	19,8	22,86

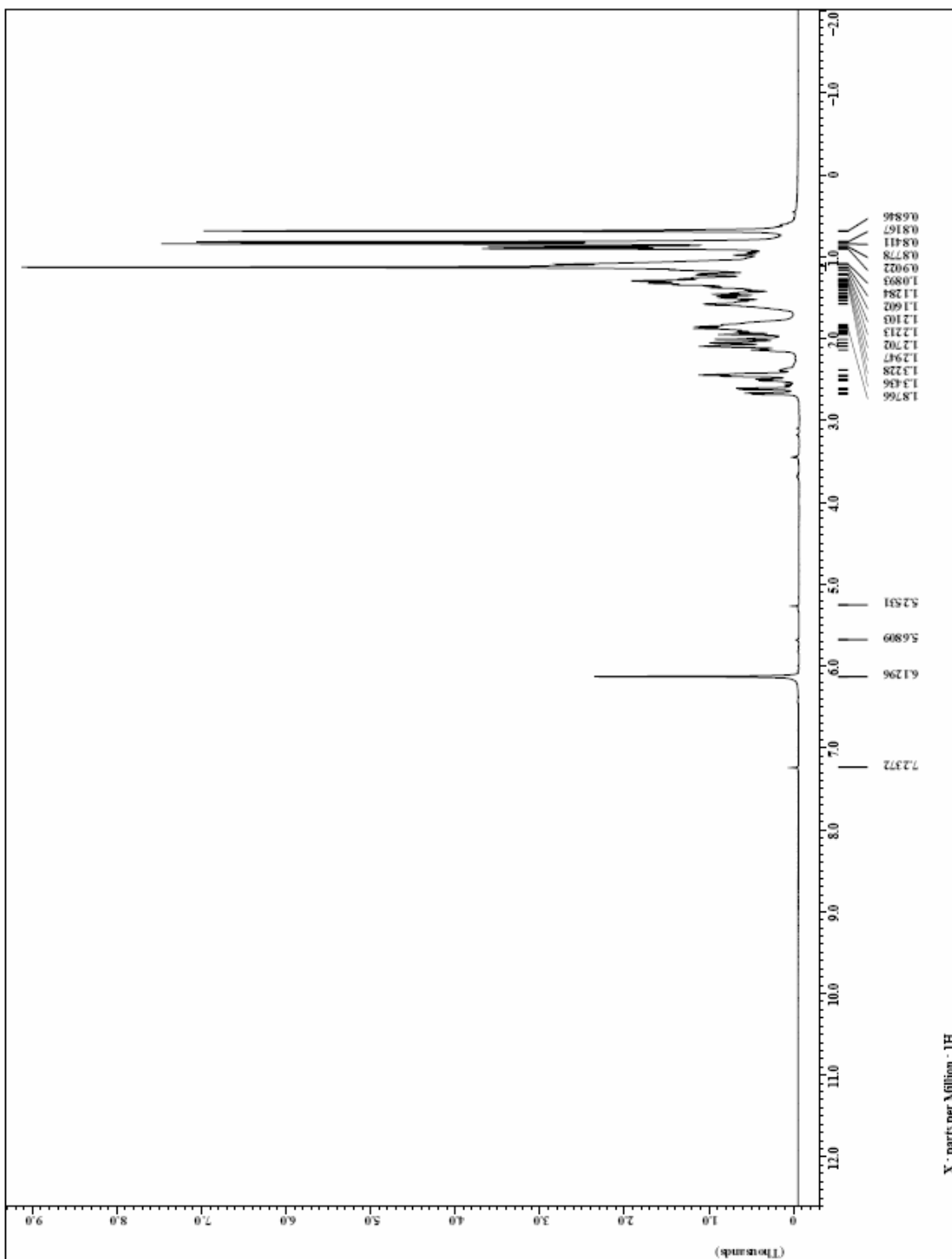
* tomado en CDCl₃

pertenece a un CH-Et

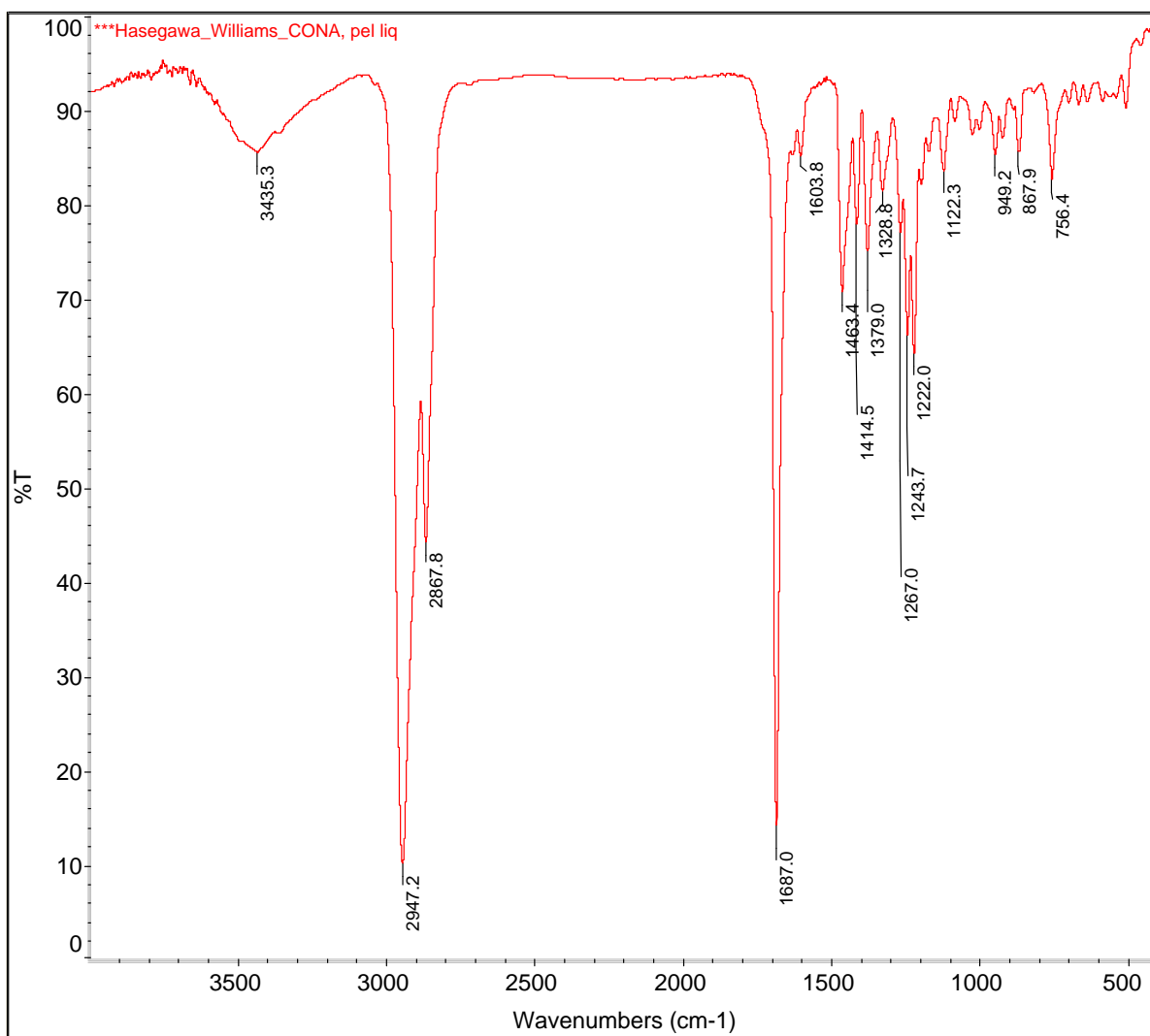
Espectro N° 3. RMN ^{13}C producto de oxidación de colesterol con Jones.



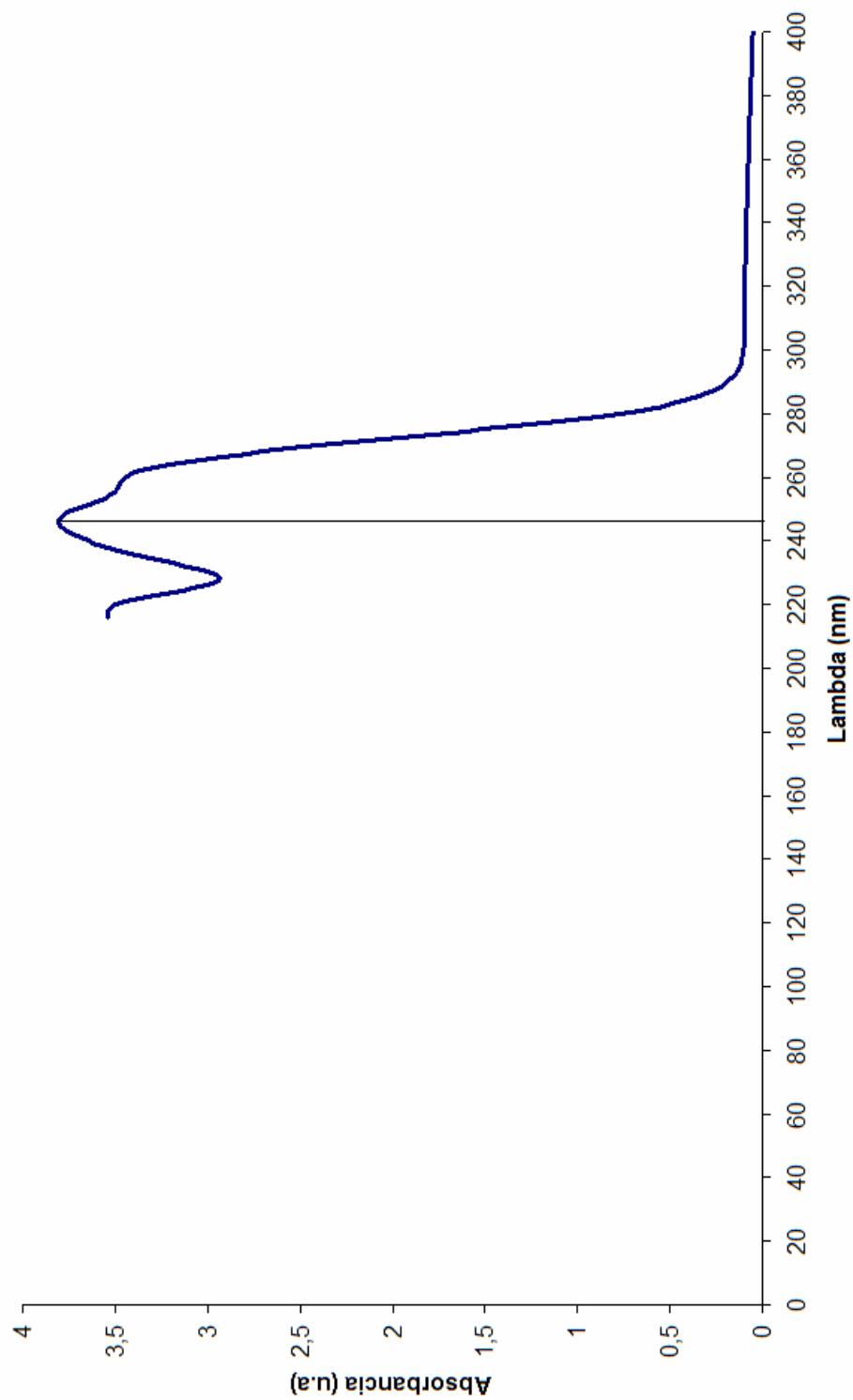
Espectro N° 4. RMN ¹H producto de oxidación de colesterol con Jones.



Espectro N° 5. IR del producto de oxidación de colesterol con Jones.

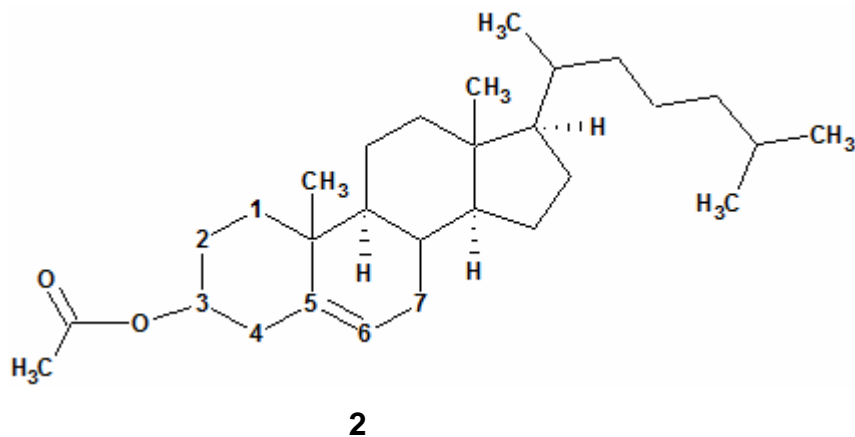


Espectro N° 6. UV producto de oxidación de colesterol con Jones.



5.1.2. Síntesis de colest-5-eno-3,7-diona:

5.1.2.1. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato:

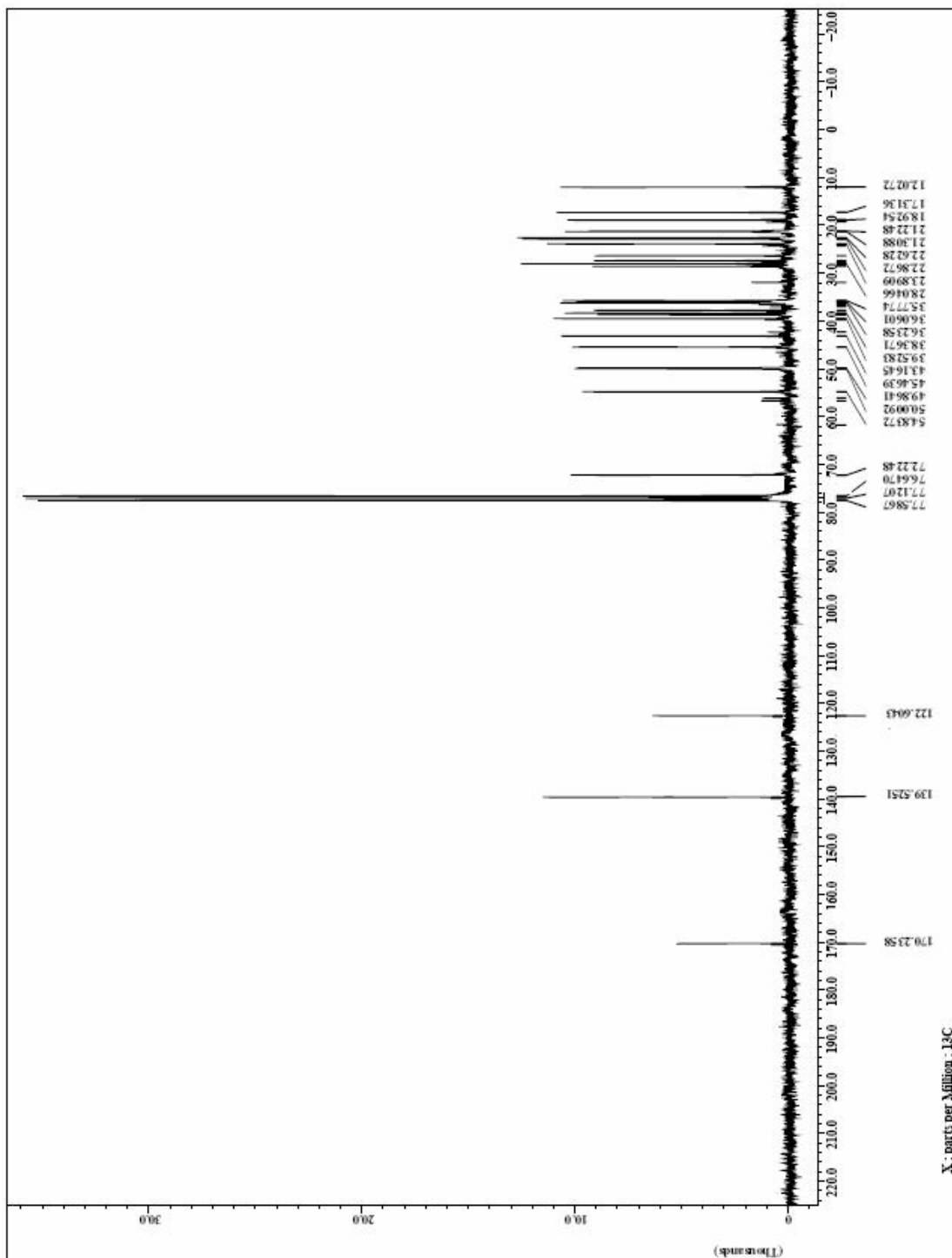


Para obtener este producto 2, se procedió a acetilar el grupo –OH presente en el carbono 3 del colesterol, de manera de protección y así realizar una oxidación alílica en el próximo paso y no afectar el grupo –OH.

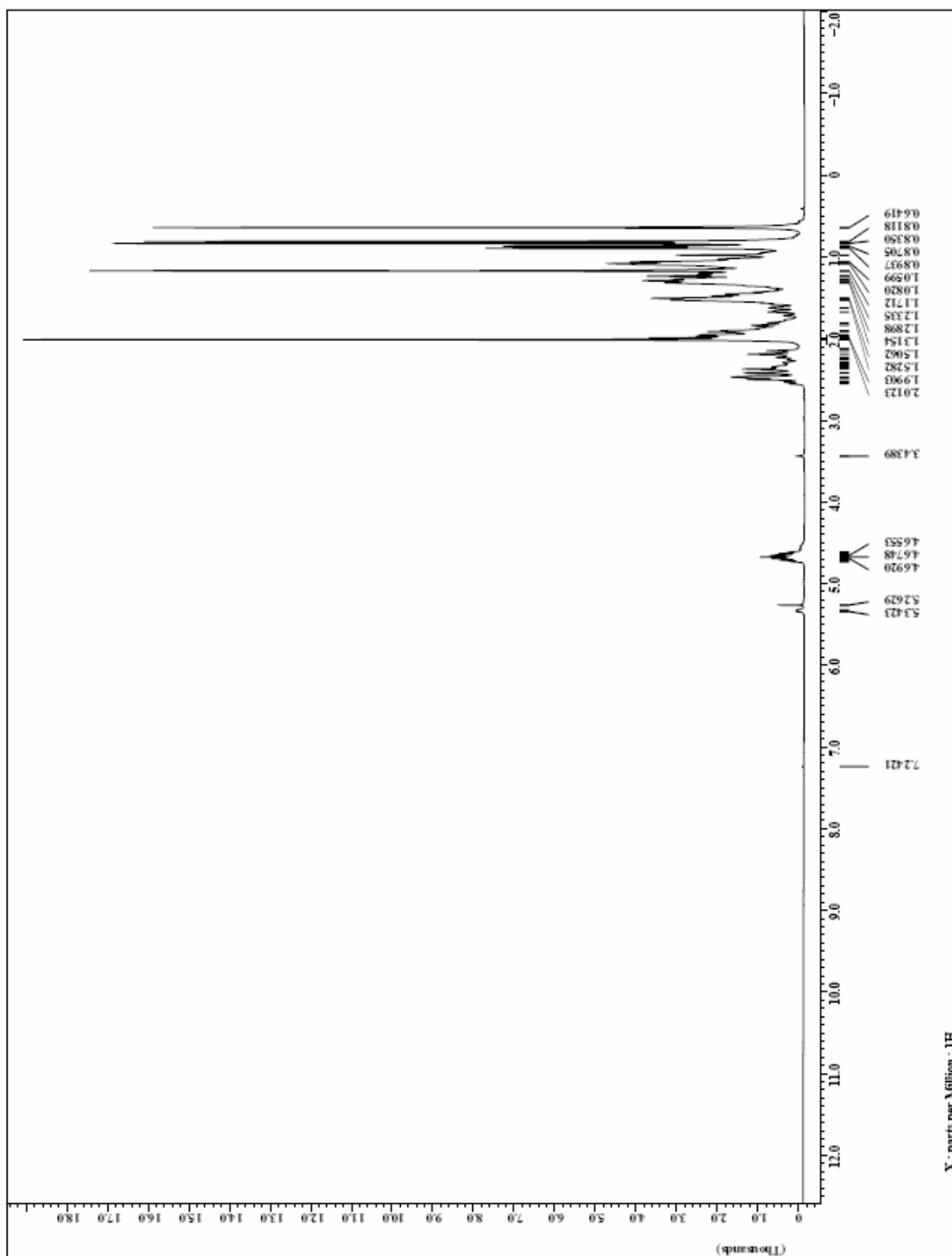
En el espectro RMN ^{13}C (espectro N $^{\circ}$ 7) tomado en CDCl_3 perteneciente al producto de acetilación de colesterol se observan las señales características de este compuesto: 170,23 ppm para el carbono carbonílico del grupo acetyl introducido; 139,52 ppm para el carbono cuaternario (5); 122,60 ppm perteneciente al carbono 6 (CH); 72,22 ppm para el carbono 3 (C-OAc).

En el espectro RMN ^1H (espectro N $^{\circ}$ 8) tomado en CDCl_3 del producto de acetilación del colesterol se observan tres señales características: un triplete en 5,34 ppm perteneciente al protón unido al carbono 6 (CH); un multiplete en 4,67 ppm que corresponde al protón del carbono 3 (CH) y un singlete en 2,01 ppm que pertenece al CH_3 del grupo acetyl introducido.

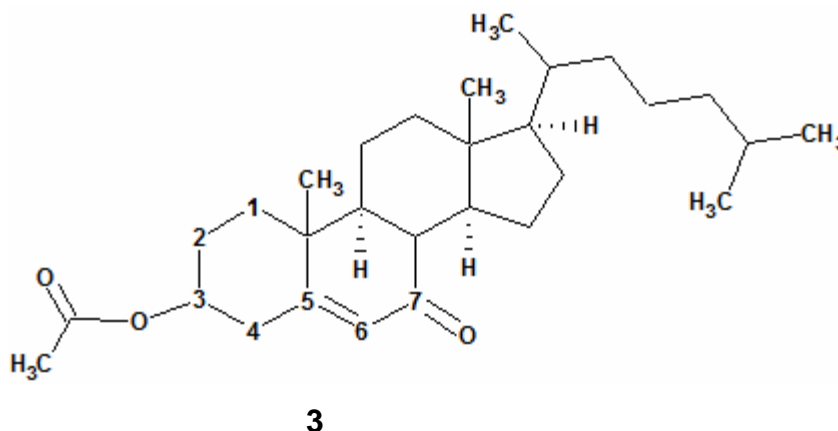
Espectro N° 7. RMN ^{13}C del producto de acetilación de colesterol.



Espectro N° 8. RMN ¹H del producto de acetilación de colesterol.



5.1.2.2. Obtención de colest-5-eno-3 β -O-acetato-7-ona:



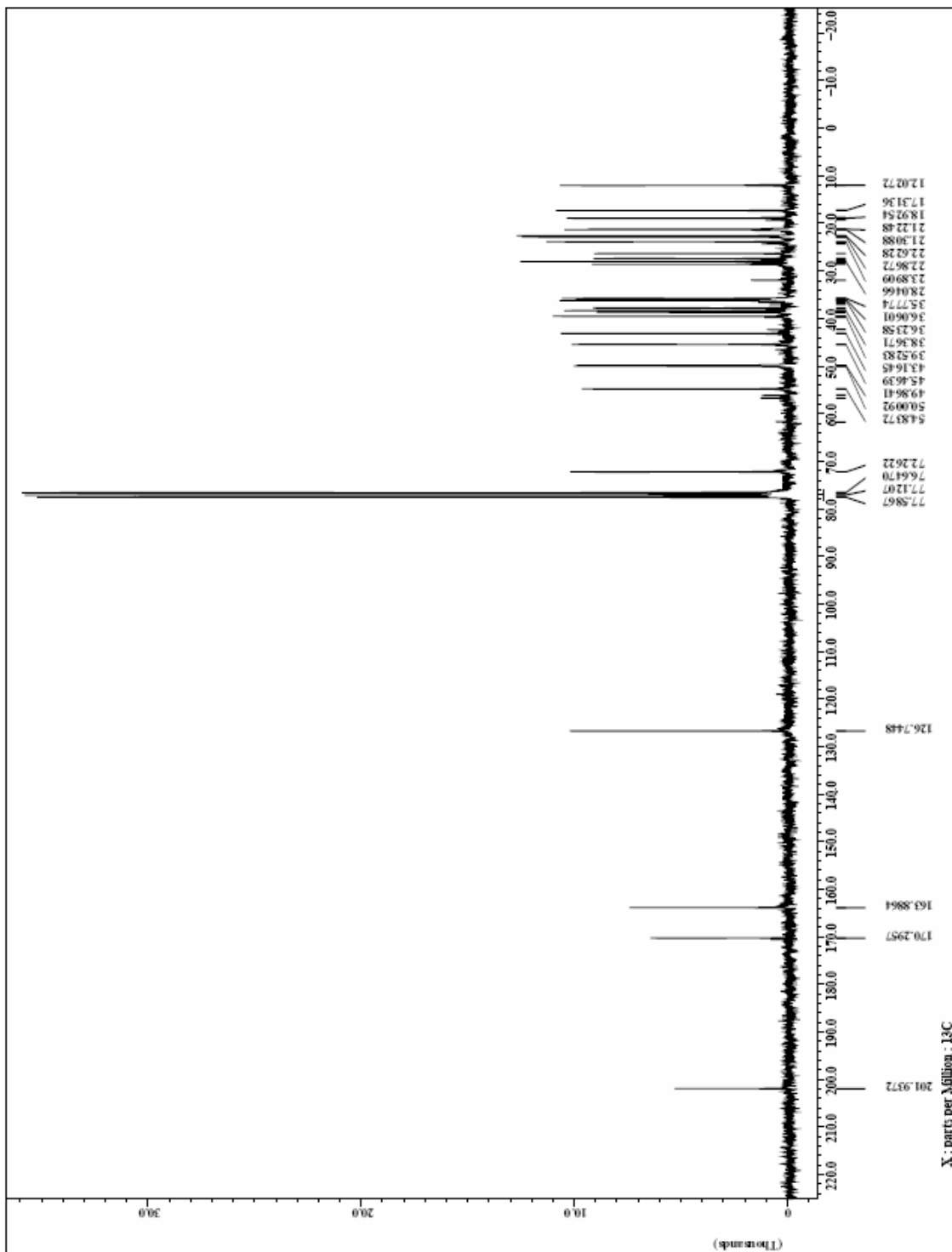
Luego de obtener colesterol acetilado, se procedió a realizar una oxidación alílica del carbono 7 y así obtener el compuesto 3.

En el espectro RMN ^{13}C (espectro N° 9) tomado en CDCl_3 del producto de la oxidación alílica se observa el número de señales correspondiente para este compuesto. Entre ellas 201,93 ppm característica de un carbono (C7) carbonílico conjugado; 170,29 ppm perteneciente al carbonilo del grupo acetil; 163,88 ppm correspondiente al carbono cuaternario C5; 126,74 ppm para el carbono 6 (CH); 72,26 ppm que corresponde al carbono 3, el cual está unido al grupo acetil.

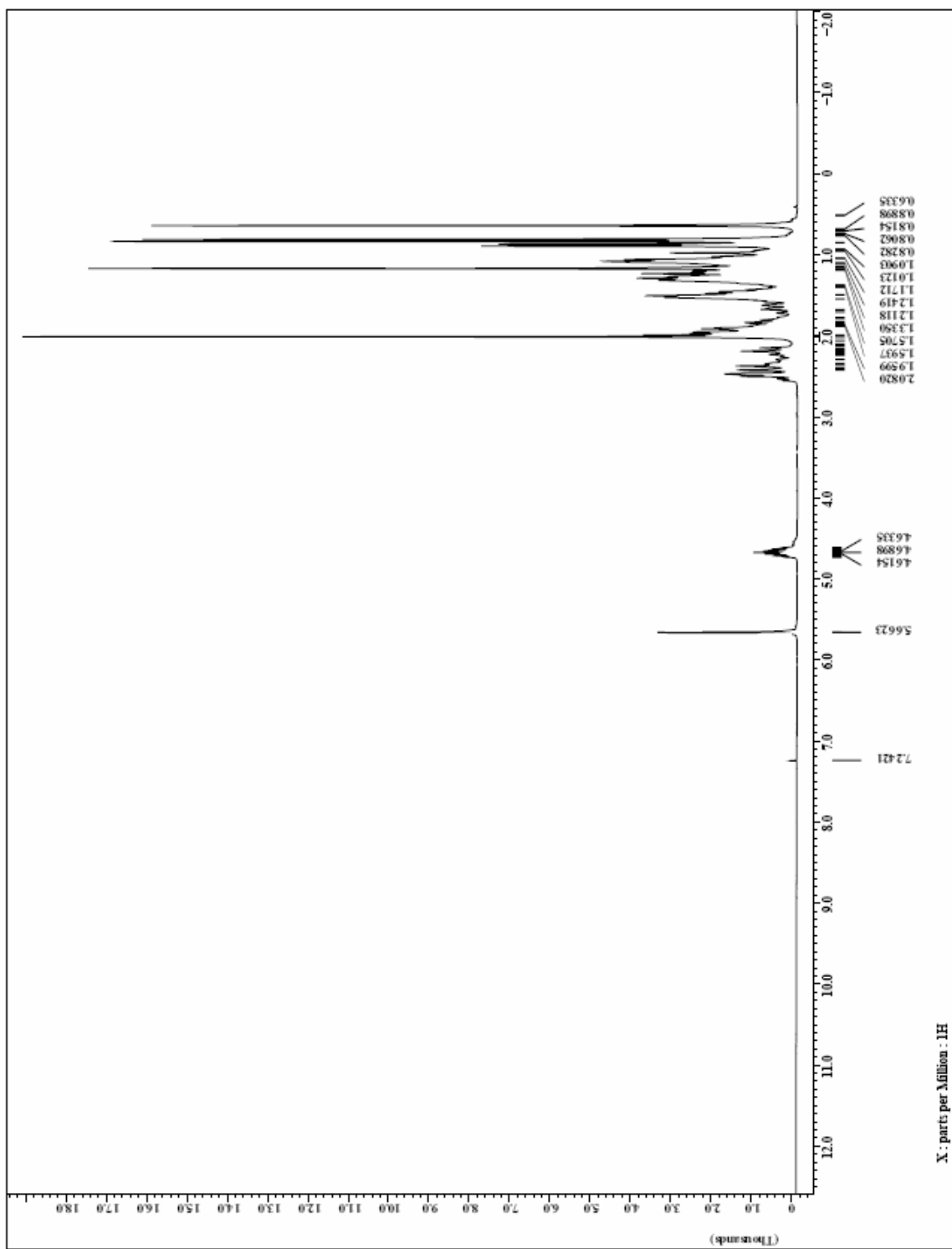
Por otro lado en el espectro RMN ^1H (espectro N° 10) tomado en CDCl_3 de este compuesto se observan dos señales características del mismo, como lo son: un singlete en 5,66 ppm que pertenece al protón unido al carbono 6 (CH) y un multiplete en 4,67 ppm que corresponde al acoplamiento del protón presente en el carbono 3 (CH) con sus protones vecinos.

En el espectro UV (espectro N° 11) del producto, se observa un máximo de absorción en 230 nm, característico de una cetona α , β -conjugada.

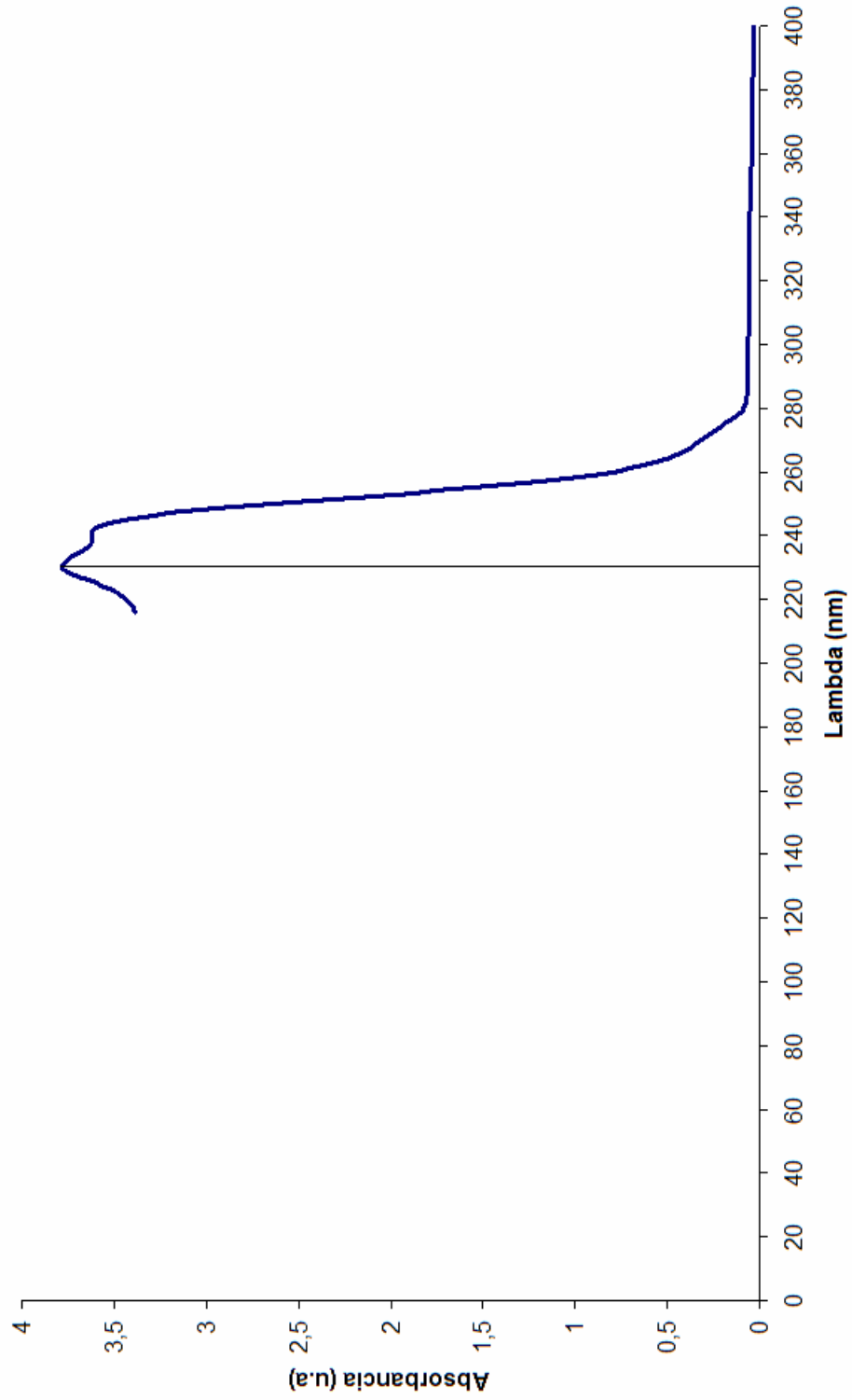
Espectro N° 9. RMN ^{13}C del producto de la oxidación alílica.



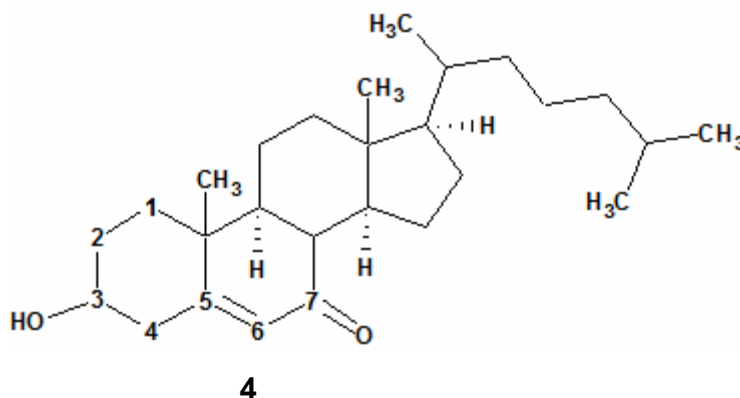
Espectro N° 10. RMN ^1H del producto de la oxidación alílica.



Espectro N° 11. UV del producto de la oxidación alílica.



5.1.2.3. Obtención de colest-5-eno-3 β -ol-7-ona:



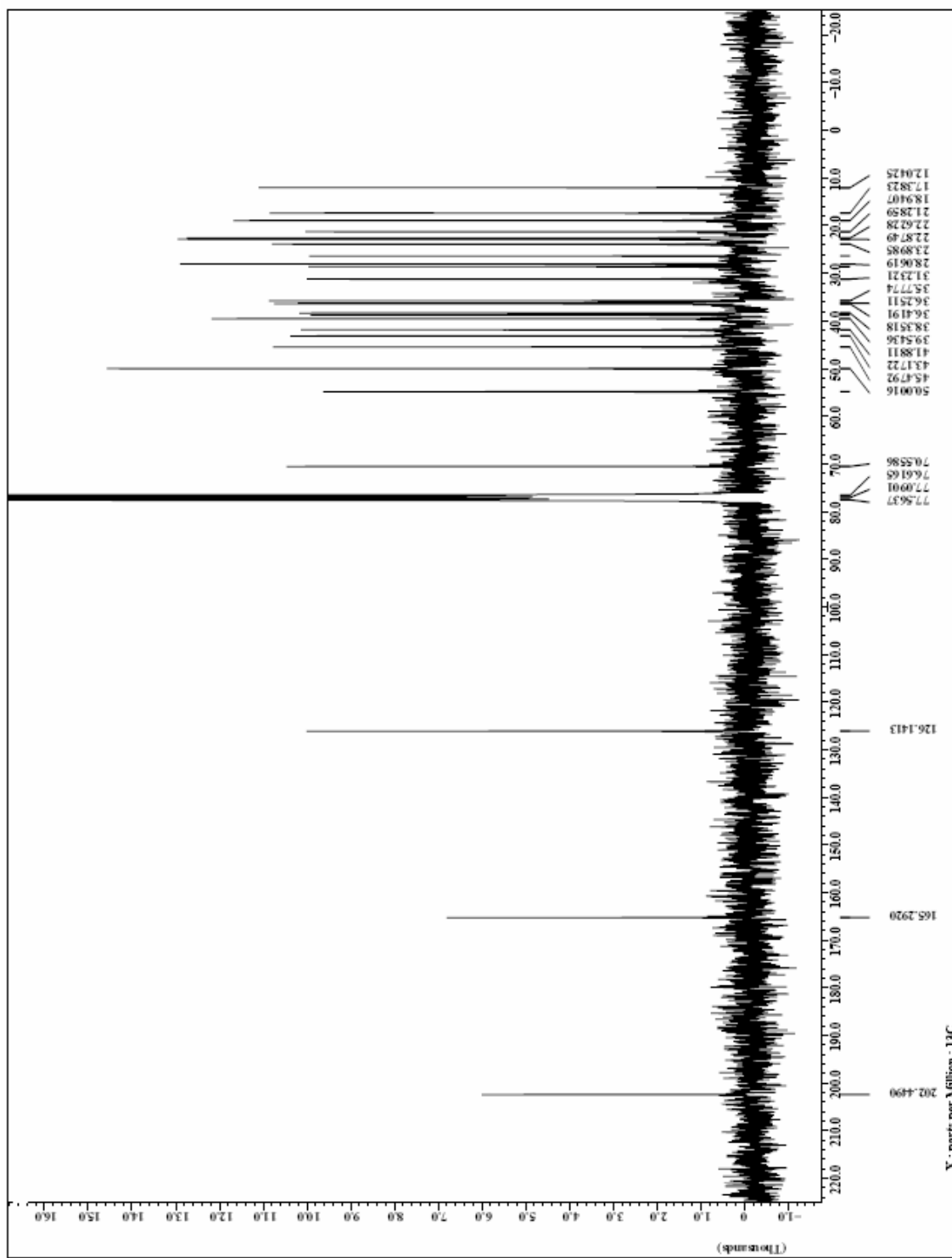
Luego de obtener el producto de oxidación alílica se procedió a realizar una hidrólisis del grupo acetil a fin de obtener el compuesto 4.

Las señales obtenidas más características del espectro de RMN ^{13}C (espectro N° 12) tomado en CDCl_3 del producto obtenido fueron las siguientes: 202,44 ppm correspondiente al grupo carbonilo conjugado (carbono 7); 165,29 ppm perteneciente al carbono 5 cuaternario; 126,14 ppm para el carbono 6 (CH); 70,55 ppm correspondiente al carbono unido al grupo $-\text{OH}$ (carbono 3).

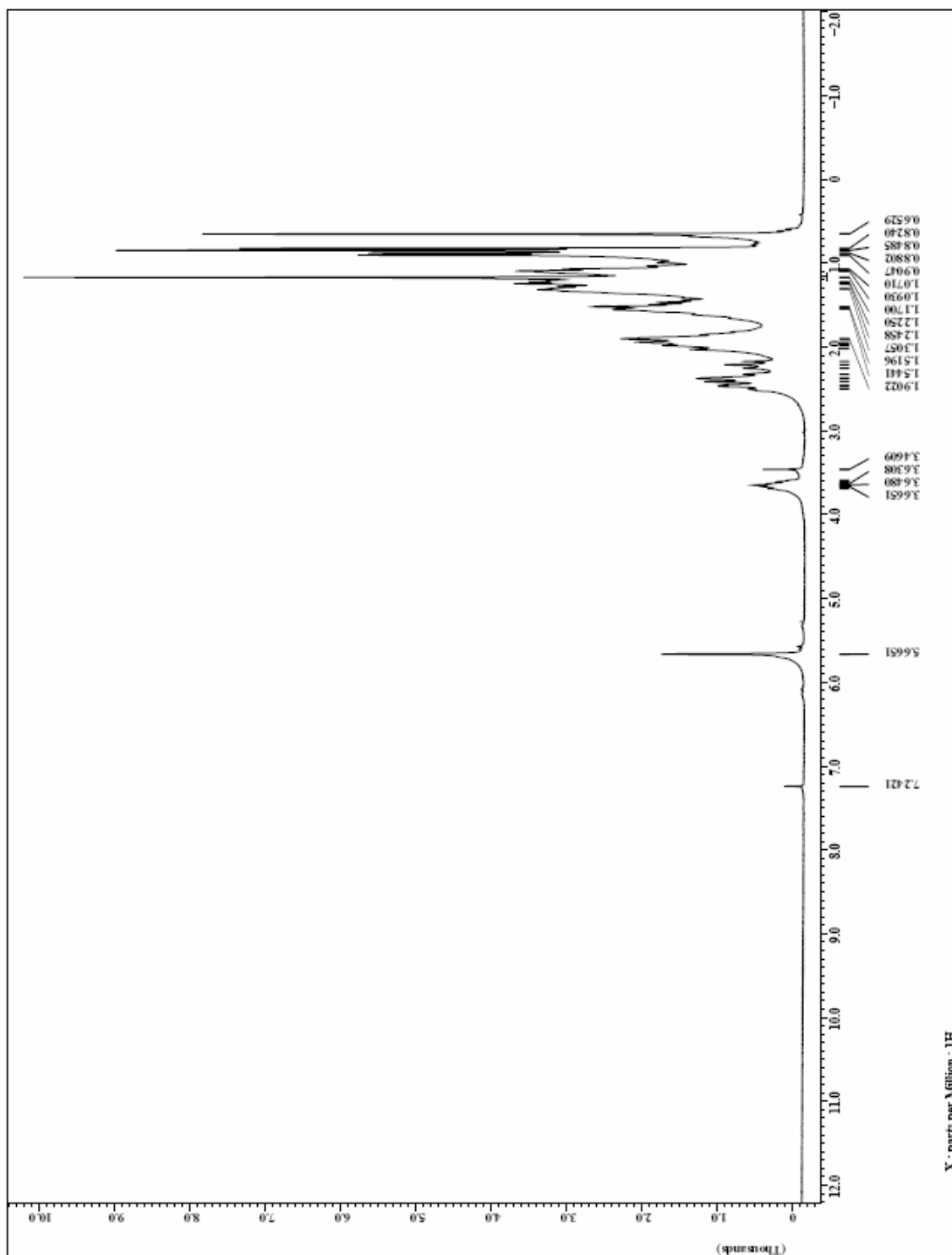
En el espectro de RMN ^1H (espectro N° 13) tomado en CDCl_3 del compuesto solo se observan dos señales características: un singlete en 5,66 ppm perteneciente al protón unido al carbono 6 (CH) y un multiplete en 3,46 ppm que corresponde al acoplamiento del protón del carbono 3 (CH) con sus protones vecinos. La desaparición de las señales correspondiente al carbonilo del grupo acetil en 170,29 ppm en el espectro de RMN ^{13}C y de la señal en 2,01 ppm del CH_3 del grupo acetil en el espectro de RMN ^1H confirman la hidrólisis del mismo.

La oxidación del compuesto 4, se intentó con PCC (pyridinium chlorochromate) resultando negativa (se obtuvo el mismo compuesto) y con $\text{CrO}_3/\text{ácido acético}$ dio una mezcla compleja. Por los momentos no se siguió intentando.

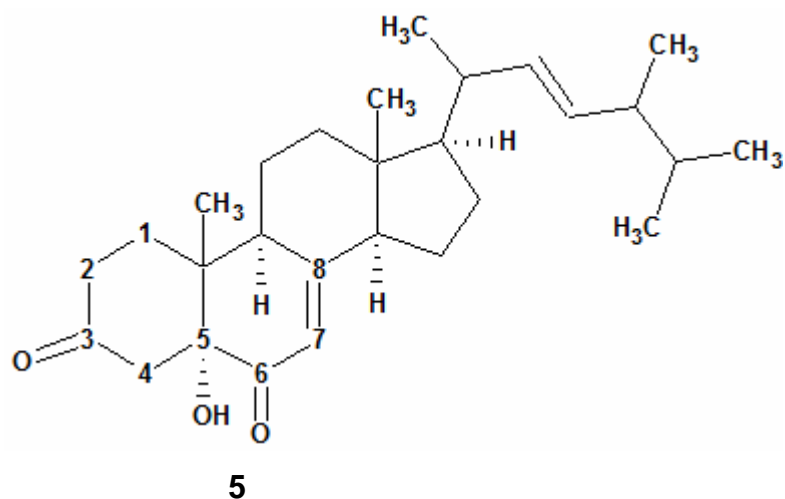
Espectro N° 12. RMN ^{13}C del producto de la hidrólisis del grupo acetil.



Espectro N° 13. RMN ^1H del producto de la hidrólisis del grupo acetil.



5.2. Oxidación de ergosterol utilizando el reactivo de Jones:



La oxidación de ergosterol con el reactivo de Jones dio como resultado el compuesto ergosta-7,22-dieno-5 α -ol-3,6-diona (5).

El espectro IR (espectro N^o 14) tomado en una película líquida de CH₂Cl₂, presenta dos bandas carbonílicas, una en 1714,1 cm⁻¹ que corresponde a la cetona no conjugada (C3) y otra en 1672,6 cm⁻¹ que pertenece a la cetona α,β conjugada (C6), también presenta una banda ancha en 3340,3 cm⁻¹ característica del grupo –OH presente en el carbono 5 y una señal en 1621,8 cm⁻¹ que pertenece al doble enlace Δ^7 .

En el espectro RMN ¹³C (espectro N^o 15) tomado en CDCl₃ con algunas gotas de MeOD del compuesto se observan siete señales características: en 212,16 ppm la correspondiente al carbono carbonílico en C3; 198,29 ppm para el carbonilo conjugado presente en C6; 166,23 ppm que pertenece al carbono cuaternario C8; 134,57 y 131,56 ppm que corresponden a los carbonos olefínicos 22 y 23 respectivamente; 118,65 ppm para el CH presente en la posición 7 y 78,74 ppm para el carbono 5 el cual está unido directamente al grupo –OH. (ver ampliación, espectro N^o 16).

En relación al espectro RMN ^{13}C de ergosterol (espectro N° 18) tomado en CDCl_3 con algunas gotas de MeOD, las señales correspondientes a los carbonos olefínicos 22 y 23 se observan en 135,89 y 131,60 ppm, lo que implica que la oxidación no afectó la insaturación presente en los mismos. Además la señal en 73,83 ppm que pertenece al C3 que está unido al grupo $-\text{OH}$ no está presente en el espectro del producto de oxidación.

El espectro RMN ^1H (espectro N° 17) del producto de oxidación de ergosterol tomado en CDCl_3 con algunas gotas de MeOD, se observan dos señales características: un singlete en 5,41 ppm del protón unido al carbono 7 y un par de dobletes de tripletes en 4,96 ppm ($J = 15,3 \text{ Hz}$) que pertenece a los protones unidos a los carbonos olefínicos 22 y 23, debido al acoplamiento con sus protones vecinos.

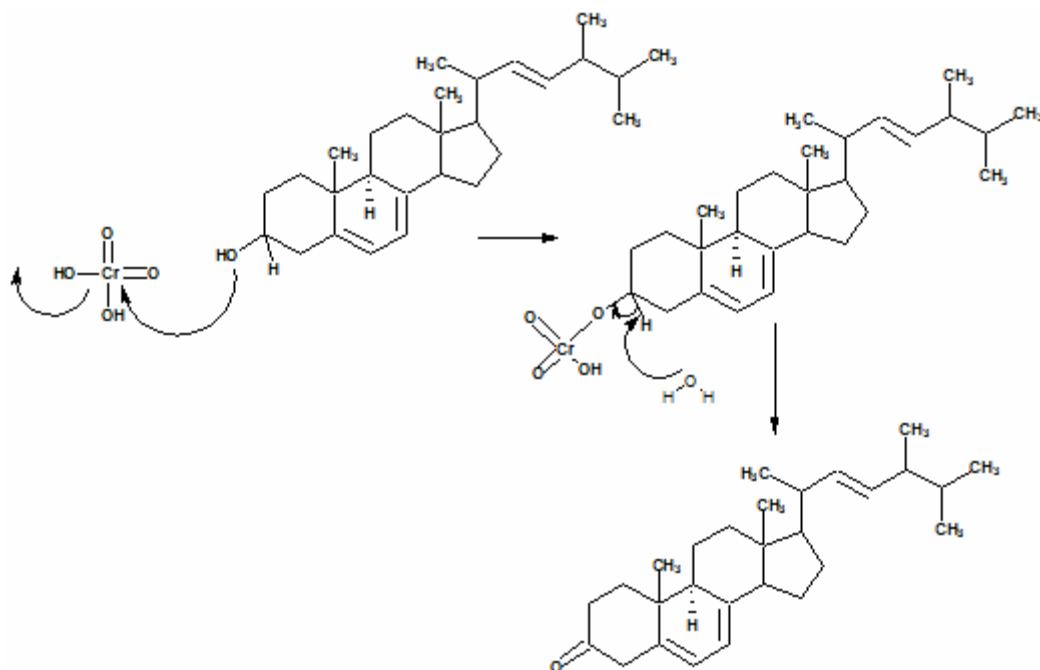
Por otro lado, en el espectro UV (espectro N° 19) del producto de oxidación de ergosterol se observa un máximo de absorción en 250 nm, el cual es un valor típico para este tipo de compuestos. ^[44] (Δ^7 -6-cetoesteroides)

Otro hecho que apoya la postulación de la estructura 5 es la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos en los espectros de RMN ^{13}C tanto del producto de oxidación de ergosterol como de los distintos derivados de colesterol obtenidos. En dicha comparación se concluyó que de las tres estructuras esperadas (a, b, c) la estructura "c" era la más adecuada, ya que las estructuras a y b fueron descartadas por dicha comparación, es decir, los datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de los derivados de colesterol con estructuras similares a las estructuras a y b no concordaban con los datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de ergosterona.

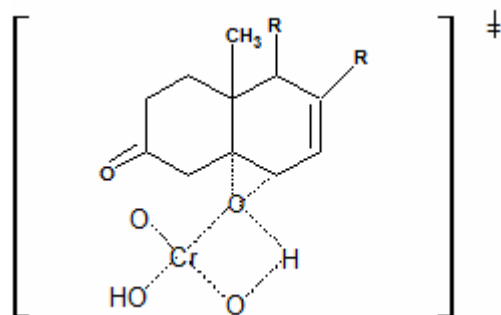
Tabla Nº 2. Comparación de datos espectroscópicos RMN ¹³C de los distintos derivados obtenidos.

Nº Carbono	Derivado 1 (ppm)	Derivado 2 (ppm)	Derivado 3 (ppm)	Derivado 4 (ppm)	Derivado 5 (ppm)	Colesta-5-eno-3,7-diona. ^[38]
3	202,37 (C=O)	72,22 (C-OAc)	72,26 (C-OAc)	70,55 (C-OH)	212,16 (C=O)	202,76 (C=O)
4	125,48 (CH)	38,36 (CH ₂)	39,52 (CH ₂)	38,35 (CH ₂)	43,66 (CH ₂)	42,92 (CH ₂)
5	161,13 (C)	139,52 (C)	163,88 (C)	163,28 (C)	78,74 (C-OH)	161,50 (C)
6	199,53 (C=O)	122,60 (CH)	126,27 (CH)	126,14 (CH)	198,29 (C=O)	125,83 (CH)
7	46,86 (CH ₂)	28,04 (CH ₂)	201,93 (C=O)	202,44 (C=O)	118,65 (CH)	199,94 (C=O)
8	34,26 (CH)	35,77 (CH)	49,86 (CH)	50,00 (CH)	166,23 (C)	51,37 (CH)
Abs. Máx. (nm)	246	----	230	----	250	----

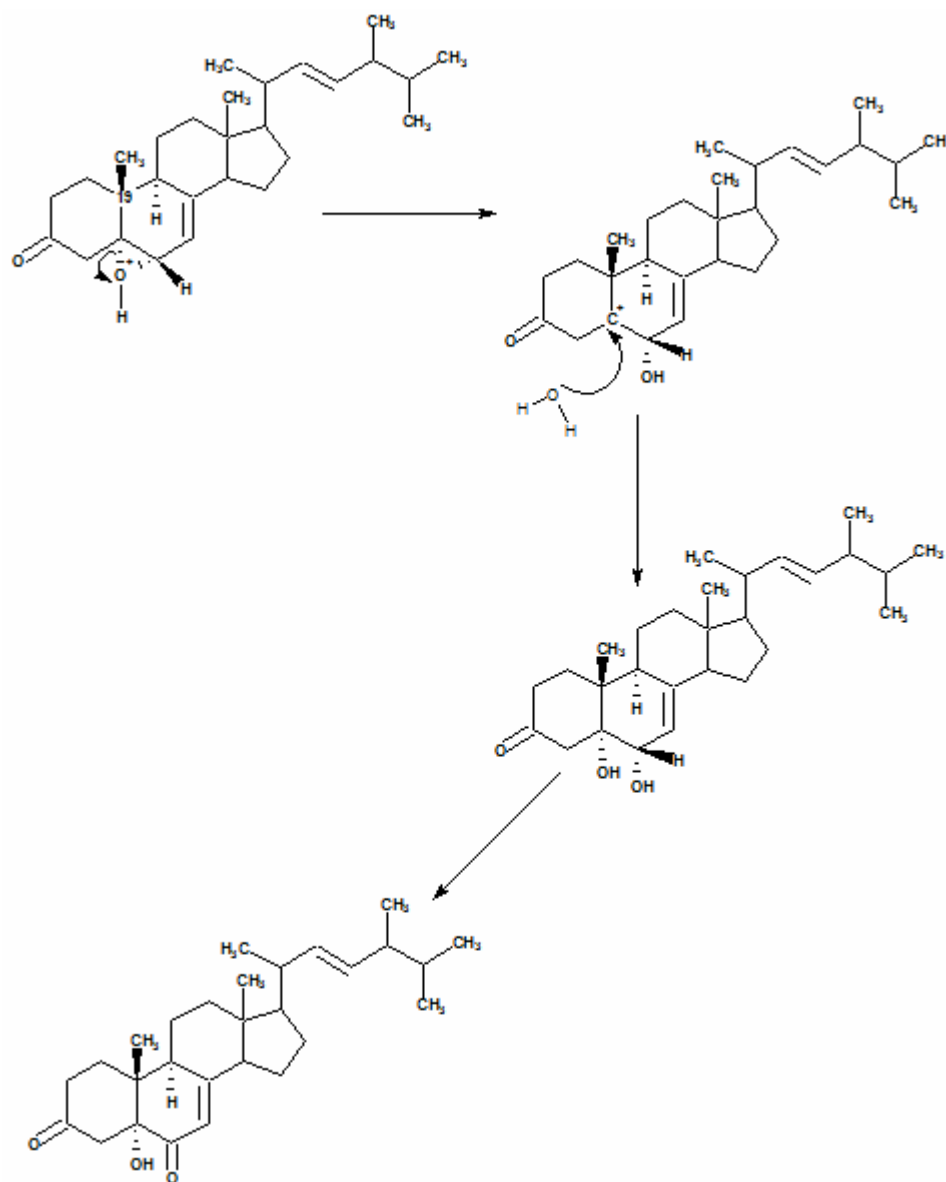
En cuanto al mecanismo de reacción, se plantea, para la oxidación del grupo –OH presente en el carbono 3, la formación de un éster de alcohol seguido por la descomposición con rompimiento del enlace C-H como se muestra a continuación:



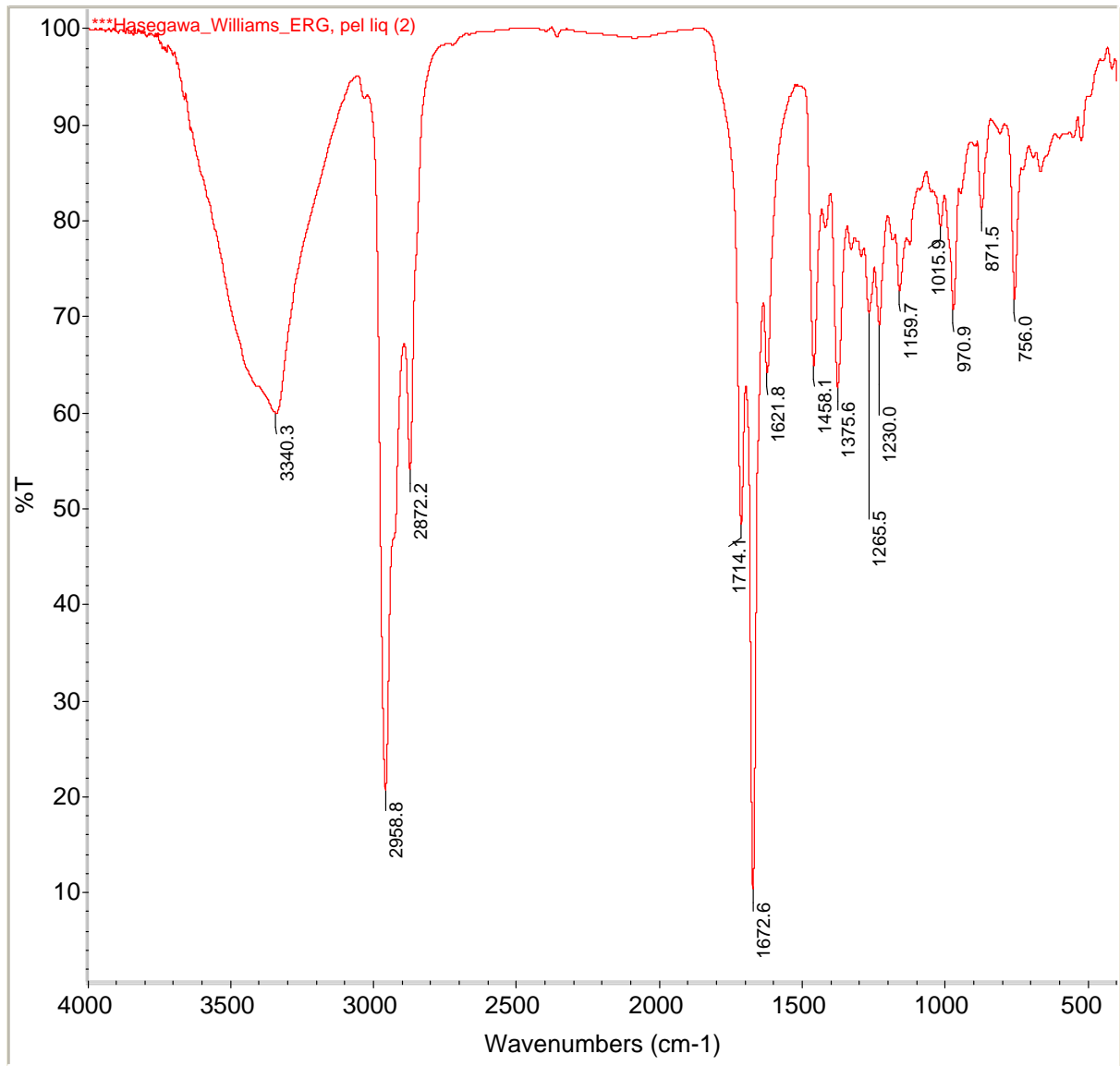
Luego ocurre la formación de un epóxido en $\Delta^{5,6}$ el cual se representa por el estado de transición que se muestra. ^[45]



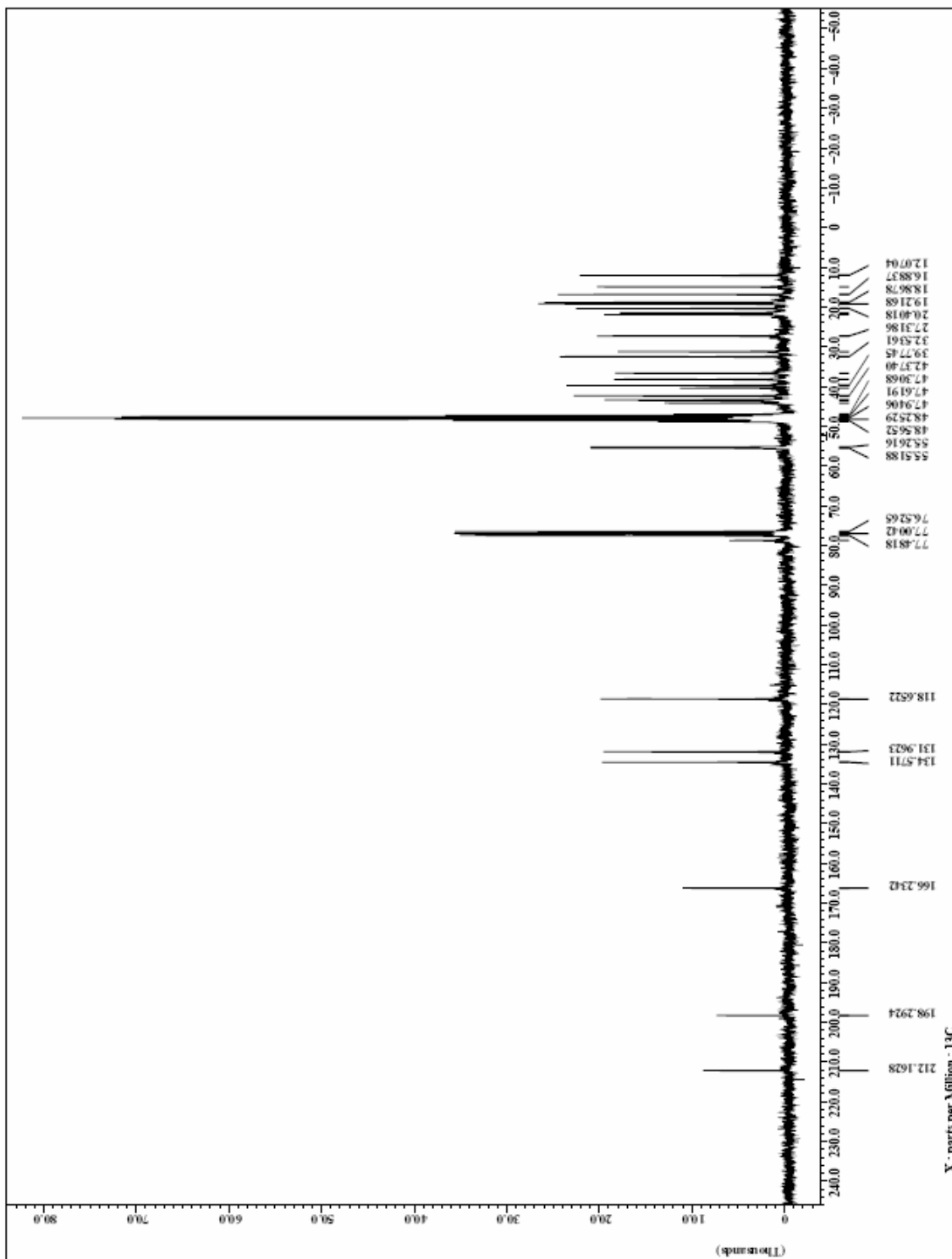
Una vez formado el epóxido protonado, se produce la apertura del mismo formando un carbocatión terciario y un -OH en posición α (C6), seguidamente ocurre un ataque al carbocatión por parte de una molécula de agua por el lado contrario al metilo en C19, el cual se encuentra en posición β , para así obtener un grupo -OH en posición α (C5). Luego el -OH en C6 se oxida siguiendo el mismo mecanismo mostrado en la oxidación del grupo -OH del carbono 3.



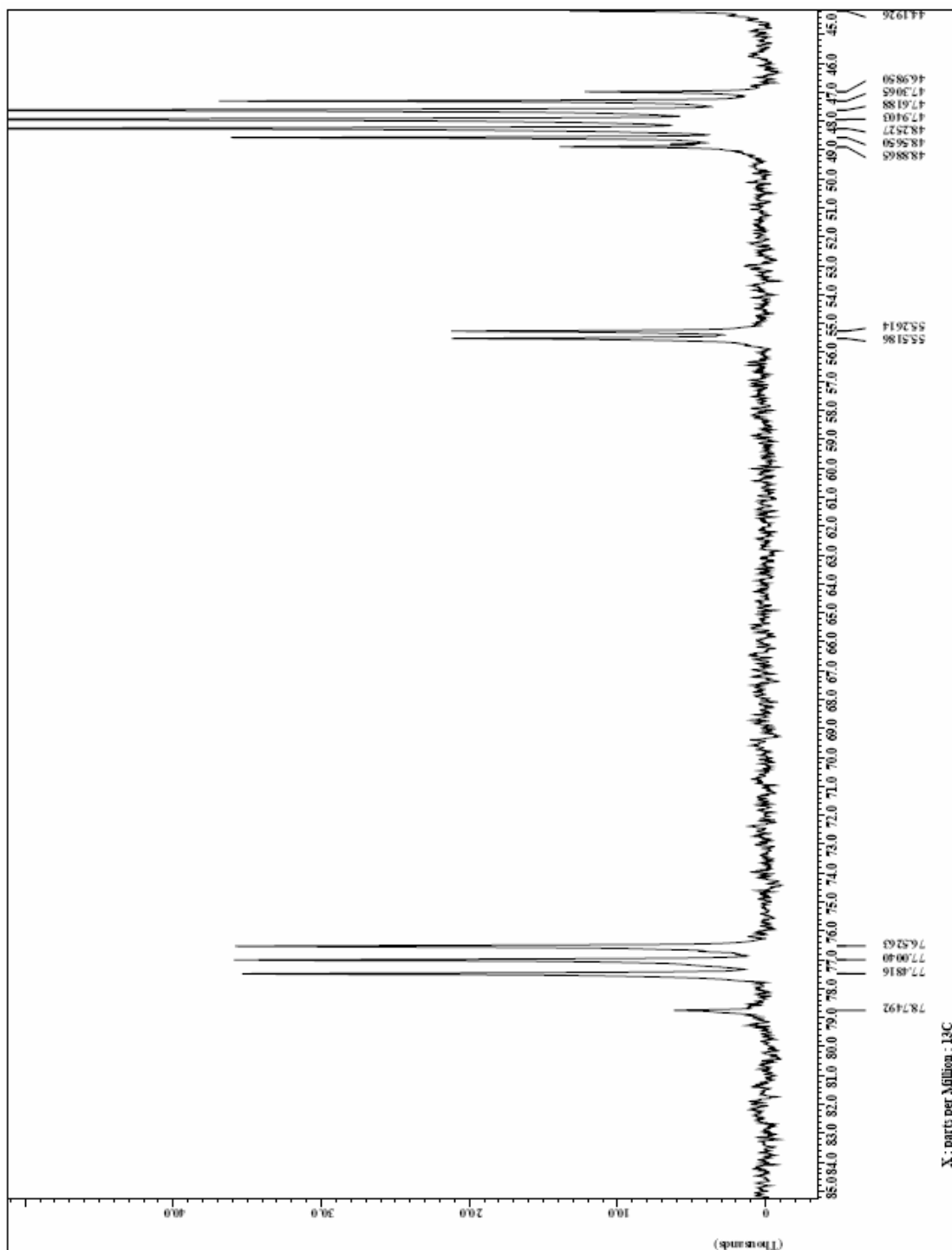
Espectro Nº 14. IR del producto de oxidación del ergosterol.



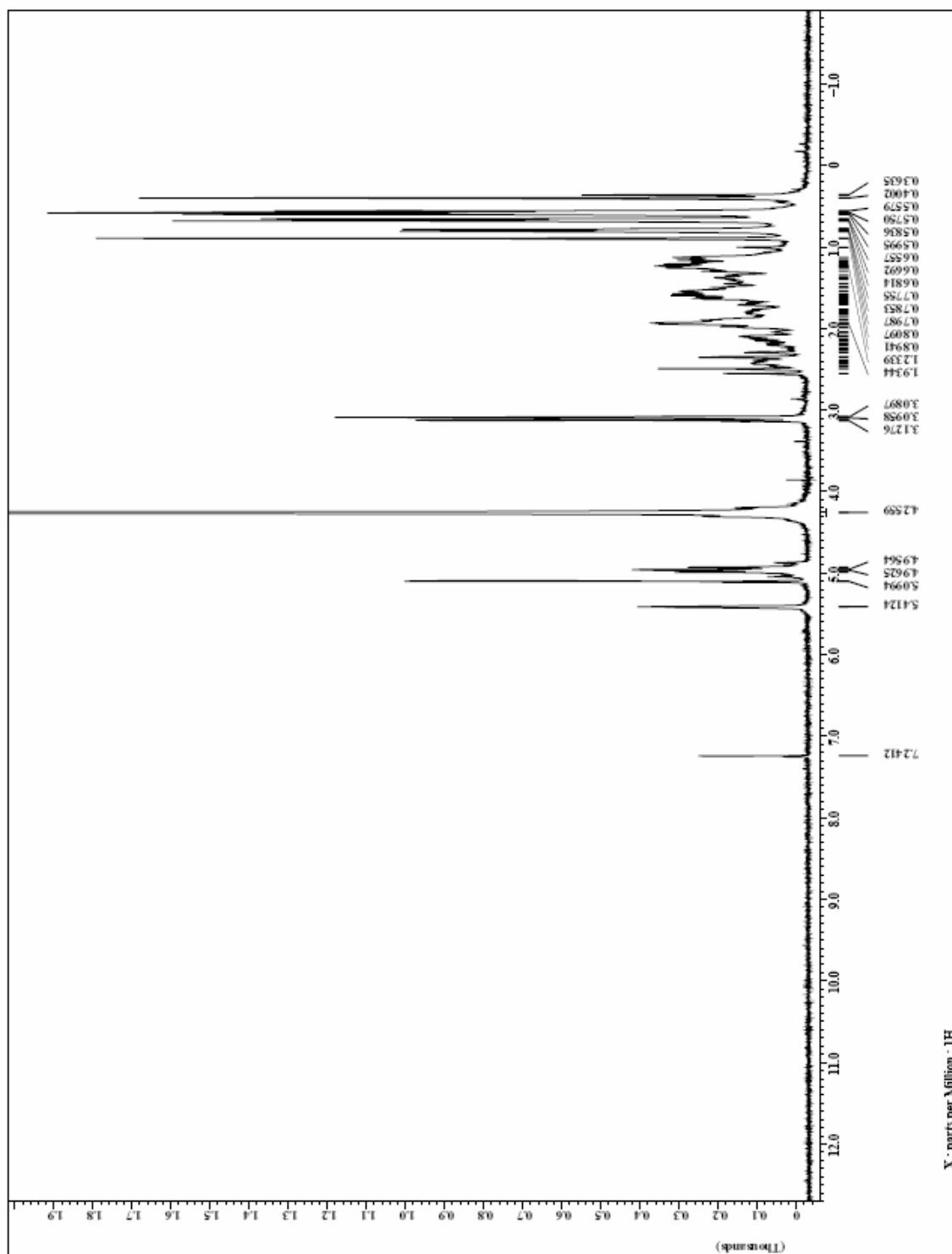
Espectro N° 15. RMN ¹³C del producto de oxidación del ergosterol.



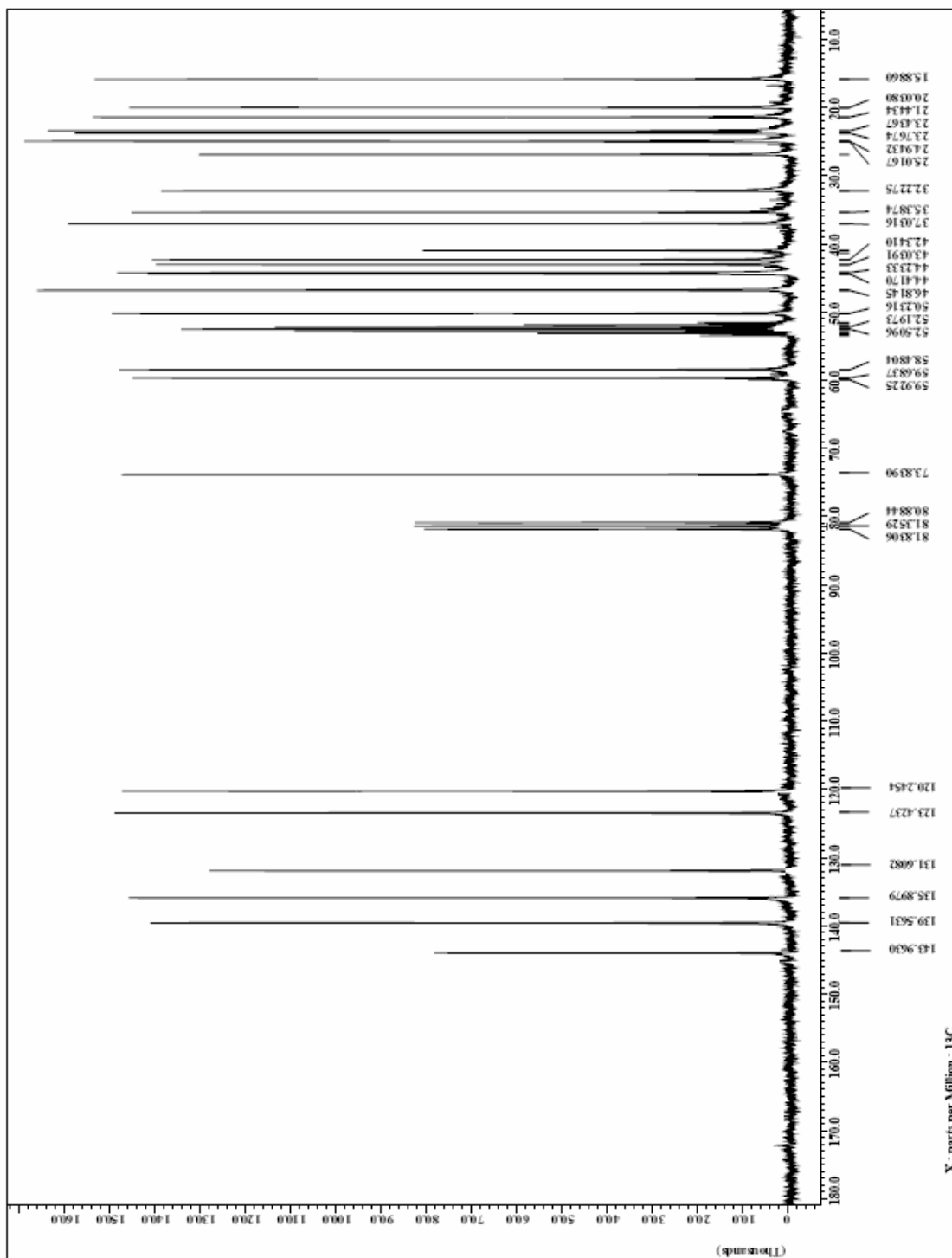
Espectro Nº 16. Ampliación de la zona de campo medio del espectro RMN ¹³C del producto de oxidación del ergosterol.



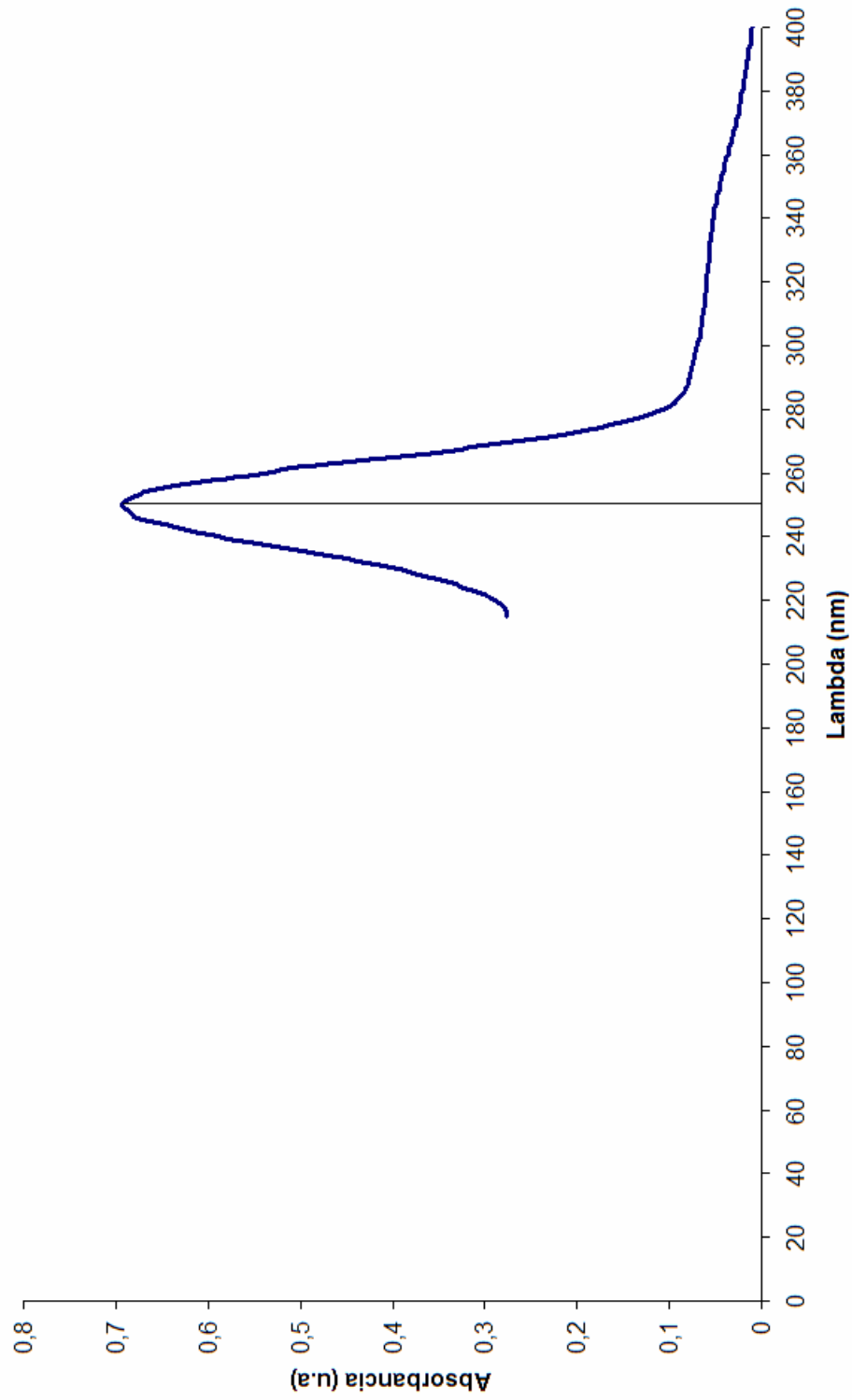
Espectro N° 17. RMN ¹H del producto de oxidación del ergosterol.



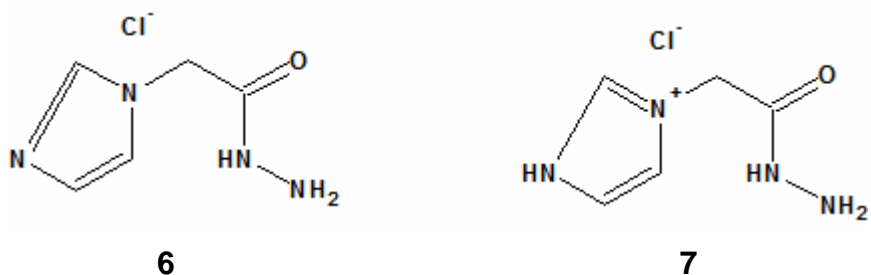
Espectro N° 18. RMN ¹³C de ergosterol.



Espectro Nº 19. UV del producto de oxidación de ergosterol.



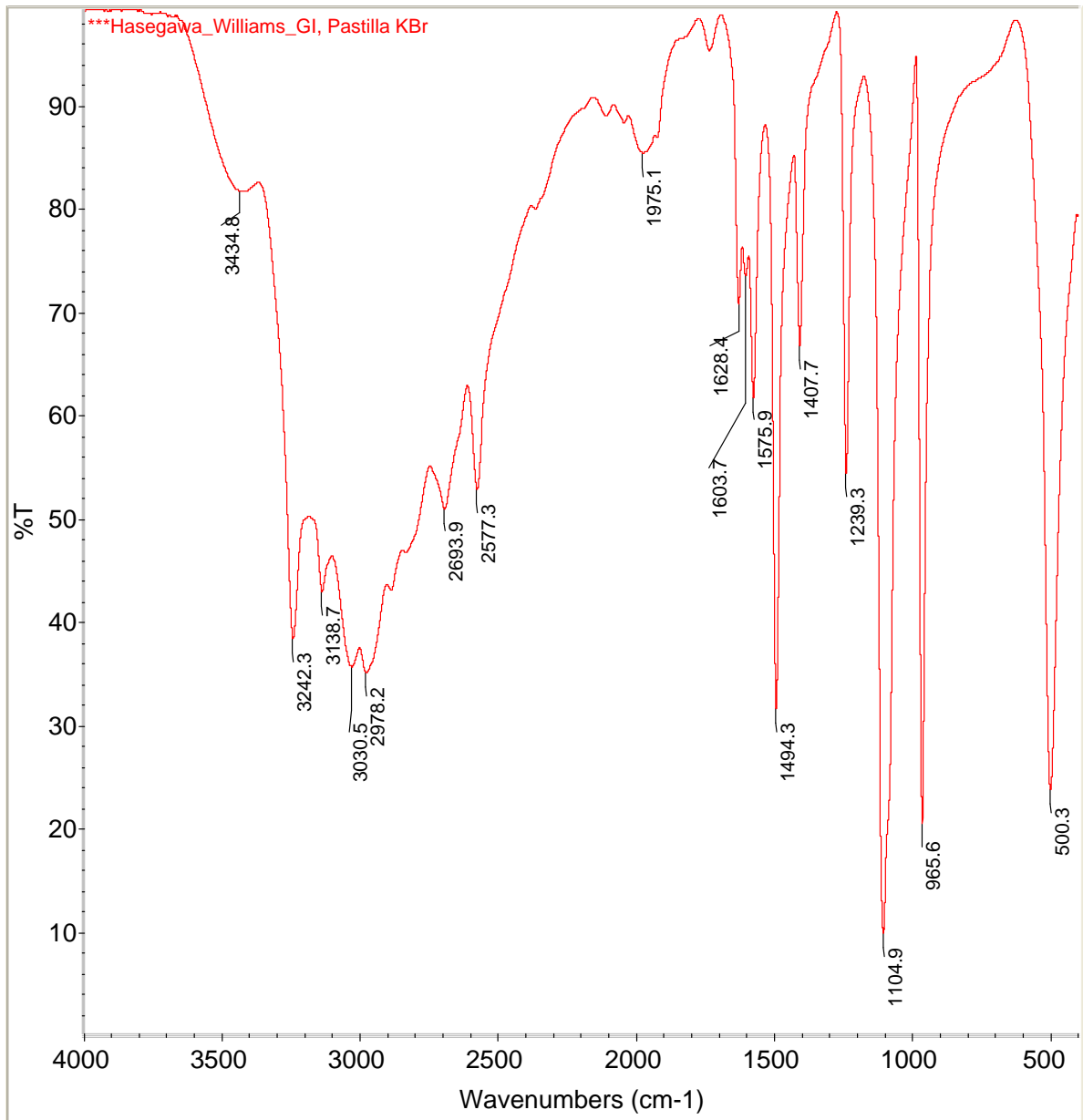
5.3. Síntesis del reactivo de Girard-Imidazol:



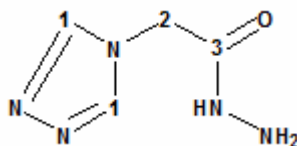
En el espectro IR de Girard-I (espectro N^o 20) tomado en una pastilla de KBr, se observa la presencia de una banda ancha en 3434,8 cm⁻¹ que corresponde al stretching del enlace N-H del grupo amino secundario y del anillo de 6, dos señales en 3242,3 y 3138,7 cm⁻¹ que corresponden al stretching asimétrico y simétrico del enlace N-H de la amina primaria, también se observa una banda en 1628,4 cm⁻¹ que corresponde al grupo carbonilo de imidas, dos bandas en 1575,9 y 1603,7 cm⁻¹ del anillo de imidazol y una banda en 1494,3 que corresponde al stretching del enlace C-N.

No se logró obtener espectros de RMN ¹³C y RMN ¹H confiables del compuesto, por tal razón no se descarto haber obtenido la mezcla mostrada.

Espectro N° 20. IR del reactivo de Girard-I.



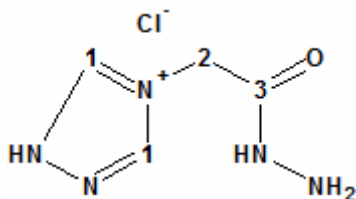
5.4. Síntesis del reactivo de Girard-Triazol:



8

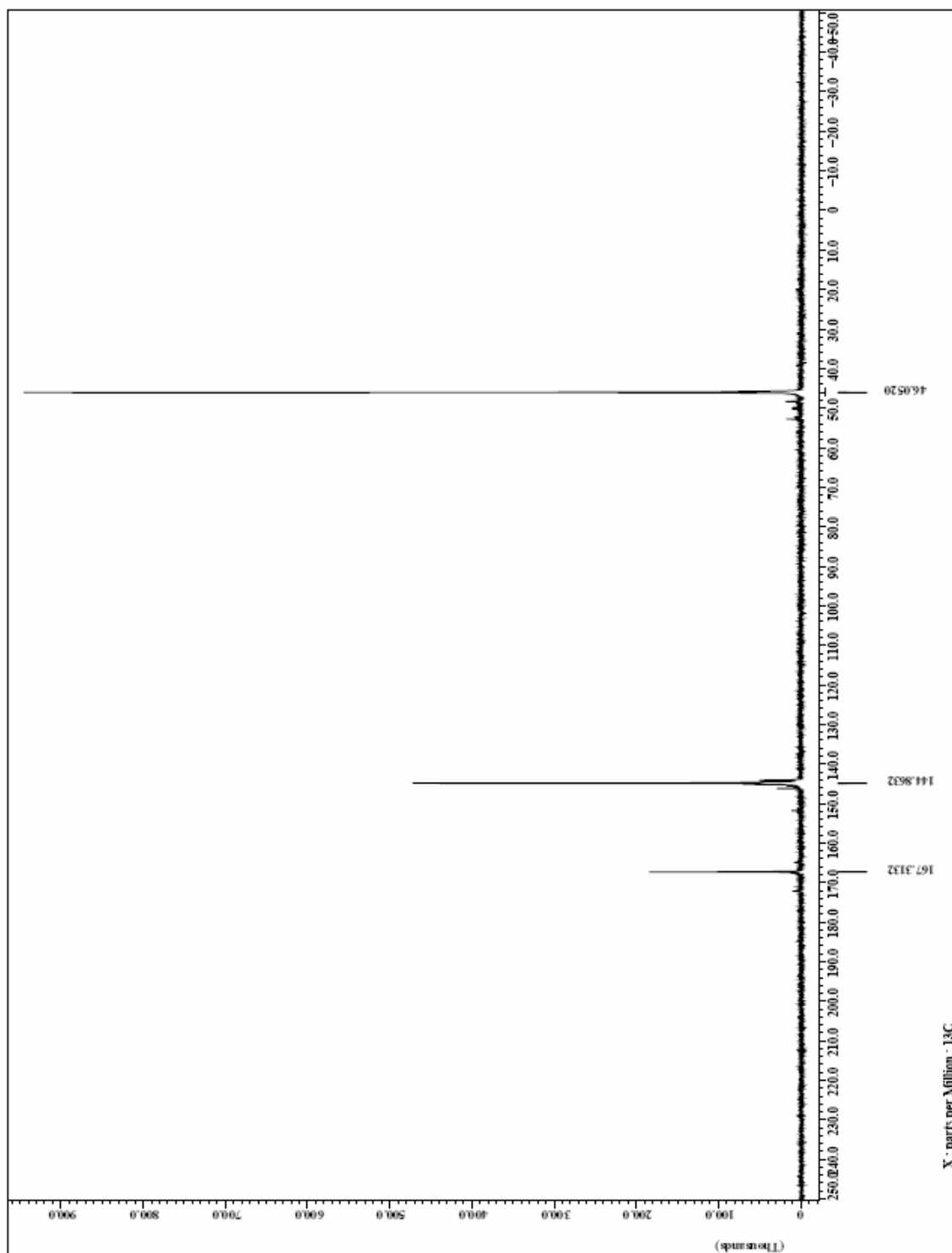
En el espectro RMN ^{13}C de Girard-Tr (8) (espectro N $^{\circ}$ 21) se observan tres señales: 167,31 ppm que pertenece al carbonilo (C3); 144,86 ppm para los carbonos del anillo de triazol (C1), los cuales son equivalentes por simetría y 46,05 ppm para el carbono 2 (CH $_2$)

La postulación de esta estructura y no de alguna otra posible (9) donde el reactivo fuese una sal cuaternaria y los carbonos aromáticos (1) deberían tener diferentes desplazamientos químicos, se debe también al valor del desplazamiento químico del carbono 2 (CH $_2$), el cual se encuentra a campo un poco alto (46,05 ppm) como para estar unido a un nitrógeno con carga positiva.

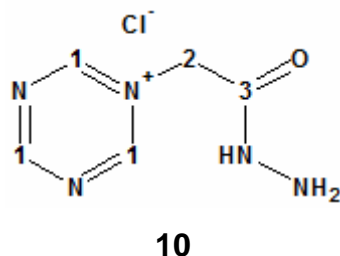


9

Espectro N° 21. RMN ^{13}C del reactivo de Girard-Tr.



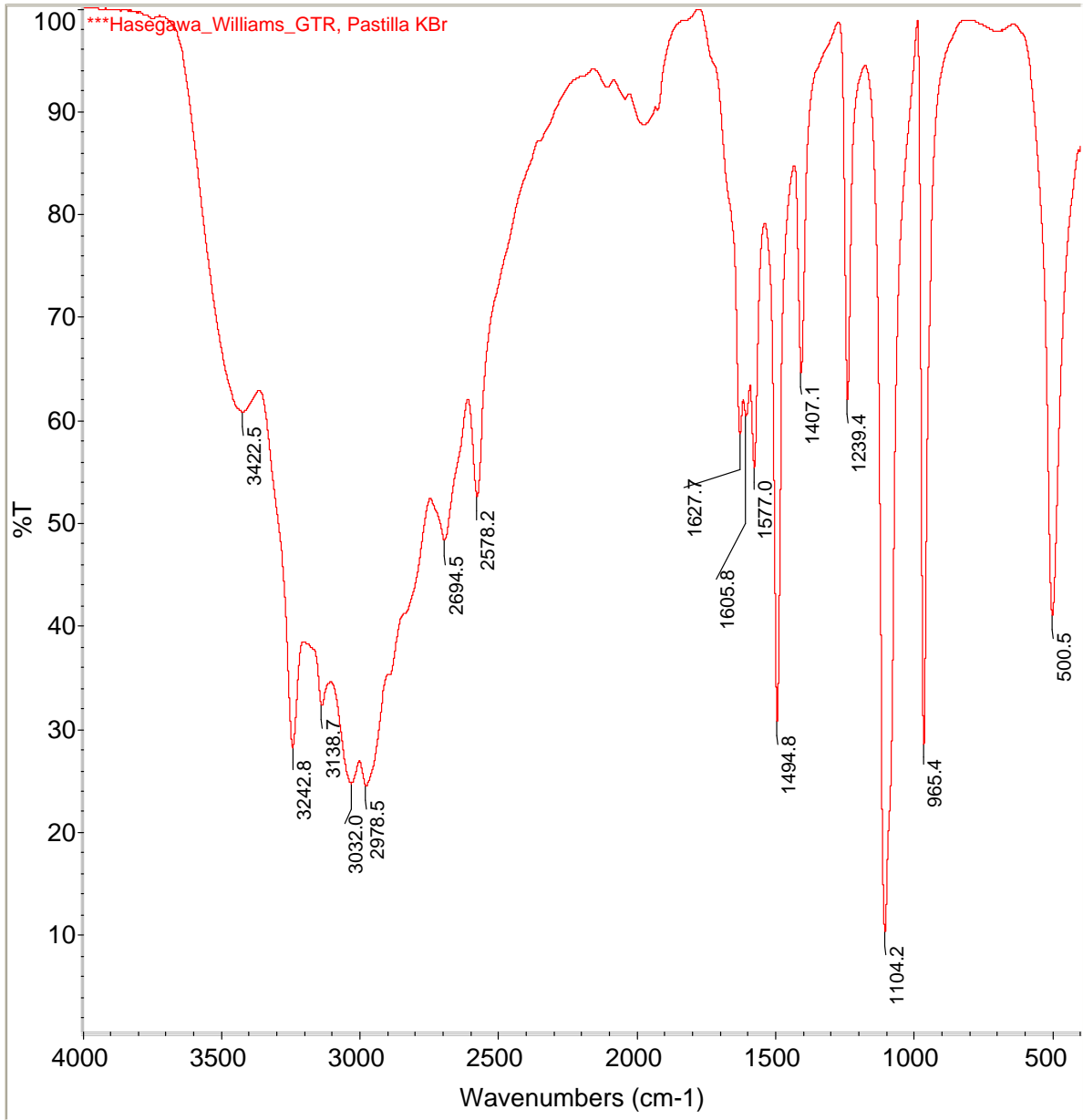
5.5. Síntesis del reactivo de Girard-Triacina:



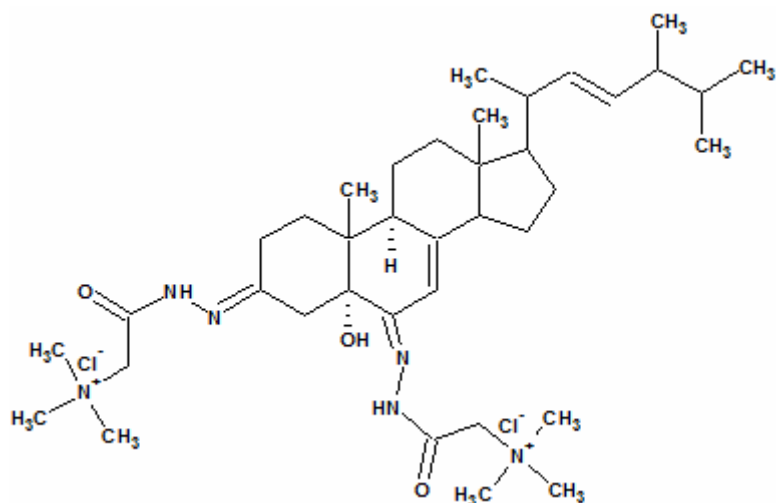
En el espectro IR de Girard-Tc (10) (espectro N^o 22) tomado en una pastilla de KBr, se observa la presencia de una banda ancha en 3422,5 cm⁻¹ que corresponde al stretching del enlace N-H del grupo amino secundario, dos señales en 3242,8 y 3138,7 cm⁻¹ que corresponden al stretching asimétrico y simétrico del enlace N-H de la amina primaria, también se observa una banda en 1627,7 cm⁻¹ que corresponde al grupo carbonilo de imidas, bandas en 1577,0 y 1605,8 cm⁻¹ del anillo de triacina y una banda en 1494,8 cm⁻¹ que corresponde al stretching del enlace C-N.

No se logró obtener espectros de RMN ¹³C y RMN ¹H confiables del compuesto.

Espectro N° 22. IR del reactivo de Girard-Tc.

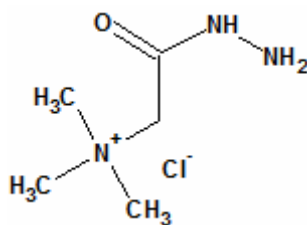


5.6. Reacción entre Girard-T y ergosterona:



11

El compuesto de Girard-T utilizado es de procedencia comercial. (Espectro N° 23) tomado en D₂O. En este espectro sólo se observan tres señales: 163,08 ppm correspondiente al carbonilo; 64,46 ppm para el CH₂ y 54,59 ppm para los N-metilos.



Girard-T

En el espectro de RMN ^{13}C del compuesto 11 (espectro N° 24), tomado en MeOD se puede observar que no aparecen las señales (212,16 y 198,29 ppm) características de los carbonilos presentes en el compuesto ergosterona (5), lo que indica la obtención de las hidrazonas respectivas en ambos carbonos 3 y 6.

Tabla N° 3. Asignación de los desplazamientos mas característicos de RMN ^{13}C obtenidos para ergosterona-GT₂.

N° Carbono	δ (ppm)	N° Carbono	δ (ppm)
3 (C=N)	187,01	23 (CH)	132,38
5 (C-OH)	95,29	3' (C=O)	163,43*
6 (C=N)	187,01	3'' (CH ₂)	63,46~
7 (CH)	116,61	6' (C=O)	163,77*
8 (C)	162,58*	6'' (CH ₂)	61,15~
22 (CH)	135,46	N-metilos	53,39

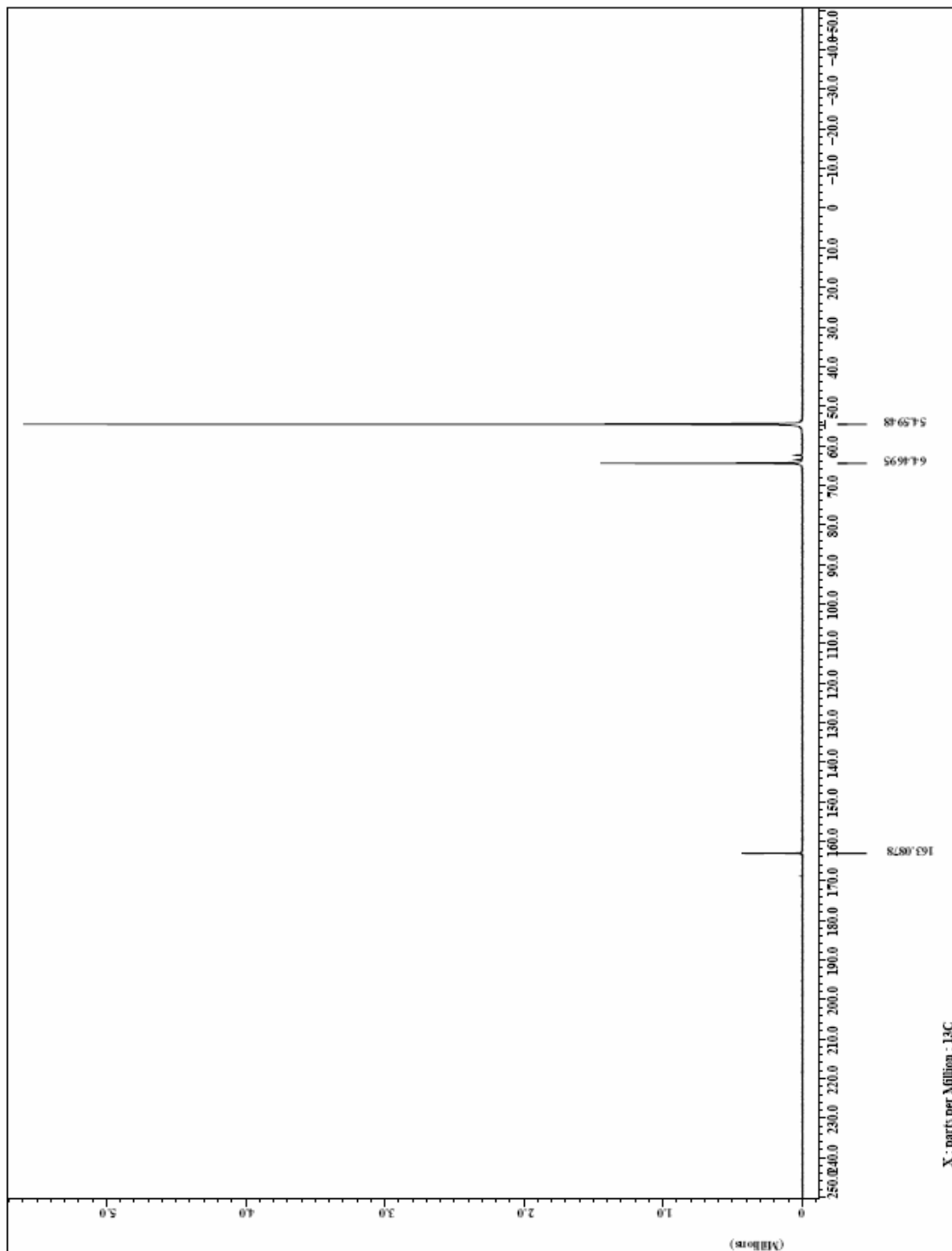
* son intercambiables

~ son intercambiables

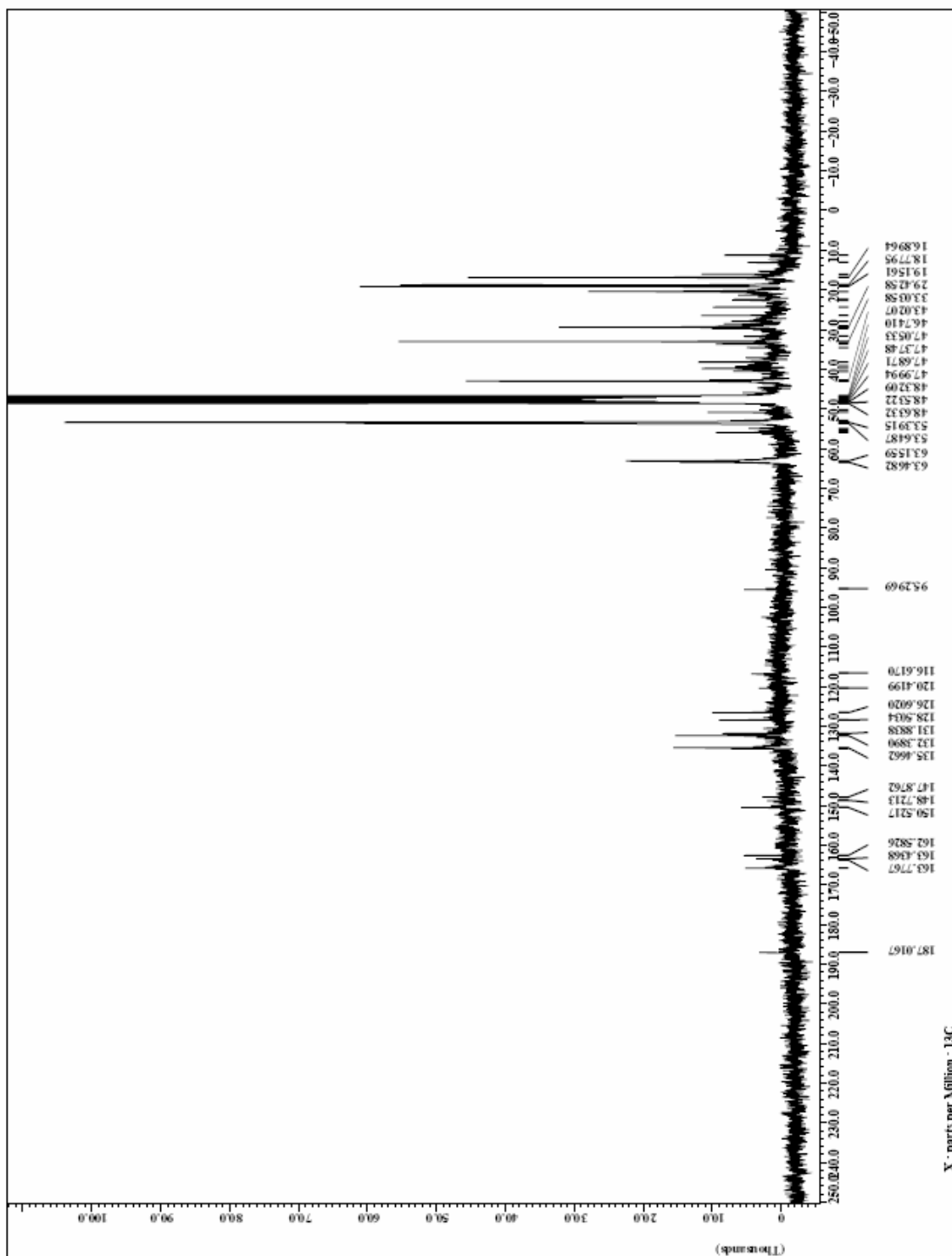
Se deberían observar dos señales correspondientes a los carbonos 3 y 6 con ciertas diferencias pero solo se observa una, debido a la coincidencia accidental.

En el espectro también se observan señales alrededor de 150 y 120 ppm las cuales no corresponden a este compuesto.

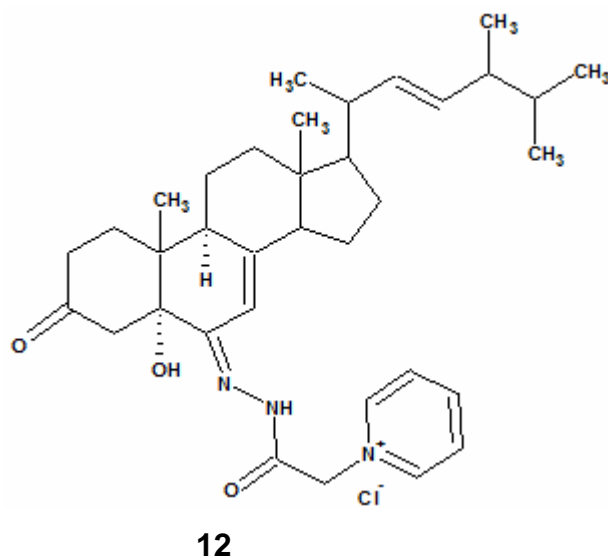
Espectro N° 23. RMN ^{13}C del reactivo de Girard-T.



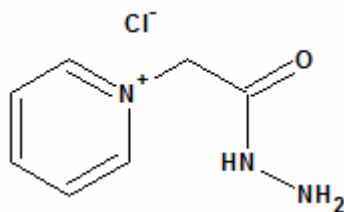
Espectro N° 24. RMN ¹³C de ergosterona-GT₂.



5.7. Reacción entre Girard-P y ergosterona:



El compuesto de Girard-P utilizado es de procedencia comercial. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro N $^{\circ}$ 25) tomado en D_2O de este compuesto se observan señales alrededor de: 170 ppm correspondiente al carbonilo; 147 ppm para los carbonos "orto" y "para" del anillo de piridina; 128 ppm para los carbonos "meta" del anillo piridinico y alrededor de 63 ppm para el carbono CH_2 de la estructura.



Girard-P

Esta reacción se llevo a cabo variando la relación estequiométrica, es decir, se realizo con una relación 1:1 y con una relación 1:2 (2 moles de Girard por 1 mol de ergosterona).

En el espectro RMN ^{13}C tomado en CDCl_3 (espectro N° 26) del compuesto 12, el cual es el producto de la relación estequiométrica 1:1, se observa la presencia de la señal que pertenece a la cetona no conjugada de la ergosterona, lo que implica que la hidrazona se formó con la cetona α,β conjugada, contrario a lo que se espera teóricamente.

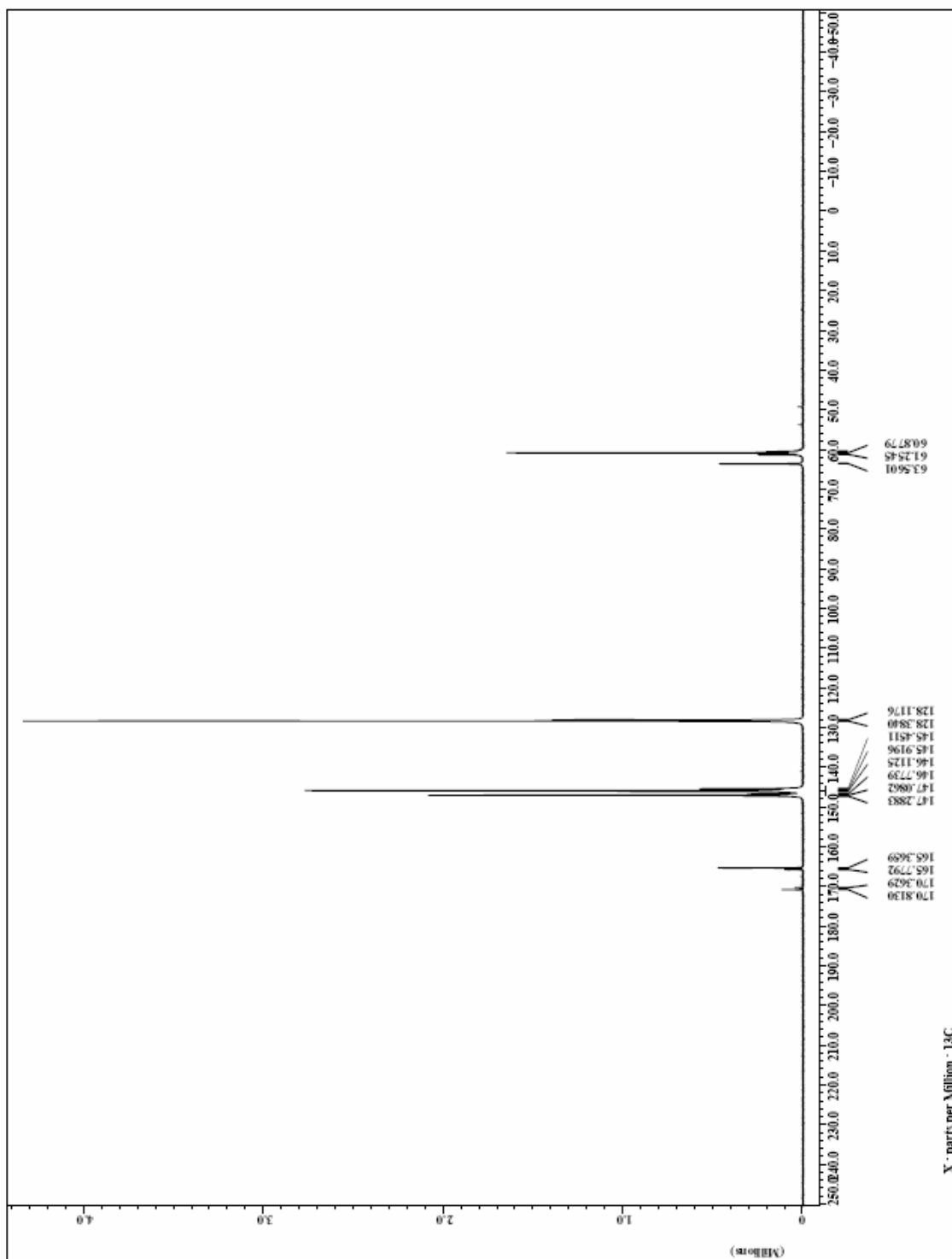
Tabla N° 4. Asignación de los desplazamientos mas característicos de RMN ^{13}C obtenidos para ergosterona-GP.

N° Carbono	δ (ppm)	N° Carbono	δ (ppm)
3 (C=O)	212,13	23 (CH)	132,60
5 (C-OH)	#	6' (C=O)	#
6 (C=N)	186,99	6'' (CH ₂)	#
7 (CH)	117,03	o (CH)	146,56
8 (C)	#	m (CH)	128,29
22 (CH)	135,60	p (CH)	146,56

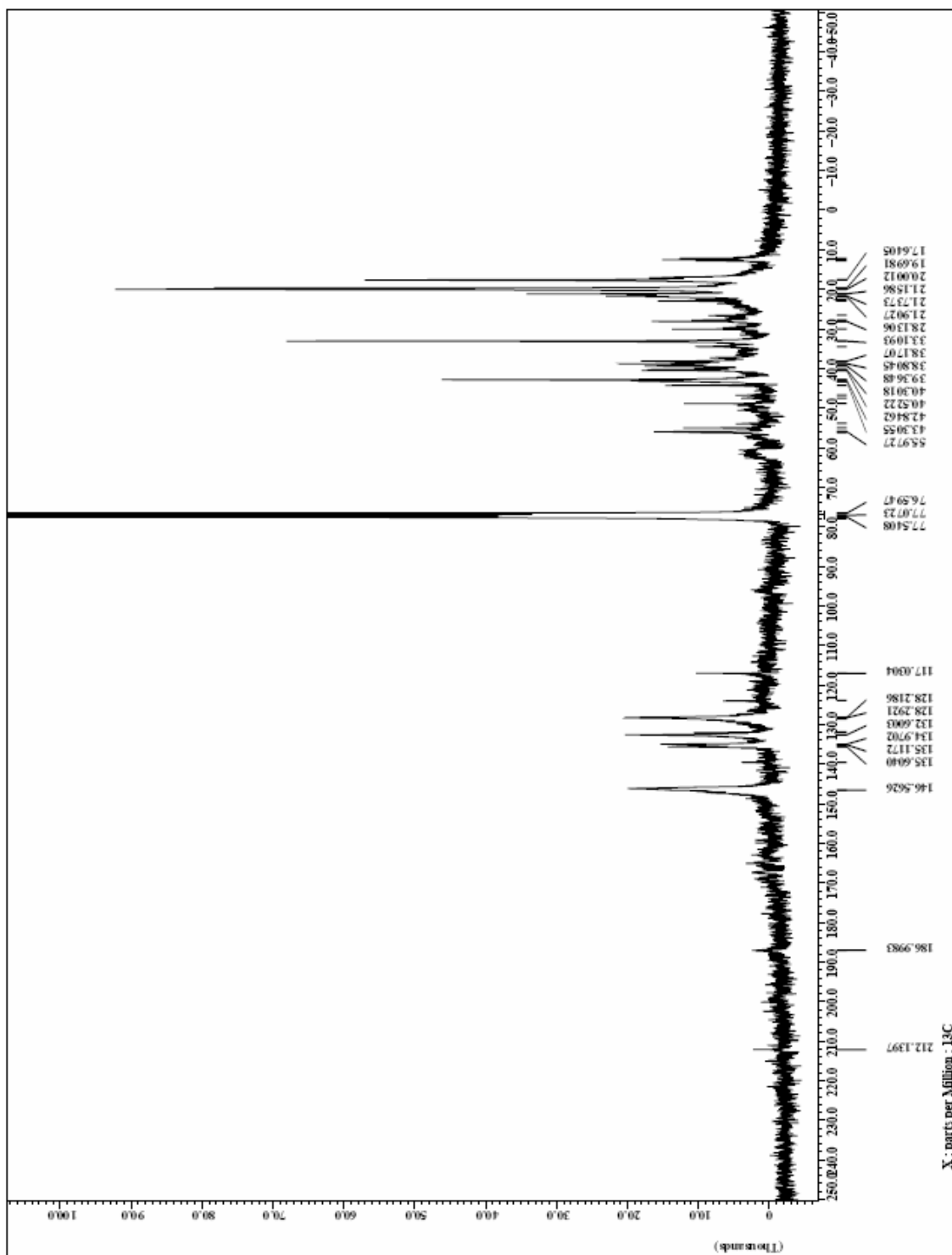
No se observan con intensidad.

La señal correspondiente a los carbonos "orto" y "para" presentes en el anillo de piridina deberían salir con desplazamientos muy parecidos, por tal razón se observa una señal ancha en 146,56 ppm correspondiente a estos carbonos.

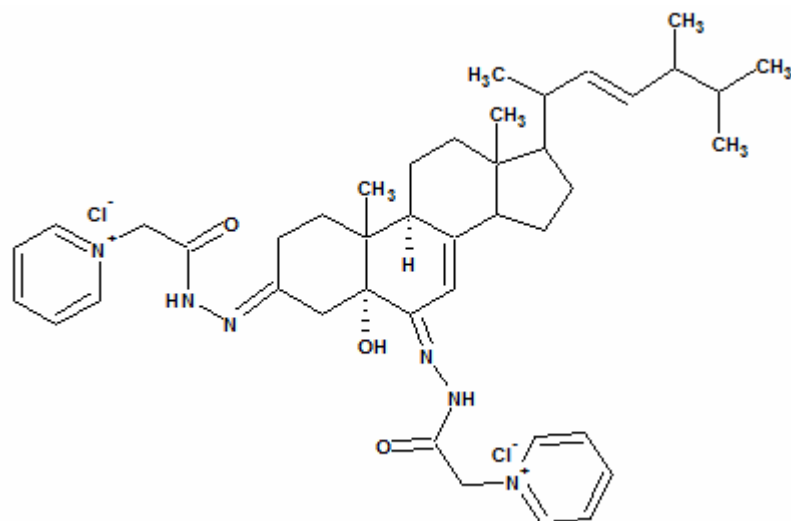
Espectro N° 25. RMN ^{13}C del reactivo de Girard-P.



Espectro N° 26. RMN ¹³C de ergosterona-GP.



En el espectro RMN ^{13}C tomado en CDCl_3 (espectro N $^{\circ}$ 27) del compuesto 13, el cual es el producto de la relación estequiométrica 2:1, no se observa la presencia de las señales (212,16 y 198,29 ppm) que pertenece a los carbonilos presentes en ergosterona, lo que implica que las hidrazonas respectivas se formaron en ambos carbonos carbonílicos (3 y 6).



13

Tabla N° 5. Asignación de los desplazamientos mas característicos de RMN ¹³C obtenidos para ergosterona-GP₂.

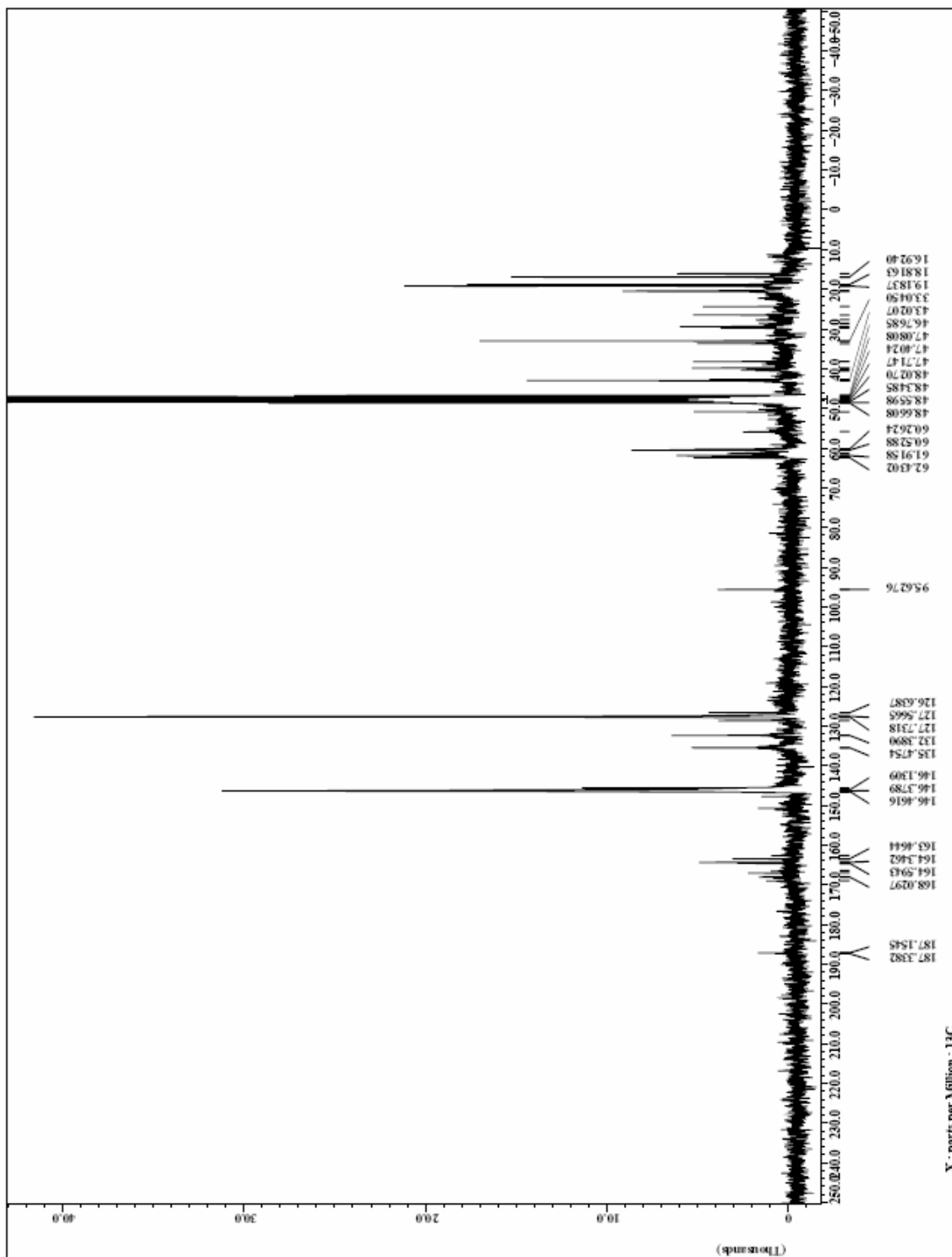
N° Carbono	δ (ppm)	N° Carbono	δ (ppm)
3 (C=N)	187,33	8 (C)	163,46
5 (C-OH)	95,62	22 (CH)	135,47
6 (C=N)	187,15	23 (CH)	132,38
7 (CH)	#	3' (C=O)	168,02*
3'' (CH ₂)	62,43	o (CH ₂)	146,46~
6' (C=O)	164,69*	m (CH ₂)	127,56
6'' (CH ₂)	60,52	p (CH ₂)	146,37~

* son intercambiables.

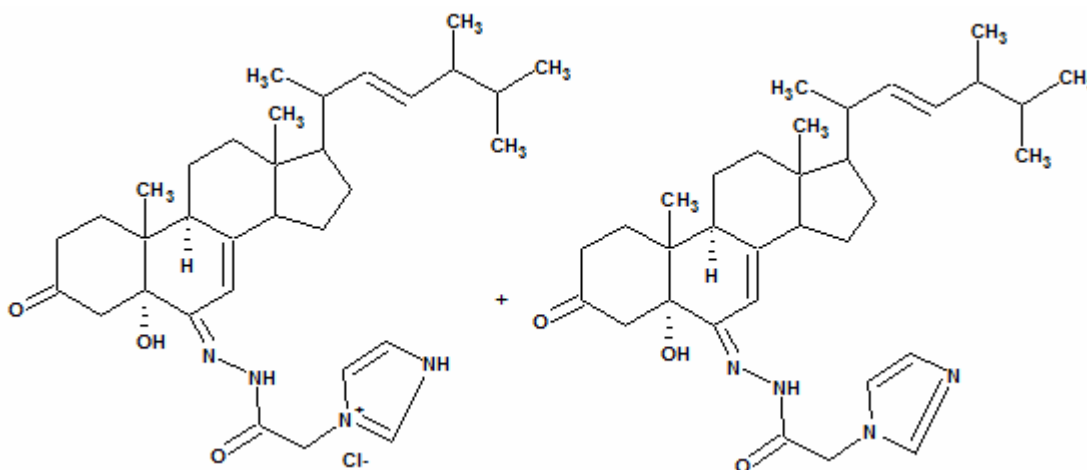
~ son intercambiables.

No se observan con intensidad.

Espectro Nº 27. RMN ¹³C de ergosterona-GP₂.



5.8. Reacción entre Girard-I y ergosterona:



14

Como se mencionó en la discusión de la síntesis del reactivo de Girard-I, se esperaba una mezcla para este reactivo, como consecuencia se obtuvo igualmente una mezcla al realizar la síntesis de la hidrazona ergosterona-GI (14).

Esta reacción se realizó únicamente con una relación estequiométrica 1:1 de los compuestos.

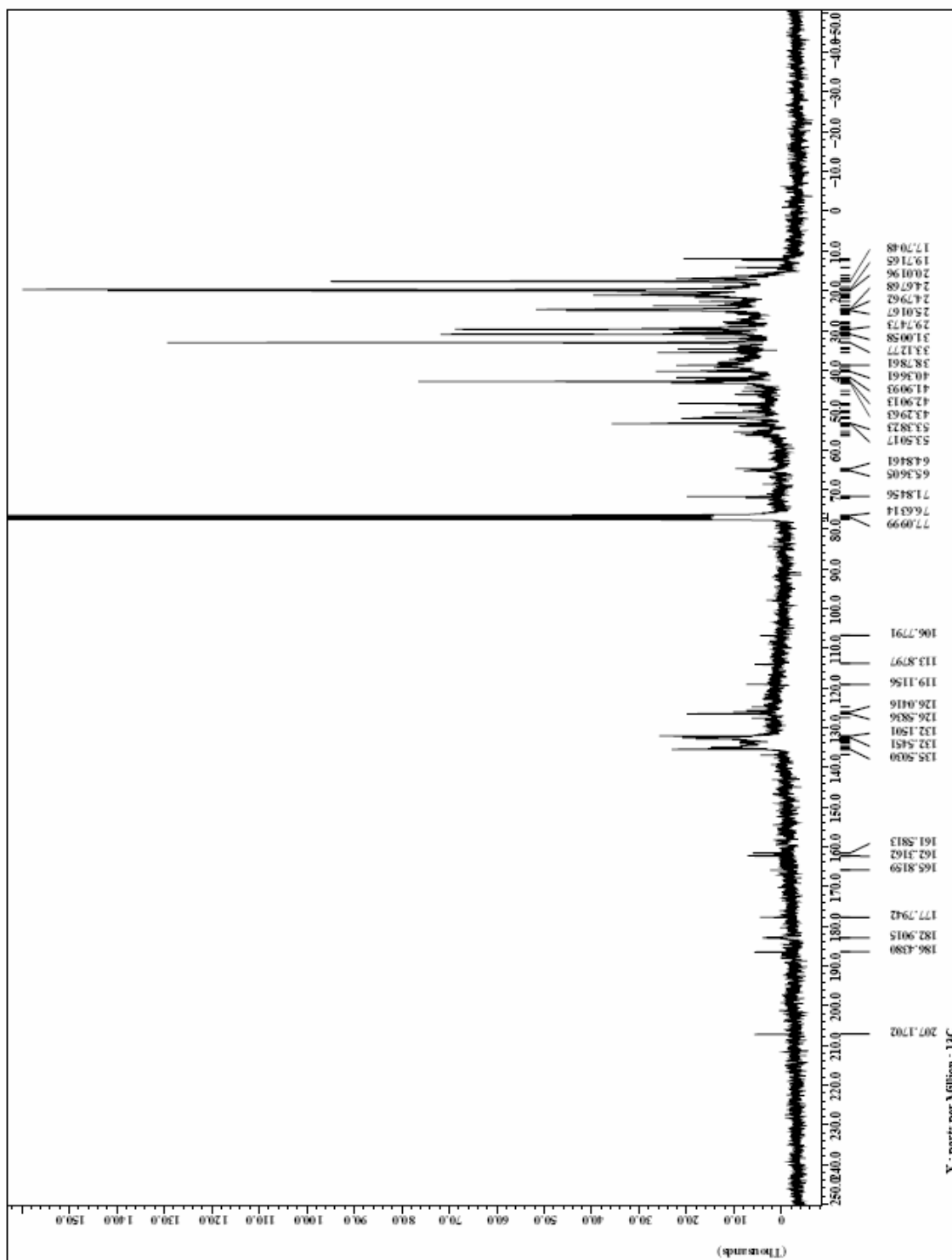
En el espectro RMN ^{13}C tomado en CDCl_3 (espectro N° 28) de la mezcla 14, se observa la presencia una señal en 207,17 ppm, característica de una cetona no conjugada, pero no coincide con el desplazamiento observado para este grupo en la ergosterona (212,16 ppm), tampoco con el desplazamiento observado para la cetona α,β conjugada (198,29 ppm). Por otro lado aparecen señales 71,84; 106,77; y 177,79 ppm, que no pueden ser asignadas a las estructuras planteadas, por tal razón la

elucidación de las estructuras en este caso es compleja y la postulación de las estructuras de la mezcla 14 es hipotética.

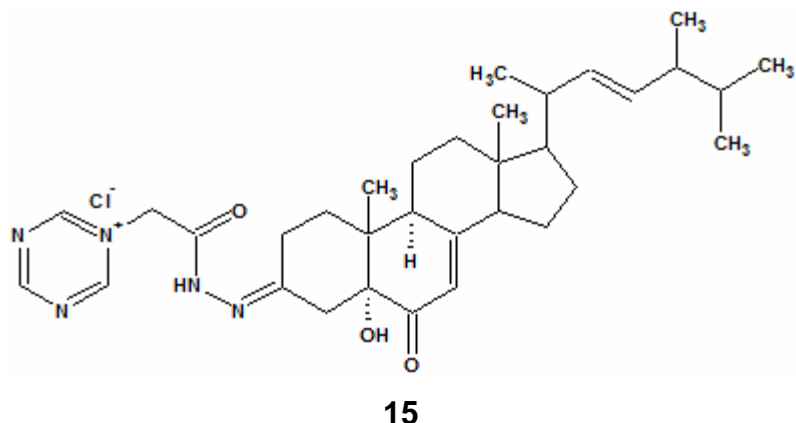
Tabla N° 6. Desplazamientos más característicos de RMN ¹³C obtenidos para la mezcla 14.

δ (ppm)
207,17
186,43
182,90
177,79
165,81
162,23
161,58
126,58
126,04
119,11
113,87
106,77
71,84

Espectro N° 28. RMN ¹³C del producto entre ergosterona y Girard-I.



5.9. Reacción entre Girard-Tc y ergosterona:



Esta reacción se llevo a cabo únicamente utilizando una relación estequiométrica 1:1 de los reactivos.

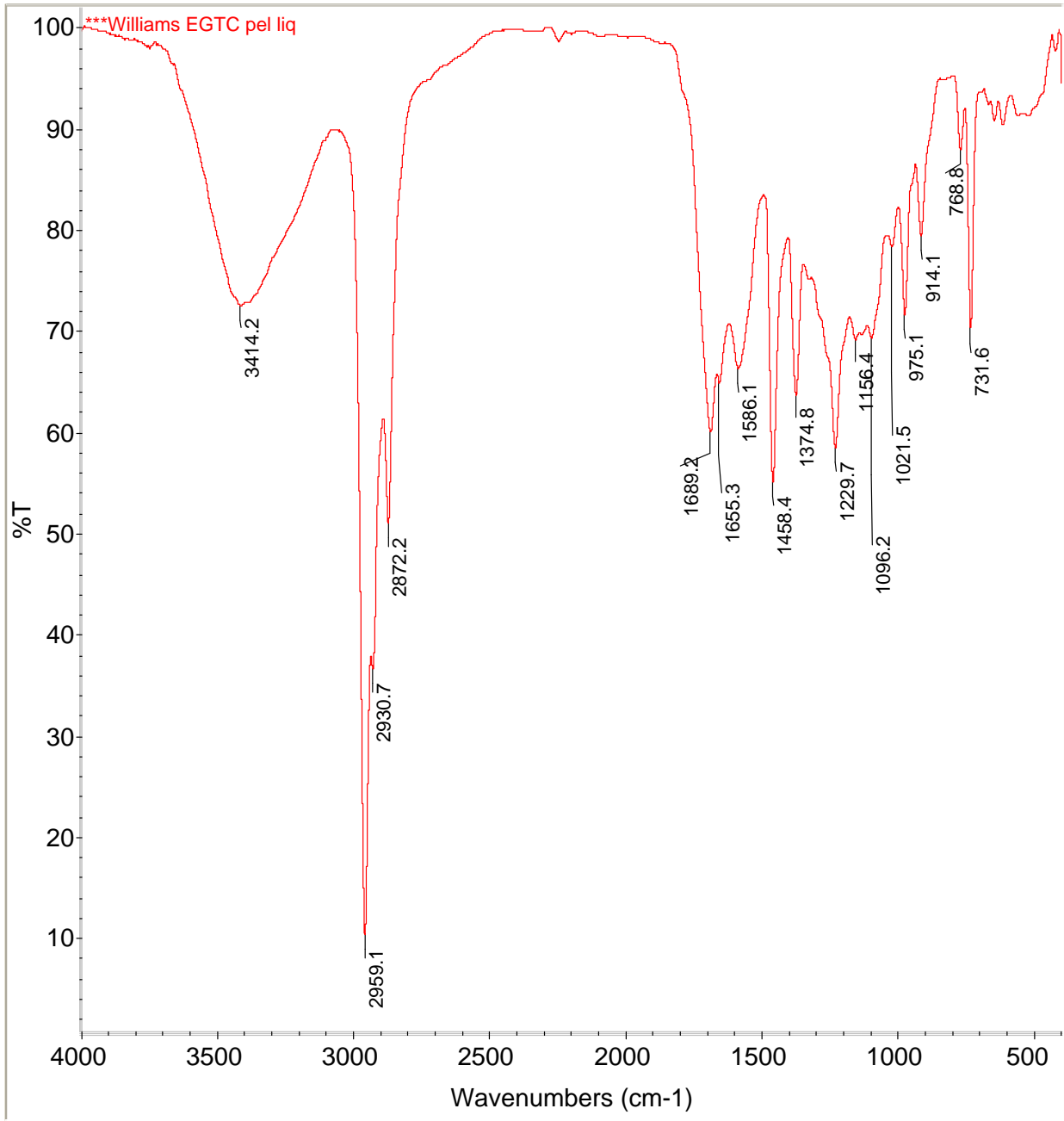
En el espectro IR (espectro N^o 29) del producto ergosterona-GTc, tomado en una película líquida de CH₂Cl₂, se puede observar que no aparece la señal en 1714,1 cm⁻¹ correspondiente a la cetona no conjugada presente en ergosterona, lo que indica que la hidrazona se formó con dicha cetona, la cual estaba presente en el carbono 3.

Por otro lado, si esta presente la banda correspondiente a la cetona α,β conjugada en 1689,2 cm⁻¹ (C6), también se presentan bandas en 1653,3 cm⁻¹ correspondiente al grupo carbonilo de imidas; 1586,1 cm⁻¹ característica de dobles enlaces y 1458,4 cm⁻¹ que pertenece al stretching del enlace C-N.

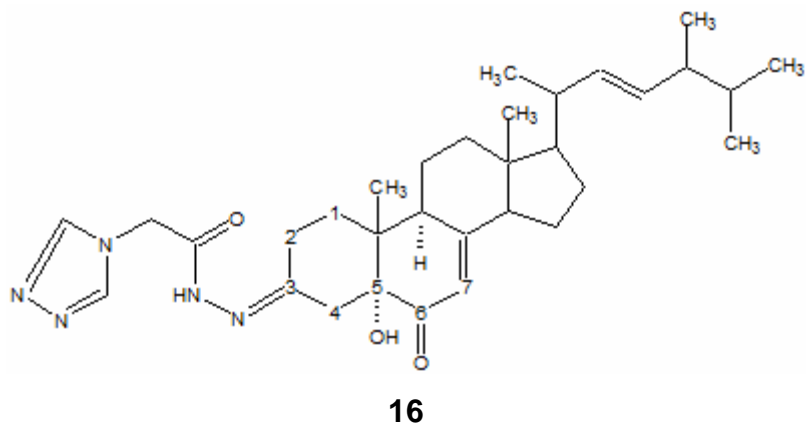
En 3414,2 cm⁻¹ aparece una banda ancha, esta se puede asociar a una superposición de las señales correspondientes al grupo -OH (C5) y al stretching de los enlaces N-H del grupo amino.

No se logró obtener espectros de RMN ¹³C y RMN ¹H confiables del compuesto.

Espectro Nº 29. IR de ergosterona-GTc.



5.10. Reacción entre Girard-Tr y ergosterona:



Esta reacción se llevo a cabo únicamente utilizando una relación estequiométrica 1:1 de los reactivos.

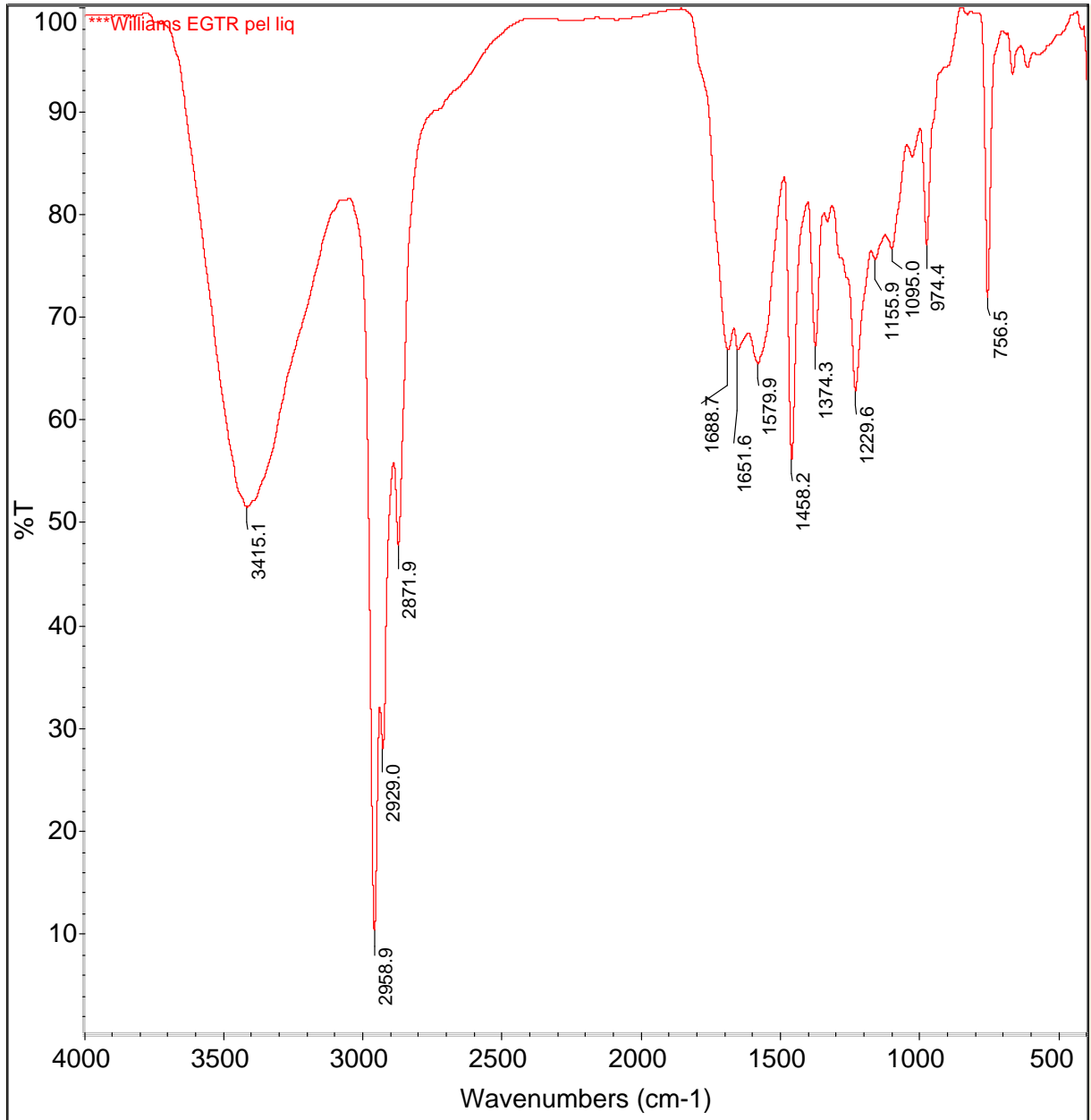
En el espectro IR (espectro N° 30) del producto ergosterona-GTr, tomado en una película líquida de CH_2Cl_2 , se puede observar que no aparece la señal en $1714,1 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la cetona no conjugada presente en ergosterona, lo que indica que la hidrazona se formó con dicha cetona, la cual estaba presente en el carbono 3.

Por otro lado, si esta presente la banda correspondiente a la cetona α,β conjugada en $1688,7 \text{ cm}^{-1}$ (C6), también se presentan bandas en $1651,6 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo carbonilo de imidas; $1579,9 \text{ cm}^{-1}$ característica de dobles enlaces y $1458,2 \text{ cm}^{-1}$ que pertenece al stretching del enlace C-N.

En $3415,1 \text{ cm}^{-1}$ aparece una banda ancha, esta se puede asociar a una superposición de las señales correspondientes al grupo $-\text{OH}$ (C5) y al stretching de los enlaces N-H del grupo amino.

No se logró obtener espectros de RMN ^{13}C y RMN ^1H confiables del compuesto.

Espectro Nº 30. IR de ergosterona-GTr.



6. CONCLUSIONES

- Se realizó la oxidación de ergosterol utilizando el reactivo de Jones, dando como resultado ergosta-7,22-dieno-5 α -ol-3,6-diona con un rendimiento de 54%, pto. Fusión: 266-268 °C.
- Los datos espectroscópicos obtenidos a partir de los derivados de colesterol sintetizados fueron de ayuda indirecta para la elucidación del producto de oxidación de ergosterol con el reactivo de Jones.
- Se sintetizaron los reactivos:
 - § Girard-Tc con un rendimiento de 68%
Punto de Fusión: 118-119 °C.
 - § Girard-Tr con un rendimiento de 67%
Punto de Fusión: 84-84 °C
 - § Mezcla de Girard-I con rendimiento de 58%
Punto de fusión: 90-92 °C
- Se obtuvieron las hidrazonas:
 - § ergosterona-GT₂ con rendimiento de 84%
 - § ergosterona-GP con rendimiento de 91%
 - § ergosterona-GP₂ con rendimiento de 84%
 - § ergosterona-GI con rendimiento de 85%
 - § ergosterona-GTc con rendimiento de 83%
 - § ergosterona-GTr con rendimiento de 91%

7. RECOMENDACIONES

- Realizar la oxidación de ergosterol utilizando otro agente oxidante distinto al reactivo de Jones, a fin de obtener únicamente la oxidación del grupo $-OH$ presente en el ergosterol.
- Sintetizar otros reactivos de Girard utilizando sustratos diferentes a los empleados en esta tesis, los cuales fueron: imidazol, triazol y triacina.
- Realizar las pruebas de actividad biológica, particularmente antiprotozoaria y antifúngica, de los distintos derivados de ergosterol que se obtuvieron y se pudieran obtener.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO, (1995). **Chagas's disease: important advances in elimination of transmission in four countries in Latin America**, Feature N° 183.
2. Schunufnis, G.A., (2000). **Tripanossomíase Americana e seu impacto na saúde publicam das Américas**, Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil 1: 1-15.
3. Pinto, J.C., (2000). **Epidemiologia. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**, Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil 1: 48-74.
4. Coura, J.R., De Castro, S.L., (2002). **A critical review on Chagas disease chemotherapy**, Memorias do instituto Oswaldo Cruz, 97(1): 3-24.
5. Paulinoa, M., Iribarnea, F., Dubinb, M., Aguilera-Morales, S., Tapiad, O., Stoppani, A.O., (2005). **The chemotherapy of Chagas' disease: an overview**, Mini. Rev. Med. Chem, 5: 499-519.
6. Castro, J.A., Montalto de Mecca, M., Bartel, L.C., (2006). **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis)**, Hum. Exp. Toxicol, 25: 471-479.
7. Watson, M.C., Grimshaw, J.M., Bond, C.M., Mollison, J., Ludbrook, A., (2005). **Tratamiento antimicótico con triazol e imidazol oral versus intravaginal para la candidiasis bulbo vaginal no complicada**, Biblioteca Cochrane Plus. N° 4, Oxford, Update Software Ltd.

8. Senior, K., (2007). **Chagas Disease: moving towards global elimination. The Lancet Infectious Diseases**, 7(9): 572.
9. Yanes, A.T., (2001). **Actividad de *A. indica*, *M. azedarach*, *M. oleifera* y *O. basilicum* contra *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas**, Tesis de Doctorado, USB, 5-49.
10. Diaz, A., (1957). **Enfermedad de Chagas**, Tesis de Doctorado, ULA, 81-83.
11. Keas, B., (2007). **Taxonomic Classification**, www.msu.edu/course/zol/316/tcrutax.htm.
12. Macedo, A., Oliveira, R., Peña, S., (2002). **Schematic representation of the life cycle of the flagellate protozoan, *Trypanosoma cruzi***, www.cbcu.cam.ac.uk/0200412Xh.htm
13. Lazdins, J., (2007). **Life cycle of *Trypanosoma cruzi***, www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm
14. Urbina, J.A., (2006). **Biología de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*: Potencial para intervención quimioterapéutica**, Conferencia presentada en el curso "Host-parasite Interactions and Vector Biology", American Society for Microbiology. Laboratorio de Química Biológica, Centro de Bioquímica y Biofísica, IVIC, Venezuela.
15. Maya, J.D., Cassels, B., Iturriaga-Vasquez, P., (2007). **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host**, Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 146: 601-620.

16. Urbina, J.A., Docampo, R., (2006). **Specific chemotherapy on Chagas disease: controversies and advances**, TRENDS in Parasitology, 19(11):495-501.
17. Croft, S.L., Barret, M.P., Urbina, J.A., (2005). **Chemotherapy of Trypanosomiasis and Leishmaniasis**, TRENDS in Parasitology, 21(11):508-512.
18. Hasegawa, M., Marcano, D., (2002). **Fitoquímica Orgánica**, Consejo de desarrollo científico y humanístico, UCV, 4: 339-344.
19. Vázquez-Conteras, E., (2007). **Esteroides**, <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/esteroides.html>
20. Dictionary of organic compounds. (1979). Oxford University. Press Inc., Vol. 3
21. Tapia, C., (2007). **Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos**, www.medwave.cl/cursos/Micologia2004/2/1.act
22. Gerpe, A., Odreman-Nuñez, I., (2007). **Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action**, Bioorganic and Medicinal Chemistry, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.031>
23. Copp, B., (2003). **Antimycobacterial natural report**, Natural Product Report, 20: 535-557.
24. Brown, D.G., (1998). **The biosynthesis of steroids and triterpenoids**, Natural Product Report, 15: 653-696.

25. Wikipedia, (2008). **Colesterol**, es.wikipedia.org/wiki/Colesterol#cite_ref-Leh_0-0
26. Allinger, N.L., Cava, M.P., De Jongh, D.C., Johnson, C.R., Lebel, N.A., Stevens, C.L., (1975). **Química Orgánica**, Editorial Reverté, S.A, 15:429-433, 18:640.
27. Marcano, D., Cortés, L., (1998). **Fundamentos de química orgánica**, Ediciones vicerrectorado académico, UCV (SADPRO), 6: 350-351.
28. Girard, A., Sandulesco, G., (1936). **Sur une nouvelle série de réactifs du groupe carbonyle, leur utilisation à l'extraction des substances cétoniques et à la caractérisation microchimique des aldéhydes et cétones**, Helvética Chimica Acta, 19(1):1105-1117.
29. Vogel, A., (1972). **A Text-book of Practical Organic Chemistry. Including Qualitative Organic Analysis**, 3^{ra} Edición, VII, 24: 976-978.
30. Shepherd, D.A., Donia, R.A., (1955). **A Synthesis of Progesterone from Ergosterol**, Journal of the American chemical Society, 2(77): 1212-1215.
31. Beugelmans, R., (1969). **Oxydation d'alcools allyliques par l'anhydride chromique dans l'hexaméthylphosphotriamide (HMPT)**, Bulletin de la Société Chimique de France, 335 -336.
32. Sasaki, T., Nakamori, R., (2001). **The Application of the Dimethyldioxirane for the Selective Oxidation of Polyfunctional Steroids**, Chemistry and Physics of Lipids, 2(109):135 -143.
33. Pérez, J.M., (2004). **Estudio de la actividad biológica de derivados del ergosterol**, Tesis de pregrado, Universidad de Carabobo, 6-10.

34. Gaertner, P., Bica, K., (2007). **Synthesis and analytics of 2,2,3,4,4-d₅-19-nor-5 α -androsterone an internal standard in doping analysis**, ELSEVIER, 72: 429-436.
35. Parr, M.K., Zapp, J., (2007). **Steroidal isomer with uniform mass spectra of their per-TMS derivate: Synthesis of 17-hydroxyandronstan-3-ones, androst-1-, and -4-ene-3,17-diols**, ELSEVIER, 72: 545-551.
36. Ji-Zhong, Y., Jian, L., Guo-Wu, R., (2007). **One-post synthesis of new A- ring fused steroidal pyridines**, ELSEVIER, 72: 736-739.
37. Bowden, K., Heilbron, I.M., Jones, E.R., Weedon, B.C., (1946). **Researches on Acetylenic Compounds. Part I. The Preparation of Acetylenic Ketones by Oxidation of Acetylenic Carbinols and Glycols**, Journal of Chemical Society, 1(13): 39-45.
38. Brunel, J.M., Loncle, C., Vidal, N., Dherbomez, M., Letourneux, Y., (2005). **Synthesis and Antifungal Activity of Oxygenated Cholesterol Derivates**, ELSEVIER, 70:907-912.
39. Shire, R.L., Fuson, R.C., Curtin, D.Y., (2001). **Identificación Sistemática de compuestos Orgánicos**, Editorial Limusa, Vol. 10, Pág. 269.
40. Sakan, T., (1957). **Reacciones de Compuestos Orgánicos**, Ediciones de la Sociedad Química de Japón, Vol. 17, Pág. 138.
41. Marshall, C.W., Richard, E.R., Laos, I., Riegel, B., (1957). **7-keto steroids. II. Steroidal 3 β -hidroxy- Δ^5 -7-ones and $\Delta^{3,5}$ -7-ones**, Journal of American Chemical Society, 4(79): 6308-6310.

42. Dong, J., Chen, W., Wang, S., Zhang, J., Li, H., (2007). **Jones Oxidation and High Performance Liquid Chromatographic analysis of Cholesterol in Biological Samples**, Journal of Chromatography B, 858(1-2): 239-246.
43. Kovganko, N.V., Chernov, Y.G., (2001). **^{13}C NMR Spectra of 6-hydroxyminosteroids on the Stigmastane Series**, Chemistry of Natural Compounds, 37(4):351-355.
44. Kovganko, N.V., Sokolov, S.N., (1999). **Synthesis of (22E,24R)-5 α -ergosta-2,7,22-trien-6-one**, chemistry of Natural Compounds, 35(1):80.
45. Freeman, F., Yamachika, N.J., (1972). **Chromyl Chloride Oxidations VI. Nature of the Activated Complex in the Electrophilic Additions of Styrenes**, Journal of American chemical Society, 94(4):1214-1219.