

84
3y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"MODIFICACION MOLECULAR DEL ALBENDAZOL
PARA LA OBTENCION DE PROFARMACOS CON
ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA POTENCIAL."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARISA ELENA ORTIZ ESPARZA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROFRA. NARANJO RODRIGUEZ ELIA BROSLA
VOCAL: PROF. HERNÁNDEZ LUIS FRANCISCO
SECRETARIO: PROF. REYES TREJO LINO JOEL
1^{ER} SUPLENTE: PROF. RIOS OLIVARES HECTOR
2do. SUPLENTE: PROFRA. CAHERO LIMÓN GISELA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

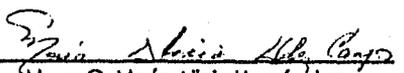
LABORATORIO No. 122; CONJUNTO "E" DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DE TESIS:



M. en C. Francisco Hernández Luis.

SUPERVISOR TÉCNICO:



M. en C. María Alicia Hernández
Campos.

SUSTENTANTE:



Marisa Elena Ortiz Esparza.

*...dedico esta tesis con todo mi AMOR y agradecimiento a
Ma. Elena Patricia Esparza López.*

*por ser todo para mí, porque no sólo le debo la vida sino todo
lo que soy y seré...*

Para ti mamá

Gracias

*Porque a pesar de estar lejos estás conmigo,
Por todo tu apoyo, tus enseñanzas y tu ejemplo,
Porque fuiste un gran ser, alguien fuera de serie y
Por tu inmenso amor.....*

AGRADEZCO A.....

DIOS, porque sin su significado mi vida no tendría sentido

Gracias por permitirme alcanzar esta meta !!

*De manera muy especial a mi tía Ofe Esparza y mi primo Sergio Aquilar, por ser para mí el barco que rescata a un naufrago.
Por su comprensión, apoyo y cariño que me han dado.*

Los amo!

Francisco Ortiz F. por su ejemplo, consejos y ayuda.

Eduardo Alcántara, por darme un giro a mi vida y así poder contemplar otro horizonte; también por la confianza que ha depositado en mí.

Mi queridísima hermana gemela Lulú Cueto, porque gracias a su inigualable forma de ser mi espíritu renació.

Gracias por estar conmigo en todo momento. 7.2.M.

Mi amiguísima Marcela Ramírez, por ser la amiga y colega que siempre esperé... y llegó. 7.2.M.

Rocio Gómez, por creer en mí, por todo su apoyo y por lo increíble de sus sentimientos.

Fredy Chávez, por su amistad y los momentos divertidos en la facultad.

Sergio Rodríguez, por su gran sentido de compañerismo, sus consejos y ayuda.

Mario Castillo, por no dejarme caer en los momentos más críticos de mi vida, por sus regaños y el amor tan grande que siempre me dió. 7.2.M.

La Familia Castillo Jiménez, por abrirme sus puertas y hacerme sentir siempre parte de ellos.

M. en C. Francisco Hernández Luis, por su GRAN APOYO incondicional, sus consejos, su paciencia enorme y su ejemplo. GRACIAS por ser tan especial !.

la Familia Z.F.B. 1990, por ser la parte divertida de la facultad y por todo lo que aprendí al convivir con ellos.

mis compañeros del Laboratorio 122, por la conviviencia y compañerismo.

Dr. Rafael Castillo B., por las facilidades prestadas en la realización de esta tesis.

La M. en C. María Alicia Hernández, por la supervisión y apoyo técnico.

Los Z.F.B.'s, Alfredo Garzón, Isabel Domínguez y Rosío Calderón, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Las Químicas: Maricela Gutiérrez, Alejandrina Acosta, Georgina Duarte y Graciela Chávez del Departamento de Química Analítica de la facultad de Química, por el registro de espectros de I.R., R.M.N. y masas.

4

mi querida Facultad de Química por la formación profesional que me ha dado.

Atte. Marisa E. Ortiz Esparza.

INDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. GENERALIDADES	4
3.1 Helmintos	4
3.2 <i>Taenia solium</i>	6
3.3 Cisticercosis humana	7
3.4 Bencimidazoles	11
3.5 Albendazol	13
3.6 Profármacos	14
3.7 Ensayos biológicos	14
4. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO	16
5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN	18
6. RESULTADOS	21
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	24
7.1 Fenoxicarbonil albendazol	24
7.2 Acetato de albendazol	26
7.3 Glicinoil oximetil albendazol	28
7.4 Acetil oximetil albendazol	29
7.5 Bioensayo con <i>Artemia salina</i>	31
8. Conclusiones	33
9. Parte experimental	34
9.1 Instrumentación	34
9.2 Acetato de albendazol	35
9.3 Acetil oximetil albendazol	35
9.4 Glicinoil oximetil albendazol	36
9.5 Fenoxicarbonil albendazol	38
9.6 Bioensayo con <i>Artemia salina</i>	38
10. Espectros	40
11. Bibliografía	52

Resumen

En esta tesis se describe el diseño y síntesis de cuatro profármacos potenciales del albendazol (antihelmíntico), con el propósito obtener productos con menor punto de fusión que este principio activo, al modificar su estructura, mediante la adición de porciones estructurales llamadas progrupos. El diseño de estos profármacos, consideró la liberación del albendazol, mediante la acción de esterasas no específicas. Asimismo, se presentan los resultados de citotoxicidad frente al crustáceo *Artemia salina* que presentaron los compuestos obtenidos. Los profármacos preparados, se identificaron por sus puntos de fusión, Rf, y fueron caracterizados estructuralmente, mediante sus datos espectroscópicos de IR, masas y RMN protónica.

Abstract

In this thesis is described the design and synthesis of four prodrugs of albendazoles (antihelminth), for to obtain products with low melting point, by addition progroups. The design of these prodrugs considered the liberation of albendazole by the action of a non specific esterases.

Also, in this work is presented the results about citotoxicity on *Artemia salina* of these compounds. The prodrugs, were identified by melting point, Rf. and all structures were characterized by IR, masas and NMR spectroscopy.

1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades parasitarias en nuestro país son un problema de salud pública, ya que la incidencia de estas sigue siendo alta. Esto se debe a diversos factores como son, la falta de educación higiénica de la población, condiciones climatológicas, geográficas, hábitos alimenticios y condiciones económicas. Desafortunadamente, la población de más bajos recursos económicos es la más afectada; tanto en el medio rural como en el urbano.^(15,16)

Debido a esto, los esfuerzos por encontrar tratamientos eficaces y accesibles económicamente, continúan. Esto sobre todo para aquellas parasitosis en donde los tratamientos no han sido bien establecidos debido a la escasez de herramientas terapéuticas; tal es el caso de algunas parasitosis causadas por helmintos.⁽¹⁶⁾

Dentro de las helmintiasis, podemos contar las de tipo intestinal y las de tipo extraintestinal; entendiéndose por las primeras, aquellas causadas por helmintos capaces de desarrollarse, establecerse y causar daño a nivel de tracto gastrointestinal, por las segundas, aquellas causadas por helmintos que afectan a nivel sistémico; es decir que se establecen en la musculatura, huesos, corazón, riñones, cerebro etc. Las de tipo extraintestinal son de interés porque actualmente no se cuenta con suficientes fármacos eficaces para la quimioterapia de estas.^(18,21)

De las sustancias que han sido reportadas como agentes antihelmínticos extraintestinales, se cuentan los bencimidazoles-2-carbamato de metilo, como por ejemplo, el mebendazol, flubendazol, fenbendazol y albendazol.⁽¹⁸⁾

Una de las helmintiasis de tipo extraintestinal importante, es la neurocisticercosis, causada por *Taenia solium*, comúnmente conocida como solitaria o tenia del cerdo.^(1,5,14)

La neurocisticercosis, puede causar graves trastornos al Sistema Nervioso Central (S.N.C.) e inclusive la muerte del individuo, de aquí la importancia de incursionar en la síntesis de sustancias con actividad contra *Taenia solim* que posean una buena biodisponibilidad, para obtener una mejor respuesta terapéutica por parte de los individuos afectados por dicho helminto.⁽²¹⁾

Esta enfermedad ha sido tratada con albendazol, pero en los individuos se ha observado que de la dosis que se les administró, solo alrededor del 5% de esta logra ser absorbida, además , de que se presenta el problema de una gran variabilidad biológica y una respuesta terapéutica pobre.^(1,4,11,18)

Esta gran variabilidad biológica, se debe en parte a su escasa solubilidad en agua, ya que a pesar de que el albendazol es una molécula polar, tiene la característica de poder formar puentes de hidrógeno intermoleculares, y esto hace que no se pueda disolver, por la dificultad de romper estos enlaces en solución, lo que hace que dicha sustancia se absorba muy poco en el organismo y la cantidad de albendazol en el torrente circulatorio sea muy pobre, y como consecuencia no se puede esperar una respuesta terapéutica buena.

Debido a este problema la presente tesis se enfoca hacia la preparación de compuestos potencialmente bio-reversibles del albendazol que tengan una mejor solubilidad acuosa que este principio activo y en consecuencia, obtener sustancias con mejores perspectivas terapéuticas hacia el tratamiento de la neurocisticercosis.

2. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar y sintetizar derivados bio-reversibles potenciales del albendazol (profármacos), que presenten menor punto de fusión, con el fin de que posean mejores características de solubilidad en disolventes polares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar revisión bibliográfica para el diseño y síntesis de derivados bio-reversibles del albendazol.
- Diseñar y Sintetizar los compuestos de interés.
- Evaluar la pureza de los compuestos obtenidos mediante su punto de fusión y su Rf en cromatografía en capa fina.
- Elucidar las estructuras de los compuestos sintetizados mediante espectroscopía infrarroja y de resonancia magnética nuclear (RMN).
- Evaluar citotoxicidad de los compuestos obtenidos, frente a *Artemia salina*.

3. GENERALIDADES.

3.1 Helmintos.

Los helmintos o gusanos (la palabra helmintho proviene del griego "ελμινθo" que significa gusano.⁽¹⁴⁾), son organismos macroscópicos y pluricelulares (nematodos o gusanos redondos, cestodos y trematodos), que poseen aparato digestivo, excretor y reproductor, así como sistema nervioso ⁽¹⁵⁾; estos son responsables de las helminthiasis: enfermedades causadas por infecciones con gusanos redondos o planos, tanto en el hombre, como en algunos animales de granja, disminuyendo así, la productividad y los beneficios que este tipo de animales nos proporciona, creando de esta manera graves repercusiones de salud y pérdidas económicas.⁽¹⁾

Los phyla de importancia médica son:

- a) nematoda gusanos redondos
- b) plathyhelminthes..... gusanos planos
- c) acanthocephala gusanos con cabeza espinosa o ganchuda

Los helminthos pueden ordenarse de acuerdo con su hábitat dentro del hospedero. Así existen nematodos intestinales, duelas hepáticas, duelas sanguíneas y otros ⁽¹⁵⁾.

Ciclos de vida

Existe un patrón de vida básico para todos los helminthos, a pesar de las variaciones aparentes. ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

- El hospedero que alberga al adulto o la fase sexual del gusano es el hospedero definitivo.
- Todos los helminthos producen huevos, que luego dan origen a larvas.
- Con pocas excepciones, los huevecillos (o sus larvas) deben salir del cuerpo del hospedero, fuera del cual el desarrollo y el crecimiento, producen larvas infecciosas para el hospedero definitivo.
- En algunos casos es necesario un hospedero intermediario, para el desarrollo de todos los estadios larvarios.

- En todos los casos, el ciclo se completa cuando la larva infecciosa vuelve a entrar al hospedero definitivo y se transforma en adulto.
- Los mecanismos de entrada y salida del hospedero son muy variados. Los huevecillos y larvas pueden ingerirse con los alimentos y bebidas; las larvas pueden penetrar a través de la piel, si esta se pone en contacto con el suelo o mediante la picadura de un insecto.
- Los mecanismos de salida incluyen la vía oral y anal, así como la piel, mediante la rotura de ampollas o la picadura de insectos.⁽¹⁵⁾

Relación Hospedero-parásito

Muchos factores, tales como la localización, el número de parásitos, las secreciones tóxicas y la respuesta inmunológica del hospedero, determinan la patogenicidad de los helmintos.

Cada larva de helminto al madurar origina un solo adulto, de modo que la pologenicidad suele ser proporcional al número de adultos alojados en el hospedero.⁽¹⁵⁾

Diagnóstico y Tratamiento.

Es necesario el aislamiento de larvas, huevecillos o adultos para establecer el diagnóstico, aunque resultan útiles otros datos, como el historial, la inmunoserología y los cultivos.

El color, forma, tamaño, naturaleza de las membranas externas y el estadio de desarrollo, son características importantes.

La disminución del número de gusanos suele bastar y por lo tanto no es indispensable la erradicación total, es decir que unos cuantos helmintos, incapaces de multiplicarse dentro del hospedero, son más fácilmente tolerados que los antihelmínticos usados para matorlos.

El hincapié sobre las diferencias metabólicas entre los gusanos y el hospedero, ha abierto una nueva brecha de investigación para el estudio de la inhibición de los sistemas enzimáticos que son cruciales para el parásito pero no para el hospedero. ^(14,15)

Tenias o cestodos

El hábitat de las tenias adultas es el aparato digestivo del hospedero definitivo. La mayor parte de las que afectan al hombre son parásitos intestinales, aunque algunas cuantas invaden los tejidos somáticos en sus estadios larvarios y se les denomina tenias somáticas.

Estos organismos se ven como en forma de una cadena. La cadena o estróbilo puede dividirse en regiones. En un extremo se encuentra un órgano de fijación denominado escólex, de forma redonda u ovalada y que contiene 4 ventosas o 2 surcos succionantes alargados. El escólex se angosta para formar una región llamada cuello, en la que se forman los proglótidos o "segmentos".^(14,15)

La serie de segmentos adyacente a la región del cuello constituye la región de proglótidos inmaduros. Conforme se producen más de ellos, los existentes son empujados, hacia el extremo posterior, maduran y forman en su interior órganos sexuales masculinos y femeninos.

Este conjunto forma la región de proglótidos inmaduros. Después de la fecundación se forman huevecillos en su interior y se dice que los proglótidos están grávidos. Así pues, el estróbilo totalmente desarrollado consta de escólex, región del cuello y regiones de proglótidos inmaduros, maduros y grávidos.^(14,15)

La tenia que carece de aparato digestivo, depende de la absorción de sustancias alimenticias simples. Los estudios indican que las tenias solo pueden utilizar monosacáridos, no los disacáridos ingeridos por el hospedero, y que obtienen los nutrientes esenciales, como vitaminas y aminoácidos mediante transporte activo o pasivo a través de su epitelio.

3.2 *Taenia solium*.

Es un platelminto que pertenece a la clase: cestoidea (tenias o cestodos).

Sinónimos: *Taenia curcubulina* Pallas, 1776; *T. pellucida* Goeze, 1782; *T. vulgaris* Werner, 1782; *T. armata umana* Brera, 1808; *T. africana* von Linstow, 1990.⁽¹⁵⁾

Distribución geográfica: La tenia del cerdo, es de distribución cosmopolita y es más común en los países donde se come carne de cerdo cruda o mal cocida. Es común en México y Sudamérica.

Morfología, biología y ciclo de vida: La tenia adulto mide en promedio 1.8 a 3 mm de longitud y tiene menos de 1000 proglótidos en su estróbilo. El escólex es pequeño y mide más o menos 1mm de diámetro; además de las cuatro ventosas típicas, el rostellum está armado con dos hileras de ganchos, lo que coadyuva a la fijación del organismo a la mucosa. Esta tenia se ubica en las regiones superiores del intestino delgado y los proglótidos grávidos salen con las heces en forma individual o en pequeños segmentos, y son laxos e inactivos. Los proglótidos maduros contienen huevecillos que miden aproximadamente 35 mm de diámetro y contienen embriones hexacantos.^(14,15,21)

Cuando el humano es infectado, el cisticerco libera su escólex invaginándolo, se fija a la mucosa y desarrolla un estróbilo maduro en dos o tres meses.⁽²¹⁾

Formas de infección:

1. Por ingestión de comida o agua contaminada con excremento humano o indirectamente por moscas.
2. Por auto-infestación externa: cuando el hospedero del parásito se contamina por falta de higiene, es decir ano-mano-boca, o cuando el individuo tiene contacto con ropa contaminada.
3. Por auto-infestación interna: mediante rejurgitación de proglótidos del gusano maduro presentes en el estómago por alguna peristalsis reversible y la subsiguiente digestión de huevecillos (embriosporas) y liberación de oncosferas viables, las cuales pueden penetrar la mucosa intestinal y desarrollarse.⁽²¹⁾

3.3 Cisticercosis humana.

De manera general, la cisticercosis comienza cuando el helminto *Taenia solium*, se presenta en los tejidos humanos.

Se dice que la cisticercosis es generalizada cuando el cisticerco se encuentra en todo el cuerpo, y localizada cuando los cisticercos se encuentran en un sólo tejido u órgano, como puede ser el corazón, cerebro, etc.^[21]

El cisticerco generalmente se distribuye a través del cuerpo del hospedero intermediario y usualmente en proporción al peso de cada órgano donde se encuentre; así pues, el tejido cerebral puede ser invadido ya sea por uno, pocos o por más de 2000 cisticercos; sin embargo, en la mayoría de los casos se encuentran, no más de 10. Cuando los cisticercos se establecen en el cerebro la patología se reconoce como neurocisticercosis.^[21]

La neurocisticercosis es un padecimiento que por su gravedad es de mayor importancia, ya que puede causar serios trastornos e inclusive la muerte del hospedero.

En sí son tres los síndromes que caracterizan la sintomatología de la cisticercosis cerebral:^[21]

- convulsiones
- hipertensión intracraneal
- desórdenes psiquiátricos

Estos pueden aparecer en combinación o separados.

Las convulsiones, comúnmente ocurren con localización cortical del cisticerco en el parénquima, este puede ser focal o generalizado, esporádico o constante, en un estado epiléptico o con un bajo impulso y un consistente progreso.^[2,3,21]

Los desórdenes mentales y las convulsiones son frecuentemente causadas por infecciones intensivas.^[2,3,21]

Cuando el cisticerco está intacto, el hospedero puede reaccionar inmunológicamente, rodeando al mismo con membranas del tejido conectivo, que consisten de células epiteliales, fibras de colágeno y una escasa infiltración celular, en la cual las células plasmáticas y los eosinófilos predominan. La membrana del tejido conectivo, permite el paso de nutrientes, metabolitos y materiales inmunogénicos.

Una reacción inflamatoria por parte del hospedero se provoca cuando el cisticerco está moribundo y/o degenerando, y hay una granulomatosis como respuesta, compuesta de células plasmáticas, linfocitos, eosinófilos y macrófagos encerrados en una red de tejido conectivo construida arriba y alrededor del cisticerco.

Las células del hospedero que se encuentran actuando, invaden los remanentes del parásito el cual puede ser transformado como una cicatriz de tejido conectivo o llegar a ser calcificado.

La inflamación y la respuesta inmunológica suele ser intensificada de forma irregular, por lo cual existe un equilibrio inestable entre la potencia biológica del cisticerco y la reacción del hospedero.⁽²¹⁾

Diagnóstico

Un cisticerco en tejido subcutáneo, puede ser extraído y mediante un análisis histológico examinar y encontrar partes constitutivas del cisticerco.⁽²¹⁾

El diagnóstico de neurocisticercosis, se puede hacer con un cierto grado de precisión mediante la combinación de varias herramientas, que pueden ser desde la observación de signos y síntomas, rayos X, tomografía axial computarizada (TAC) o imágenes por resonancia magnética, pruebas serológicas y exámenes de laboratorio.⁽²¹⁾

Las técnicas radiológicas usadas en el diagnóstico de cisticercosis incluyen:

- a) rayos X del pecho, cuello y brazos (para cisticercos calcificados).
- b) angiografía cerebral, escaneamiento por isótopos, pneumoencefalografía, ventriculografía, encefalografía y mielografía, son estudios que pueden ser reemplazados mientras se determinan uno a uno por tomografía axial computarizada (TAC).⁽²¹⁾

Tratamiento

El tratamiento de la cisticercosis humana puede ser sintomático, quirúrgico o farmacológico.⁽²⁾

a) Sintomático:

enfocado al control de las crisis convulsivas: antiepilépticos

cefaleas: analgésicos.

hipertensión intracraneana: esteroides y diuréticos.

alteraciones de la conducta: psicofármacos.⁽³⁾

b) quirúrgico: varía según la localización y las características anatomopatológicas de la cisticercosis en el sistema nervioso central.^(2,3)

c) Farmacológico: Este debe aplicarse en casos de cisticercosis y neurocisticercosis en los cuales se encuentren parásitos vivos.⁽³⁾

Aunque se han reportado varios compuestos como herramientas terapéuticas, en la actualidad clínicamente se utilizan el praziquantel (figura 1.) y el albendazol. Cabe señalar que el costo del tratamiento con este último compuesto es 6 veces menor en relación al primero.

Por lo que respecta al praziquantel, es eficaz para lograr la desaparición o reducción de un alto porcentaje de quistes parenquimatosos y subaracnoideos corticales del cerebro. No tiene efecto sobre cisticercos calcificados. Después de su absorción gastrointestinal, se distribuye por todos los tejidos del organismo, pero las concentraciones que llegan al cerebro son bajas: 1/7 del nivel sérico se encuentra en el líquido cefalorraquídeo (LCR).^(2B) El praziquantel, se encuentra comercialmente como: Cistid (Merck).

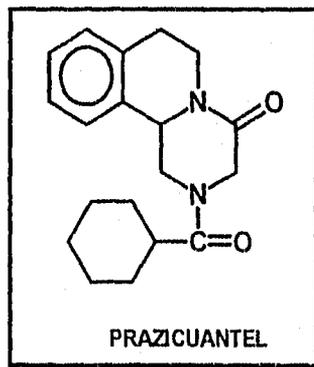


figura 1.

3.4 Bencimidazoles

Todos los bencimidazoles derivan de un anillo aromático de 6 miembros, fusionado con un anillo imidazol como núcleo; a partir de este núcleo se han realizado numerosas modificaciones, resultando así el grupo de los bencimidazoles-2-carbamato de metilo⁽¹⁷⁾.

Los bencimidazoles-2-carbamato son interesantes en el campo de la investigación química farmacéutica por presentar actividad antihelmíntica de amplio espectro; sin embargo, por sus características estructurales, en general son poco solubles en agua lo que ha sido aprovechado para utilizarlos como agentes antiparasitarios intestinales debido a su escasa absorción.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Algunos ejemplos de estos bencimidazoles-2-carbamato de metilo, son: fenbendazol, flubendazol, mebendazol y albendazol (figura 2).

Aunque el efecto antihelmíntico de los bencimidazoles, puede ser asociado con el agotamiento de glucógeno y reducción en el transporte de glucosa, existen evidencias que indican que el principal mecanismo de acción antiparasitaria de los bencimidazoles, es su interferencia en la formación de los microtúbulos y en la velocidad de síntesis de tubulina.⁽¹²⁾ Un deterioro en la integridad microtubular, causa varias anomalías en la función celular incluyendo la muerte del parásito. Algunos bencimidazoles-2-carbamato, deben su acción antihelmíntica a la unión selectiva con la tubulina del parásito interfiriendo en la polimerización de los microtúbulos.^(13,14,18)

Recientemente se ha informado^(26,30-32), que algunos de estos bencimidazoles han mostrado cierto grado de eficacia contra parásitos extraintestinales como los que se muestran en la tabla siguiente:

tabla 1. Algunas helmintiasis a nivel extraintestinal.

enfermedad	agente causal	bencimidazol de elección para el tratamiento
Filariasis	<i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Brugia malayi</i> , <i>Onchocerca volvulus</i> etc.	5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo. mebendazol
Trichinosis	<i>Trichinella spiralis</i>	flubendazol
Neurocisticercosis	<i>Taenia solium</i>	albendazol

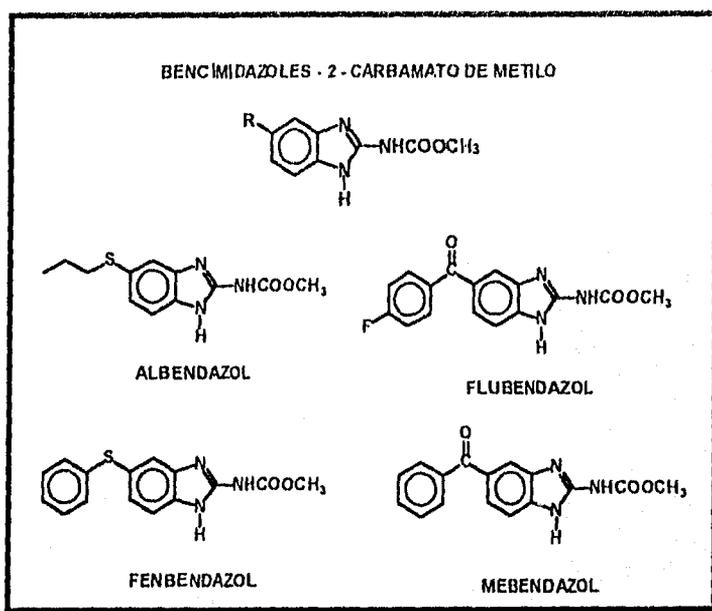


figura 2. Ejemplos de bencimidazoles-2-carbamato

3.5 Albendazol, [5-propillio-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo).

Es un antihelmíntico de amplio espectro que tiene acción sobre las larvas y las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares, y sobre las formas adultas de los cestodos y trematodos ⁽⁴⁾. Es de los antihelmínticos más potentes y menos tóxicos que existen en la actualidad, y es bien tolerado en dosis de hasta 10 mg/Kg de peso diariamente, durante 30 días ⁽⁵⁾. Se ha indicado para el tratamiento de las teniasis y se ha empleado con eficacia para prevenir y aún destruir el quiste en la cisticercosis experimental. ⁽⁶⁻⁹⁾

En estudios de absorción en intestina y estómago de ratas, se encontró que la mayor vía de absorción es la gástrica, quedando el intestino en segundo plano. ⁽¹⁰⁾

La absorción del albendazol, en los seres humanos, no ha sido del todo determinada, ya que la curva de concentración versus tiempo corresponde a su metabolito principal, el sulfóxido de albendazol. Dada la rapidez con que ocurre este proceso metabólico, se propone que la variabilidad interindividual de los niveles plasmáticos del sulfóxido de albendazol, se debe a diferencias en la absorción y no a diferencias en el metabolismo. ^(5,10,11)

La absorción del albendazol en el canal intestinal no es buena, lo cual conduce a bajas concentraciones en el tejido y plasma, lo que resulta en respuestas variables para el tratamiento de la neurocisticercosis.

Esta deficiente absorción del albendazol se atribuye a que esta sustancia en su estructura en la posición 1 posee un hidrógeno capaz de formar puentes de hidrógeno intermoleculares, esto trae como consecuencia una poca solubilidad acuosa y por consiguiente su mala absorción intestinal.

3.6 Profármacos.

Un profármaco es un derivado farmacológicamente inactivo de un principio activo que requiere de una transformación química y/o enzimática, dentro del organismo, para poder liberar o generar al fármaco (principio activo), y así este, pueda ejercer su acción terapéutica.⁽²⁶⁾

Los profármacos según su conformación estructural se clasifican en dos grupos:⁽²⁶⁾

a) Derivados Bio-reversibles. Son profármacos que en su estructura presentan al fármaco, unido a una porción estructural denominada progrupo o acarreador, el cual modifica las propiedades fisicoquímicas del primero. El derivado bio-reversible libera al principio activo dentro del organismo mediante reacciones químicas intramoleculares o reacciones enzimáticas de hidrólisis, oxidación o reducción.

b) Bioprecusores. Son profármacos que formalmente no presentan al fármaco en su estructura sino que al ser biotransformados enzimáticamente por medio de reacciones de oxidación o reducción generan al principio activo. Por ser estructuralmente distinto al principio activo, sus propiedades de solubilidad y liposolubilidad serán totalmente diferentes a las del fármaco que van a generar.

3.7 Ensayos biológicos.

Entre las evaluaciones biológicas de carácter general, destaca por su sencillez y economía la determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach. El método consiste en evaluar extractos, fracciones o compuestos puros, en concentraciones de 10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$.^(22,25)

El material objeto de la evaluación se coloca en viales (tres viales por cada concentración). Posteriormente, a cada vial con la concentración adecuada del material de prueba se le adiciona un volumen determinado de medio salino y 10 larvas del crustáceo con 48 horas de desarrollo. Al cabo de 24 horas se cuentan los organismos sobrevivientes y se determina el porcentaje de mortalidad para cada dosis. Por último, se determina la dosis letal media

mediante un programa de análisis Finney⁶. Para compuestos puros, dosis letales media menores de 200 µg/mL indican actividad citotóxica. La toxicidad para *Artemia salina* ha correlacionado en múltiples ocasiones con actividades biológicas más complejas, como por ejemplo, citotoxicidad *in vitro* para células cancerígenas, actividad antihelmíntica y actividad antipalúdica, entre otras.^(23,24)

La prueba de *Artemia salina*, se puede correlacionar con el efecto antihelmíntico, porque el mecanismo de acción de algunos antihelmínticos, es parecido al de compuestos con actividad antitumoral; es decir, por un lado, en estudios anteriores, se ha comprobado que el uso del crustáceo *Artemia salina*, correlaciona con efectos antitumorales que actúan como inhibidores de la reproducción celular⁽²³⁾, y por otro lado, el mecanismo de acción de los benzimidazoles-2-carbamato con actividad antihelmíntica, consiste en evitar, la polimerización de tubulina. La tubulina es una proteína globular presente en el citoesqueleto de todas las células vivientes, y es importante en la formación de los microtúbulos; estos controlan varias funciones celulares tales como: transporte exoplásmico, movimiento citoplasmático y división celular. Así pues, el efecto antihelmíntico es resultado de un impedimento en la división celular, lo que ocasiona la muerte del organismo afectado por baja o nula producción celular.^(13,14,18)

4. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO DE LOS PROFÁRMACOS POTENCIALES.

Para incrementar la solubilidad en disolventes polares del albendazol, en el presente trabajo se decidió modificar la estructura de este principio activo, mediante la elaboración de profármacos potenciales, especialmente como derivados bio-reversibles. Los compuestos diseñados, se muestran a continuación (tabla 2.):

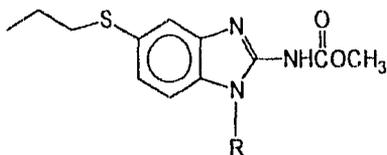


tabla 2. profármacos potenciales diseñados.

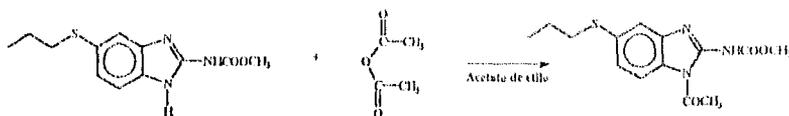
Compuesto	R	Nombre
albendazol	- H	albendazol
I	- COCH ₃	acetato de albendazol
II	- CH ₂ OCOCH ₃	acetiloximetil albendazol
III	- CH ₂ OCOCH ₂ NH ₂	glicinoiloximetil albendazol
IV	- COOC ₆ H ₆	fenoxicarbonil albendazol

Por la naturaleza estructural de los derivados bio-reversibles diseñados, se espera contar con moléculas que presenten mejores características de solubilidad en disolventes polares que el propio albendazol; ya que al sustituir el hidrógeno de la posición 1(3) del albendazol por los progrupos, la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares se vería afectada; de esta forma, el acomodamiento de las moléculas de albendazol en estado sólido ya no sería la misma, haciendo así más factible la solubilidad de cada compuesto en disolventes polares.

Así mismo, las modificaciones moleculares realizadas sobre el albendazol, consideraron una de las estrategias que existen para incrementar la solubilidad en disolventes polares de algunos principios activos, que es la de agregar progrupos (elaboración de profármacos) que logren la obtención de moléculas, con menor punto de fusión que el principio activo de interés; ya que se ha observado que si se logra disminuir 100°C el punto de fusión, la solubilidad en disolventes polares se incrementa en un factor de 10 veces más respecto a la solubilidad que presente originalmente la sustancia en estos disolventes.⁽²⁰⁾

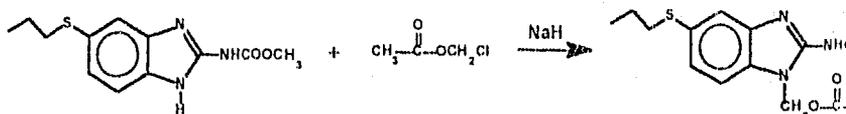
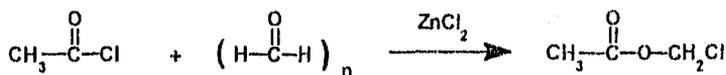
5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN.

COMPUESTO I.- Acetato de albendazol.



Partiendo de albendazol comercial (Smith-Kline) se llevó a cabo una reacción de acilación con anhídrido acético, en acetato de etilo, durante 60 minutos, la mezcla de reacción se concentró en evaporador rotatorio a una temperatura de 50°C, obteniéndose un sólido color beige, el cual se recristalizó de hexano caliente (69°C), resultando un sólido blanco mismo que presentó un punto de fusión de 123°C y un Rf. de 0.72 (CH₂Cl₂:MeOH 98:02).

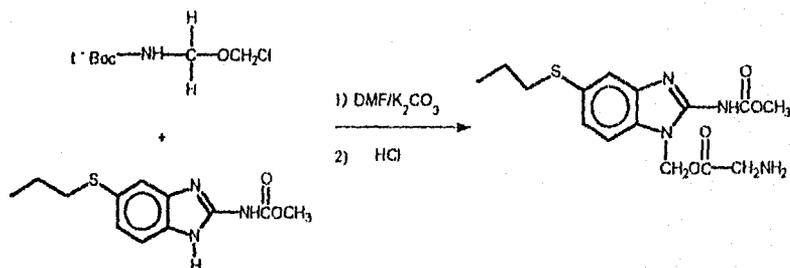
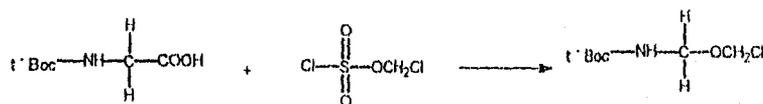
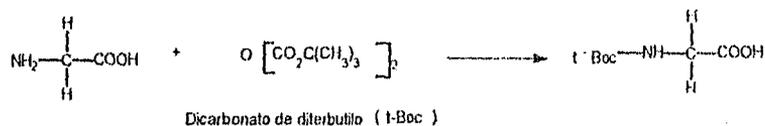
COMPUESTO II. Acetil oximetil albendazol.



La síntesis del acetiloximetil albendazol se llevó a cabo en dos pasos; el primero mediante la obtención del acetato de clorometilo, haciendo reaccionar cloruro de acétilo y paraformaldehído en presencia de cloruro de zinc anhídrido como catalizador, dejando reaccionar por 24 horas a reflujo. El producto se obtiene purificando por destilación entre 104 y 108°C, con buen rendimiento (90%).

El segundo paso se llevó a cabo haciendo reaccionar hidruro de sodio (NaH) con albendazol, en dimetilformamida (DMF), para posteriormente agregar el acetato de clorometilo, dejando reaccionar por 24 horas a temperatura ambiente; al término de este tiempo se aisló el producto deseado que presentó un punto de fusión de 65° C y un rendimiento de 87.5%.

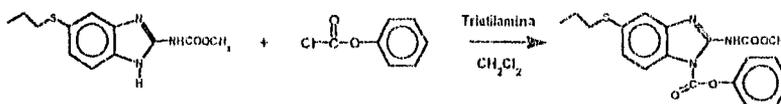
COMPUESTO III.- Glicinoil oximetil albendazol.



Para la obtención del compuesto (III), se llevaron a cabo 3 pasos; primero se hizo reaccionar la glicina con dicarbonato de diterbutilo (Aldrich), para proteger el grupo amino de la glicina; el segundo paso requirió la previa preparación del clorosulfato de clorometilo (Cl-SO₃CH₂Cl)^[27], para después hacerlo reaccionar con la glicina protegida y así obtener el progrupo que posteriormente, en un

tercer paso se hizo reaccionar con albendazol en presencia de carbonato de potasio (K_2CO_3) y dimetilformamida (DMF) como disolvente. Al producto resultante de este tercer paso, se le agregaron gotas de ácido clorhídrico (HCl) concentrado, para hidrolizar el grupo ter-boc, y así obtener finalmente el compuesto deseado. El glicinoiloximetil albendazol se obtuvo con un rendimiento del 57 % y un punto de fusión de 145-148 °C.

COMPUESTO IV.- Fenoxicarbonil albendazol.



Se hizo reaccionar albendazol con cloroformiato de fenilo (Aldrich), utilizando diclorometano como disolvente y trietilamina como base. La reacción se llevó a cabo en 24 horas, al término de este tiempo, la mezcla se concentró en rotaevaporador a temperatura ambiente, obteniéndose una sustancia viscosa color café claro que presentó un Rf. de 0.62 (CHCl₃:Acetato de etilo 90:10).

6. RESULTADOS

tabla 3. Nombre, punto de fusión y solubilidad de los compuestos sintetizados.

compuesto	nombre	punto de fusión	metanol	etanol	acetona
referencia	albendazol	205°C	ns	ns	ns
I	acetato de albendazol	123°C	s	s	s
II	aceliloximetil albendazol	65°C	s	s	s
III	glicinoiloximetil albendazol	130-140°C	s	s	s
IV	fenoxicarbonil albendazol	*	ns	ns	ns

* par su edo. físico no fué posible determinarlo.

ns- no soluble.

s - soluble.

tabla 4. Coeficientes de reparto y rendimiento de los compuestos sintetizados.

compuesto	r.f.	sistema	*tr (min)	rendimiento
I	0.72	a	20.5	85.0%
II	0.57	a	20.1	87.5%
III	0.51	b	nd	57.0 %
IV	0.62	b	nd	36.0%

a: CHCl₃:MeOH 98:2

b:CHCl₃:ACETATO DE ETILO 90:10

nd: no determinado

*tr: tiempo de retención cromatografía de gases (gas: Helio, columna: silica fundida con fase fenil-metil silicón.).

Tabla 6. Datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos

compuesto	espectroscopía
albendazol	IR (KBr) ν = 1608 (-NHCOO-), 3332 (NH) cm^{-1} $^1\text{H RMN (TMS)} \delta$ = 0.9 (t,3H), 1.55 (m, 2H), 2.9 (t,2H), 3.6 (s, 3H), 7.2 (dd, 1H), 7.42 (d, 1H), 8.0 (d, 1H) ppm.
acetato de albendazol	IR (KBr) ν = 1710 (COCH ₃), 1646 (-NHCOO-), 1623 (-NHCOO-), 1608 (-NHCOO-), 1368 (CH ₃) cm^{-1} . $^1\text{H RMN (TMS)} \delta$ = 0.9 (t,3H), 1.55 (m, 2H), 2.78 (s,3H), 2.9 (t,2H), 3.6 (s, 3H), 7.2 (dd, 1H), 7.42 (d, 1H), 8.0 (d, 1H) ppm. EM (I.E.): 207 (100%, M^+ - 100), 249 (48%, M^+ - 58), 163.95 (52%, M^+ -144.95), 164.95 (54%, M^+ - 143.95), 43.05 (34%, M^+ -264.05) m/z.
acetil oximetil albendazol	IR (KBr) ν = 1742 (CH ₃ COO ⁻), 1608 (-NHCOO-) cm^{-1} $^1\text{H RMN (TMS)} \delta$ = 0.9 (t,3H), 1.5 (m, 2H), 2.0 (s,3H), 2.82 (t,2H), 7.19 (dd, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.6 (d, 1H) ppm. EM (I.E.): 207 (100%, M^+ - 100), 249 (59%, M^+ - 58), 164.05 (52%, M^+ -143.05), 165.05 (73%, M^+ - 142.05)m/z.
glicinoil oximetil albendazol	IR (KBr) ν = 1368 (CH ₃), 1644 (-NHCOO-) cm^{-1} $^1\text{H RMN (TMS)} \delta$ = 1.1 (t,3H), 1.49 (m, 2H), 2.2 (s,3H), 2.9 (t,2H), 7.3,7.7 (señales complejas)* ppm. *Esta sustancia se descompuso al enviarla al análisis.
fenoxicarbonil albendazol	$^1\text{H RMN (TMS)} \delta$ = 0.92 (t,3H), 1.5 (m, 2H), 2.8 (t,2H), 3.7 (s,3H), 7.1-7.5 (señales complejas)* ppm. *Esta sustancia se descompuso al enviarla al análisis.

En la siguiente tabla se muestra la concentración letal 50 para los compuestos I y II que fueron evaluados contra *Artemia salina*.

tabla 5. Concentración letal 50 de los compuestos evaluados.

compuesto	CL50 ppm	CL50 mM
I	0.23	7.45×10^{-7}
II	0.24	7.09×10^{-7}
albendazol *	2	7.53×10^{-6}

* compuesto de referencia

7. DISCUSIÓN.

7.1 Preparación del fenoxicarbonil albendazol.

Al llevar a cabo la revisión bibliográfica sobre derivados bio-reversibles de bencimidazoles-2-carbamato de metilo, encontramos que el progrupo meloxicarbonil ($\text{CH}_3\text{OCO}-$), se había utilizado para modificar la estructura del fenbendazol y análogos con el propósito de cambiar sus propiedades de solubilidad. Los productos obtenidos fueron estables durante su almacenamiento.⁽¹⁹⁾

Con este antecedente se diseñó un profármaco del albendazol utilizando dicho progrupo, los resultados no fueron los esperados, ya que la molécula obtenida fué muy inestable e higroscópica; por lo que se decidió cambiar el progrupo, utilizando el fenoxicarbonilo, ya que por su mayor liposolubilidad podría proporcionar a la nueva molécula, mayor estabilidad. Además de que al unirse al albendazol, el enlace éster presente en el nuevo compuesto, se esperaba que no fuera sustrato para las esterasas del cuerpo humano, pero sí para las de los helmintos, del tal forma que al degradar el compuesto se liberaría CO_2 , fenol y albendazol, y este profármaco podría presentar mejores características antiparasitarias, porque tanto el albendazol, como las moléculas liberadas al escindir el enlace éster, son tóxicas para los helmintos.

Para la preparación del fenoxicarbonil albendazol se hizo reaccionar el albendazol y el cloroformiato de fenilo, utilizando dimetilformamida como disolvente e hidróxido de sodio como base a una temperatura de $40-50^\circ\text{C}$. La reacción se siguió por cromatografía en placa fina, observándose la presencia de tres sustancias distintas a las materias primas. Una de las tres manchas ($R_f = 0.62$), se presentaba como la más intensa; las otras dos eran prácticamente tenues. ($R_f = 0.5$ y 0.55)

Es probable que por la presencia de NaOH , el cloroformiato de fenilo diese lugar a fenol o que el grupo carbamato del albendazol, fuese afectado.

Al terminar la reacción, se obtuvo una mezcla viscosa de color café claro. Los intentos por aislar los productos fueron infructuosas ya que al final se obtenía albendazol contaminado ligeramente con dos de las tres manchas originales.

Ante tal situación, se decidió cambiar las condiciones de reacción, utilizando diclorometano como disolvente, este cambio se hizo porque la DMF nos ocasionó problemas en la purificación anterior; y trietilamina como base. Al inicio y durante más de 3 horas la mezcla de reacción fué una suspensión por la poca solubilidad del albendazol; sin embargo, transcurrido este tiempo, la mezcla quedó prácticamente transparente. El seguimiento con placa fina mostró prácticamente una sola mancha ($R_f = 0.62$), después de 24 horas de agitación. Nuevamente se obtuvo una sustancia viscosa de color café. Sin posterior purificación, se envió a análisis de resonancia magnética nuclear protónica en DMSO-deuterado.

A pesar de la inestabilidad del compuesto, se lograron registrar las señales correspondientes al grupo propilo y al grupo metoxilo del albendazol. La asignación en la zona de los protones aromáticos se hizo difícil debido al amontonamiento de las señales, de donde no se pudo discernir si la sustancia analizada fué una mezcla formada por un derivado 1-fenoxi-carbonil-5-propiltio-bencimidazol-2-il carbamato de metilo, compuesto IV (fig.3a), más su isómero 1-fenoxicarbonil-6-propiltio-bencimidazol-2-il carbamato de metilo, compuesto IV' (fig.3b). La sustancia obtenida también fué inestable, ya que después de almacenarla a temperatura ambiente, se encontró albendazol en la muestra lo cual indica la reversibilidad de la reacción.

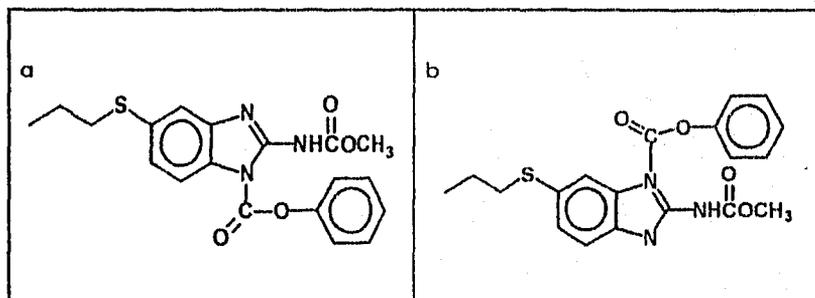


figura 3. a.compuesto IV y b. compuesto IV'.

Finalmente debido a la viscosidad e inestabilidad del producto obtenido, decidimos diseñar y sintetizar otros derivados bio reversibles potenciales del albendazol.

7.2 Preparación del Acetato de albendazol

Para el diseño de este compuesto, se consideró que el grupo acetilo por ser pequeño sería fácil de añadir a la molécula del albendazol mediante una reacción de acilación típica. Aunque el enlace formado es una amida, por las características del anillo imidazol, se esperaba una de relativamente fácil hidrólisis de este derivado⁽²⁷⁾, en condiciones ácidas del estómago o por hidrólisis enzimática. Así, al romperse el enlace amídico de este profármaco se liberaría por una parte el albendazol y por otra ácido acético, el cual es bien metabolizado en el organismo humano y no representaría riesgos de toxicidad para el hospedero.

Para obtener el compuesto deseado se realizó primero una reacción con albendazol y anhídrido acético y usamos como disolvente DMF, con este disolvente tuvimos muchas dificultades en el aislamiento del producto ya que se presentaron bajos rendimientos (menor al 5 %); por lo que optamos por cambiar las condiciones de reacción, utilizando acetato de etilo como disolvente. Al tomar muestras y eluirlas en cromatografía de placa fina, revelando con luz ultravioleta, se observaron dos manchas de menor polaridad que el albendazol. La mancha con $R_f = 0,72$ se presentaba en mayor proporción (80%) que la mancha de $R_f = 0,68$. Al agotarse la materia prima, después de 24 horas, se procedió a aislar los productos obtenidos. Después de recrystalizar se logró obtener el producto mayoritario con un rendimiento satisfactorio. El acetato de albendazol presentó un punto de fusión de 123°C , lo cual es significativo, ya que, la diferencia de puntos de fusión en grados centígrados, entre el acetato de albendazol y el albendazol es de 82°C ; lo que nos aseguraba de algún modo que este compuesto tendría mayores posibilidades de ser soluble en disolventes polares.

Por lo anterior, determinamos la solubilidad del acetato de albendazol en varios disolventes polares, encontrando que dicho compuesto, es soluble en metanol, etanol, acetona y acetato de etilo.

Para la elucidación estructural, encontramos que en el espectro de infrarrojo, se presentaron las bandas a 3308, 3254, 2964, 1716, 1646, 1628, 1624, 1118 cm^{-1} ; en el espectro de ^1H RMN se presentaron las siguientes señales: $\delta=0.9$ triplete, asignado al metilo de la porción propililo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S-}$), así como un sexteto centrado a 1.55 ppm asignado al metileno ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) de la misma porción, y un triplete a 2.9 ppm para el otro metileno ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$) vecino al átomo de azufre. El grupo metilo del acetilo presentó un singulete a 2.78 ppm y el grupo metoxilo del carbamato, presentó un singulete a 3.6 ppm.

Uno de los aspectos interesantes de mayor apoyo estructural dado por la resonancia protónica, fué la asignación sobre cual de los nitrógenos en el anillo imidazol se había llevado a cabo la reacción de acilación. Con este fin, se asignaron los señales del anillo bencénico.

En el espectro registrado, se observa doble de dobles, centrado a 7.2 ppm asignado para el hidrógeno H_β ($J=9\text{Hz}$, 2Hz), en seguida se presenta un doblete centrado a $\delta=7.42$ ppm ($J=2\text{Hz}$) asignado al hidrógeno H_x . Posteriormente, se presenta un doblete centrado a 8 ppm ($J=9\text{ Hz}$) asignado al hidrógeno H_A .

En base al espectro del albendazol previamente reportado^[pag.51] y registrado con el mismo aparato y disolvente, se determinó que el compuesto acetilado fué el I (fig.4a), debido al desplazamiento paramagnético del doblete asignado para el hidrógeno H_A . En el albendazol, este protón aparece a 7.5 ppm y en el derivado acetilado a 8 ppm. Los cambios de desplazamiento de las otras dos señales, fueron mínimos. Si el derivado ocelilado tuviese la estructura I' (fig.4b), entonces se esperaría que el hidrógeno H_x presentara desplazamiento a campos bajos. Finalmente, la señal que se presentó a más de 10 ppm y que desaparece con D_2O se asignó al NH del grupo carbamato.

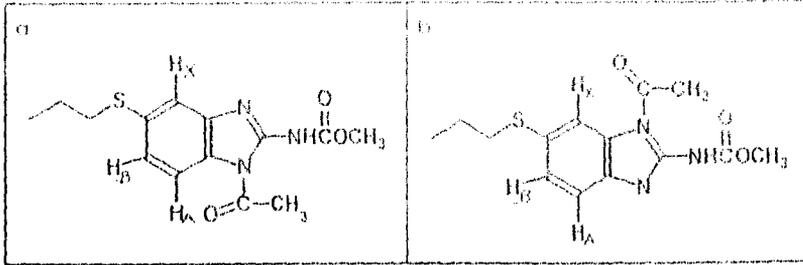


figura 4. a. compuesto I, b. compuesto I'.

El estado sólido que presenta el acetato de albendazol, permite su fácil manejo para posteriores estudios biológicos; sin embargo a pesar de esto, el compuesto no resulta ser muy estable en solución acuosa por más de 6 horas a temperatura ambiente, con lo cual nos vimos en la necesidad de sintetizar un compuesto que ofreciera mayor estabilidad y de ser posible menor punto de fusión para obtener mejores resultados en solubilidad acuosa.

7.3 Preparación del Glicinoil oximelil albendazol.

Para este compuesto se pensó en utilizar glicina como progrupo, con el fin de liberar *in vivo* por un lado al albendazol y por otro, al aminoácido glicina ya que por ser un compuesto útil en el organismo humano no presentaría problemas de toxicidad para el individuo. Por estudios previos, se ha recomendado que al utilizar a los α -aminoácidos como progrupos, se haga mediante el diseño de derivados bioreversibles tripartitas (fármaco-conector-progrupo) con el propósito de que la molécula obtenida presente estabilidad y sea un mejor sustrato para las enzimas⁽³³⁾. Tradicionalmente, se han utilizado los grupos $-\text{CH}_2\text{-O}-$ y $-(\text{CH}_3)\text{CH-O}-$ como conectores debido a que una vez que el derivado bio-reversible es hidrolizado, el conector, por equilibrio químico, libera al fármaco, generando formaldehído o acetaldehído según sea el caso.

Así pues, en nuestro caso el compuesto resultante de la ruptura del enlace amídico sería el formaldehído, que a la concentración en la cual estaría presente en el organismo del paciente tampoco resultaría tóxico.

Durante el desarrollo de cada uno de estos pasos, no se tuvieron problemas, excepto en que los rendimientos en la obtención del t-boc-glicinato de clorometilo y del producto final fueron bajos (30% y 57% respectivamente).

Desafortunadamente el compuesto obtenido resultó ser inestable a temperatura ambiente, y su estado físico un líquido viscoso; lo que complica su manipulación en posteriores estudios, y por ello no fue evaluado con *Artemia salina*. Esta inestabilidad probablemente pueda deberse a la presencia del grupo amino protonado (fig.5) de la glicina, que al inducir un mayor carácter electrofílico al carbonilo, trae como consecuencia mayor susceptibilidad a sufrir un ataque nucleofílico (H_2O).

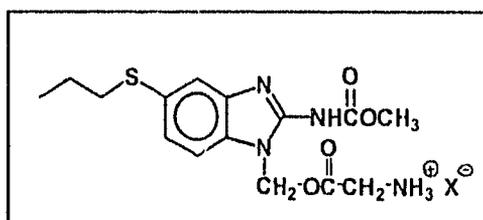


figura 5.

7.4 Preparación del Acelil oximetil albendazol.

El pensar en derivados bio-reversibles tripartitas, que tengan como conector el grupo metileno, abre la posibilidad de obtener compuestos con mayor estabilidad, siempre y cuando no se encuentre un grupo que incremente el carácter electrofílico del grupo carbonilo del éster.

Después de llevar a cabo las reacciones correspondientes para obtener este compuesto, se presentaron problemas en el aislamiento del producto ya que en todos los casos en que se intentó obteníamos una sustancia muy viscosa de apariencia pegajosa color café clara; al principio pensamos en que probablemente el disolvente utilizado en las reacciones llevaba a obtener un producto con esa consistencia, por lo que se realizó de nuevo la reacción

utilizando acetona; con el uso de este disolvente sabíamos que no se obtendría tan fácilmente el producto deseado, porque el albendazol es insoluble o muy escasamente soluble en ella pero se dejó reaccionando por 5 días a temperatura ambiente, al término de este tiempo, se observó presencia de producto y albendazol sin reaccionar, y procedimos al aislamiento del producto encontrando el mismo aspecto en él.

Esto nos condujo a descartar la influencia del disolvente en el aspecto o estado físico del producto obtenido, por ello regresamos a las mismas condiciones de reacción especificadas en la parte experimental de este trabajo hasta aislar el producto deseado.

Se llevaron a cabo muchos intentos infructuosos, que nos hacían pensar que el estado físico natural del compuesto deseado era precisamente viscoso y de ese color; pero nos faltaba descartar la posibilidad de que el producto se comportara así debido a que nosotros no habíamos eliminado el aceite en el cual viene suspendido el NaH comercialmente; así que nos dimos a la tarea de eliminarlo con lavados de eter de petróleo y posteriormente lavamos el producto repetidamente varias veces llegando finalmente a obtener un compuesto color café claro con apariencia de cera y sólido.

Al compuesto obtenido se le practicaron los análisis espectroscópicos para su elucidación estructural, encontrando así que se trata del acetiloximetil albendazol. Aunque con los datos del espectro de infrarrojo y la resonancia magnética nuclear protónica no fué posible asignar en cual nitrógeno del anillo imidazol se llevó a cabo la alquilación o si el sólido obtenido es en realidad una mezcla de los dos compuestos posibles (compuestos II y II') (figura. 6a y 6b), el compuesto presentó un punto de fusión de 65°C, y resultó ser soluble en acetato de etilo, etanol, acetona y metanol.

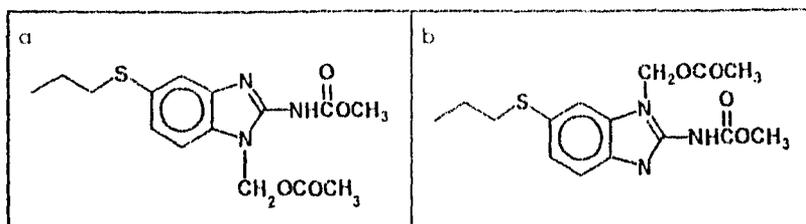


figura 6 a. compuesto II y b. compuesto II'.

Por las características físicas del compuesto y sus propiedades de solubilidad se decidió realizar un bioensayo con *Artemia salina* para evaluar su citotoxicidad.

7.5 BIOENSAYO con *Artemia salina*.

De los compuestos que se sintetizaron, sólo 2 de ellos el acetato de albendazol y oceliloximetil albendazol compuestos I y II respectivamente, fueron evaluados con *Artemia salina*.

Los compuestos I y II presentaron un CL₅₀ de 0.23 y 0.24 ppm respectivamente; esto en comparación con el albendazol (2ppm), es bastante considerable, ya que demuestran ser 10 veces más citotóxicos que el albendazol.

Por otra parte, ambos compuestos (I y II), tienen una CL₅₀ muy semejante, estos valores indican que no varía mucho el efecto citotóxico entre ellos y que de alguna forma su citotoxicidad no se debe tanto al progrupo presente en sus estructuras, sino al poder de solubilidad en el medio salino, al grado de absorción en *A. salina* y o la liberación del principio activo *in vivo*.

Con estos resultados podemos plantear lo siguiente:

1. Que los compuestos I y II son bien absorbidos y por lo tanto liberan al principio activo en mayor cantidad de la que sería absorbido por sí solo, y por eso resultan ser más tóxicos que el compuesto activo.

2. Que los compuestos I y II son absorbidos y son citotóxicos por sí mismos y que probablemente no liberan albendazol.

Para corroborar estas hipótesis tendrían que llevarse a cabo estudios posteriores, que serían objeto de otros trabajos de tesis.

Además, cabe señalar que hasta el momento no se ha utilizado la prueba de *Artemia salina* para evaluar la posible actividad biológica de los profármacos. Con los resultados obtenidos, esta prueba resulta atractiva, ya que a parte de ser indicativa de citotoxicidad, ahora es posible utilizarla como un parámetro de referencia indirecta de bioconversión de profármacos, siempre y cuando estos, sean estables en el medio salino en donde se realice la evaluación.

8. CONCLUSIONES.

Finalmente, se cumplieron los objetivos planteados, ya que se obtuvieron compuestos con menor punto de fusión, que además presentaron mejor solubilidad en disolventes polares.

Respecto al trabajo realizado, se puede concluir lo siguiente:

- Al sintetizar derivados bio-reversibles, con menor punto de fusión que el principio activo que se pretende liberar, las posibilidades de mejorar las propiedades de solubilidad acuosa de los compuestos, se incrementan.
- El acetylloximetil albendazol es un derivado bio-reversible potencial del albendazol que presenta características favorables para posteriores estudios con animales de laboratorio.
- El ensayo biológico con *Artemia salina*, es una prueba que se puede utilizar como un parámetro de referencia indirecta de bioconversión de pro-fármacos, siempre y cuando, estos, sean estables en el medio salino en donde se realiza la evaluación.

9. PARTE EXPERIMENTAL

9.1 INSTRUMENTACIÓN.

Los puntos de fusión (p.f) se determinaron con un capilar, en un Büchi Mod 530 y están corregidos. Para concentrar los productos se utilizó un evaporador rotatorio marca Büchi RE 111, con vacío generado por un bomba Felisa Mod. 1600 ajustada a 55 cm de Hg y condensador de hielo seco.

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

Los espectros de resonancia magnética protónica (^1H RMN) para los compuestos obtenidos y materias primas se determinaron en un espectrofotómetro Varian EM-390 de 90 MHz. En todos los casos se utilizó dimetilsulfóxido deuterado como disolvente. Los desplazamientos químicos se dan en partes por millón (ppm).

Los espectros de masas se determinaron en un sistema acoplado de Cromatografía de Gases-Espectrómetro de masas por impacto electrónico (EI) en un aparato Hewlett Packard 5988A, utilizando una columna capilar de sílica fundida con fase fenil-metil silicón de 25 metros de longitud, un diámetro interno de 0.32 milímetros y un espesor de 0.52 micras. El volumen de inyección fue de 1 μl .

Cromatografía en capa fina: se utilizaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice GF254 (Merck). Los compuestos se revelaron con luz UV y por exposición a vapores de yodo.

9.2 COMPUESTO I. Acetato de albendazol

En un matraz de bola de 1 boca (14/20), adaptado con agitación magnética, se colocaron albendazol ($2\text{g}, 7.53 \times 10^{-4} \text{mol}$) y anhídrido acético (10mL, d.1.080 g/mL, 0.105mol), verificando por cromatografía en capa fina ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 98:02) la desaparición del albendazol; al término de 60 minutos, la mezcla de reacción se concentró en evaporador rotatorio alcanzando una temperatura de 50°C , obteniéndose un sólido color beige el cual se recrystalizó de hexano, resultando un sólido blanco, mismo que presentó un punto de fusión de 123°C y un Rf de 0.72.

9.3 COMPUESTO II.- Acetil oximetil albendazol.

Esta reacción se llevó a cabo en dos pasos:

Primeramente, en un matraz de bola (14/20) previamente pesada, se colocó ZnCl_2 ($1\text{g}, 7.34 \times 10^{-3} \text{mol}$) y se deshidrató a la flama, hasta observar que se pone color café, posteriormente se agregó paraformaldehído ($5\text{g}, 0.166 \text{mol}$), adaptándose un refrigerante y una trampa anhidra; se colocó en baño de hielo y lentamente se fué adicionando cloruro de acetilo (13mL, d.1.104g/mL, 0.165mol), terminada la adición, se dejó con agitación magnética toda la noche.

Al término de este tiempo, se destiló entre 104 y 108°C , utilizando una cabeza de destilación Kontes, para obtener finalmente el acetato de clorometilo.

Para el segundo paso, en un matraz bola de una boca previamente pesada, se agregó NaH ($0.22\text{g}, 9.166 \times 10^{-3} \text{mol}$) en suspensión al 20% y posteriormente se adicionaron albendazol ($1.6\text{g}, 6.03 \times 10^{-3} \text{mol}$) y dimetilformamida (DMF) (10mL); después con el matraz en baño de hielo se agregó acetato de clorometilo (1mL, $9.22 \times 10^{-3} \text{mol}$), se dejó reaccionando por 24 horas, verificándose la desaparición del albendazol mediante cromatografía en capa fina, ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 98:02).

Al término de este tiempo, se agregó al matraz de reacción, acetato de etilo (5mL), y después salmuera (5 mL). Las dos fases fueron separadas por

extracción haciendo 8 lavados con salmuera (5 mL por lavado), la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro (Merck). Posteriormente se separó por filtración la fase orgánica, del sulfato de magnesio anhidro. El filtrado fue concentrado en evaporador rotatorio, obteniéndose un compuesto oleoso.

A esta sustancia se le agregó éter de petróleo (10 mL) y metanol absoluto (10 mL), a continuación se separaron las dos fases formadas; la fase metanólica se concentró en evaporador rotatorio, obteniéndose un sólido con aspecto ceroso color beige, se dejó secando en el mismo matraz 24 horas y al término de este tiempo el producto se lavó de nuevo con éter de petróleo y se obtuvo finalmente un sólido color hueso que presenta un punto de fusión 65 °C, un rendimiento de 87.5%, y un RI de 0.57 (CHCl₃:MeOH 98:02).

9.4 COMPUESTO III. Glicinoiloximetil albendazol.

PASO 1. Obtención de glicina protegida.

En un matraz Erlenmeyer se preparó una solución de glicina (3.204 g, 42.73 mmol) (Merck) y trietilamina (5.72 mL, d. 0.7255 g/mL, 62.72 mmol) (Merck), en agua destilada (16 mL), manteniéndola en agitación hasta que se homogenizó. En seguida, se adicionó dioxano (16 mL) y dicarbonato de diterbulilo (Aldrich) (6.9 mL, 45.97 mmol).

Se dejó reaccionando la mezcla por 2 horas en agitación constante y a temperatura ambiente. Cuando la reacción se completó, se hizo una extracción con acetato de etilo (38 mL) agregando más agua destilada a la mezcla de reacción (32 mL); la fase acuosa fue saturada con cloruro de sodio (NaCl) y lavada con acetato de etilo (38 mL) y agua destilada por 3 veces.

Una vez separada la fase acuosa del acetato de etilo, con una solución de ácido cítrico al 10 %, se aciduló hasta obtener un pH de 2 ó 3. La solución acidulada, fue sometida a un proceso de extracción con acetato de etilo (38.4 mL) por 3 veces, y fue secada con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) (0.5 g). La solución se quedó en reposo por varias horas; posteriormente, se filtró y concentró en evaporador rotatorio controlando la temperatura por debajo de

60°C. Por último, se llevó a sequedad en bomba de alto vacío con trampa en hielo seco, hasta obtener un polvo blanco.

El producto obtenido fué verificado mediante RMN protónica.

PASO 2.

2.1 Obtención del clorosulfato de clorometilo.

En un matraz de bola se preparó una mezcla de ácidoclorosulfónico (100mL, 1.5mol) y bromoclorometano (50 mL, 1.5/2 mol), la cual se puso a reflujo por 3 horas. La mezcla se vertió en hielo y se extrajo con diclorometano (50 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2 lavados de 50 mL c/u) y se secó con MgSO₄ anhidro. El disolvente fué removido en rotaevaporador, a una temperatura de 60°C y vacío de 60 mmHg. Este proceso también eliminó los residuos de bromo presentes en la fase orgánica; y posteriormente, el clorosulfato de clorometilo se destiló al vacío para su purificación, con un rendimiento del 90%.

2.2 Obtención del t-boc-glicinato de clorometilo

En un matraz de bola se puso una mezcla de glicina-t-boc (5.8g, 0.02 mol), agua (20 mL), carbonato de potasio (10.5g, 0.076mol), sulfatoácido de tetrabutilamonio (0.68g, 0.002 mol) (Aldrich), y se agitó a 20-22 °C. Se adicionó una solución de clorosulfato (0.023 mol) en diclorometano (5mL), manteniendo la temperatura por abajo de los 30 °C, con agitación constante por 30 minutos. La fase orgánica se separó y secó con MgSO₄ anhidro. El disolvente fué removido utilizando vacío, el éster crudo se purificó por destilación (50-52°C/ 10-12 mmHg), obteniéndose un aceite color amarillo claro, con un rendimiento del 30 %.

PASO III. Obtención del glicinoiloximetil albendazol.

En un matraz de bola de una boca se colocó albendazol (0.8975g; 0.003mol) con DMF (6mL), hasta disolución. Posteriormente, se agregó K₂CO₃ (0.2083 g; 0.0015 mol) y después el t-boc-glicinato de clorometilo (1g, 0.003mol) observándose turbidez; al término de media hora se aclaró la mezcla de reacción; se vertió sobre salmuera fría (10mL), obteniéndose un precipitado blanco que se filtró y lavó con agua fría, el filtrado fué concentrado en evaporador rotatorio hasta la formación de un sólido color crema el cual

presentó un Rf. de 0.51 (CHCl₃:MeOH 99:01) y un punto de fusión de 133-140°C. En seguida el sólido se suspendió en agua acidulada para obtener un producto inestable e higroscópico, con un rendimiento del 57.5 %.

9.5 COMPUESTO IV. Fenoxicarbonil albendazol.

En un matraz de bola de 3 bocas (14/20), adaptado con agitación magnética y baño de hielo, se colocó albendazol (2g, 7.53×10^{-3} mol), diclorometano (140 mL) y trietilamina (0.52 mL, d. 0.7255 g/mL, mol); se puso una trampa anhidra y se dejó en agitación 20 minutos, al término de este tiempo, se fué adicionando gota a gota cloroforniato de fenilo (1.9 mL, d. 1.248 g/mL, 0.015 mol). Se dejó reaccionando durante 24 horas a 25°C, verificando la desaparición de albendazol mediante cromatografía en capa fina (CHCl₃:Acetato de etilo 90:10).

Al término de este tiempo, la mezcla de reacción se concentró en evaporador rotatorio a temperatura ambiente, obteniéndose una sustancia muy viscosa color café claro que presentó un Rf. de 0.62 y un rendimiento de 36 %.

9.6 Bioensayo con *Artemia salina*.

Este bioensayo fué realizado para los compuestos I y II, de la siguiente forma:

Se pesaron 10 mg del compuesto a evaluar y se colocaron en un vial con capacidad de 10 mL, completando el volumen con acetona, posteriormente, con una micropipeta se tomaron 40 μ L y se colocaron en una probeta de 50 mL y se completó un volumen de 40 mL con medio salino comercial (Instant ocean, 38g/L).

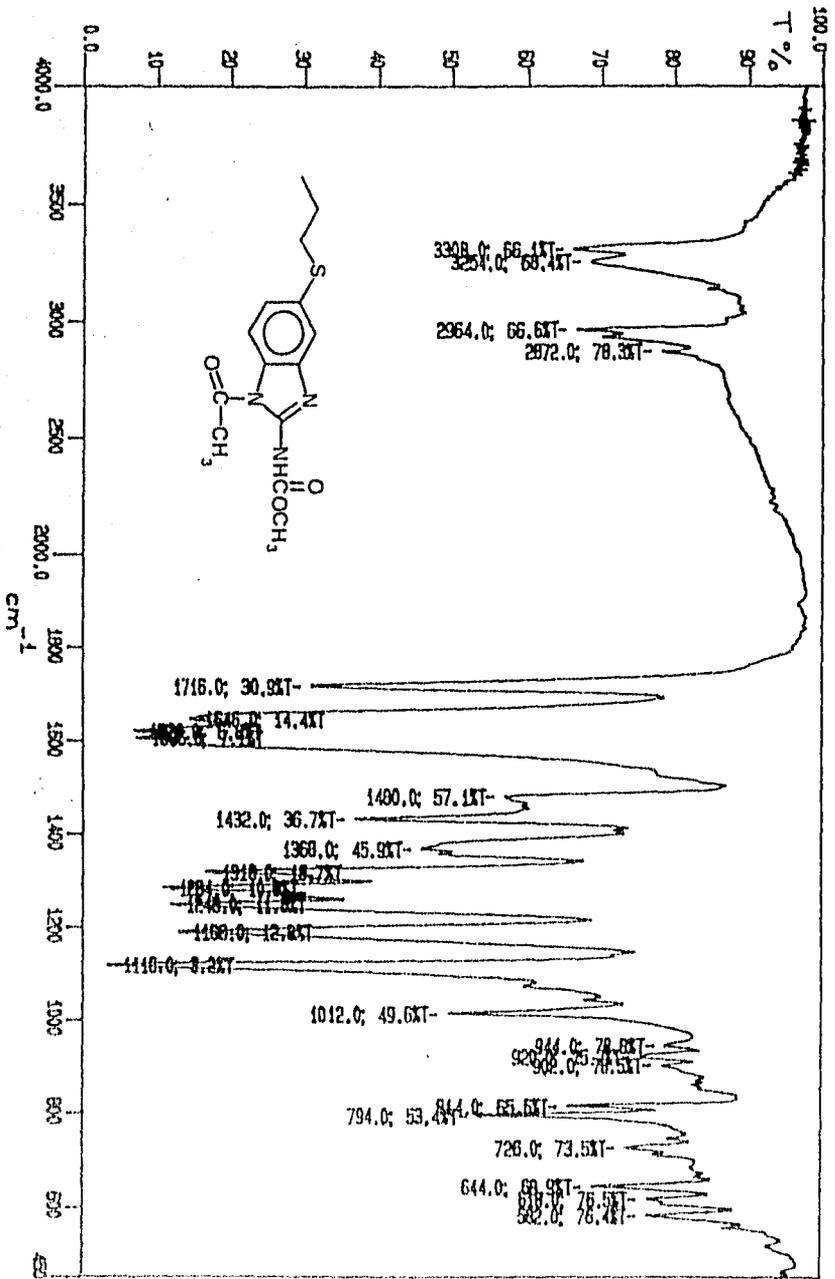
De la solución anterior se tomaron 1, 3 y 5 mL por separado y se colocaron en diferentes viales, completando un volumen de 10 mL con medio salino, para obtener una concentración final de 1,3 y 5 ppm respectivamente, después con la ayuda de un capilar se contaron 10 crustáceos y se colocaron 10 en cada uno de los viales (se realizó por triplicado para cada concentración).

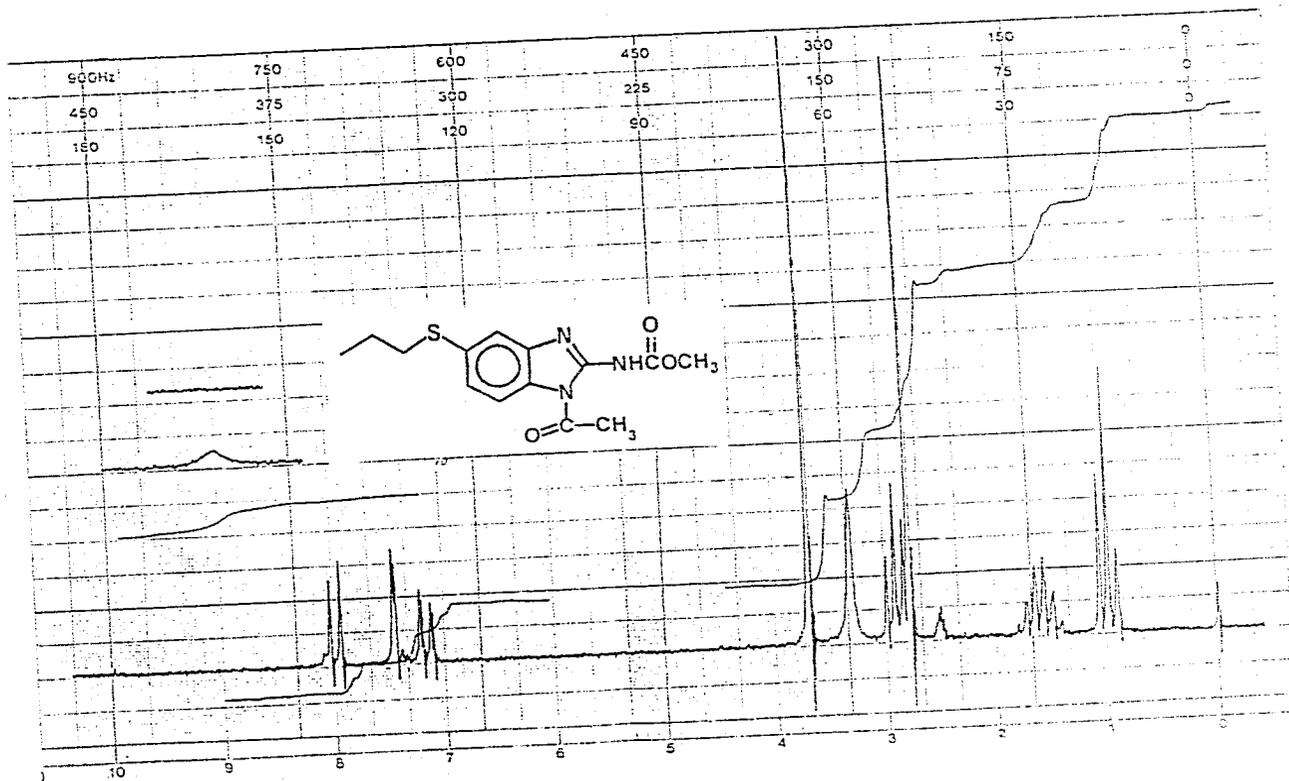
Por otra parte, en 6 viales con medio salino únicamente se colocaron 10 crustáceos (*Artemia salina*) en cada uno, después todos los viales se dejaron 24

horas con luz artificial y a 30°C. Al término de este tiempo, se procedió a contar de cada vial los organismos vivos. Los datos obtenidos fueron procesados en un programa de análisis Finney® para determinar la concentración letal 50 tanto para el acetato de albendazol como para el acefloximetil albendazol.

10. ESPECTROS

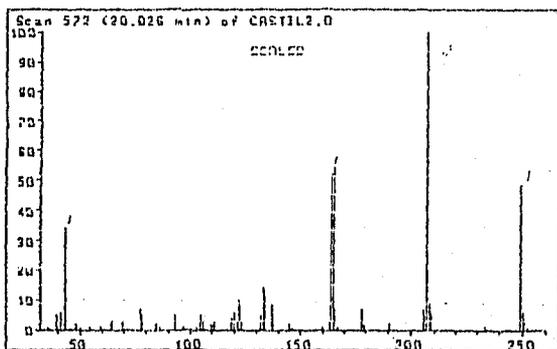
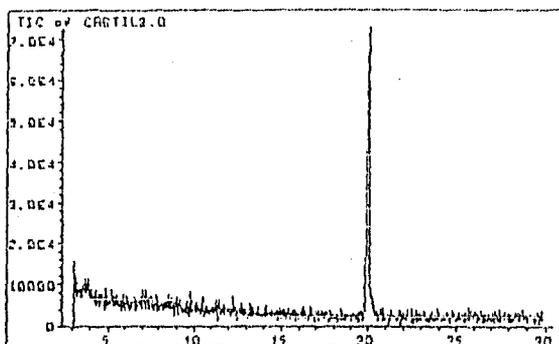
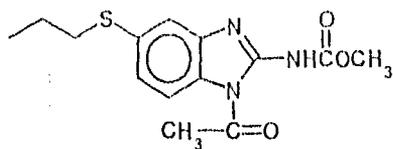
Espectro No. 1. I.R.: Acetato de albendazoi





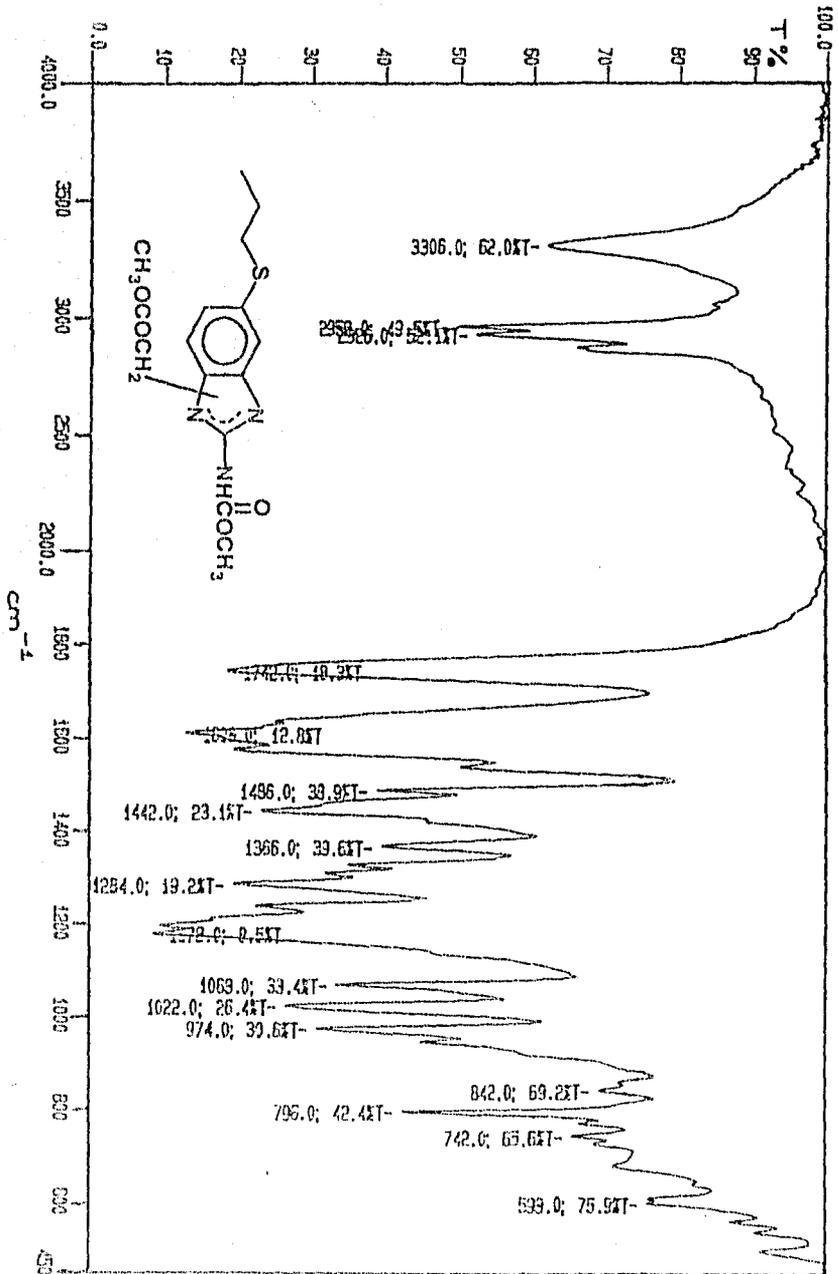
ESPECTRO

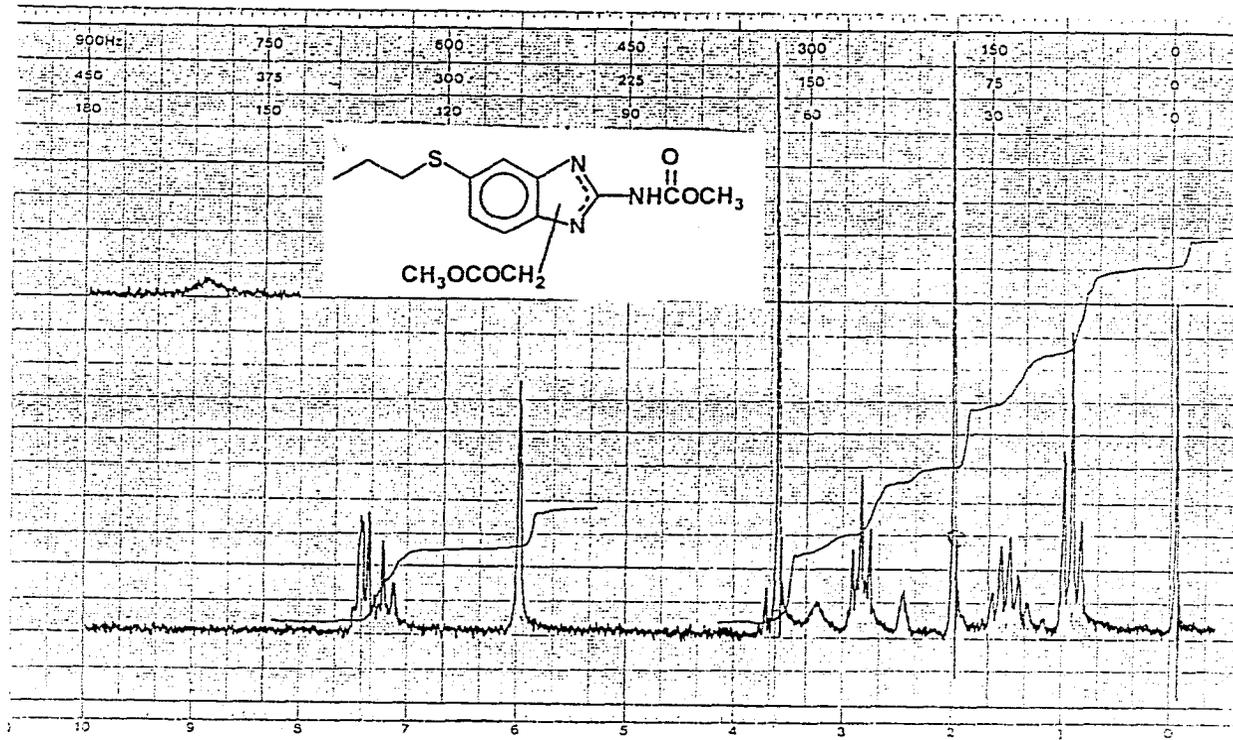
Espectro No.2. RMN: Acetato de albendazole



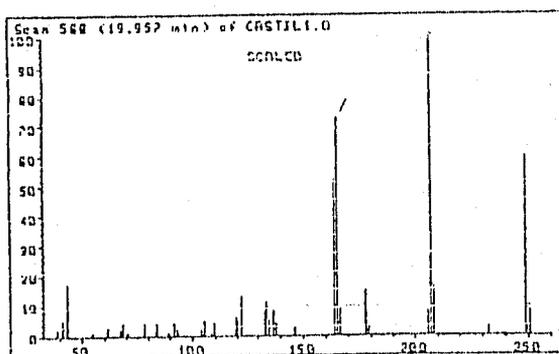
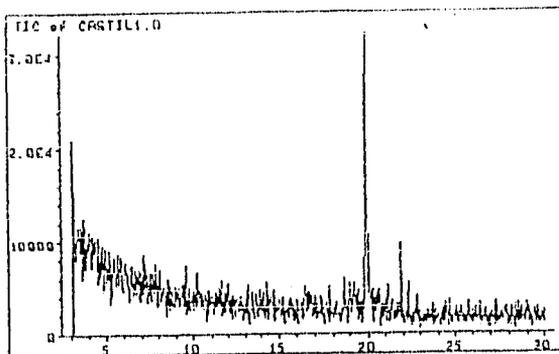
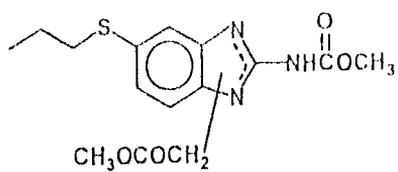
Espectro No. 3. Masas : Acetato de albendazol

Espectro No.4. I.R.: Acefili oximefil dibendazol

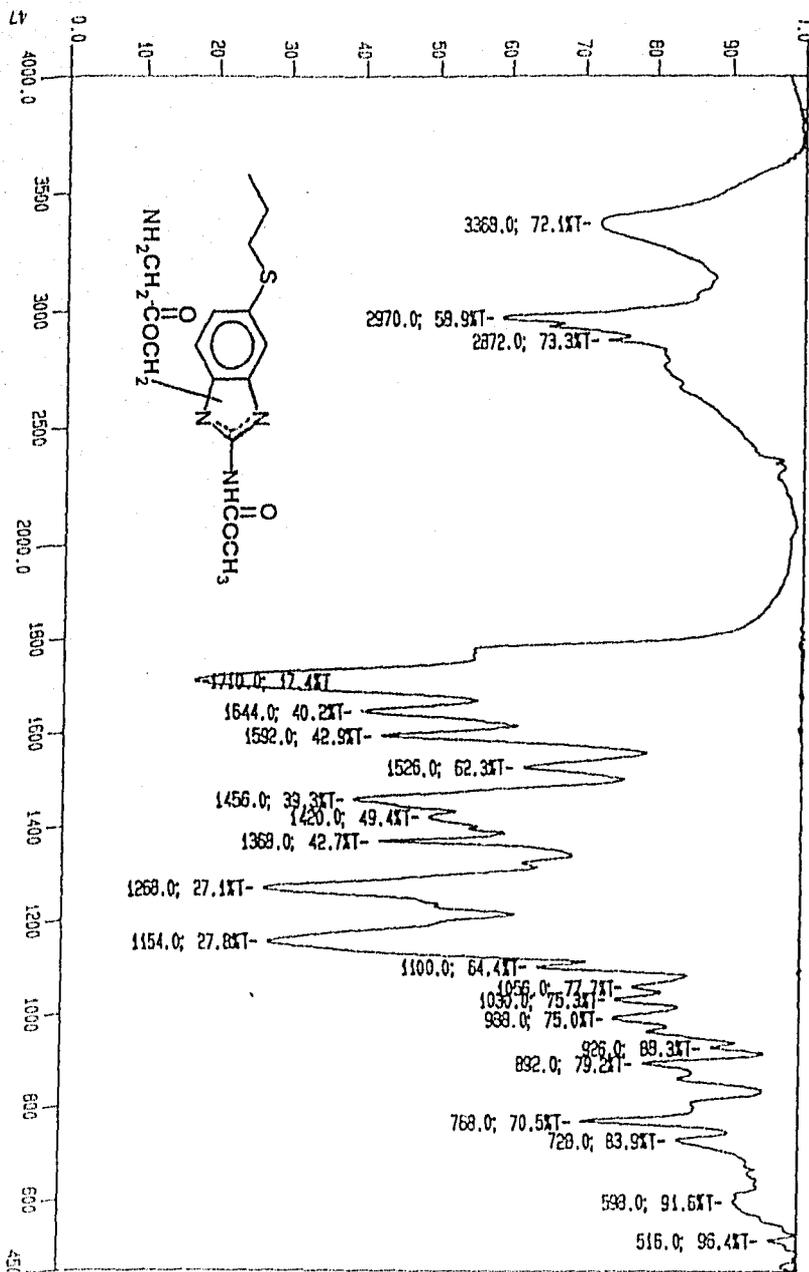


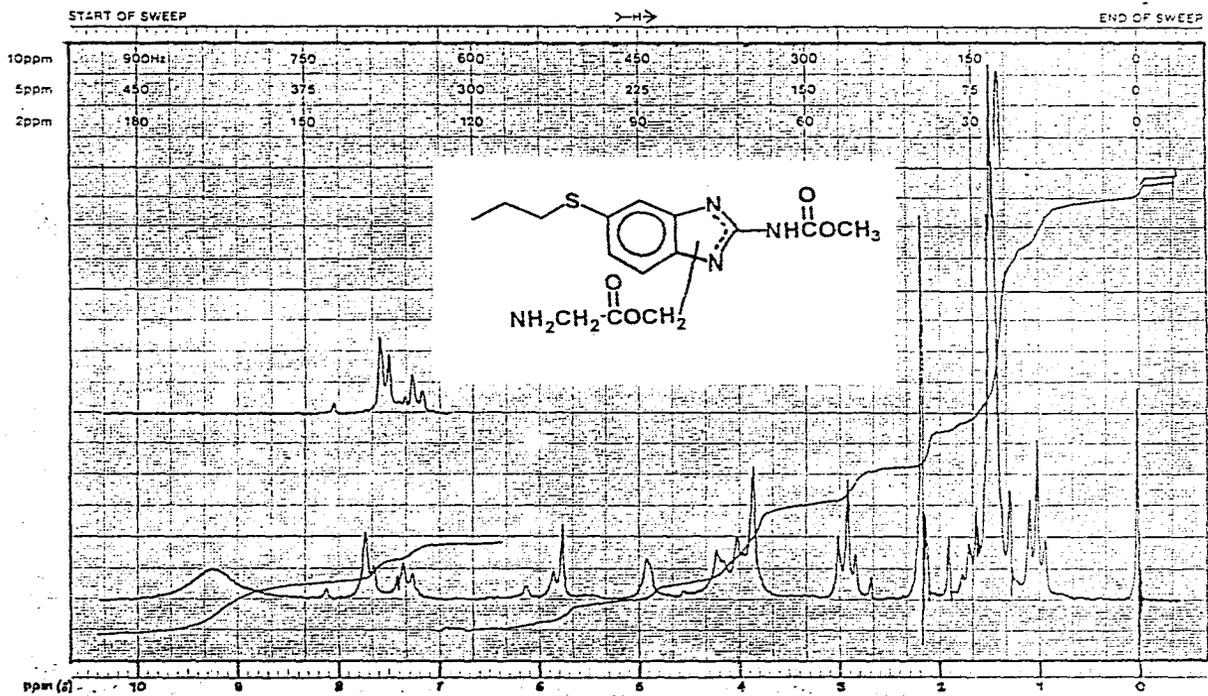


Espectro No. 5. RMN : Acetil oximetil albendazol



Espectro No. 6. Masas : Acetil oximetil albendazol

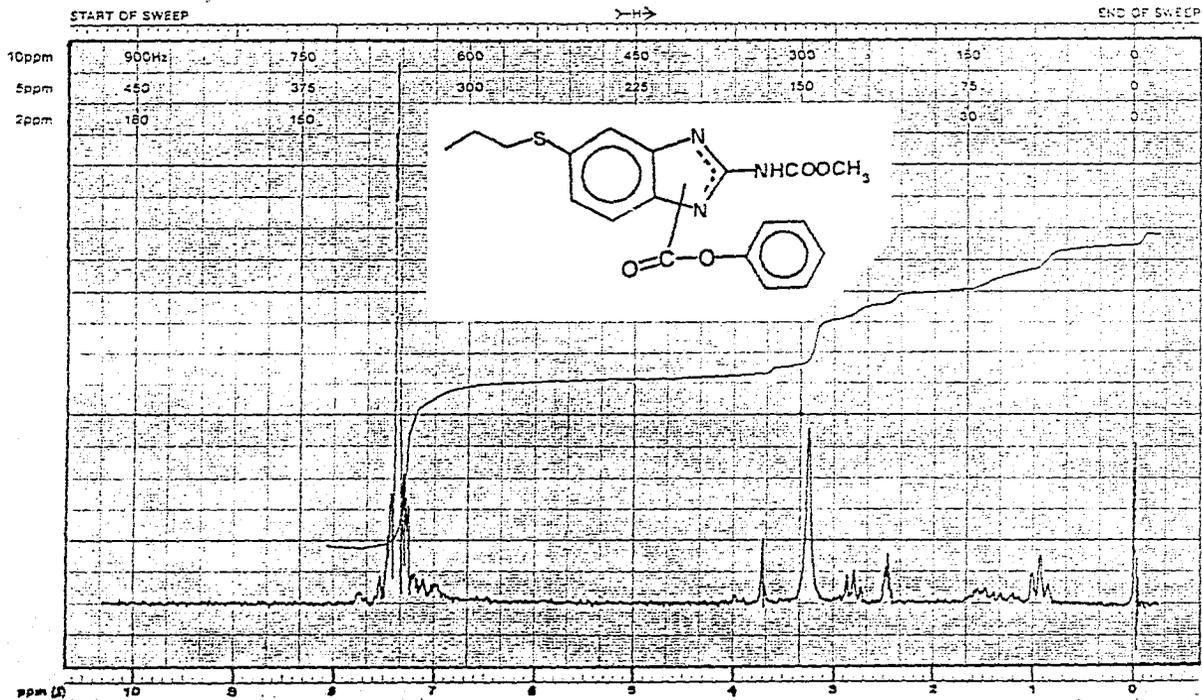




Espectro No. 8. RMN: Glicinoil oximetil albendazol

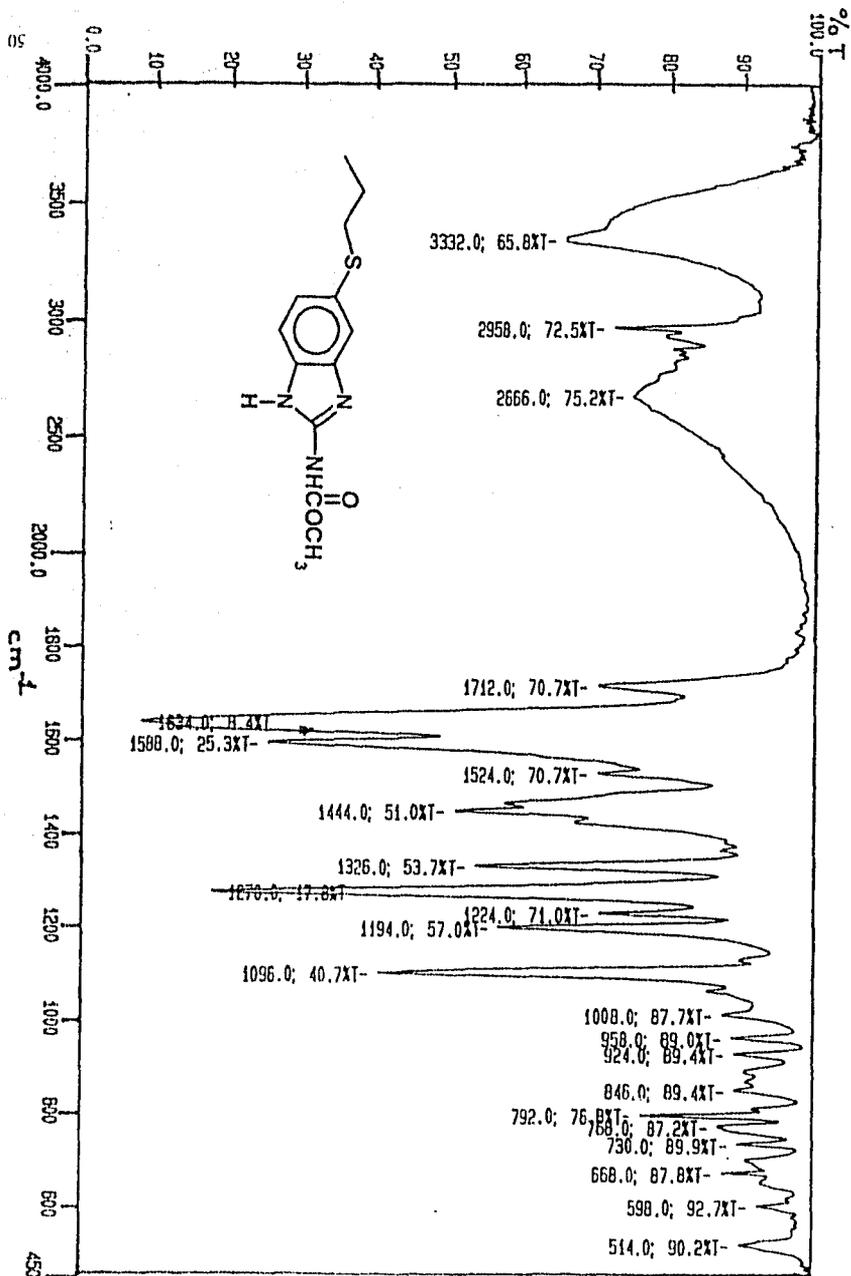
STAD
SALA DE LA FARMACIA

49

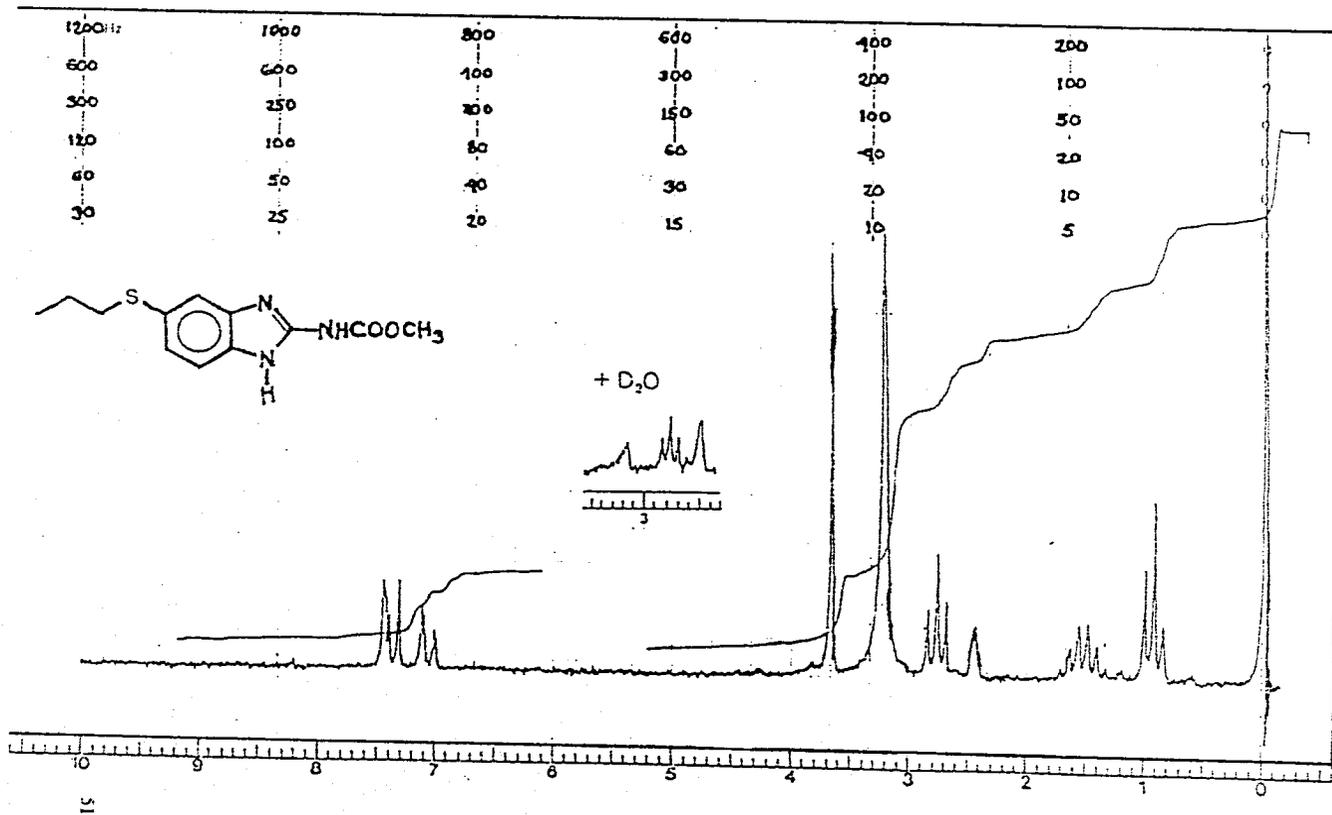


Espectro No. 9. RMN: Fenoxicarbonil albendazol

ESPECTROS



13773103



Espectro No. 11. RMN: Albendazol

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Sharma,S; and Abusar, S; *Progr. drug Res.*, 27,86, 1983
2. Aluja,Aline; et al; Cisticercosis. Una recopilación documental. *Fondo de cultura económica.*, pp. 1-48, (1897).
3. Del bruto, O; Sotelo, J.; Neurocisticercosis. *Med. Hoy.*,6, pp 21-24, (1987).
4. Escobedo, F; et al. Albendazole Therapy for Neurocysticercosis. *Arch. Intern. Med.*, 147, pp. 738-741, (1987).
5. Hurtado, P.M. Farmacocinética Clínica del Albendazol. Tesis de M. en Biof. Fac. Química. UNAM, (1991).
6. Alarcón, F; et al. Neurocysticercosis: short course of treatment with albendazole. *Arch.Neurol.*, 46 pp. 1231-1236, (1989).
7. Agapejev, S; et al. Neurocysticercosis: Treatment with Albendazole and Dextrochloropheniramine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83, pp. 377-383, (1989).
8. Bruto,O.H; et al. Albendazole Therapy for Subarachnoid and Ventricular Cysticercosis. *J. Neurosurg.*, 72, pp. 816-817, (1990).
9. Horton,J;et al. Neurocysticercosis:Treatment with Albendazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84, pp. 174-175, (1990).
10. Prieto, G.; et al. Tissue Levels of Albendazole after in vivo Intestinal and Gastric Absortion in rats. *J. Pharmac. and Biochem. Anal.*, 6, pp. 1059-1063, (1988).
11. Marriner, S.; et al. Pharmacokinetics or Albendazole in Man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 30, pp. 705-708, (1986).

12. Vande Waa. Chemotherapy of Filariases. *Parasit. Today.*, 2(8), pp. 194-199, (1991).
13. Salyavan Sharma. Drugs for Filariases: Four Decades of Research. *Adv. Drug Research.*, 24, pp.199-251, (1993).
14. Brown. H.W., Neva F.A. Parasitología Clínica. 5^a Ed. Nva. Editorial Interamericana., pp. 153-166, (1985).
15. Beck J.W, Davies J.E; Parasitología Médica. 3^a Ed. Interamericana., pp. 118-119, (1983).
16. Chester B.P.; Clinical Parasitology. 9th Ed., pp. 221-222 y 512-519, (1987).
17. John Wiley & Sons. Inc. Current Status of Medicinal Research in Helminth Diseases. *Med. Res. Rev.*, 11,(6), pp. 581-615, (1991).
18. S.Sharma.; New Drugs for Helminth Diseases. *Adv. Drug Res. Academic Press.*,pp(104-163) (1994).
19. N.Viswanathan & A.R. Sidhaye. 1-Alkoxy carbonyl benzimidazole-2-carbamales. *Ind. J.Chem.*, 24 (8), pp. 948-951, (1985).
20. G. Amidon.; Drug Derivatization as a Means of Solubilization: Physicochemical and Biochemical Strategies. *Techniques of Solubilization of Drug. Serie: Drugs and the Pharmaceutical.*, 12 pp. 183-208, (1981).
21. G. Webbe. Human Cysticercosis: Parasitology, Pathology, Clinical Manifestations and Available Treatment. *Pharm. Ther.*, 64, pp. 175-200, (1994).
22. Anderson J.E., et al; A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumour Prescreens. *Phytochem. Anal.*, 2 pp.107-111 (1990).

23. J.L. Mc Laughlin. Crown Gall Tumours on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. *Met. Plant. Biochem.*, 6, pp.1-30 (1991).
24. J.L. Mc Laughlin. Bench-top Bioassays for the Discovery of Bioactive Natural Products: an update. *St. Nat. Prod. Chem.*, 2, pp.383-385 (1991).
25. L.Lewan, et al. The Use of *Artemia salina* in Toxicity Testing. *ATLA*, 20, pp 297-301, (1992).
26. Alcántara P.E. Síntesis de un Compuesto Filaricida del Tipo Benzimidazol-2-Carbamato de Melilo, Un Profármaco del Mismo y La Determinación de sus Propiedades Físicoquímicas de Interés Farmacéutico. Tesis Licenciatura (Q.F.B), Fac. Química, U.N.A.M. Méx., pp.11-15, (1996).
27. Fife T.H. Kinetic and Mechanistic Effects of Ease of C-N Bond Breaking in Amide Hydrolysis. The Mechanisms of Hydrolysis. The Mechanisms of Hydrolysis of N-Acylimidazoles and N-Acylbenzimidazoles. *Acc. Chem. Res.*, 26, pp. 325-331, (1993).
28. Morales Z.R. Estudio sobre la Síntesis del Albendazol. Tesis de Maestría en Química Farmacéutica, Fac. Química, U.N.A.M. Méx., pp. 66, (1992).
29. Binclerup E., Hansen E.T. Chlorosulfates as Reagents in the Synthesis of Carboxylic Acid Ester Under Phase-Transfer Condition. *Synth. Comm.*, 14 (9), pp. 857-864, (1984).
30. Rajshekhar. Albendazole Therapy for persistent solitary cysticercus granulomas in patients with seizures. *Neur.*, 43,(6), pp.1238-40, (1993).
31. Okelo-G.B, Hagos-B; et al. Pharmacokinetics of albendazole in children with hydatid disease. *East. Afr. Med. J.*, 70 (10), pp. 643-5, (1993).
32. Mukherjee A., Roy T., et al. Neurocysticercosis. *J. Assoc. Physic.*, 41 (5), pp. 0004-5772, (1993).

33. Bundgaard H. Formation of Prodrugs of Amines, Amides, Ureides and Imides.

Meth. Enz. 112, pp. 355-357, (1985).