

85



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## SINTESIS DE UN DERIVADO BIORREVERSIBLE DEL (R ) (S)-5(6)-(1-FENIL-1-HIDROXI) METIL-2- METOXCARBONILAMINO-1H-BENCIMIDAZOL, METABOLITO DEL MEBENDAZOL, CON POTENCIAL ACTIVIDAD GIARDICIDA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**MARICELA LOPEZ AGUILAR**



MEXICO, D.F.

2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**



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:** Prof. Armando Cabrera Ortiz  
**VOCAL:** Prof. Maria Alicia Hernández Campos  
**SECRETARIO:** Prof. Francisco Hernández Luis  
**1er. SUPLENTE:** Prof. Lino Joel Reyes Trejo  
**2do. SUPLENTE:** Prof. Fernando Cortes Guzmán

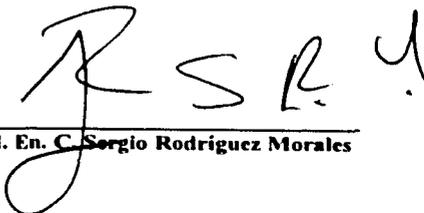
**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

LABORATORIO 122, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, DIVISIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

**ASESOR DE TESIS:**

  
Dr. Francisco Hernández Luis

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

  
M. En. C. Sergio Rodríguez Morales

**SUSTENTANTE :**

  
Maricela López Aguilar

## **DEDICATORIA**

**A MI MADRE, LA SRA. YOLANDA AGUILAR,  
POR SU CARIÑO, COMPRENSIÓN Y PACIENCIA.**

**A MIS HERMANOS, VERÓNICA, ESMERALDA, MARIO Y CRISTIAN,  
POR SU CARIÑO Y TOLERANCIA.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir mi desarrollo como Profesional y como Ser Humano.

Al Dr. Francisco Hernández Luis, por compartirme sus conocimientos de Química Farmacéutica, motivando mi interés por esta disciplina. De igual manera agradezco sus consejos y su confianza al permitirme colaborar como su ayudante en la materia de Toxicología.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por su ayuda y por sus clases de Química Orgánica en la Licenciatura que motivaron mi interés en esta materia.

A la M. en C. Alicia Hernández Campos, por su atención, sus consejos y por la revisión del trabajo escrito.

Al M. en C. Sergio Rodríguez Morales por la supervisión técnica de este trabajo, por su paciencia y ayuda desinteresada en la realización del trabajo escrito.

Al M. en C. J. Gabriel Navarrete Vázquez por su ayuda y paciencia en la realización del trabajo escrito.

A la Dra. Lilian Yépez Mulia y a la Bióloga Amparo Tapia, del Hospital de Pediatría del IMSS-Siglo XXI, por su colaboración en la evaluación de los compuestos contra *Giardia lamblia*.

Al Personal de la USAI, en especial a Rosa Isela Del Villar, Margarita Guzmán, Marisela Gutiérrez y Georgina Duarte, por la determinación de los espectros.

Al Subprograma 121 "Formación de Profesores".

A mis compañeros de la Licenciatura: Cindy, Flor, Paty, Rolando y Roberto por su amistad invaluable, su comprensión y por hacer mi estancia en esta Facultad más agradable.

A mis compañeros del Laboratorio 122: Paty, Víctor, Miguel, Montserrat, Nayeli, Yeni, Eduardo, Luis y Ceci, por su ayuda desinteresada y por hacer agradable mi estancia en este laboratorio.

A todos los Profesores con los que tuve la fortuna de tomar clases, los cuales me brindaron parte de sus conocimientos.

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	3
1.1. <i>Giardia lamblia</i> .....	3
1.1.1. Taxonomía.....	3
1.1.2. Morfología.....	4
1.1.3. Ciclo biológico.....	5
1.1.4. Epidemiología.....	7
1.1.5. Patogenia.....	7
1.1.6. Manifestaciones clínicas.....	8
1.1.7. Tratamiento.....	8
1.2. Bencimidazoles.....	12
1.2.1. Bencimidazoles como antihelmínticos.....	12
1.2.2. Bencimidazoles como antiprotozoarios.....	14
1.2.3. Mebendazol.....	16
1.3. Los profármacos en la investigación Química Farmacéutica.....	18
1.3.1. Procesos para la optimización del comportamiento biológico de fármacos.....	18
1.3.2. Estrategias para el diseño de profármacos.....	20
1.3.2.1. Los profármacos y los fármacos "suaves".....	20
1.3.2.2. Clasificación de los profármacos.....	21
1.3.2.3. Diferencias entre los bioprecusores y los derivados biorreversibles.....	22
1.3.2.4. Criterios para la elaboración de derivados biorreversibles.....	23
1.3.2.4.1. Tipos estructurales de derivados biorreversibles.....	23
1.3.3. Los pro-bencimidazoles.....	24
1.3.4. La liposolubilidad y la solubilidad acuosa en la actividad biológica.....	26
1.3.4.1. Importancia de las propiedades fisicoquímicas del fármaco.....	27
1.3.4.2. La liposolubilidad.....	27
1.3.4.3. La solubilidad acuosa.....	28
1.3.4.4. Los profármacos para modificar la solubilidad acuosa.....	29
1.3.4.4.1. Los derivados biorreversibles en la insolubilidad acuosa.....	30
1.3.4.5. Estrategias en el diseño de derivados biorreversibles hidrosolubles.....	30
1.3.4.5.1. Adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas.....	30
1.3.4.5.2. Adición de un modificador para disminuir el punto de fusión del principio activo.....	32
1.3.5. Mecanismo de disolución y liberación del fármaco a partir del derivado biorreversible, en la cercanía del intestino delgado.....	33
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	38
<b>4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES</b> .....	40
4.1. Instrumentación y materiales.....	40
4.2. Síntesis del derivado biorreversible.....	41
4.2.1. Síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (1).....	41
4.2.2. Síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2).....	42
4.3. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> para <i>Giardia lamblia</i> .....	44

	Página
4.4. Determinación de solubilidad.....	44
4.5. Evaluación de la estabilidad del derivado biorreversible frente a enzimas.....	45
4.5.1. Determinación de espectros en la región ultravioleta.....	45
4.5.2. Evaluación de estabilidad del derivado biorreversible en presencia de enzimas mediante cromatografía en capa fina.....	46
4.5.2.1. Evaluación de la actividad de la enzima esterasa mediante la hidrólisis del Acetato de 4-nitrofenol.....	46
4.5.2.2. Evaluación de la actividad de la enzima tripsina mediante la hidrólisis de $N\alpha$ -Benzoil-DL-arginato de 4-nitroanilida.....	47
4.5.2.3. Evaluación de la estabilidad del derivado biorreversible en presencia de la enzima esterasa o tripsina.....	47
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
5.1. Síntesis del derivado biorreversible.....	49
5.2. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> para <i>Giardia lamblia</i> .....	51
5.3. Determinación de solubilidad.....	51
5.4. Evaluación de la estabilidad del derivado biorreversible.....	51
5.5. Determinación de log P.....	54
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
6.1. Consideraciones para el diseño del derivado biorreversible.....	55
6.2. Síntesis del derivado biorreversible.....	56
6.2.1. Síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (1).....	56
6.2.1. Síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2).....	61
6.3. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> para <i>Giardia lamblia</i> .....	66
6.4. Determinación de solubilidad.....	67
6.5. Evaluación de estabilidad del derivado biorreversible (2).....	68
6.6. Determinación de log P.....	68
6.7. Síntesis de un derivado biorreversible sobre la base de la estrategia adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas.....	70
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>74</b>
<b>APÉNDICE (Espectros).....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

		Página
Esquema 1.	Representación esquemática del Trofozoito y Quiste de <i>Giardia lamblia</i> .....	4
Esquema 2.	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i> .....	6
Esquema 3.	Microfotografía electrónica de <i>Giardia</i> que muestra el disco de succión y los flagelos.....	8
Esquema 4.	Principales agentes terapéuticos utilizados como giardicidas.....	11
Esquema 5.	5,6-Dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)bencimidazol.....	12
Esquema 6.	Bencimidazoles comúnmente utilizados como agentes antihelmínticos en la medicina veterinaria y humana.....	13
Esquema 7.	Puentes de hidrógeno intermoleculares en bencimidazoles 2-carbamato de metilo.....	14
Esquema 8.	Ruta metabólica del Mebendazol.....	19
Esquema 9.	Diferencia conceptual entre un bioprecursor y un derivado biorreversible...	22
Esquema 10.	Pro-bencimidazoles de bencimidazoles 2-carbamato de metilo.....	25
Esquema 11.	Bioprecusores de bencimidazoles 2-carbamato de metilo reportados.....	26
Esquema 12.	Disolución de los profármacos en el lumen del intestino delgado.....	34
Esquema 13.	Mecanismo propuesto para la liberación del fármaco, a partir del profármaco en la cercanía del intestino delgado.....	34
Esquema 14	(R)(S)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol, metabolito del Mebendazol a sintetizar.....	38
Esquema 15	Ruta sintética del derivado biorreversible (R)(S)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol, (2).....	43
Esquema 16	Procedimiento experimental para la determinación de la solubilidad del Mebendazol y de su metabolito hidroxilado en EtOH.....	45
Esquema 17	Procedimiento experimental para la determinación de la solubilidad del compuesto (2) en H <sub>2</sub> O/EtOH.....	45

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 18. Espectro de absorción en ultravioleta de (R)(S)-5(6)-(1-Fenil-1hidroxi)metil-1H-bencimidazol (1) en EtOH.....	52
Esquema 19. Espectro de absorción en ultravioleta de (R)(S)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-1H-bencimidazol (2) en EtOH.....	52
Esquema 20. Tiempo observado para la degradación del 50 y 100 % del derivado biorreversible (2) frente a las enzimas esterasa y tripsina.....	53
Esquema 21. Espectro bidimensional COSY, del compuesto 2.....	64
Esquema 22. Espectro bidimensional HETCOR del compuesto 2.....	64
Esquema 23. Espectro bidimensional NOESY del compuesto 2.....	65
Esquema 24. Representación tridimensional del compuesto (R)(S)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-1H-bencimidazol (2).....	66

		Página
Tabla 1.	Clasificación taxonómica de <i>Giardia lamblia</i> .....	4
Tabla 2.	Dosis recomendadas de los principales agentes indicados en el tratamiento de giardiosis.....	9
Tabla 3.	Susceptibilidad de <i>Giardia lamblia</i> a algunos agentes antimicrobianos.....	16
Tabla 4.	Resultados de pruebas de carcinogenicidad en ratas y ratones para algunos agentes giardiciadas.....	18
Tabla 5.	Criterios de clasificación para los profármacos.....	21
Tabla 6.	Diferencias operativas entre un derivado biorreversible y un bioprecursor.....	22
Tabla 7.	Modificadores para solubilizar fármacos.....	31
Tabla 8.	Valores de $\Delta$ p.f. para algunas modificaciones con profármacos.....	32
Tabla 9.	Cantidades adicionadas para la evaluación de estabilidad del compuesto 2 frente a las enzimas esterasa y tripsina en soluciones amortiguadoras.....	48
Tabla 10.	Datos espectroscópicos y espectrométricos asignados al compuesto 1.....	49
Tabla 11.	Datos espectroscópicos y espectrométricos asignados al compuesto 2.....	50
Tabla 12.	Aspecto, rendimiento y constantes físicas de los compuestos 1 y 2.....	50
Tabla 13.	Resultados de pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Giardia lamblia</i> , en presencia del metabolito hidroxilado del Mebendazol, Mebendazol, Albendazol y Metronidazol.....	51
Tabla 14.	Solubilidad del Mebendazol y de los compuestos 1 y 2, en medios polares.....	51
Tabla 15.	Valores de log P teóricos, obtenidos con el programa ACD Lab log P DB.....	54

### INTRODUCCIÓN

La parasitosis gastrointestinales se encuentran entre las infecciones más comunes a nivel mundial. Se sabe que las enfermedades parasitarias han producido a través de los tiempos más muertes y daño económico a la humanidad que todas las guerras juntas. La organización mundial de la salud (OMS) estima que cerca de 3.5 billones de personas se encuentran afectadas, y que 450 millones están enfermos como resultado de estas infecciones, siendo los niños, los principalmente afectados. Cada año, alrededor de 65,000 muertes se atribuyen directamente a infecciones por *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* (Uncinarias), y otras 60,000 a *Ascaris lumbricoides*. *Entamoeba histolytica*, causante de amibiasis, se estima que infecta a 48 millones de personas, con una mortandad anual de 70,000.

En los países latinoamericanos, las enfermedades parasitarias, ocupan lugares preponderantes como problemas de salud pública, debido a su localización geográfica, variedad de climas, costumbres y principalmente al nivel socioeconómico de la mayor parte de la población.

En la República Mexicana, las infecciones por parásitos son causa severa de morbilidad en la población infantil, ya que cerca de 45 por ciento de los niños tienen parásitos, lo cual representa uno de los mayores problemas de salud pública. Entre las parasitosis gastrointestinales más frecuentes reportadas en México, se presentan aquellas causadas por helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana*, Uncinarias, y *Taenia solium*, y aquellas provocadas por protozoarios como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*.

*Giardia lamblia* (también conocida como *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*), es un protozoario de amplia distribución que provoca el padecimiento conocido como giardiasis. Esta enfermedad se ubica como una de las 10 principales parasitosis del ser humano. Se estima que 280 millones de personas en el mundo están infectadas y se presenta con una mortandad anual de 10,000 fallecimientos. En los países en vías de desarrollo, como la República Mexicana, se presenta como una infección recurrente en la niñez, ocasionando diarrea, mala absorción de

nutrientes y fallas del crecimiento. Durante 1999, la Secretaría de Salud de la República Mexicana, reportó 38 mil casos de personas infectadas con *Giardia lamblia*. A pesar de esto, la diversidad de fármacos para combatir esta infección es limitada. La mayoría de ellos presentan una serie de características que los hacen no del todo ideales para su utilización

Estudios recientes han mostrado que los bencimidazoles que presentan un sustituyente carbamato de metilo en la posición 2, tales como el Albendazol y el Mebendazol, usados principalmente como agentes antihelmínticos, son efectivos *in vitro* contra *Giardia lamblia*. Por otro lado al administrarlos a pacientes adultos y niños (estudios *in vivo*), se han presentado cifras variables respecto a su eficacia. Los resultados de los estudios *in vivo* se atribuyen principalmente a la insolubilidad acuosa de estos compuestos, que ocasiona que gran parte de la dosis no este disponible en solución para ser absorbida por el microorganismo.

Por otra parte, dentro del campo de la Química Farmacéutica, se encuentra la alternativa de optimización farmacocinética, donde se realizan modificaciones químicas de los principios activos para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, tales como su solubilidad acuosa.

Tomando en consideración la importancia de encontrar principios activos para combatir esta parasitosis y los problemas que presentan los bencimidazoles carbamatos de metilo, en el presente trabajo de tesis se pretende realizar la optimización farmacocinética del Mebendazol, mediante la síntesis, diseño y evaluación de estabilidad de profármacos, específicamente del tipo de derivado biorreversible, con la finalidad de mejorar su solubilidad acuosa.

## 1. ANTECEDENTES

En este capítulo se encuentran contenidos los conceptos teóricos y definiciones que apoyarán el presente trabajo de tesis. Se presentan clasificados en tres subcapítulos: el primero contiene los aspectos más importantes relacionados con *Giardia lamblia*, el parásito de interés, así como de la enfermedad que produce dicho microorganismo, la giardiosis; el segundo con los conceptos referentes al grupo de moléculas objeto de síntesis, los bencimidazoles; y el tercero con los conceptos de Química Farmacéutica necesarios para la optimización farmacocinética del Mebendazol, el principio activo de interés.

### 1.1 *Giardia lamblia*

Las enfermedades parasitarias constituyen uno de los problemas cruciales de salud pública en los países en vías de desarrollo. Entre las enfermedades gastrointestinales encontramos aquellas causadas por helmintos como *Ascaris lumbricoides* y *Necator americanus* y aquellas provocadas por protozoarios como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*.

*Giardia lamblia*, también conocida como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, es un parásito protozoario\* del intestino delgado que causa morbilidad extensiva alrededor del mundo, y es el agente causal del padecimiento conocido como giardiosis.<sup>1</sup> A continuación se mencionan los aspectos más importantes sobre este microorganismo y la enfermedad que ocasiona.

#### 1.1.1. Taxonomía

Los protozoarios se clasifican dentro del reino protista, en el subreino Protozoa. Este subreino se encuentra dividido en siete phylum: *Sarcomastigophora*, *Labyrinthomorpha*, *Apicomplexa*, *Microsporal*, *Ascetospora*, *Mixospora* y *Ciliophora*. Dentro del phylum *Sarcomastigophora* se encuentran los subphylum *Mastigophora* y *Sarcodina*. *Giardia lamblia* se clasifica en el subphylum *Mastigophora* donde se encuentran los protozoarios cuya movilidad se lleva a cabo por medio de flagelos.<sup>2,3</sup> En la Tabla 1 se puede observar la clasificación taxonómica completa de *Giardia lamblia*.

\* Protozoario: Organismo unicelular eucariote que carece de pared celular. El citoplasma de cada protozoario esta totalmente envuelto en una membrana única llamada membrana plasmática, que separa el interior del exterior y permite la entrada y salida de algunas sustancias.<sup>4,5</sup>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Giardia lamblia* \*

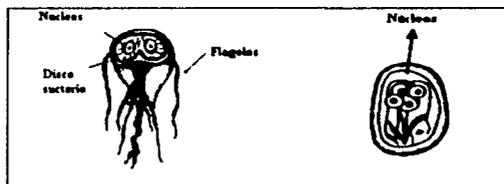
Reino	<i>Protista</i>
Subreino	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum	<i>Mastigophora</i>
Clase	<i>Zoomastigophora</i>
Orden	<i>Diplomonadida</i>
Familia	<i>Hexamitidae</i>
Genero	<i>Giardia</i>
Especie	<i>Lamblia</i>

### 1.1.2. Morfología

Morfológicamente *Giardia lamblia* adopta dos estadios a lo largo de su ciclo de vida:

**a) Trofozoíto:** Es el estadio vegetativo, habitante del intestino. Es un organismo que generalmente se encuentra dentro del rango de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de longitud y 6 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, presenta una morfología característica en forma de pera, posee simetría bilateral,<sup>7</sup> con un extremo anterior ancho y un extremo posterior sumamente delgado, su superficie dorsal es convexa, en la parte anterior posee una estructura llamada disco ventral o suctorio con la cual se fija firmemente a la superficie epitelial, presenta además una parte central rígida llamada axonema o axostilo que tiene como función servir de esqueleto, sobre el se encuentran estructuras llamadas blefaroblastos o cuerpos parabasales de las cuales nacen ocho flagelos, posee dos núcleos idénticos, y además presenta un par de cuerpos medios distintivos.<sup>4</sup>

**b) Quiste:** Es el estadio más pequeño y es transmisible de infección, ya que resiste las condiciones adversas del medio ambiente.<sup>4</sup> Generalmente presenta de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud y 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, dentro de él se localizan 2 a 4 núcleos dependiendo de la etapa de división en la que se encuentre, también cuenta con cuerpos medios, cuerpos parabasales y elementos estructurales del disco suctorio y flagelos.<sup>7</sup> En la Esquema 1 se muestra la representación esquemática de ambas estructuras.



Esquema 1. Representación esquemática del Trofozoíto (izquierda) y Quiste (derecha) de *Giardia lamblia*.<sup>2</sup>

### 1.1.3. Ciclo biológico

*Giardia lamblia* presenta un ciclo de vida, que se muestra en la Esquema 2 y se explica en detalle a continuación:

**A) Transmisión.** *Giardia lamblia* se encuentra principalmente en mamíferos, incluyendo humanos, gatos, perros, castores y ganado vacuno.<sup>1</sup> La transmisión se realiza predominantemente por vía fecal-oral ya que se efectúa por la ingestión de quistes viables en agua, bebidas y alimentos contaminados, provenientes de las heces,<sup>8</sup> también por el contacto íntimo entre individuos infectados con no infectados como en el caso de las prácticas sexuales que incluyen contacto oral anal,<sup>7</sup> o bien la transmisión entre niños en centros de cuidado diurnos y salas de cuna y también entre otros sujetos internados en diversas instituciones. No se necesita la intervención de un huésped intermediario, pero algunas especies de mamíferos sirven como reservorios de la infección.<sup>9</sup>

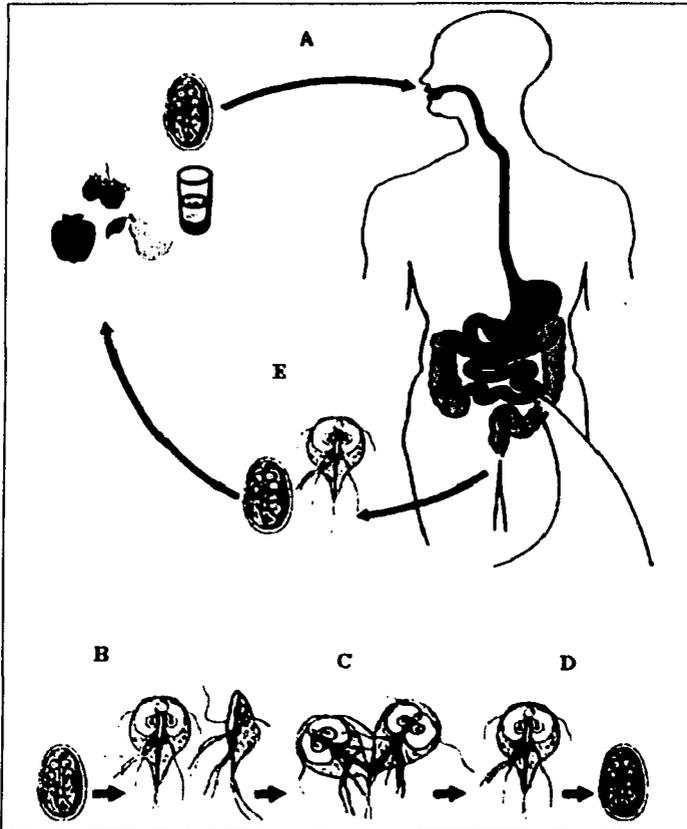
**B) Desenquistamiento.** Este se efectúa inmediatamente después de la ingestión de los quistes. Es originado por el pH bajo que se encuentra después de la salida del estómago en la parte superior del intestino delgado y da lugar al estadio de trofozoito. El desenquistamiento conduce a una colonización rápida del intestino delgado por los trofozoitos, específicamente duodeno y yeyuno donde atacan la mucosa intestinal usando su disco succionario.<sup>7</sup> En ocasiones los trofozoitos también colonizan los conductos biliares y la vesícula biliar.<sup>8</sup>

**C) Reproducción de trofozoitos.** Los trofozoitos se multiplican rápidamente mediante un proceso complicado de fisión binaria longitudinal que incluye la división del núcleo, después el aparato neuromotor (flagelos, axonema) y el disco succionario, enseguida la separación del citoplasma, de tal manera que se forman dos trofozoitos hijos.<sup>8</sup> Los trofozoitos pueden llevar a cabo algunas formas de reproducción sexual.<sup>7</sup>

**D) Enquistamiento.** Cuando los trofozoitos pasan a la región posterior del intestino delgado se lleva a cabo el enquistamiento, el cual parece ser iniciado por la presencia de sales biliares en dicha región dando lugar al estadio de quiste. Una vez que se encuentra en dicho estadio se lleva a cabo la reproducción asexual con división nuclear que precede o continua a la formación de la pared quística, produciendo un quiste con cuatro núcleos.<sup>7</sup>

**E) Reinfección.** Se puede llevar a cabo principalmente por la ingestión de quistes los cuales pueden permanecer sin infectar por al menos dos meses bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad.<sup>7</sup> Por otra parte los trofozoitos pueden pasar a las heces en casos de diarrea aguda, y de esta manera ser fuente de infección, especialmente en situaciones donde la transmisión directa entre individuos es probable que ocurra.<sup>10</sup> Aunque los trofozoitos son más lábiles que los quistes y tienen una capacidad de supervivencia en el ambiente limitada,

algunas infecciones indican que pueden pasar a través del estómago sobreviviendo a las secreciones gástricas y establecerse de nuevo en el intestino delgado.<sup>7</sup>



Esquema 2. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*: A) Transmisión, B) Desenquistamiento, C) Reproducción de trofozoitos, D) Enquistamiento, E) Reinfección.<sup>11</sup>

#### 1.1.4. Epidemiología

La giardiosis es de distribución cosmopolita, más común en climas cálidos que en fríos.<sup>8</sup> Esta enfermedad se ubica como una de las 10 principales parasitosis del ser humano. Se considera un problema urgente de salud pública en algunos países desarrollados donde tiene la distinción de ser el parásito intestinal humano más reportado y en los países en vías de desarrollo donde se presenta como una infección recurrente en la niñez.<sup>7</sup> Se estima que 280 millones de personas en el mundo están infectadas y presenta una mortandad anual de 10000 fallecimientos,<sup>12</sup> aunque se presenta con cifras de frecuencia muy variables dependiendo de las condiciones sanitarias de cada región y del nivel educativo de la población.<sup>13</sup> Las infecciones por *Giardia lamblia* son más frecuentes en niños que en adultos, pero la predisposición a la giardiosis existe en todas las edades, siempre y dondequiera que haya oportunidad de contagio.<sup>8</sup> La transmisión directa entre hombres homosexuales se ha incrementado y se considera significativa en la epidemiología de la giardiosis.<sup>7</sup>

#### 1.1.5. Patogenia

La determinación de la patogénesis es difícil debido a la amplia variedad de manifestaciones clínicas que se presentan y que pueden ir desde enfermedad severa, hasta un estado de portador asintomático. Sin embargo varias teorías han sido aceptadas. Algunas de las más comunes incluyen:

- La habilidad del protozoario de causar daño directo a la mucosa intestinal debido a la adherencia con su disco succionador.<sup>1</sup> En la Esquema 3 se muestra el daño ocasionado a dicha mucosa. Los hallazgos histopatológicos más comúnmente reportados son acortamiento y engrosamiento de las vellosidades intestinales, hiperplasia de la lámina propia e inflamación aguda de la mucosa.<sup>13</sup>
- Reducción de la actividad de enzimas disacaridasas debido al daño provocado a las mucosas del borde de cepillo y por la disminución de las microvellosidades, lo que finalmente lleva a un deterioro en la digestión y mala absorción.<sup>1</sup>
- Liberación de *Giardia* de sustancias citotóxicas como tiol-proteasas y lectinas.<sup>1,7</sup>
- Estimulación de la respuesta inmune del huésped debido a liberación de citocinas e inflamación de la mucosa.<sup>1</sup>
- La superficie de *Giardia*, donde se encuentran proteínas ricas en cisteína, puede sufrir variación antigénica en el humano y de esta manera evadir la detección inmunológica.<sup>1</sup>



Esquema 3. Microfotografía electrónica de *Giardia* que muestra el disco de succión y los flagelos; en la superficie de la mucosa intestinal se pueden observar las impresiones de los discos de succión.<sup>14</sup>

#### 1.1.6. Manifestaciones clínicas

La mayoría de los pacientes infectados con *Giardia lamblia* son asintomáticos. Sin embargo, los síntomas clínicos típicos de giardiasis generalmente inician de 1 a 3 semanas después de la ingestión de los quistes y están constituidos por náusea, vómito, diarrea aguda de corta duración, flatulencia, dolor, malestar y calambres abdominales. Otros síntomas incluyen inflamación, pérdida de peso y anorexia. En la mayoría de los pacientes no tratados, la infección se resuelve espontáneamente y los síntomas desaparecen a las pocas semanas. En los casos de enfermedad crónica, se observa mala absorción de grasas, lactosa, vitamina A y vitamina B<sub>12</sub>. En niños se ha observado disminución del crecimiento y pérdida de peso.<sup>1</sup> Debido a que en ocasiones *Giardia lamblia* puede invadir la vesícula biliar, se puede presentar en estos pacientes asociados cólico biliar e ictericia.<sup>8</sup>

#### 1.1.7. Tratamiento

A pesar de que *Giardia lamblia* es uno de los 10 principales parásitos en humanos, en los últimos 20 años no se han presentado avances en su tratamiento.<sup>15</sup> La terapia actual se

encuentra formada por una serie de fármacos, presentados en el Esquema 4, con los cuales no se obtiene la eficacia deseada, particularmente debido a que los pacientes no completan el tiempo de terapia,<sup>16</sup> además de que algunos de estos fármacos son activos contra la flora intestinal normal,<sup>17</sup> y que presentan los efectos adversos y contraindicaciones inherentes a sus uso.<sup>1</sup> Adicionalmente, se ha podido observar que en algunas ocasiones se han presentado resistencias a algunas infecciones,<sup>12</sup> así como reacciones de hipersensibilidad e incluso algunos de ellos son administrados por varios días y pueden requerir varios tratamientos.<sup>16</sup> En la Tabla 2 se presentan las indicaciones terapéuticas (posología) para el uso de estos fármacos.

Tabla 2. Dosis recomendadas de los principales agentes indicados en el tratamiento de giardiasis.<sup>24</sup>

Fármaco	Posología
Metronidazol	Adultos : 250 mg (1.46 mmol)/kg, tres veces al día, durante 5 a 7 días. Pediátrica: 5 mg (0.029 mmol)/kg, tres veces al día, durante 5 a 7 días.
Tinidazol	Adultos : 2 g (8.09 mmol), dosis única. Pediátrica: 50 mg(0.2 mmol)/kg, dosis única (máximo 2 g ).
Quinacrina	Adultos : 100 mg(0.25 mmol)/kg, tres veces al día, durante 5 a 7 días. Pediátrica: 2 mg (0.005 mmol)/kg, tres veces al día, durante 7 días.
Furazolidona	Adultos : 100 mg (0.444 mmol), cuatro veces al día, durante 7 a 10 días. Pediátrica: 2 mg(0.009 mmol)/kg, cuatro veces al día, durante 10 días
Paromomicina	Adultos : 500 mg (0.812 mmol), tres veces al día, durante 5 a 10 días. Pediátrica: 30 mg (0.049 mmol)/kg/día, en tres dosis, durante 5 a 10 días.
Nitazoxanida	Adultos: 500 mg(1.63 mmol) dos veces al día, durante tres días. Pediátrica: 7.5 mg( 0.024 mmol)/kg dos veces al día por tres días.

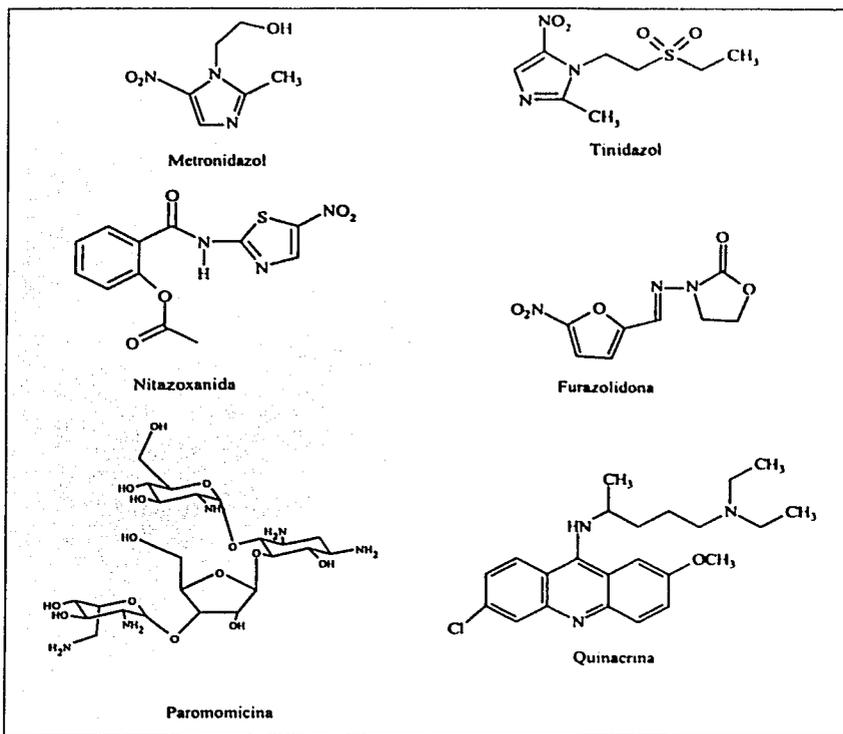
A continuación se enlistan los principales agentes terapéuticos utilizados como agentes giardicidas así como su eficacia, reacciones adversas y contraindicaciones.

- ° **Nitroimidazoles.** En este grupo de compuestos, los principales agentes giardicidas son el Metronidazol y el Tinidazol, aunque el primero es de uso más común. El porcentaje de eficacia es del 88 % para Metronidazol y de 87 % para el Tinidazol. Los efectos adversos más comúnmente observados, en este grupo de compuestos, son dolor de cabeza, mareo, náusea, sabor metálico, disturbios gastrointestinales, pancreatitis ocasional, urticaria y convulsiones. Se pueden presentar reacciones similares a la del Disulfuram con la ingestión de alcohol. Es raro presentar, toxicidad del sistema

nervioso central, neutropenia reversible, neuropatía periférica. Con el uso prolongado se puede observar sensación de temblor. Se encuentran contraindicados en pacientes con embarazo, lactancia, alteraciones del sistema nervioso central y discrasias sanguíneas.<sup>1,7</sup> El Metronidazol presenta actividad cancerígena en ratas y ratones machos y hembras.<sup>19</sup>

- **Quinacrina.** Se introdujo primero para combatir el paludismo, pero presenta una eficacia terapéutica del 90 % o más como agente giardicida. Las principales reacciones secundarias incluyen náusea y vómito, mareo, fiebre, dolor de cabeza, disturbios gastrointestinales, toxicidad ocular ocasional, ictericia, dermatitis exfoliativa, decoloración de la piel y membranas mucosas. En pacientes deficientes de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se puede presentar hemólisis. Es raro que presenten psicosis tóxica.<sup>1,7</sup>
- **Furazolidona.** Otro nitroaromático que resulta ser menos efectivo que los agentes antes mencionados, ya que presenta una eficacia terapéutica de 80 a 90 %. Se ha reportado con su uso los siguientes efectos secundarios: hipersensibilidad, náusea, vómito, diarrea, cambio de coloración de la orina. Con la ingestión de alcohol se pueden presentar reacciones similares a las del Disulfuram. En pacientes con administración de inhibidores de la enzima monoaminooxidasa se observan reacciones desfavorables y se puede observar hemólisis en pacientes deficientes de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se encuentra contraindicado en pacientes con tratamientos antidepressivos.<sup>1,7</sup> Presenta actividad cancerígena en ratones macho y hembra y en ratas hembra.<sup>19</sup>
- **Paromomicina.** Es un aminoglucósido que aunque presenta actividad contra *Giardia lamblia*, es generalmente más baja que la de los Nitroimidazoles, Quinacrina o Furazolidona, ya que presenta una eficacia terapéutica de 55 a 90 %. Se ha observado que puede causar, en casos de administración sistémica, ototoxicidad y nefrotoxicidad.<sup>1,7</sup>
- **Nitazoxanida.** Es un agente de amplio espectro contra protozoarios, helmintos y algunas bacterias, que está indicado en el tratamiento de la giardiosis, aunque ha mostrado eficacia terapéutica limitada en México, 71 % en adultos y 78 % en niños. Las reacciones adversas más comunes son náuseas, cefalea, anorexia, vómito, malestar epigástrico inespecífico y dolor abdominal de tipo cólico.<sup>18</sup>

Debido a esto resulta importante la búsqueda de nuevos agentes con potencial actividad giardicida que no presenten los efectos secundarios mencionados anteriormente y que además presente ventajas tales como dosis única, estabilidad y economía, aunque dicho propósito no ha avanzado a la rapidez que se requiere por los pocos estudios en la fisiología y metabolismo del parásito,<sup>7</sup> así como estudios de la relación estructura actividad para entender la influencia de la estructura química en la actividad antiparasitaria. En virtud de que se han obtenido resultados positivos de algunos bencimidazoles con actividad giardicida, se continúa trabajando en la búsqueda de un agente giardicida ideal en este grupo de compuestos.

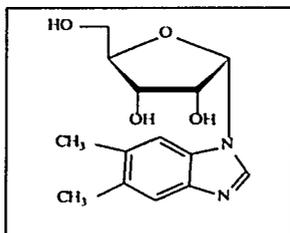


Esquema 4. Principales agentes terapéuticos utilizados como giardicidas

## 1.2. Bencimidazoles

Los bencimidazoles como su nombre lo indica son anillos bicyclicos en los cuales el benceno se encuentra fusionado al heterociclo imidazol en la cara d.<sup>20</sup>

La base, para el interés en los bencimidazoles, como un núcleo del cual desarrollar agentes quimioterapéuticos potenciales, fue establecida en los años 1950, cuando se encontró que el 5,6-Dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)bencimidazol, mostrado en el Esquema 5, formaba parte de la estructura de la vitamina B12.<sup>21</sup> Debido a este interés se obtuvieron cientos de compuestos, los cuales presentan un amplio espectro de actividad biológica como antihelmínticos, antimicrobianos, pesticidas, anticancerígenos, antiprotozoarios y otras actividades farmacológicas. Como consecuencia de la amplia funcionalidad relacionada con el núcleo del bencimidazol, la facilidad de llevar a cabo varias reacciones orgánicas en dicho núcleo, y su asociación con biomoléculas se ha presentado un amplio interés por parte de varios laboratorios de todo el mundo para explorar su síntesis y efectos biológicos.<sup>22</sup> En estos antecedentes únicamente se mencionan sus actividades biológicas como antiprotozoarios y antihelmínticos por ser las de interés en nuestro grupo de trabajo.



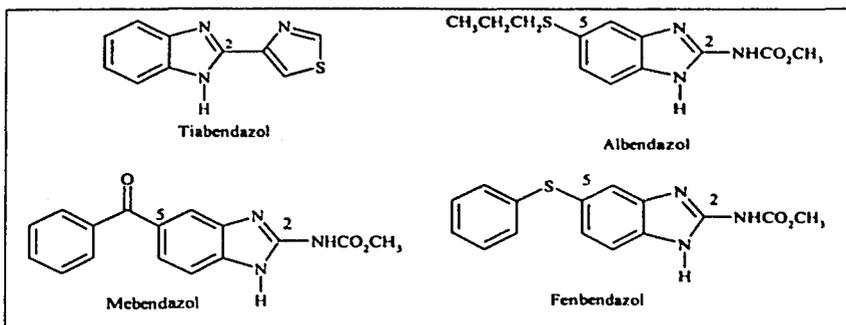
Esquema 5. 5,6-Dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)bencimidazol

### 1.2.1. Bencimidazoles como antihelmínticos.

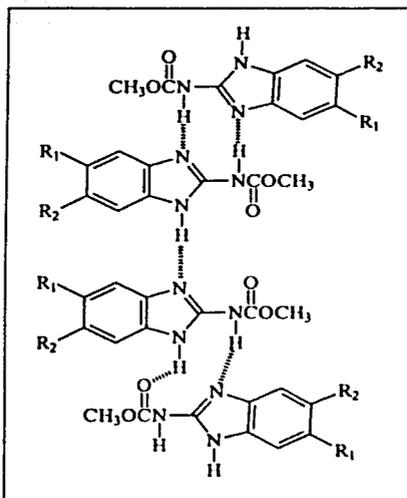
Las infecciones causadas por helmintos (helmintosis) son conocidas, tanto en los animales domésticos, como en los humanos. La magnitud de estas parasitosis es tan grande que en la actualidad representa el grupo más importante de infecciones sobre el planeta, donde afectan a más de 2000 millones de personas.<sup>23</sup>

El descubrimiento, hecho por Brown y colaboradores (1961) de que el Tiabendazol (Esquema 6), un bencimidazol con un anillo de tiazol en la posición 2, presentaba actividad potente contra nematodos gastrointestinales fue el punto de partida para obtener bencimidazoles como antihelmínticos de amplio espectro, contra parásitos de importancia en

la medicina veterinaria y clínica, aunque en la actualidad su empleo en seres humanos ha disminuido debido a su toxicidad relativa. Entre los cientos de derivados probados, los que mayor utilidad terapéutica han presentado, son aquellos que tienen modificaciones en las posiciones 2 y 5 o en ambas del anillo benzimidazol, específicamente un grupo carbamato de metilo en la posición 2, ya que este patrón de sustitución le confiere a la molécula mayor vida media, alta polaridad y baja biodisponibilidad.<sup>9</sup> Generalmente los benzimidazoles 2-carbamato de metilo, Albendazol, Mebendazol (MBZ), Fenbendazol, presentados en el Esquema 6, presentan insolubilidad acuosa debido a los puentes de hidrógeno intermoleculares, que se forman en la molécula del benzimidazol, como se muestra en el Esquema 7. Lo anterior lleva a una biodisponibilidad baja, como ya se mencionó, y en consecuencia una respuesta terapéutica poco favorable, por lo que su uso se limita al tratamiento de helmintosis intestinales.<sup>24</sup> Este grupo de fármacos presentan amplio espectro de actividad en contra de diferentes parásitos, los cuales incluyen nematodos, tales como *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (oxiurias), *Trichuris trichuria* (tricocefalos), *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (uncinarias), *Triquinella spiralis*, *Capillaria philippinensis* entre otros, ya sea en infecciones únicas o mixtas. El Albendazol se ha utilizado en el tratamiento de infecciones producidas por algunos cestodos y se ha convertido en el medicamento más indicado en la neurocisticercosis y también contra la hidiatosis quística producida por la larva de los cestodos *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus granulosus*.<sup>9</sup>



Esquema 6. Benzimidazoles comúnmente utilizados como agentes antihelmínticos en la medicina veterinaria y humana, se encuentran indicadas las posiciones 2 y 5.



Esquema 7. Puentes de hidrógeno intermoleculares en bencimidazoles 2-carbamato de metilo.

Respecto a su mecanismo de acción, se sabe que, los bencimidazoles ocasionan muchos cambios bioquímicos en nematodos sensibles, por ejemplo, inhibición de la fumarato reductasa de mitocondrias, disminución del transporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilización oxidativa. No obstante, hay pruebas de peso de que el principal mecanismo de acción de los bencimidazoles 2-carbamato de metilo, es la inhibición de la polimerización de la  $\beta$ -tubulina, para formar el microtúbulo nuclear, afectando la división mitótica de la célula. La toxicidad selectiva de dichos compuestos depende la unión específica y muy ávida con la  $\beta$ -tubulina del parásito que se produce con concentraciones mucho menores de las que se necesitan para unirse a proteínas de mamíferos.<sup>9</sup>

### 1.2.2. Bencimidazoles como antiprotozoarios.

Hasta hace poco se consideraba que los bencimidazoles 2-carbamato de metilo, únicamente presentaban actividad antihelmíntica; sin embargo, tomando en consideración que el citoesqueleto de *Giardia lamblia*, se encuentra formado por microtúbulos los cuales contienen como proteína principal tubulina, la cual también forma parte del disco succionario, se pensó que al ser esta proteína blanco de acción de los bencimidazoles, se podrían utilizar como agentes giardicidas.<sup>25</sup>

A raíz de lo anterior se han llevado a cabo estudios *in vivo* e *in vitro* con la finalidad de evaluar la eficacia del MBZ y el Albendazol contra *Giardia lamblia*. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

- **Estudios *in vitro*.** La habilidad del Albendazol para afectar la morfología, adherencia y viabilidad de los trofozoítos de *Giardia lamblia*, fue mayor que la del Metronidazol o Tinidazol.<sup>25,26</sup> Por otra parte, en la Tabla 3, se presentan los resultados obtenidos al evaluar las susceptibilidad *Giardia lamblia*, a algunos agentes giardicidas, a partir de estos resultados se hace notar que el Albendazol y el Mebendazol, resultaron ser mejores agentes giardicidas que el Tinidazol, Metronidazol y Furazolidona.<sup>17</sup> Anteriormente se informó que tanto el Albendazol como el MBZ fueron más efectivos que la Quinacrina *in vitro*.<sup>1</sup>
- **Estudios *in vivo*.** Se han realizado varios estudios clínicos, con Mebendazol y Albendazol, tanto en adultos como en niños. Los resultados obtenidos, a partir de estos estudios, muestran variabilidad respecto a su eficacia y en ellos se ha tratado de obtener el esquema terapéutico adecuado.<sup>1,27</sup>

Uno de los principales problemas que presentan el MBZ y el Albendazol, es su insolubilidad acuosa, como ya se mencionó en el apartado 1.2.1.; probablemente, dicha insolubilidad sea la causa de los resultados obtenidos en los estudios para evaluar su eficacia clínica como agentes giardicidas (estudios *in vivo*), ya que ocasiona que una proporción razonable de la dosis administrada permanezca en el tracto gastrointestinal,<sup>26</sup> en forma sólida, no permitiendo que alcance la mucosa de duodeno y yeyuno; al mismo tiempo se impide la entrada del compuesto, por difusión pasiva, al interior de *Giardia lamblia*; lo que no sucede cuando estos compuestos actúan como agentes antihelmínticos, debido a que los helmintos presentan sistemas digestivos que les permiten ingerir el compuesto en forma sólida.

Debido a lo anterior, en nuestro grupo de trabajo, se utilizaron estrategias tales como la optimización farmacéutica del Albendazol, mediante la síntesis de profármacos del tipo derivados biorreversibles y bioprecusores de este principio activo, con la finalidad de mejorar su solubilidad acuosa, obteniéndose resultados positivos en dicho intento. En este trabajo de tesis se pretende realizar la optimización farmacéutica del MBZ, con la misma finalidad de la realizada con el Albendazol.<sup>28</sup> Debido a lo anterior se mencionan a continuación, algunos aspectos importantes del Mebendazol, el principio activo de interés en este trabajo.

Tabla 3. Susceptibilidad de *Giardia lamblia* a algunos agentes antimicrobianos.<sup>17</sup>

Agente antimicrobiano	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mg/L)	CI <sub>90</sub> <sup>b</sup> (mg/L)	CLM <sup>c</sup> (mg/L)
Albendazol	0.01	0.02	0.03-0.04
Mebendazol	0.06	0.13	0.20-0.50
Tinidazol	0.14	0.44	0.50-1.00
Metronidazol	0.21	1.28	1.00-5.00
Furazolidona	0.62	2.10	5.00-10.00

<sup>a</sup> CI<sub>50</sub>, 50 % de concentración inhibitoria, concentración de fármaco que inhibe el 50 % del crecimiento.

<sup>b</sup> CI<sub>90</sub>, 90% de concentración inhibitoria; de manera similar a la CI<sub>50</sub>.

<sup>c</sup> CLM, concentración mínima letal, concentración más baja del fármaco en la cual se observa que no sobreviven los trofozoitos en subcultivos.

### 1.2.3. Mebendazol

El MBZ (Vermox), es uno de los bencimidazoles antihelmínticos de amplio espectro indicados en la terapia humana, su utilización ha disminuido por su pobre absorción a través del tracto gastrointestinal, toxicidad embriotóxica y teratogénica en animales, y su inhabilidad para eliminar todos los helmintos intestinales.<sup>29</sup> Recientemente, en 1996, la agencia de regulación sanitaria de los Estados Unidos (FDA), la Unión Europea y Japón, llevaron a cabo un análisis retrospectivo como parte de una Conferencia Internacional de Armonización (ICH), con la finalidad de evaluar las pruebas de carcinogenicidad, en ratas y ratones, a partir de la base de datos de la FDA, algunos de los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4. A partir de ellos se puede deducir que el Mebendazol no resulto ser cancerígeno para ratas y ratones, en comparación con otros agentes giardicidas ( Metronidazol y Furazolidona).<sup>19</sup>

Por otra parte se sabe que el MBZ se liga en una proporción de 95 % a las proteínas plasmáticas. La poca biodisponibilidad sistémica (22 %) del MBZ es consecuencia de una combinación de absorción deficiente y metabolismo rápido de primer paso por el hígado. El MBZ es primero absorbido, metabolizado por el hígado y subsecuentemente excretado en la bilis.<sup>9</sup> Solamente una porción estructural del fármaco es biotransformado en los metabolitos 5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol (MBZ-OH) y 2-Amino-5(6)-benzoi-1*H*-bencimidazol,<sup>9,30</sup> cuyas estructuras se presentan en el Esquema 8. El primero de ellos es el principal metabolito (>99 %) resultado de la reducción del carbonilo a un alcohol secundario y que se identificó como un conjugado glucoronido o sulfato. Esta reducción, se propuso que ocurre en el intestino grueso antes de la absorción, es una reacción

común debido a la alta concentración de microflora intestinal en esta región, y a su naturaleza anaeróbica.<sup>30</sup>

Aunque las enzimas específicas responsables de la reducción del MBZ no fueron identificadas, se conocen una gran cantidad de cetonas reductasas. Las características de esta clase de enzimas incluyen una distribución tisular ubicua, localización citoplásmica (opuesta a la microsomal), preferencia por NADPH como cofactor y bajo peso molecular. Las cetonas reductasas juegan un papel importante en la detoxificación. Muchos de los sustratos que contienen carbonilos son muy lipofílicos, y la reducción al alcohol secundario proporciona una ruta para incrementar su solubilidad acuosa así como también la introducción de grupos funcionales capaces de participar en reacciones de tipo fase II (conjugación).<sup>30</sup>

Otros metabolitos identificados del MBZ, incluyen los productos de hidrólisis del carbamato, la amina y el alcohol amina (Esquema 8), este último es producido a través de una combinación de reducción del carbonilo y la hidrólisis del carbamato. Ambos productos se encuentran en forma libre y como conjugados. Estudios adicionales con los metabolitos aislados indican que la reducción del carbonilo ocurre antes de la hidrólisis del carbamato.<sup>30</sup>

El MBZ-OH exhibe potente actividad antihelmíntica, menor a la del MBZ, aunque es la forma principal en el plasma de oveja y de perro y es más embriotóxico que el Mebendazol. Como regla general, la hidrólisis del grupo carbamato a la amina, elimina tanto la actividad biológica como la toxicidad.<sup>30</sup>

Por otra parte, en un estudio *in vitro*, realizado en 1984, con la finalidad de ver la relación estructura actividad de benzimidazol carbamatos como inhibidores de la polimerización de tubulina de mamíferos, se observó que el MBZ-OH resultó ser menos afín a la tubulina presente en cerebro de oveja comparado con el MBZ, ya que el MBZ-OH presentó un  $CI_{50}$  (concentración requerida para inhibir la velocidad de polimerización en un 50 %) de 70  $\mu M$ , en tanto que el MBZ presentó un  $CI_{50}$  de 6.1  $\mu M$ . Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos en este estudio presentan buena correlación con valores reportados previamente, en los cuales se utilizó tubulina de cerebro de bovino y de cerebro de oveja.<sup>31</sup> Estos resultados muestran que el MBZ-OH resulta ser menos afín que el MBZ a la tubulina de mamíferos, lo que indica menor toxicidad para el huésped (humano) y tal vez su mecanismo de acción antihelmíntico no se deba a unión a tubulina, indicando que es necesario realizar más estudios para conocer dicho mecanismo, o bien realizar estudios para ver en que proporción se une a la tubulina de helmintos y protozoarios.

Tabla 4. Resultados de pruebas de carcinogenicidad en ratas y ratones para algunos agentes giardicidas <sup>19</sup>

Fármaco	Rata macho	Rata hembra	Ratón macho	Ratón hembra
Furazolidona	-	+	+	+
Mebendazol	-	-	-	-
Metronidazol	+	+	+	+

### 1.3. Los profármacos en la investigación Química Farmacéutica

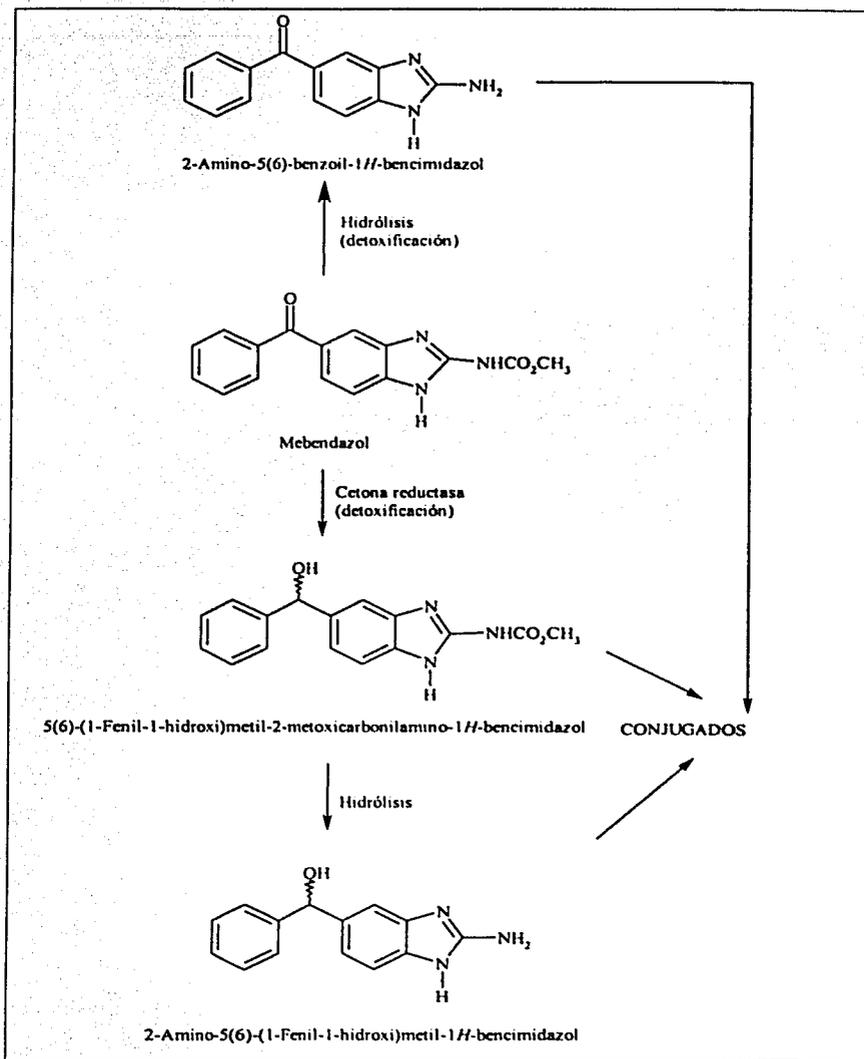
En algunas ocasiones, las propiedades físicas y químicas de los compuestos que presentan alguna actividad biológica de interés terapéutico, como en este caso, el MBZ, no pueden ser siempre del todo satisfactorias. Los grupos funcionales que poseen, pueden provocar una absorción muy pobre o una distribución inadecuada en el organismo; o bien, pueden ser la causa de la inestabilidad del fármaco, ya sea por reacción química o por destrucción metabólica en el hígado u otros órganos. Esto puede dar lugar a perfiles farmacocinéticos inadecuados para los fines terapéuticos perseguidos. Ante tal situación, la administración de estas sustancias se encuentra limitada y su utilidad clínica es de ámbito restringido.<sup>32, 33</sup>

#### 1.3.1. Procesos para la optimización del comportamiento biológico de fármacos.

Para tratar de eliminar los inconvenientes que presentan algunos fármacos en su comportamiento biológico, se utilizan recursos biológicos, físicos y químicos.<sup>34</sup> Las líneas de investigación que estos estudios llevan a cabo se agrupan bajo el nombre de optimización del comportamiento biológico de los fármacos.<sup>35</sup>

Los recursos biológicos implican cambios en las rutas de administración. Por ejemplo, el uso de inyectables para acelerar el inicio de la acción del fármaco, incrementar su concentración en sangre, y eliminar las irritaciones gástricas. La utilidad de este recurso está limitada porque las rutas de administración parenterales son siempre menos inconvenientes que la administración oral.<sup>36</sup> En el caso del Mebendazol, este recurso no ha podido ser aplicado, ya que la insolubilidad acuosa de este compuesto no permite cambiar su ruta de administración oral.

Una versatilidad más amplia lo presentan los recursos físicos. Algunas veces una formulación adecuada (microencapsulación, liberación sostenida) puede superar las desventajas fisicoquímicas y farmacológicas que presente el fármaco.<sup>34</sup>



Esquema 8 Ruta metabólica del Mebendazol.<sup>30</sup>

Por su parte, los recursos químicos ofrecen el mayor grado de flexibilidad para lograr la optimización del comportamiento biológico.<sup>34, 36</sup> En este rubro, dos alternativas de trabajo pueden ser consideradas. La primera y más utilizada, se denomina optimización farmacodinámica,<sup>37</sup> la cual consiste en realizar modificaciones estructurales a un principio activo (prototipo), con el propósito de obtener derivados, denominados análogos, con mayor potencia terapéutica o índice terapéutico más amplio.<sup>38,39</sup> Estos cambios no siempre cumplen con su cometido de optimización; ya que en ocasiones, provocan la pérdida total de la actividad o el encuentro de una nueva molécula con propiedades farmacológicas diferentes.<sup>38</sup> En el área de investigación de los benzimidazoles 2-carbamato de metilo, la búsqueda de análogos se ha realizado con moléculas como el Albendazol, Mebendazol, Flubendazol y Fenbendazol, que hoy en día se utilizan en el campo clínico para combatir parásitos en medicina humana o veterinaria.<sup>40,41</sup> En ningún caso se logró mejorar la solubilidad acuosa de estos principios activos, por lo que su uso quedó prácticamente restringido al tracto gastrointestinal.

En la segunda alternativa, denominada optimización farmacocinética,<sup>37,42</sup> las modificaciones son dirigidas a lograr una mejor eficacia en el comportamiento de absorción, distribución, metabolismo y excreción, así como, hacer más selectiva la acción biológica de un principio activo utilizado en la clínica en etapa de investigación preclínica. Dentro de este ámbito, existen dos diseños cualitativamente bien establecidos, los profármacos<sup>42,43,44</sup> y los fármacos "suaves".<sup>43,45</sup> Con frecuencia, los procedimientos para desarrollarlos resultan ser más económicos, que la búsqueda de nuevos análogos que pudiesen servir de prototipos para una optimización farmacodinámica.<sup>43</sup>

### 1.3.2. Estrategias para el diseño de profármacos.

En virtud que, tanto los profármacos y los fármacos "suaves", son dos alternativas de optimización farmacocinética de fármacos, es importante tener en cuenta las diferencias conceptuales que conciernen a cada uno de ellos.

#### 1.3.2.1. Los profármacos y los fármacos "suaves".

- Un profármaco es un compuesto farmacológicamente inactivo que requiere de una transformación espontánea o enzimática, dentro del organismo, para poder liberar o generar al fármaco, y que sea este último quien pueda ejercer la acción terapéutica.<sup>42,44</sup>

- El fármaco "suave" representa la idea contraria de los profármacos, ya que son entidades biológicamente activas, las cuales una vez que han ejercido su acción terapéutica, se desactivan metabolitamente para ser excretados rápidamente del organismo.<sup>45</sup>

Los profármacos son utilizados para principios activos con problemas de formulación, absorción, metabolismo o selectividad de acción (direccionamiento).<sup>46</sup> Por otro lado los fármacos "suaves" se recomiendan para moléculas con problemas de excreción o toxicidad por su distribución.<sup>45</sup>

Para el caso del Mebendazol, cuyo problema principal es su insolubilidad acuosa, se ve como alternativa la síntesis de profármacos para modificar dicha insolubilidad.

### 1.3.2.2. Clasificación de los profármacos.

En la actualidad existen varios criterios para clasificar a los profármacos, los cuales consideran sus características estructurales y el comportamiento que van a presentar dentro del organismo.<sup>47</sup> Los diferentes criterios de clasificación se presentan en la Tabla 5:

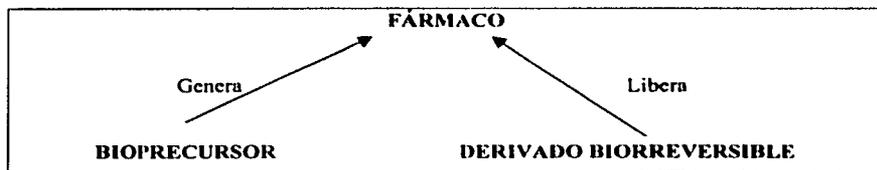
Tabla 5. Criterios de clasificación para los profármacos.<sup>47</sup>

Clasificación	Tipo
1. Química	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioprecusores</li> <li>• Derivados biorreversibles</li> <li>• Sistemas de liberación química selectiva</li> <li>• Profármacos macromoleculares</li> <li>• Profármacos secuenciales: Terapia anticuerpo-enzima profármaco (ADEPT)</li> </ul>
2. Mecanismos de activación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzimáticos:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Presentan variabilidad biológica</li> <li>▪ Dificultades de optimización</li> </ul> </li> <li>• No enzimáticos:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No presentan variabilidad biológica</li> <li>▪ Menos dificultades para optimizar</li> <li>▪ Dificultades por inestables</li> </ul> </li> </ul>
3. Direccionamiento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediante la bioactivación selectiva en un tejido (ADEPT)</li> <li>• Mediante un sistema de liberación química selectiva</li> <li>• Mediante un sistema de transporte selectivo hacia un tejido</li> </ul>

**1.3.2.3. Diferencias entre los bioprecusores y los derivados biorreversibles**

Los tipos de profármacos que se han considerado como la primera alternativa para la optimización de las propiedades de un fármaco, son los bioprecusores y los derivados biorreversibles, los cuales difieren entre sí por sus características estructurales y la forma en como se espera su biotransformación.<sup>48</sup> A continuación se explica la diferencia conceptual entre ambos tipos de profármacos y se ilustra en el Esquema 9.

- **Bioprecusores:** son aquellos compuestos que formalmente no presentan la estructura del principio activo, pero una vez dentro del organismo, lo generan mediante reacciones de reducción, oxidación o hidrólisis.<sup>42,43,48</sup>
- **Derivados biorreversibles:** Son aquellos compuestos que presentan la estructura del principio activo, al cual se le ha adicionado una porción estructural, denominada modificador, que cambiará temporalmente las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Este tipo de compuestos liberan al principio activo mediante reacciones de hidrólisis, oxidaciones o reducciones.<sup>33,42,43</sup>



Esquema 9. Diferencia conceptual entre un bioprecursor y un derivado biorreversible

Por la forma en como están constituidos los bioprecusores y los derivados biorreversibles van a presentar algunas diferencias en sus características fisicoquímicas, mismas que pueden convertirse en ventajas o desventajas según sea el caso particular de que se trate.<sup>42,43,48</sup> Estas diferencias se presentan en la Tabla 6:

Tabla 6. Diferencias operativas entre un derivado biorreversible y un bioprecursor

Características	Derivado biorreversible	Bioprecursor
Constitución	Principio activo más modificador	No presenta al principio activo
Liposolubilidad	Fuertemente modificada	Ligeramente modificada
Bioactivación	Liberación o reconversión del principio activo por hidrólisis, oxidación o reducción	Generación del principio activo por oxidación, reducción o hidrólisis.
Estabilidad	Problemas de estabilidad en solución acuosa	Estables en solución acuosa
Catálisis	Química o enzimática	Solamente enzimática

En el caso del Mebendazol, se ve como alternativa de síntesis, los profármacos de tipo derivado biorreversible, ya que este tipo de profármacos presenta la estructura del principio activo, necesaria para la actividad giardicida, y es posible adicionar un modificador, mediante una modificación estructural.

#### 1.3.2.4 Criterios para la elaboración de derivados biorreversibles.<sup>49</sup>

Para la elaboración de los derivados biorreversibles se deben tomar en cuenta los siguientes lineamientos:

- 1) La unión entre el fármaco y el modificador es generalmente un enlace covalente.
- 2) La unión entre el fármaco y el modificador debe de romperse *in vivo*.
- 3) La liberación del fármaco debe ser cinéticamente rápida para asegurar niveles efectivos del principio activo en los sitios de acción, y/o minimizar el metabolismo del profármaco como tal, o la gradual inactivación del fármaco mismo.
- 4) El derivado así como el modificador liberado *in vivo* deben presentar un riesgo mínimo de toxicidad a las concentraciones utilizadas.

#### 1.3.2.4.1. Tipos estructurales de derivados biorreversibles.<sup>43</sup>

Respecto a los tipos estructurales de derivados biorreversibles se encuentran:<sup>41</sup>

- **Bipartita:** se forma por la unión del principio activo al modificador, [modificador-fármaco].
- **Tripartita:** el modificador y el profármaco son enlazados por un tercer componente estructural llamado acoplador: [modificador-acoplador-fármaco]. El acoplador no le confiere alguna propiedad fisicoquímica al fármaco.
- **Profármaco doble o pre-profármaco:** estos se caracterizan por la presencia de dos modificadores [modificador-modificador-fármaco]. Algunas veces uno de los modificadores presenta propiedades fisicoquímicas diferentes al fármaco y el otro sirve para realizar una liberación selectiva del mismo. En otras ocasiones, un modificador bloquea un sitio de biotransformación y el otro sirve como acarreador del fármaco a través de las membranas.<sup>50</sup>
- **Profármaco mutuo:** se forman por el acoplamiento de dos principios activos [fármaco<sub>1</sub>-fármaco<sub>2</sub>]. Esta unión puede darse de forma directa o mediante un acoplador.

Para agentes antiparasitarios de administración no prolongada, como el Mebendazol, existe la libertad de utilizar cualquiera de las variantes estructurales anteriores.

### 1.3.3. Los Pro-bencimidazoles

En el campo de investigación de los bencimidazoles, se ha utilizado la estrategia de los profármacos con el propósito fundamental de incrementar la escasa solubilidad acuosa que presentan este tipo de compuestos. Los profármacos diseñados y sintetizados reciben el nombre de pro-bencimidazoles.<sup>40,41</sup> En el Esquema 10 se presentan algunos de los pro-bencimidazoles que se encuentran en fase de investigación preclínica en medicina veterinaria.<sup>51</sup>

Uno de estos pro-bencimidazoles es el Netobimin, el cual fue diseñado como un bioprecursor del Albendazol,<sup>52</sup> y cuya evaluación se ha llevado a cabo en animales domésticos.<sup>52-55</sup> Aunque dichos trabajos han mostrado que este bioprecursor ha generado al Albendazol, así como ha sus metabolitos, no ha logrado superar las concentraciones de estos últimos, cuando se compara su administración con el Albendazol en dosis equimoleculares.<sup>52,53,54</sup> Es probable que este comportamiento sea debido a que el Netobimin,<sup>56</sup> presenta un comportamiento zwitterión a los valores de pH del tracto gastrointestinal, lo que merma su capacidad para disolverse en el lumen intestinal.

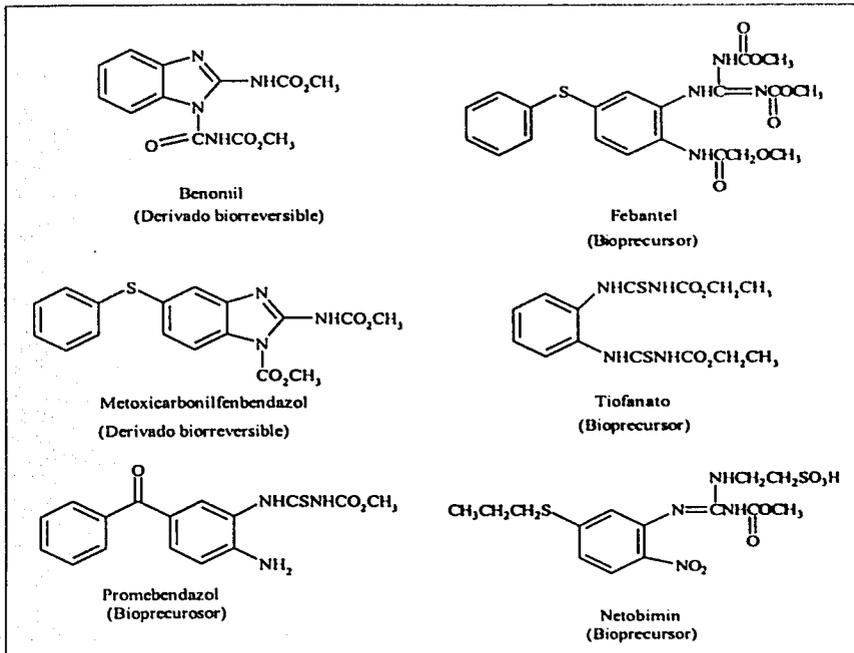
Otros bioprecursores de bencimidazoles 2-carbamato de metilo como el Pro-mebendazol, el Febantel y el Tiofanato, se presentan como compuestos en donde la generación de la porción 2-imidazol-carbamato de metilo, se lleva a cabo mediante una reacción de ciclación intramolecular. Estos bioprecursores no presentan comportamiento de zwitterión en las condiciones de acidez gastrointestinal, por lo que las perspectivas para absorberse son buenas.<sup>51</sup>

En el Esquema 11 se presentan dos bioprecursores del tipo *N,N'*-disustituidos cuyos resultados fueron favorables para el propósito de su diseño, y que los hacen atractivos para más amplia investigación. En el primer caso, se trata de un bioprecursor del Mebendazol, el Pro-mebendazol. En el trabajo realizado, se mostró que la ciclación intramolecular, en el cual el grupo amino se comporta como nucleófilo, fue favorecida al incrementar los valores de pH. La conversión fue prácticamente cuantitativa a valores de pH mayores a 7.0, sin embargo, no se realizaron estudios biológicos con este compuesto.<sup>57</sup>

El segundo caso trata sobre un bioprecursor del 5-Trifluorometil-2-bencimidazol carbamato de metilo.<sup>58</sup> Este diseño, al igual que en el del Netobimin, consideró que en primera instancia, se debería de llevar a cabo la reducción del grupo nitro a grupo amino, y luego la reacción de ciclación intramolecular, para dar lugar al bencimidazol 2 carbamato de metilo. Cabe hacer mención que en este bioprecursor, la ubicación del grupo nitro, en relación al sustituyente de la posición 5 del bencimidazol 2 carbamato de metilo, difiere de la que

presenta el Netobimin. En este trabajo, se administró el bioprecursor a gerbos infectados con *Echinococcus multilocularis* en tejido pulmonar. Los resultados mostraron una regresión de la infección, la cual fue atribuida a que el bioprecursor generaba al correspondiente bencimidazol, el cual es activo contra este parásito.<sup>58</sup>

Por lo que respecta a los derivados biorreversibles, básicamente las modificaciones, para la optimización farmacéutica, se han llevado a cabo al adicionar alguna porción estructural, a los nitrógenos de la porción imidazol de estos antiparasitarios. Como ejemplo, podemos citar al Metoxicarbonilmebendazol, el cual cuando se administró a conejos, logró incrementar la cantidad del principio activo en el plasma en relación a aquellos animales que solo recibieron Mebendazol en cantidades equimoleculares.<sup>59</sup>

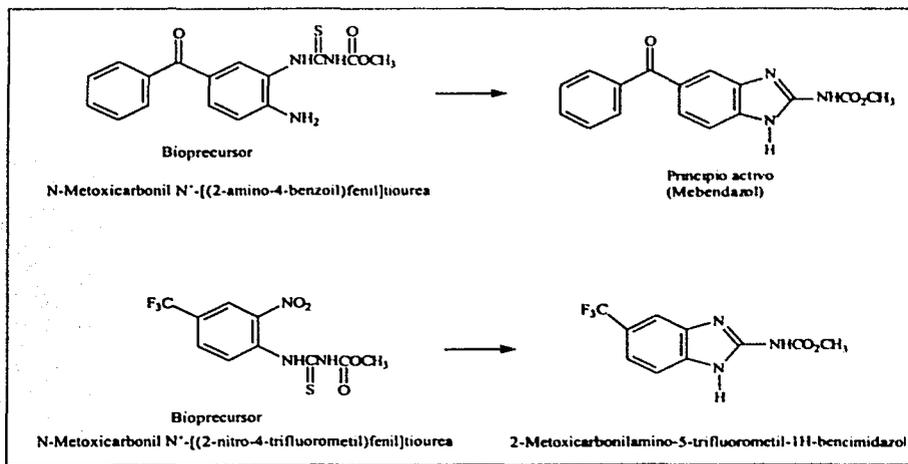


Esquema 10. Pro-bencimidazoles de bencimidazoles 2-carbamato de metilo

Todos estos estudios muestran que es factible utilizar la estrategia de los profármacos para tratar de optimizar el comportamiento biológico de bencimidazoles 2-carbamato de metilo, en especial la del Mebendazol.

### 1.3.4. La liposolubilidad y la solubilidad acuosa en la actividad biológica

A menos que un compuesto activo alcance su sitio de acción dentro del organismo en cantidad suficiente para mostrar su eficacia terapéutica, no será clínicamente útil como fármaco.<sup>44</sup> La eficacia de la actividad biológica, depende en muchas ocasiones, de una liberación eficiente del compuesto en su sitio de acción, dando lugar con esto a las mejores respuestas terapéuticas con un mínimo de efectos colaterales o secundarios. Para que un principio activo llegue a tener una liberación eficiente, es necesario que las dificultades encontradas en su absorción, su distribución, su metabolismo y su excreción, no constituyan las etapas críticas en su comportamiento biológico. La optimización de las propiedades del compuesto activo para lograr dicha liberación es un proceso importante dentro de la etapa de diseño y desarrollo de fármacos y frecuentemente se convierte en la etapa clave para que un principio activo llegue a convertirse en medicamento.<sup>48,60</sup>



Esquema 11. Bioprecursores de bencimidazoles 2-carbamato de metilo reportados

#### 1.3.4.1. Importancia de las propiedades fisicoquímicas del fármaco.

Un parámetro clínico a considerar es el transporte a través de las membranas biológicas que el principio tenga que efectuar hasta alcanzar su sitio de acción (el parásito).<sup>64</sup> Es reconocido que dentro de los factores que influyen en el transporte de un compuesto, sus propiedades fisicoquímicas ocupan un lugar preponderante, sobre todo en aquellos que son administrados en un lugar distinto a su sitio de acción. En este sentido, debemos de mencionar que las sustancias activas deben cumplir con requerimientos de liposolubilidad, polaridad, carga eléctrica, solubilidad acuosa, tamaño molecular o similitud a sustancias endógenas. Los dos últimos, prácticamente restringidos a un grupo particular de compuestos, tales como, iones metálicos de tamaño pequeño para atravesar los poros membranales, o compuestos orgánicos que utilizan el transporte activo para trasladarse en el organismo.<sup>61</sup>

El Mebendazol utiliza difusión simple como medio de transporte a través de las membranas biológicas. Los elementos que influyen en la velocidad a la que ocurre dicho proceso son:<sup>65</sup>

1. El gradiente de concentración, el cual influye de manera directamente proporcional a la velocidad de difusión y depende de la cantidad disuelta del compuesto en ambos lados de la membrana.
2. Los parámetros que afectan la facilidad para que la molécula del fármaco pueda moverse al interior lipofílico de la membrana, a saber, la liposolubilidad, el tamaño molecular y el grado de ionización.

Para tratar de optimizar el comportamiento de una sustancia activa que se administra por vía oral, como el Mebendazol, se debe de tomar en cuenta la absorción y la disolución. Para que estos dos parámetros puedan modificarse, mediante el uso de recursos químicos, es necesario alterar las características de liposolubilidad y solubilidad acuosa del principio activo. La decisión de intentar modificaciones químicas a la estructura del principio activo, depende del tamaño de la dosis administrada, el costo de producción de tales cambios estructurales, la dificultad de tomar sales acuosas en condiciones biológicas, así como la eficiencia de la respuesta terapéutica.<sup>62</sup>

#### 1.3.4.2 La liposolubilidad

Este parámetro denota el grado de solubilidad de un compuesto en una fase lipoidea (por ejemplo, la membrana celular). De forma ideal, la liposolubilidad podría ser medida directamente como el coeficiente de partición entre una bicapa de fosfolípidos y agua; el valor de este coeficiente señalaría la facilidad con que el compuesto puede transportarse en las

membranas biológicas. Experimentalmente, la fragilidad de la capa de fosfolípidos no permite utilizarla en mediciones de rutina, por lo que es reemplazada por disolventes orgánicos, como el 1-octanol, con la intención de hacer aproximaciones al comportamiento de la membrana celular.<sup>44</sup> Los valores usualmente manejados para el coeficiente de partición (P) son logarítmicos ( $\log_{10}$ ); por lo que un fármaco que se distribuya en una proporción 10:1 en un sistema octanol/agua, tendrá un valor de  $\log P=1$

$$P = \frac{\text{[fase orgánica]}}{\text{[Fase acuosa]}}$$

En la actualidad se disponen de paquetes computacionales para calcular el valor de log P, los cuales se basan en que la solubilidad intrínseca de un compuesto depende de las contribuciones que en este sentido, realicen sus grupos funcionales y porciones estructurales que lo integren.<sup>63-65</sup> Para el caso del Mebendazol, el valor experimental de  $\log P = 2.83$  a pH 5.0.<sup>66</sup>

Un aspecto adicional a considerar, es la ionización de bases y ácidos débiles, ya que el grado de partición de un fármaco es dependiente del pH. Experimentalmente, la fase acuosa es reemplazada por una solución amortiguadora de fosfatos, usualmente a pH 7.4 o pH 6.0. Los valores obtenidos de esta manera son referidos como coeficientes de distribución,  $\log D_{pH}$ , en lugar de log P. Se asume que el log P representa la liposolubilidad intrínseca y no cambia a menos que la estructura del fármaco se modifique, por el contrario, el  $\log D_{pH}$ , se modificará de acuerdo a las condiciones de acidez del medio. Con el valor del coeficiente de distribución, se espera mayor representatividad del comportamiento de partición de los ácidos y bases débiles.<sup>67</sup>

#### 1.3.4.3. La solubilidad acuosa

Como se ha indicado, el gradiente de concentración es un parámetro que influye en la velocidad de difusión simple. A mayor gradiente de concentración mayor velocidad de difusión, y en consecuencia mayor absorción, hasta que la relación de equilibrio alcance su valor máximo. Un gradiente de concentración dependerá de la velocidad de disolución del principio activo sólido, misma que estará limitada por la solubilidad acuosa que presente dicho compuesto.

La solubilidad acuosa es un parámetro crítico. Una solubilidad mayor al 1 % (10 mg/ml) a 37 °C de un principio activo, indica que no se presentarán problemas en la

biodisponibilidad como resultado de sus características de solubilidad.<sup>68</sup> Es importante indicar que esto es una guía y no una limitante estricta en la relación solubilidad-absorción. Los factores que determinan esta relación son:<sup>69</sup>

- La velocidad de disolución y la solubilidad como una función del pH dentro del rango fisiológico
- La velocidad de disolución en función del tamaño de partícula o su área superficial y
- La dosis del compuesto

A diferencia de la liposolubilidad, no existe una guía general para estimar la solubilidad acuosa de las moléculas orgánicas, a partir de sus estructuras o sus propiedades físicas. La razón, es que el fenómeno de la solubilidad, no surge de un simple equilibrio sino de una combinación de varios de ellos. Entre los factores que afectan la solubilidad de un fármaco se encuentran:<sup>70</sup>

- a) *El soluto*: estructura molecular, grupos funcionales, polimorfismo.
- b) *El disolvente*: polaridad, formación de puentes de hidrógeno, fuerza iónica, cosolventancia, agentes solubilizantes.
- c) *Temperatura*: exotérmico versus endotérmico.
- d) *Tamaño de partícula y agitación*: usualmente afectan únicamente la velocidad de disolución, pero en algunos casos pueden afectar la solubilidad.

#### 1.3.4.4. Los profármacos para modificar la solubilidad acuosa

Cuando un principio activo presenta problemas de insolubilidad acuosa, lo primero es intentar incrementarla mediante cosolventancia o por la formación de sales, debido a la facilidad de su elaboración y bajo costo económico. En caso de que con estos medios no se mejore satisfactoriamente, el comportamiento de solubilidad, entonces se requerirá de aplicar otras herramientas más elaboradas, como recursos físicos de formulación o el recurso químico de los profármacos.<sup>71</sup> Cuando se ha decidido utilizar a los profármacos, con la finalidad de incrementar su solubilidad acuosa, se ha establecido como meta el obtener compuestos cuya solubilidad sea igual o mayor al valor de la dosis (mg/Kg) del principio activo, dividida entre 100 y referida en ml. En el caso del Mebendazol, cuya dosis promedio de administración es de 15 mg, los profármacos deberían presentar al menos una solubilidad de 0.15 mg/ml (150µg/mL).

El éxito en el diseño de profármacos de un principio activo con problemas de absorción radica en lograr incrementos en la extensión de su absorción de hasta un doble o

triple de cantidad. La consecuencia de esto podría ocasionar disminuciones significativas en la dosis administrada o en el abatimiento del costo del tratamiento particular. En general un fármaco o un profármaco que presente una absorción uniforme minimizará las variaciones que se presenten entre diversos pacientes o entre las administraciones dadas a un mismo individuo.<sup>72</sup>

#### **1.3.4.4.1. Los derivados biorreversibles en la insolubilidad acuosa.**

La aplicación de la estrategia de preparación de derivados biorreversibles para tratar de resolver problemas de insolubilidad, presenta la ventaja de que no se pierde la estructura del principio activo, y se cambia la solubilidad mediante el uso de una porción estructural denominada modificador, la cual se puede utilizar con un mayor margen de maniobra estructural para modular la relación solubilidad-liposolubilidad.

Cuando se inicia el diseño de los profármacos es importante tomar en cuenta, que la solubilidad y la liposolubilidad en un compuesto, en general, guardan una relación inversa, cada vez que se intenta modificar la estructura de un fármaco para incrementar la solubilidad, repercute en una disminución de su liposolubilidad.

#### **1.3.4.5. Estrategias en el diseño de derivados biorreversibles hidrosolubles.**

En términos generales, hay una mayor cantidad de trabajos realizados con derivados biorreversibles que con bioprecusores para abordar el problema de la insolubilidad de diversos principios activos.<sup>73,74</sup> Dos estrategias pueden ser empleadas para incrementar la solubilidad acuosa, al sintetizar derivados biorreversibles:<sup>70</sup>

- 1) Mediante la adición de una porción estructural iónica o ionizable en condiciones fisiológicas.
- 2) Mediante la adición de una porción estructural para disminuir el punto de fusión del principio activo.

##### **1.3.4.5.1. Adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas.**

La síntesis de un derivado biorreversible iónico o ionizable de un fármaco, es tal vez la más común de las estrategias realizadas en este rubro. Esta alternativa se basa en la relación pH-solubilidad para ácidos y bases débiles. En la Tabla 7 se enlistan algunos de los modificadores utilizados para este propósito.

Tabla 7. Modificadores para solubilizar fármacos

Fármaco	Modificador	Derivado biorreversible
F-OH	Hemisuccinato	F-O-COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>
	Clorhidrato de dimetilaminoacetato	F-O-COCH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> HCl
	Fosfato	F-O-PO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>
	Aminoácido	F-O-COCHR-NH <sub>2</sub>
F-COOH	Éster de colina	F-COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> X <sup>-</sup>
	Clorhidrato de dimetilaminoéster	F-COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> HCl
	Aminoácido	F-CONHCH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>

F: Fármaco

De la tabla anterior, se puede decir, que los fármacos más fáciles para ser modificados con el propósito de desarrollar profármacos, son aquellos que tienen grupos carboxilos o hidroxilos. Algunos de los trabajos de investigación realizados en este sentido, han arrojado buenos resultados a este respecto.<sup>35,62</sup> Sin embargo, no todos los compuestos activos presentan estos grupos funcionales, como el caso de la mayoría de los bencimidazoles 2-carbamato de metilo, por lo que los estudios actuales, se abocan a tratar de utilizar el diseño de profármacos en moléculas con estas características.

Un aspecto importante que hay que señalar, y puede convertirse en una desventaja para esta alternativa, es la relación que se presenta entre la solubilidad acuosa y la liposolubilidad. La importancia de lo anterior, radica en que prácticamente todo incremento de solubilidad, necesariamente se ve acompañado por una disminución en la liposolubilidad de la sustancia.<sup>69</sup>

En esta relación inversa de la liposolubilidad y solubilidad, al parecer es esta última la que proporcionalmente está más afectada por las modificaciones estructurales que se realicen en un compuesto. En el ámbito de la absorción y disolución, si la solubilidad del principio activo es igual o mayor a la dosificación administrada, la pérdida de solubilidad, por incremento de la liposolubilidad, no tendría consecuencia en su biodisponibilidad. Por otra parte, si el fármaco presenta poca solubilidad, como el Mebendazol, una ganancia esperada en su absorción por mayor liposolubilidad, se vería anulada por una disminución en su velocidad de disolución.

### 1.3.4.5.2. Adición de un modificador para disminuir el punto de fusión del principio activo.

Esta estrategia se basa en el hecho de que para disolver moléculas, deben ser removidas de su red cristalina. Cualquier modificación estructural que disminuya la energía de red cristalina, y en consecuencia provoque la reducción del punto de fusión, podría incrementar la solubilidad del fármaco. En el caso de los bencimidazoles 2-carbamato de metilo, se ha propuesto que su insolubilidad acuosa se debe a su alta energía de red cristalina originada por la presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares, como ya se observó en la sección 1.2.1. Por estudios realizados en diversos principios activos, se ha logrado establecer que diferencias en 100°C en el punto de fusión cambia significativamente la solubilidad acuosa y biodisponibilidad de los fármacos. Algunos de los grupos funcionales modificados con este propósito y los cambios en el punto de fusión ( $\Delta$  p.f.) que se han presentado en algunos profármacos se presentan a continuación, en la Tabla 8:

Tabla 8. Valores de  $\Delta$  p.f. para algunas modificaciones con profármacos

Fármaco	Profármaco	Aromático ( $\Delta$ p.f.)	Alifático ( $\Delta$ p.f.)
F-COOH	F-COOCH <sub>3</sub>	-100	-70
	F-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-150	-70
	F-COOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	70	--
	F-COONH <sub>2</sub>	50	20
F-OH	F-OCH <sub>3</sub>	-100	-30
	F-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-100	-50
	F-OCOCH <sub>3</sub>	-20	-20
	F-OCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0	0
F-NH <sub>2</sub>	F-NHCOCH <sub>3</sub>	60	--
	F-NHCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	60	--

F: Fármaco

A este respecto, prácticamente poco ha sido el estudio realizado cuando está presente un NH ácido en el fármaco, como es el caso de los bencimidazoles 2-carbamato de metilo. Aunque se esperaría una disminución en el punto de fusión ya que se alteraría el patrón de formación de puentes de hidrógeno o una disminución en el número de los mismos.

Una de las ventajas que presenta esta alternativa de disminuir el punto de fusión, es que al incrementar la solubilidad del principio activo, no disminuye su liposolubilidad. Ventaja adicional sobre la alternativa anterior de adición de grupos ionizables al principio activo.

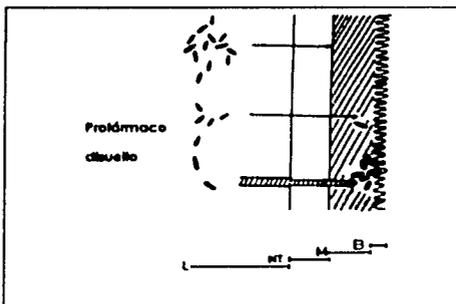
### **1.3.5. Mecanismo de disolución y liberación del fármaco a partir del derivado biorreversible, en la cercanía del intestino delgado.**

Un aspecto a considerar es que los fármacos o bien, en este caso, los profármacos liberados vía el estómago en la parte superior del intestino delgado (duodeno), se pueden disolver en la fase acuosa del contenido luminal. Las moléculas del profármaco, una vez en disolución son promovidas y agitadas por la motilidad intestinal en el lumen. Sin embargo, antes de alcanzar la mucosa, tienen que difundir a través de tres capas intestinales diferentes, como se presenta en la Esquema 12.<sup>73</sup>

- 1) La capa no turbulenta (NT): que es la más ancha. Físicamente es una capa de agua inmóvil, adyacente a la mucosa. Tiene un diámetro de cerca de 200 a 500  $\mu$  y reduce la superficie de agitación intestinal 100 veces comparada con la superficie de la mucosa.
- 2) La segunda capa, es una capa de moco (M), protege la superficie de la mucosa de daño y puede restringir la difusión.
- 3) La tercera capa es rica en protones y es llamada "microclima ácido", afecta la protonación y permeabilidad de ácidos y bases débiles.

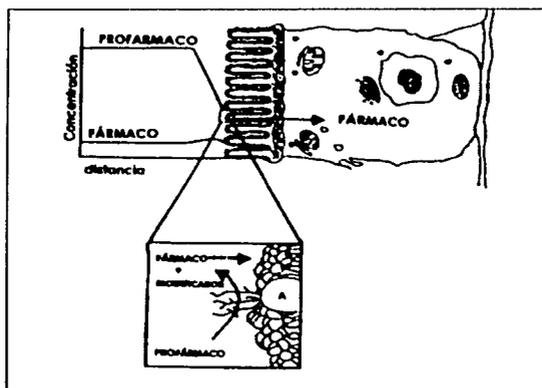
Una consideración adicional es el sitio donde se espera que ocurra la biotransformación, por varias razones:<sup>74</sup>

- a) La hidrólisis del derivado biorreversible para liberar al principio activo y su posible precipitación deben ser minimizados previamente a su absorción oral o parenteral.
- b) Las ventajas de la difusión del fármaco no polar, a través de las membranas no debe comprometerse.
- c) La presencia de enzimas para la oxidación, reducción (microflora intestinal) o hidrólisis para la liberación del fármaco, a partir del derivado biorreversible.



Esquema 12. Disolución de los profármacos en el lumen del intestino delgado. B, borde de cepillo, M, moco, NT, capa no turbulenta; L, lumen intestinal.<sup>73</sup>

La estrategia de los profármacos, específicamente del tipo derivado biorreversible, dirige las consideraciones mencionadas anteriormente, debido a que el profármaco se diseña como un sustrato para las enzimas que se encuentran unidas a la membrana de las células del intestino delgado (enterocitos), o bien en el interior de dicha célula. Como se muestra en el Esquema 13, la conversión del profármaco en el fármaco se lleva a cabo muy cerca de la membrana, el alto coeficiente de partición del fármaco en la membrana disminuirá la precipitación en el lumen.



Esquema 13. Mecanismo propuesto para la liberación del fármaco a partir del profármaco, en la cercanía del intestino delgado.<sup>74</sup>

Sin embargo, si la conversión en la pared de la membrana, es rápida, la permeabilidad efectiva del profármaco no deberá ser menor que la del fármaco. La alta solubilidad del profármaco es de interés particular, ya que incrementa el gradiente de concentración desde el lumen intestinal a la pared y además es la fuerza química que dirige la reacción/absorción a la pared. Debido a que la solubilidad del profármaco puede ser mayor que la del fármaco, con esta estrategia se obtiene un incremento en la absorción.<sup>74</sup>

El conocimiento de la distribución y especificidad de ciertos sistemas de enzimas intestinales digestivas, sugiere una estrategia para el diseño de profármacos, en la cual el profármaco debe presentar enlaces lábiles frente a una enzima. Las enzimas unidas a la membrana de borde de cepillo, en la mucosa del intestino delgado, son de interés particular por presentar sitios blancos específicos, debido a que se incluyen aminopeptidasas, dipeptidasas y fosfatasa alcalina. Los profármacos con grupos fosfato son más solubles que el fármaco al pH intestinal debido a la carga negativa del profármaco y a su estabilidad en solución acuosa, mientras que los derivados de aminoácidos proporcionan la posibilidad de amplias modificaciones de sus propiedades físicas, así como también que los productos de hidrólisis no son compuestos tóxicos. Por otra parte, esterases con alta actividad inespecífica, se localizaron principalmente en los compartimientos intracelulares de las células de la mucosa en el intestino de rata.<sup>74</sup>

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Giardia lamblia*, es un protozoo causante de la enfermedad conocida como giardiasis.<sup>1</sup> Esta enfermedad se ubica como una de las 10 principales parasitosis del ser humano y debido a ello se considera un urgente problema de salud pública en algunos países desarrollados y en vías de desarrollo.<sup>7</sup> A pesar de lo mencionado anteriormente, en los últimos 20 años no se han presentado avances en su tratamiento,<sup>15</sup> y los fármacos implicados en su tratamiento actual, presentan problemas de eficiencia y toxicidad.<sup>1,12,16,17</sup>

Por otra parte el Mebendazol, es uno de los bencimidazoles antihelmínticos de amplio espectro indicados en la terapia humana, aunque su utilización ha disminuido debido a su pobre absorción a través del tracto gastrointestinal y su inhabilidad para eliminar todos los helmintos intestinales.<sup>29</sup> Recientemente se han llevado a cabo estudios para evaluar su actividad como agente giardicida,<sup>1,17,25-27</sup> debido a que su mecanismo de acción, como antihelmíntico, involucra la inhibición de la polimerización de tubulina para formar el microtúbulo nuclear, afectando la división mitótica de la célula.<sup>9</sup> Tomando en consideración que *Giardia lamblia* posee gran cantidad de esta proteína, formando parte de su citoesqueleto, se pensó que podría actuar contra dicho microorganismo.<sup>25</sup> Los resultados obtenidos han sido contrastantes; por una parte al realizar pruebas *in vitro*, se ha observado que resulta ser mucho más activo que la mayoría de los agentes giardicidas utilizados actualmente,<sup>1,17,25,26</sup> pero no sucede lo mismo al utilizarlo *in vivo*, ya que se han obtenido cifras variables respecto a su eficiencia al administrarlo tanto a adultos como a niños.<sup>1,27</sup>

Los resultados *in vivo* se han atribuido a uno de los principales problemas que presenta el Mebendazol, su insolubilidad acuosa, debido principalmente a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares; esta insolubilidad ocasiona que gran parte de la dosis ingerida por vía oral, permanezca en el tracto gastrointestinal, impidiendo que se encuentre disponible para absorción, en el caso de que se desee una acción sistémica. En relación a la giardiasis, es necesario que el principio activo llegue a la mucosa del intestino delgado, específicamente duodeno y yeyuno, pero además también es importante que al llegar a dicho sitio blanco, se

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

encuentre en solución para que se facilite su entrada al interior del microorganismo, mediante difusión pasiva, y de esta manera se lleve a cabo la acción giardicida.

Como consecuencia de los mencionado anteriormente resulta necesario mejorar la solubilidad acuosa del Mebendazol, pero ¿es posible llevar a cabo la modificación del Mebendazol para mejorar su solubilidad acuosa? , Y una vez realizada la modificación ¿los nuevos compuestos sintetizados tendrán la capacidad de convertirse en el fármaco, en la mucosa de duodeno y yeyuno, para que este ejerza su acción giardicida?

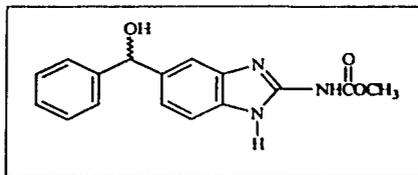
### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

En el presente trabajo de tesis se pretende realizar la optimización farmacocinética del Mebendazol con la finalidad de modificar su solubilidad acuosa, mediante el diseño y síntesis de un profármaco de este principio activo, específicamente del tipo de derivado biorreversible; tomando en consideración el conocimiento de que su metabolito principal, el (*R*)/(*S*)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol presenta un grupo hidroxilo, capaz de permitir tanto la adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas, como la adición de un modificador para disminuir el punto de fusión.

#### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Sintetizar el (*R*)/(*S*)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol, metabolito del Mebendazol.



Esquema 14. (*R*)/(*S*)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol, metabolito del Mebendazol a sintetizar

- 3.2.2. Sintetizar un derivado biorreversible del Mebendazol a partir de su metabolito hidroxilado.
- 3.2.3. Caracterizar el derivado biorreversible sintetizado, así como el metabolito del Mebendazol, mediante sus propiedades físicas: punto de fusión,  $R_f$ , por Métodos Espectroscópicos (RMN, IR, UV) y Espectrometría de masas.
- 3.2.4. Evaluar la actividad giardicida, *in vitro*, de los compuestos sintetizados, obtener su concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) y comparar los resultados obtenidos con los del Mebendazol, Albendazol y Metronidazol.
- 3.2.5. Evaluar la solubilidad de los productos sintetizados y comparar los resultados obtenidos con los del Mebendazol.

- 3.2.6. Evaluar la bioconversión *in vitro* del derivado biorreversible sintetizado, en presencia de las enzimas esterasa y tripsina, con la finalidad de determinar si ocurre la liberación del metabolito hidroxilado del Mebendazol.
- 3.2.7. Calcular el valor de coeficiente de partición log P, de los compuestos sintetizados, mediante la utilización de un modelo computacional, y de esta manera evaluar su liposolubilidad.

### 4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Para conseguir el objetivo planteado, los procedimientos experimentales se dividieron en cuatro etapas; la etapa inicial involucra la síntesis del derivado biorreversible del Mebendazol a partir de su metabolito hidroxilado; continuando con la prueba de susceptibilidad *in vitro* para *Giardia lamblia* en presencia de los compuestos sintetizados; posteriormente, la evaluación de la solubilidad a de cada uno de ellos; y finalmente la determinación de la capacidad de bioconversión (estabilidad) del derivado biorreversible, en el metabolito del Mebendazol, en presencia de soluciones amortiguadoras y enzimas. Antes de explicar los procedimientos experimentales se mencionan en detalle las características de los instrumentos utilizados

#### 4.1. Instrumentación y materiales.

- El Mebendazol utilizado para las síntesis del Compuesto 1, fue donado por Smithkline Beechman Farmacéutica, S.A. de C.V., México.
- Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato Marca Büchi Modelo B-540, mediante capilar y no se encuentran corregidos.
- El avance de las reacciones se observó por cromatografía en capa fina (c.c.f.), utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> (Merck 1.05715) y una lámpara de luz ultravioleta Marca UVP, Inc. San Gabriel C.A. 01778 U.S.A. Modelo UVGL-25 Mineralight®, para revelar.
- Para concentrar los disolventes, se utilizó un rotavapor Marca Büchi Modelo R 114, con vacío generado por una bomba y condensador Marca VWR Scientific Modelo 1107.
- Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de Transformadas de Fourier modelo FT-IR-1600 en pastilla de KBr, las señales se reportaron en  $\text{cm}^{-1}$ .
- Los espectros de Resonancia Magnética Protónica ( $^1\text{H}$  RMN 300 MHz) y los de Resonancia Magnética de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN, 75 MHz) se realizaron en un espectrómetro Varian modelo Unity Inova. Se utilizó dimetilsulfóxido-*d*<sub>6</sub> (DMSO-*d*<sub>6</sub>) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en todos los casos. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm).

- Los espectros de masas, por impacto electrónico (IE 70 eV) y por bombardeo de átomos rápidos (FAB) utilizando Xenón como gas ionizante; se determinaron con un espectrómetro de masas marca Joel Modelo SX-102 A. La simbología utilizada es  $M^+$  para el ión molecular y  $[M + H]^+$  para el ión molecular protonado. La aplicación de la muestra fue por introducción directa o mediante cromatografía de gases (EM-CG), con un cromatógrafo marca Hewlett Packard Modelo 5890 Serie II.
- Los espectros de ultravioleta se registraron en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1601 con lámpara de luz UV y con programa para el registro de barrido de absorbencia.
- La determinación de solubilidad se realizó en una Parrilla con agitación magnética a temperatura controlada Marca IKA-Werke Modelo Ret-Basic.
- Para la evaluación de estabilidad del derivado biorreversible se utilizó un termomezclador Marca eppendorf Modelo R.
- En el caso del cálculo del coeficiente de partición se utilizó el programa computacional ACD Lab log P DB (ACD Inc. Toronto, Canada), Versión 4.56.
- La estructura tridimensional del compuesto **2**, se modeló mediante el programa computacional Cache (Fujitsu Inc. Pittsburg U.S.A.), Versión 3.2, utilizando el algoritmo de mecánica molecular MM3.

#### 4.2. Síntesis del derivado biorreversible.

Para la síntesis del derivado biorreversible, (*R*)(*S*)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol (**2**), se siguió la secuencia de reacción ilustrada en el Esquema 15. A continuación se explica en detalle, como se llevó a cabo la síntesis de cada compuesto.

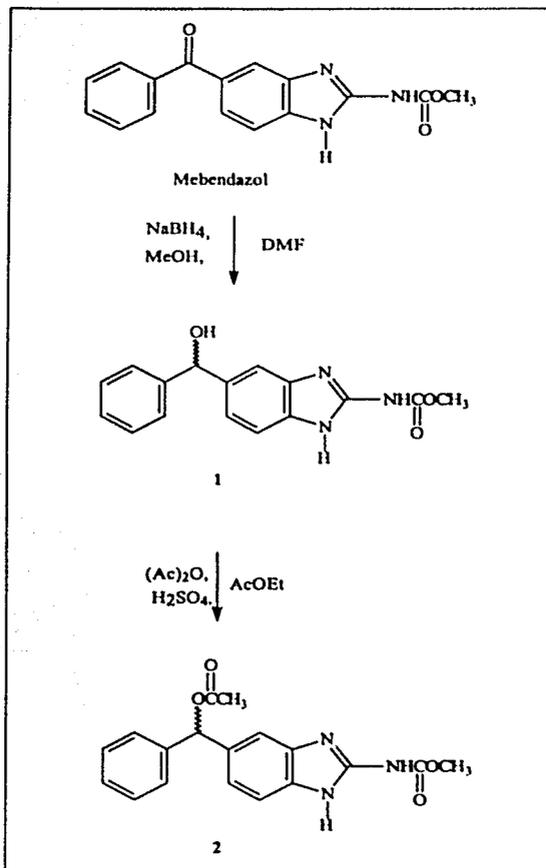
##### 4.2.1. Síntesis de (*R*)(*S*)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol (**1**).<sup>75,76</sup>

En un matraz bola de 200 ml, acondicionado con una globo para atrapar el gas generado, se colocaron 5 g (16.95 mmol) de Mebendazol suspendidos en 75 mL de dimetilformamida (DMF), a los cuales se les adicionó una cantidad total de 2.693 g (71.17 mmol) de borohidruro de sodio ( $NaBH_4$ ). La adición de  $NaBH_4$  se realizó en cuatro porciones, inicialmente se adicionó

1.343 g (35.5 mmol), transcurridas 24 horas se adicionaron 450 mg (11.89 mmol) de  $\text{NaBH}_4$ , operación que se repitió 2 veces más en similares condiciones. Después de la adición inicial de  $\text{NaBH}_4$  y una vez que la mezcla anterior se encontraba a temperatura entre 0 y 5 °C se adicionaron 10 mL (322.5 mmol) de metanol (MeOH), dejando en agitación, con baño de hielo aproximadamente 2 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente. En la tercera adición de  $\text{NaBH}_4$  se agregaron, también, 5 mL (161.25 mmol) de MeOH. Al término de la reacción, la mezcla se vertió sobre 2 L de agua a temperatura ambiente. El producto crudo que precipitó se obtuvo por filtración al vacío, se lavó con agua fría varias veces, obteniendo 2.8695 g de un sólido amorfo de color ligeramente crema, con un rendimiento de 57 %. Una vez seco, el producto anterior se colocó en 100 mL de acetona y dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, posterior a las cuales, la suspensión se separó por filtración al vacío para obtener un sólido amorfo de color blanco con un rendimiento de 50 %. El producto **1**, presentó:  $R_f = 0.47$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15),  $R_f = 0.30$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  90:10) y p.f. > a 380 °C con descomposición.

**4.2.2. Síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxycarbonilamino-1H-benzimidazol (2)<sup>77</sup>**

En un matraz bola de 100 mL acondicionado con trampa anhidra, se colocaron 297 mg (1 mmol) de **1**, 40 mL de acetato de etilo, 0.3 mL (3 mmol) de anhídrido acético y 0.05 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Al realizar c.c.f. de la reacción en el sistema  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  90:10, se observaron dos productos, uno en menor proporción con  $R_f = 0.27$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  90:10) y otro mayoritario, con  $R_f = 0.48$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  90:10). Se adicionó a la mezcla de reacción, 40 mL de acetato de etilo y 20 mL de agua y se separaron las fases. La fase orgánica se extrajo con una solución acuosa de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  al 5 % (3 x 20 mL), posteriormente se lavó con 20 mL de agua, secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y concentró a sequedad en el rotavapor. Se obtuvieron 310 mg (91.4 %) de un sólido amorfo de color blanco que por c.c.f. se presentaba como un solo producto. El sólido crudo se recrystalizó de etanol dando lugar a un producto amorfo de color blanco con un rendimiento de 85 %. El producto **2** presentó:  $R_f = 0.48$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  90:10) y p.f. = 153-154 °C.



Esquema 15. Ruta sintética del derivado biorreversible (R)(S) (5)(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol , (2).

### 4.3. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Giardia lamblia*

Para las pruebas de susceptibilidad se empleó la cepa de *Giardia lamblia* IMSS: 0989:1, la que se mantuvo en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 modificado, adicionado con suero de ternera descomplementado al 10 %.

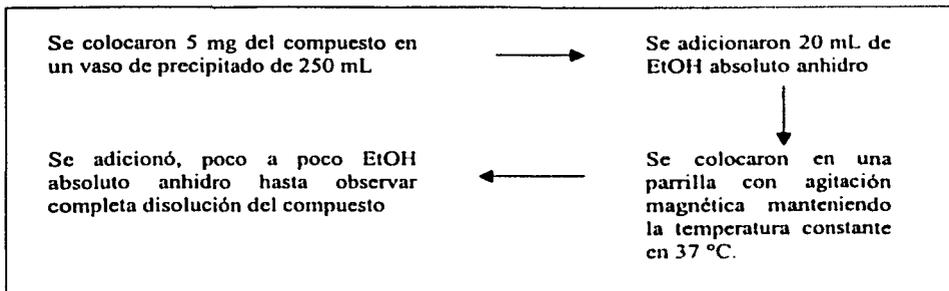
Los parásitos se subcultivaron 2 veces por semana. Se empleó el método de subcultivo previamente estandarizado (Cedillo Rivera R. *Et al*, 1992):  $1.6 \times 10^6$  trofozoitos/mL de *Giardia lamblia*, se incubaron por 48 horas a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes del Mebendazol y compuesto 1 (0.05, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 µg/mL), además del Albendazol y Metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia. Como control negativo se emplearon trofozoitos en medio libre de compuestos. Después de la incubación se inocularon 50 µL de los trofozoitos tratados, en medio fresco, sin la adición de los compuestos y se incubaron por otras 48 horas.

El número final de trofozoitos se determinó en un cámara cuenta glóbulos. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit se calculó la CL<sub>50</sub> que correspondió a la concentración que inhibió al 50 % el crecimiento de trofozoitos. Los experimentos se efectuaron por triplicado y se repitieron en tres ocasiones.<sup>17</sup>

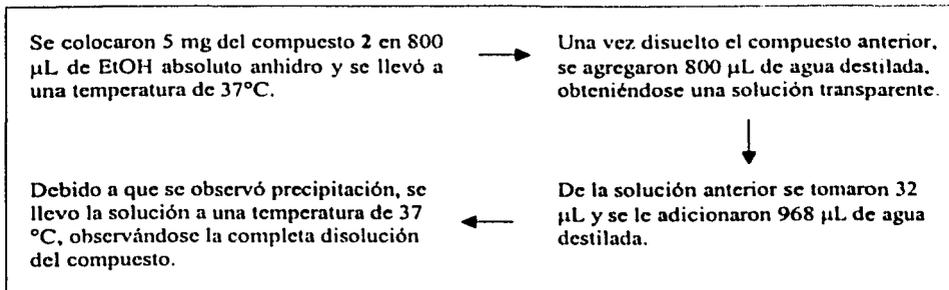
### 4.4. Determinación de solubilidad.

Debido a que el Mebendazol y su metabolito hidroxilado (1), son completamente insolubles en agua, no fue posible determinarles su solubilidad acuosa, por lo que se utilizó un disolvente polar, etanol (EtOH), para con ello determinar su solubilidad en medios polares ya que al adicionarles pequeñas cantidades de agua precipitaban por completo. El procedimiento experimental se presenta en el Esquema 16.

Para el caso del derivado biorreversible (2), la determinación de su solubilidad acuosa se llevó a cabo disolviendo inicialmente la mínima cantidad de 2 en EtOH absoluto anhidro y posteriormente se agregó agua observando que no presentaba precipitación. El procedimiento experimental se ilustra en el Esquema 17.



Esquema 16. Procedimiento experimental para la determinación de la solubilidad del Mebendazol y de su metabolito hidroxilado en EtOH.



Esquema.17. Procedimiento experimental para la determinación de solubilidad del compuesto 2 en H<sub>2</sub>O/EtOH.

#### 4.5. Evaluación de la estabilidad del derivado biorreversible frente a enzimas.

Para poder evaluar la estabilidad del derivado biorreversible se realizaron diferentes determinaciones que se explican a continuación.

##### 4.5.1. Determinación de espectros en la región ultravioleta.

Se registraron los espectros de absorción de los compuestos 1 y 2, en la región ultravioleta, con la finalidad de conocer si presentaban diferentes  $\lambda$  máximos de absorción y de esta manera monitorear la cinética de degradación del derivado biorreversible frente a las enzimas. Para lo anterior se prepararon soluciones de ambos compuestos en EtOH absoluto anhidro con una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  para el compuesto 1 y 50  $\mu\text{g/mL}$  para el compuesto

**2**, las cuales se corrieron en el espectrofotómetro determinando su absorbencia de 200 y 400 nm. Debido a que ambos compuestos presentan muy pocas diferencias en sus  $\lambda$  máximos de absorción no fue posible cuantificar la estabilidad de **2** por esta metodología. Por lo que se recurrió a utilizar cromatografía en capa fina

#### **4.5.2. Evaluación de estabilidad del derivado biorreversible en presencia de enzimas y soluciones amortiguadoras, mediante cromatografía en capa fina.**

Para llevar a cabo la evaluación de la estabilidad del derivado biorreversible en presencia de las enzimas esterasa y tripsina, primeramente se evaluó la actividad de dichas enzimas en presencia de sustratos conocidos, en el caso de la esterasa se utilizó el Acetato de 4-nitrofenol y en el caso de la tripsina se utilizó *N* $\alpha$ -Benzoil-DL-arginato de 4-nitroanilida.

##### **4.5.2.1. Evaluación de la actividad de la enzima esterasa mediante la hidrólisis del acetato de 4-nitrofenol.<sup>78</sup>**

Se utilizó la enzima esterasa de hígado de cerdo adquirida comercialmente (Aldrich, Co.), como fuente de enzimas hidrolasas. La evaluación se llevó a cabo, como se detalla a continuación:

- 1) Se pesaron 18.1 mg de Acetato de 4-nitrofenol y se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo. Enseguida se agregaron lentamente 10 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 100 mL (concentración final 1mM).
- 2) Un volumen de 1.8 mL de la solución anterior se depositó en un tubo eppendorf y se añadieron 0.1 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 o bien 0.1 mL de solución amortiguadora de acetatos pH = 5.0. Posteriormente se adicionó 0.1 mL de solución de enzima esterasa.
- 3) Las muestra problema se comparó con un control el cual contenía 1.9 mL de solución de Acetato de 4-nitrofenol y 0.1 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 o bien 0.1 mL de solución amortiguadora de acetatos pH = 5.0.
- 4) La hidrólisis del Acetato de 4-nitrofenol se observa espontáneamente por la presencia de un color amarillo en el tubo problema y al ausencia de color en el tubo control. Indicando actividad de la enzima a los pH 7.4 y 5.0

**4.5.2.2. Evaluación de la actividad de la enzima tripsina mediante la hidrólisis de  $N\alpha$ -Benzoil-DL-Arginato de 4-nitroanilida.<sup>79</sup>**

Se utilizó la enzima tripsina de páncreas de cerdo adquirida comercialmente (Sigma.). La evaluación se llevo a cabo , como se detalla a continuación:

- 1) Se pesaron 43.5 mg de  $N\alpha$ -Benzoil-DL-arginato de 4-nitroanilida (BAPA) y se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo. Enseguida se agregaron lentamente 10 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 100 mL (concentración final 1mM).
- 2) Un volumen de 1.8 mL de la solución anterior se colocó en un tubo eppendorf y se añadieron 0.1 mL solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M con 0.02 M  $CaCl_2$  a pH 8.2. Posteriormente se adicionó 0.1 mL de solución de enzima tripsina.
- 3) La muestra problema se comparó con un control el cual contenía 1.9 mL de solución de  $N\alpha$ -Benzoil-DL-arginato de 4-nitroanilida y 0.1 mL de solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M con 0.02 M  $CaCl_2$  a pH 8.2.
- 4) La hidrólisis de  $N\alpha$ -Benzoil-DL-Arginato de 4-nitroanilida se observó espontáneamente por la presencia de un color amarillo en el tubo problema y la ausencia de color en el tubo control. Indicando actividad de la enzima.

**4.5.2.3. Evaluación de la estabilidad del derivado biorreversible en presencia de la enzima esterasa o tripsina.<sup>78,79</sup>**

Para determinar la liberación de **1** a partir de **2**, se realizaron ensayos a dos diferentes valores de pH para cada enzima; para la esterasa se realizaron las determinaciones a pH 7.4 y pH 5.0 y para la enzima tripsina se realizaron a pH 4.0 y pH 1.0. Las cantidades a adicionar en tubos eppendorf de 2 mL, marcados como problema y control, se muestran en la Tabla 9.

Para cada determinación se utilizaron 8 tubos (4 controles y 4 muestras), los cuales se incubaron a una temperatura de 37 °C y con una velocidad de agitación de 1000 r.p.m.. Al tiempo determinado, se retiró de incubación y el volumen total se trasvasó a un tubo de ensayo de 13x100, al cual inmediatamente se adicionó 0.5 mL de acetato de etilo para extraer los compuestos **1** y **2**, la fase orgánica se analizó por cromatografía en capa fina utilizando como fase de elución  $CHCl_3/MeOH$  90:10 y como referencias los compuestos **1** y **2**, que presentan  $R_f = 0.30$  y  $R_f = 0.48$  respectivamente, en este sistema. El porcentaje de degradación de los compuestos se

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

apreció cualitativamente por la intensidad de las manchas obtenidas, ya que en todas las ocasiones se aplicó la misma cantidad de compuesto.

Tabla 9. Cantidades adicionadas para la evaluación de estabilidad del compuesto 2 frente a las enzimas esterasa y tripsina en soluciones amortiguadoras.

Solución adicionada (mL)	Tubo control Esterasa	Tubo problema Esterasa	Tubo control Tripsina	Tubo problema Tripsina
Volumen de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 o solución amortiguadora de acetatos pH = 5.0. <sup>a</sup>	1.9	1.8	-----	-----
Volumen de solución amortiguadora de acetatos pH = 4.0 o solución de HCl 0.1 N. <sup>b</sup>	-----	-----	1.9	1.8
Volumen de solución de enzima esterasa. <sup>c</sup>	-----	0.1	-----	-----
Volumen de solución de enzima tripsina. <sup>c</sup>	-----	-----	-----	0.1
Volumen de solución de 2 0.5 mg/mL en EtOH	0.1	0.1	0.1	0.1

<sup>a</sup> La solución a adicionar depende del pH necesario para llevar a cabo cada determinación en presencia de la enzima esterasa.

<sup>b</sup> La solución a adicionar depende del pH necesario para llevar a cabo la determinación en presencia de la enzima tripsina.

<sup>c</sup> La solución de enzima se realizó con la solución amortiguadora necesaria en cada determinación.

5. RESULTADOS

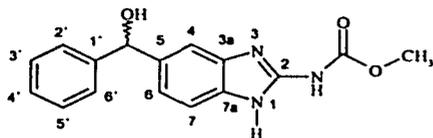
Los resultados se presentan a continuación, en el orden en que se llevaron a cabo los procedimientos experimentales, posteriormente en el capítulo siguiente se presenta la discusión relacionada.

5.1. Síntesis del derivado biorreversible

En las Tablas 10 y 11 se presentan los resultados de Espectroscopia Infrarrojo (IR), de Espectrometría de masas (EM), Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear protónica (<sup>1</sup>H RMN) y Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13 (<sup>13</sup>C RMN) para los compuestos 1 y 2, respectivamente.

Tabla 10. Datos espectroscópicos y espectrométricos asignados al compuesto 1

Compuesto	Datos Espectroscópicos
	Espectro 3: IR (KBr) $\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) 3563 (N-H), 3330(O-H), 1632 (NH-C=O), 1596 (C=C), 1278 (O=C-O), 1095 (C-O)
	Espectro 4: EM (FAB) $m/z$ 298 ([M+H] <sup>+</sup> , 45 %), $m/z$ 154 (100 %)
	Espectro 5a: <sup>1</sup> H RMN, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> $\delta$ 3.735 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); $\delta$ 5.746 (d, 1H, J=3.6, CH-OH); $\delta$ 5.819 (d, 1H, J=3.9, CH-OH); $\delta$ 7.079 (dd, 1H, $J_{ortho}$ = 8.1, $J_{meta}$ = 1.35, H-6); $\delta$ 7.167 (tt, 1H, $J_{ortho}$ = 7.2, $J_{meta}$ = 2.1, H-4'); $\delta$ 7.250-7.420 (m, 6H, H-4, H-7, H-2', H-3', H-5', H-6'); $\delta$ 11.758 (s, 2H, H-1, NH y NH-CO <sub>2</sub> )
	Espectro 6a: <sup>13</sup> C RMN, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> $\delta$ 52.375 (O-CH <sub>3</sub> ); $\delta$ 74.655 (CH-OH); $\delta$ 111.304 (C-7); $\delta$ 112.958 (C-4); $\delta$ 119.976 (C-6); $\delta$ 126.233 y $\delta$ 126.326 (C-2' y C-6'); $\delta$ 126.353 (C-4'); $\delta$ 127.487 y $\delta$ 127.954 (C-3' y C-5'); $\delta$ 134.812 (C-3a); $\delta$ 135.532 (C-7a); $\delta$ 139.014 (C-5); $\delta$ 146.285 (C-1'); $\delta$ 148.006 (C-2); $\delta$ 155.291 (NH-CO <sub>2</sub> )



(R)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-1H-bencimidazol (1)

FAB: Bombardeo de átomos rápidos.  $m/z$ : relación de masa carga. DMSO *d*<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado. S: singulete. d: doblete. dd; doble de dobles. tt: triplete de triples m: multiplete. J: constante de acoplamiento (Hz)

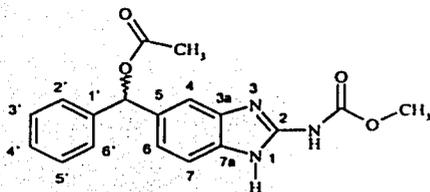
Tabla 11. Datos espectroscópicos y espectrométricos asignados al compuesto 2.

Compuesto	Datos espectroscópicos
-----------	------------------------

Espectro 7: IR (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)  
 3396 (N-H), 1733 (O-C=O), 1647(NH-C=O), 1600 (C=C), 1267 y 1229 (C-O)

Espectro 8: EM (IE)  
*m/z* 339 (M<sup>+</sup>, 66 %), *m/z* 247 (100 %)

Espectro 9: <sup>1</sup>H RMN, DMSO *d*<sub>6</sub>  
 $\delta$  2.137 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>);  $\delta$  3.760 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>);  $\delta$  6.866 (s, 1H, CH-O);  $\delta$  7.114 (dd, 1H, *J*<sub>orto</sub> = 8.1, *J*<sub>meta</sub> = 1.5, H-6);  $\delta$  7.253 (tt, 1H, *J*<sub>orto</sub> = 6.9, *J*<sub>meta</sub> = 1.5, H-4');  $\delta$  7.312-7.430 (m, 6H, H-4, H-7, H-2', H-3', H-5', H-6')  $\delta$  11.929 (s, 2H, NH y NH-CO<sub>2</sub>)



(*R*)-5(6)-(1-Acetoxy-1-fenil)metil-1*H*-  
 benzimidazol (2)

Espectro 10a: <sup>13</sup>C RMN, DMSO *d*<sub>6</sub>  
 $\delta$  21.024 (COCH<sub>3</sub>);  $\delta$  52.505 (O-CH<sub>3</sub>);  $\delta$  76.886 (CH-O);  $\delta$  112.343 (C-7);  $\delta$  113.552 (C-4);  $\delta$  120.355 (C-6);  $\delta$  126.453 (C-2' y C-6');  $\delta$  127.513 (C-4');  $\delta$  128.433 (C-3' y C-5'),  $\delta$  133.452 (C-5);  $\delta$  135.847 (C-3a);  $\delta$  136.179 (C-7a);  $\delta$  141.156 (C-1');  $\delta$  148.151 (C-2);  $\delta$  154.809 (NHCO<sub>2</sub>);  $\delta$  169.596 (COCH<sub>3</sub>)

IE: Impacto electrónico. *m/z*: relación de masa carga. DMSO *d*<sub>6</sub>, dimetilsulfóxido deuterado. S: singulete. d: doblete. dd, doble de dobles. tt: triplete de triples. m: multiplete. *J*: constante de acoplamiento (Hz)

En la Tabla 12 se puede observar los resultados de aspecto físico, rendimiento y constantes físicas para los compuestos 1 y 2.

Tabla 12. Aspecto, rendimiento y constantes físicas de los compuestos 1 y 2.

Compuesto	Aspecto físico	Rendimiento %	p.f. (°C)	<i>R<sub>f</sub></i>
1	Polvo blanco amorfo	50	> 380 <sup>a</sup>	0.47 <sup>b</sup> y 0.30 <sup>c</sup>
2	Polvo blanco amorfo	85	153-154	0.48 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Con descomposición

<sup>b</sup> Sistema CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15

<sup>c</sup> Sistema CHCl<sub>3</sub>/MeOH 90:10

**5.2. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Giardia lamblia***

En la Tabla 13 se presentan los resultados de la Concentración letal (CL) concentración que ocasiona disminución del 50 y el 90 % de la viabilidad de los trofozoitos CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> expresada como concentración letal 50 y concentración letal 90, en unidades micro molar (µM)

Tabla 13. Resultados de pruebas de susceptibilidad *in vitro* de *Giardia lamblia*, en presencia del metabolito hidroxilado del Mebendazol, Mebendazol, Albendazol y Metronidazol

COMPUESTO	CL <sub>50</sub> (µM)	CL <sub>90</sub> (µM)	CL <sub>90</sub> /CL <sub>50</sub>
1	0.895	24.747	27.65
Mebendazol	0.203	0.440	2.17
Albendazol	0.037	0.075	2.02
Metronidazol	1.220	7.47	6.12

**5.3. Determinación de solubilidad.**

En la Tabla 14 se muestran los resultados de solubilidad para el Mebendazol y los compuestos 1 y 2. En cada caso se expresa si se utilizó únicamente etanol absoluto anhidro o una mezcla de agua con etanol absoluto anhidro.

Tabla 14. Solubilidad del mebendazol y de los compuestos 1 y 2, en medios polares.

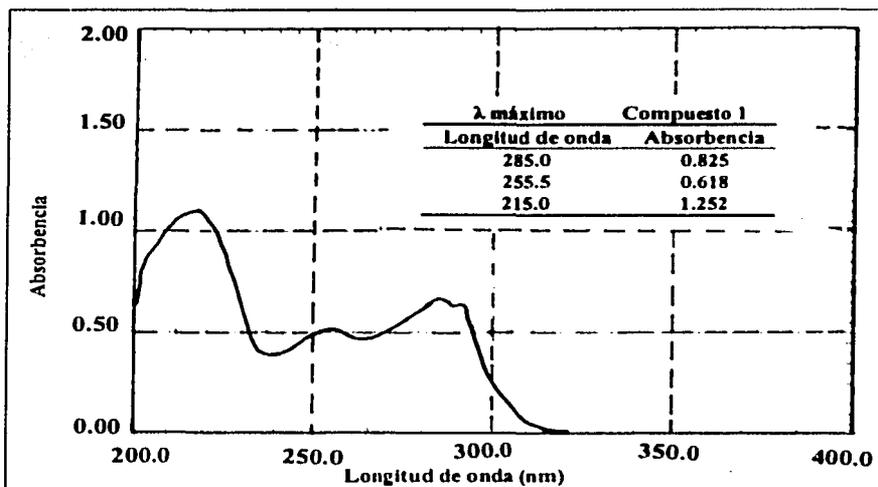
Compuesto	Solubilidad en medios polares (µg/mL)
Mebendazol	33.33 <sup>a</sup>
1	45.45 <sup>a</sup>
2	100.00 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> El disolvente utilizado fue EtOH absoluto anhidro.

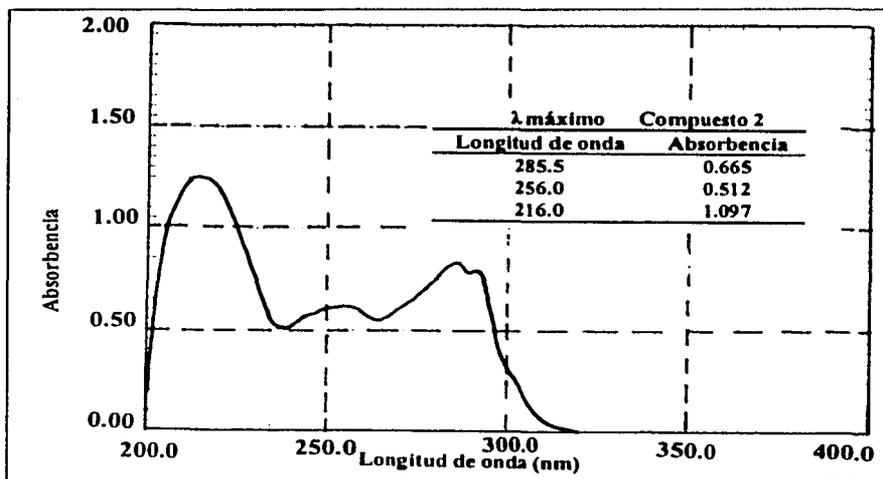
<sup>b</sup> El compuesto se disolvió en una solución de H<sub>2</sub>O:EtOH (30 25 1) o bien con 1.6 % de EtOH

**5.4. Evaluación de la estabilidad del derivado biorreversible.**

En los Esquemas 19 y 20 se presentan los espectros de absorción para los compuestos 1 y 2 obtenidos en una longitud de onda entre 200 y 400 nm. Además estos esquemas incluyen los valores de λ máximo de absorción para cada uno de los compuestos.

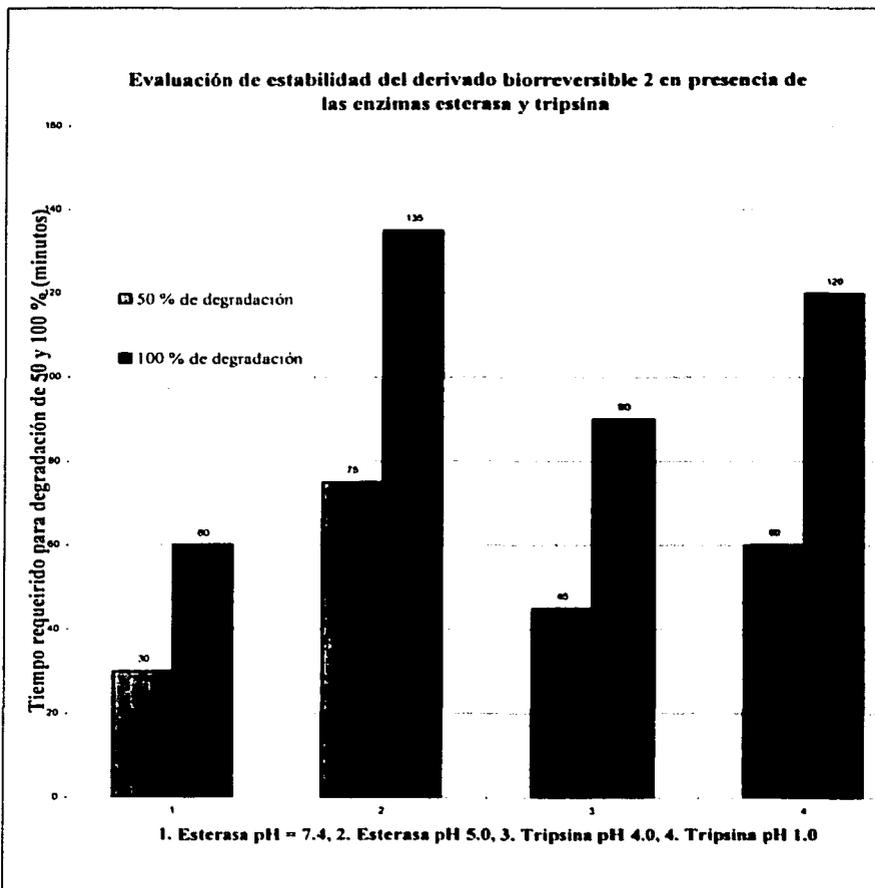


Esquema 18. Espectro de absorción en ultravioleta de *(R)(S)*-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-1*H*-bencimidazol (1) en EtOH.



Esquema 19. Espectro de absorción en ultravioleta de *(R)(S)*-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-1*H*-bencimidazol (2) en EtOH.

En el Esquema 20 se muestran los resultados cualitativos de la evaluación de estabilidad del derivado biorreversible (2) en soluciones amortiguadoras en presencia de las enzimas esterasa y tripsina obtenidas mediante cromatografía en capa fina



Esquema 20. Tiempo observado para la degradación del 50 y 100 % del derivado biorreversible (2) frente a las enzimas esterasa y tripsina. Sobre las barras se observa el tiempo requerido para la degradación.

**5.5. Determinación de Log P.**

En la Tabla 15 se presentan los valores teóricos de log P obtenidos mediante el programa computacional ACD Lab log P DB.

Tabla 15. Valores de log P teóricos, obtenidos con el programa ACD Lab log P DB

COMPUESTO	Log P
Mebendazol	2.42 ± 0.89
1	1.99 ± 0.62
2	2.88 ± 0.62

**6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS****6.1 Consideraciones para el diseño del derivado biorreversible**

El diseño se sustentó en varios aspectos, los cuales se mencionan a continuación:

- Se conoce que el principal metabolito del Mebendazol el 5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol (**1**), presenta en su estructura un grupo hidroxilo,<sup>30</sup> que permite utilizar cualquiera de las dos estrategias para el diseño de derivados biorreversibles hidrosolubles:<sup>70</sup>
  - a) La adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas y
  - b) La adición de un modificador para disminuir el punto de fusión.
- Para generar el metabolito de interés fue necesario llevar a cabo la reducción del grupo carbonilo presente en el Mebendazol dando lugar al respectivo alcohol secundario. Se espera que al llevar a cabo dicha reducción, el metabolito generado, presente similar actividad giardicida, ya que se tiene el conocimiento de que este metabolito también presenta actividad antihelmíntica,<sup>30</sup> partiendo del hecho de que ambas actividades se deben a mecanismos de acción similares (inhibición de la polimerización de tubulina para formar el microtubulo nuclear, afectando la división mitótica del microorganismo).<sup>9</sup>
- Se optó por sintetizar un derivado biorreversible del tipo estructural bipartita por ser el que presenta menor cantidad de pasos en la síntesis, ya que sólo se requiere la unión del fármaco (que en este caso es el metabolito hidroxilado del Mebendazol) y el modificador.<sup>43</sup>
- El derivado biorreversible propuesto es el acetilado del metabolito del Mebendazol, el cual presenta un enlace éster factible de ser hidrolizado por las enzimas esterazas, específicamente carboxilesterazas, presentes en las células de la mucosa intestinal (enterocitos).<sup>74</sup>
- El derivado biorreversible deberá presentar un tiempo de estabilidad en soluciones acuosas mayor a 3 horas (el tiempo de tránsito del intestino delgado es de 3.5 a 4.5 horas), para que al alcanzar dicha zona se encuentre en forma estructuralmente íntegra.<sup>80</sup>
- Se espera que el derivado biorreversible alcance la parte superior del intestino delgado (duodeno), y una vez en este lugar se solvate en la fase acuosa luminal y posteriormente alcance la mucosa intestinal difundiendo a través de las capas presentes en dicha zona, como se muestra en el Esquema 12,<sup>73</sup> alcanzando, de esta manera al sitio de acción del

compuesto, mucosa de duodeno y yeyuno, específicamente. Al momento de llegar a esta capa intestinal, el derivado biorreversible podrá ser hidrolizado por las carboxilesterasas presentes en el espacio intersticial (las cuales provienen del citoplasma de los enterocitos y fueron liberadas después del daño celular ocasionado al implantarse *Giardia lamblia* en dicha región), mecanismo propuesto para la liberación del fármaco a partir del derivado biorreversible como se ilustra en el Esquema 13.<sup>74</sup> Una vez que el principio activo se encuentre en solución, es posible que pueda entrar al interior del microorganismo a través de difusión pasiva y lleve a cabo su acción giardicida.

- En el caso de que el metabolito del Mebendazol presente baja actividad giardicida, se consideró que una vez que el derivado biorreversible llegue al sitio de acción, las enzimas esterases hidrolizaran el enlace ester de este derivado para originar el metabolito del Mebendazol. El grupo hidroxilo de dicho compuesto puede ser oxidado por los sistemas enzimáticos citocromo P-450, presentes en la mucosa intestinal, y de esta manera regenerar al Mebendazol.<sup>81</sup>

## 6.2. Síntesis del derivado biorreversible.

Para la síntesis del compuesto 1, necesario para la preparación del derivado biorreversible, se utilizó como materia prima Mebendazol, al cual se le determinó Espectro de Infrarrojo (Espectro 1) y Espectro de masas (Espectro 2), que correspondieron a los reportados en la literatura.<sup>82</sup> Todos los espectros se encuentran en el apartado denominado Apéndice. A continuación se discuten los resultados obtenidos durante la preparación de los compuestos 1 y 2

### 6.2.1 Síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (1).

Para la síntesis del compuesto 1, se empleó un método de reducción química con la utilización de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) como donador de hidruros, metanol ( $\text{MeOH}$ ) como donador de protones y dimetilformamida (DMF) como medio de reacción. La reacción es una adición nucleofílica de hidruro al grupo carbonilo del Mebendazol.<sup>75,76</sup>

Como se sabe el  $\text{NaBH}_4$  es un agente reductor suave y se puede utilizar con disolventes próticos tales como  $\text{MeOH}$ , aunque se debe de considerar que en esas condiciones se presenta una reacción secundaria entre el hidruro del  $\text{NaBH}_4$  y el protón del  $\text{MeOH}$  para generar

hidrógeno. Debido a que en nuestras condiciones de reacción el Mebendazol, no se encontraba completamente en solución, la reacción secundaria mencionada anteriormente se vio favorecida y por ello no fue conveniente utilizar como medio de reacción MeOH.<sup>75</sup> Una consideración adicional, en esta síntesis, es la adición de borohidruro y metanol a temperatura baja (baño de hielo), con la finalidad de disminuir la energía liberada al inicio de la reacción.

El MeOH es un reactivo primordial en esta reacción, como se pudo constatar cuando no se utilizó en nuestros primeros intentos de realizar la reducción, en los cuales la reacción no se llevó a cabo; esto es debido a que el protón del MeOH, ligeramente ácido  $pK_a = 15.2$ ,<sup>83</sup> protonó al oxígeno del carbonilo, provocando que el carbono sea más electrófilico, para el ataque del nucleófilo (ión hidruro), debido a que presenta una carga positiva parcial, situación que permite que la reacción avance;<sup>74</sup> al mismo tiempo el MeOH solubiliza ligeramente al Mebendazol favoreciendo el avance de la reacción.

Se optó por utilizar dimetilformamida como medio de reacción, debido a que el Mebendazol es ligeramente soluble en dicho disolvente, y el borohidruro de sodio es bastante soluble.<sup>84</sup> Esta escasa solubilidad del Mebendazol permitió que la poca cantidad que se encuentra en solución reaccione con el borohidruro para formar producto, ocasionando que el equilibrio de la reacción se desplace hacia una mayor disolución del Mebendazol, el cual se encontrará disponible para formación de más producto.



Lo anterior fue debido a que con otros disolventes tales como tetrahidrofurano, diclorometano, cloroformo, 2-propanol, etilenglicoldimetileter, éter dietílico, se intentó llevar a cabo la reacción sin observar ningún progreso y se atribuyó principalmente a la nula solubilidad del Mebendazol en estos disolventes.<sup>84</sup>

En un intento por aumentar la solubilidad del Mebendazol y de esta manera aumentar la velocidad de la reacción, se adicionó una pequeña cantidad de ácido fórmico (HCOOH), ya que se sabe que el Mebendazol es soluble en este disolvente,<sup>84</sup> pero tampoco hubo progreso en la reacción; lo mismo sucedió al adicionar ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). El origen de esta nula

reactividad puede ser debido a que el  $\text{NaBH}_4$  forma complejos acetoxiborohidruros con el ácido acético y fórmico, complejos a partir de los cuales no es posible que el hidruro pueda reaccionar con el grupo carbonilo del Mebendazol, debido a impedimento estérico ya que a que el carbonilo se encuentra entre el grupo fenilo y el bencimidazol; esto último se ha podido observar cuando se han hecho intentos por realizar reducciones estéreselectiva con  $\text{NaBH}_4$  en presencia de ácido acético, a partir de las cuales se ha logrado reducir el carbonilo de la acetofenona, no así el de la benzofenona.<sup>85</sup> Además la presencia de ácidos más fuertes que el  $\text{MeOH}$  ( $\text{RCOOH}$ ,  $\text{pK}_a \sim 4-5$ ),<sup>83</sup> provocaría una mayor formación de hidrógeno, por tener protones más disponibles para que reaccionen con el hidruro.

Una vez que concluyó la reacción, se utilizó agua para precipitar el producto. Al mismo tiempo se disuelven las sales de borato formadas,<sup>75</sup> así como se permitió separar la DMF. El sólido crudo que se obtuvo con un rendimiento del 57 %, presentó un color crema, por cromatografía en capa fina se observaron dos productos, uno en menor cantidad, el cual desapareció después de lavar con acetona. El compuesto **1** puro, se obtuvo con un rendimiento del 50 % (Tabla 12).

Con la finalidad de encontrar un método de reducción química que proporcionara un rendimiento más alto, se optó por utilizar tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), para mejorar el carácter reductor del borohidruro de sodio,<sup>86</sup> en presencia de dietilenglicoldimetiléter como disolvente, en este intento no se consiguió obtener el producto deseado y el fracaso se atribuye principalmente a la insolubilidad del Mebendazol en dicho disolvente, el cual permite solubilizar ampliamente al  $\text{NaBH}_4$ . Por otra parte, se buscó obtener el compuesto **1**, utilizando formiato de amonio y paladio sobre carbono al 10 % en metanol,<sup>87</sup> obteniendo al parecer un producto originado por la reducción del grupo carbamato o bien la reducción de la cetona hasta metileno, pero que no es posible asegurarlo debido a que no se caracterizó. Otro intento consistió en utilizar zinc metálico en medio básico, proporcionado por hidróxido de sodio, utilizando como disolvente etanol, basándonos en el método de reducción del carbonilo de la benzofenona,<sup>88</sup> los resultados obtenidos no proporcionaron el compuesto **1** y el compuesto obtenido mediante esta reacción se descompuso al exponerlo a la luz.

Por otra parte cuando se determinó el punto de fusión de **1**, se observó descomposición a 380 °C. Resultó lógico lo observado puesto que en este compuesto el hidroxilo contribuye en mayor proporción a la formación de puentes de hidrógeno, en comparación con el carbonilo del

Mebendazol, cuyo punto de fusión es de 288.5.0 °C.<sup>84</sup> La presencia del hidroxilo origina que se requiera una cantidad de energía adicional para provocar la fusión del compuesto I.

Debido a lo anterior, se decidió llevar a cabo la acetilación del hidroxilo del compuesto I, con la finalidad de abatir su punto de fusión,<sup>70</sup> y al mismo tiempo sintetizar un derivado biorreversible.

A continuación se detallan los datos Espectroscópicos y Espectrométricos que permitieron caracterizar y corroborar la síntesis del compuesto I

- En el Espectro de Infrarrojo en KBr del compuesto I (Espectro 3), la señal que permitió determinar que se llevó a cabo la reducción, es la banda ancha en 3330  $\text{cm}^{-1}$  que se asignó al hidroxilo (O-H), además de la desaparición de la banda en 1731  $\text{cm}^{-1}$  que se presentó en el espectro del Mebendazol (Espectro 1),<sup>82</sup> correspondiente al carbonilo de la cetona. Las señales adicionales presentes en el Espectro 3 son similares a las presentadas en el Mebendazol, la banda en 3563  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al amino (N-H) así como la banda en 1632  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del carbamato (NH-C=O), que permanece sin cambio, indicándonos que no hubo reducción del carbonilo del carbamato.
- Referente al Espectro de masas del compuesto I (Espectro 4), debido a que este compuesto presentó un punto de fusión bastante alto (más de 380 °C), no fue posible determinar su peso molecular por impacto electrónico o ionización química, ya que en ambos casos es necesario volatilizar al compuesto para realizar cromatografía de gases. Por lo cual su peso molecular se determinó mediante FAB (Bombardeo de átomos rápidos),<sup>89</sup> donde se utilizó como matriz alcohol-3-nitrobencílico. En el espectro 4 se presentó una señal en  $m/z$  298 con una intensidad del 45 % y se asignó a  $[M + H]^+$ , es decir el ión molecular protonado, por lo tanto se corroboró el peso molecular del compuesto I que es 297, ya que como se puede mostrar, no corresponde a ninguna de las señales originadas por el espectro de masas de la matriz utilizada en FAB, Alcohol 3-nitrobencílico, cuyo espectro de masas, se presenta en el Apéndice (Espectro 14).
- En relación al Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica del Compuesto I (Espectros 5a), se observaron entre 5.740 y 5.826 ppm, dos dobletes, cada uno de los cuales integró para 1 protón, y se asignaron al grupo CH-OH; el doblete centrado en 5.746 ppm se asignó al hidrógeno del metino y presentó  $J = 3.6$  Hz, se acopló con el protón presente en el hidroxilo, acoplamiento que desapareció al intercambiar el protón del

hidroxilo con agua deuterada produciendo un singulete en esta señal ( Espectro 5b); el doblete que apareció centrado en 5.819 ppm con  $J = 3.9$  Hz se asignó al protón del hidroxilo, como se observó al realizar el intercambio con agua deuterada (Espectro 5b), donde dicha señal disminuyó de intensidad, debido al intercambio de este protón por deuterio. La constante de acoplamiento en ambos casos presentó un valor muy cercano al reportado teóricamente (CH-OH,  $J \sim 4-5$  Hz).<sup>90</sup> Los desplazamientos obtenidos por estos protones permitieron corroborar la formación del alcohol secundario a partir de la reducción del grupo carbonilo de cetona en el Mebendazol. El singulete en 3.735 ppm que integró para 3 protones se asignó al metoxilo (O-CH<sub>3</sub>) del grupo carbamato. El doble de dobles centrado en 7.079 ppm que integró para un protón con  $J_{orto} = 8.1$  Hz y una  $J_{meta} = 1.35$  Hz, se asignó al protón H-6. En 11.758 ppm se observó un singulete que integró para 2 protones, la señal se asignó a los protones de las dos aminas, la amina secundaria presente en el imidazol y la amina del carbamato NH-CO<sub>2</sub>, señal que desapareció al intercambiar los protones por deuterio (Espectro 5b). Se observó un triplete de triplete centrado en 7.167 ppm, con  $J_{orto} \sim 7.2$  ppm y  $J_{meta} \sim 2.1$  ppm, señal que integró para un protón y que se asignó al protón H-4' y cuyas constantes de acoplamiento no son iguales en ambos lados por no ser equivalentes los protones con los que se acopló este protón. Entre 7.250 y 7.420 se presentó un multiplete que integró para 6 protones, por el valor de los desplazamientos estas señales se asignaron a los protones aromáticos: H-4, H-7, H-2', H-3', H-5' y H-6'.

- Respecto al espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono (Espectro 6a y 6b), en 52.375 ppm se presentó la señal que se asignó al carbono del metoxilo O-CH<sub>3</sub>; en 74.655 ppm se presentó una señal que se asignó al carbono presente en el CH-OH, señal que nos permitió confirmar la reducción realizada. Las señales en 111.304 ppm, 112.858 ppm y 119.978 ppm se asignaron a los C-4, C-7 y C-6 respectivamente, basadas en desplazamientos teóricos. Las señales entre 126.233 ppm y 127.954 ppm, se asignaron a los carbonos presentes en el fenilo, también en base a desplazamientos teóricos, en este caso se puede observar que debido a la presencia de un grupo que cede densidad electrónica (CH-OH), los C-2' y C-6' y los C-3' y C-5' no presentan desplazamientos completamente iguales, además es posible decir que los carbonos C-2' y C-6', se presentan a valores de desplazamiento más bajos que los carbonos C-3' y C-5', porque se

encuentran más cerca del grupo que cede densidad electrónica. Las señales en 134.815 ppm y 135.559 ppm se asignaron a los carbonos cuaternarios C-3a y C-7a respectivamente, ya que son señales de menor intensidad. La señal en 139.014 ppm se asignó al C-5 y la señal en 146.285 ppm se asignó al C-1', la señal en 148.006 ppm se asignó al carbono C-2 y la señal en 155.292 ppm se asignó al carbonilo del grupo carbamato (NH-CO<sub>2</sub>).

### 6.2.2. Síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol (2)

La reacción de acetilación del hidroxilo del compuesto 2 se llevó a cabo con anhídrido acético, un reactivo que resulta ser muy accesible y barato, utilizando como medio de reacción acetato de etilo, disolvente en el cual el compuesto 1 es ligeramente soluble, y como catalizador ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La reacción que se realizó es una sustitución nucleofílica en carbono sp<sup>2</sup>, en este caso el nucleófilo entrante es el hidroxilo del compuesto 1, el cual sustituyó al ión acetato que se eliminó como grupo saliente. El ácido sulfúrico en esta reacción se utilizó como catalizador debido a que tiene la capacidad de protonar el carbonilo del anhídrido acético para hacerlo más electrófilico y de esta manera reacciona a mayor velocidad con el alcohol (nucleófilo).<sup>77</sup> La reacción se intentó realizar en ausencia de ácido sulfúrico observándose que no se llevaba a cabo después de 72 horas.

Una vez que la reacción había concluido se obtuvieron dos productos uno de los cuales presentaba un  $R_f = 0.27$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 90:10). Este producto desapareció después de lavar con agua la mezcla de reacción y posterior neutralización del ácido generado, con solución acuosa de carbonato de potasio al 5 %. El producto que desaparece puede ser el generado por la acetilación del imidazol, reacción que produce una amida, que se tiene como antecedente, se hidroliza fácilmente en presencia de agua.<sup>59</sup> El producto crudo se obtuvo al concentrar la fase orgánica tratada mediante extracciones con carbonato de potasio al 5 %, se recristalizó de EtOH, proporcionando el compuesto 2, con un rendimiento del 85 %.

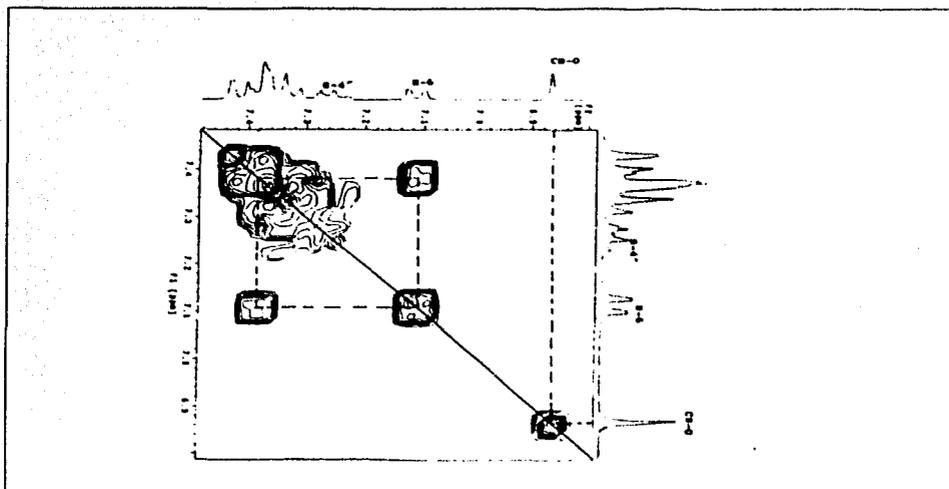
El compuesto 2, presentó un punto de fusión de 154 °C (Tabla 12), mostrando que se consiguió el objetivo de abatir el punto de fusión del compuesto 1, mediante este derivado acetilado, ya que el compuesto 1 presentó un punto de fusión mayor a 380 °C. Al mismo tiempo, el compuesto 2 se considera derivado biorreversible del metabolito hidroxilado del Mebendazol.

La acetilación en el grupo OH de **1** se puede corroborar por los datos Espectroscópicos y Espectrométricos que se explican a continuación:

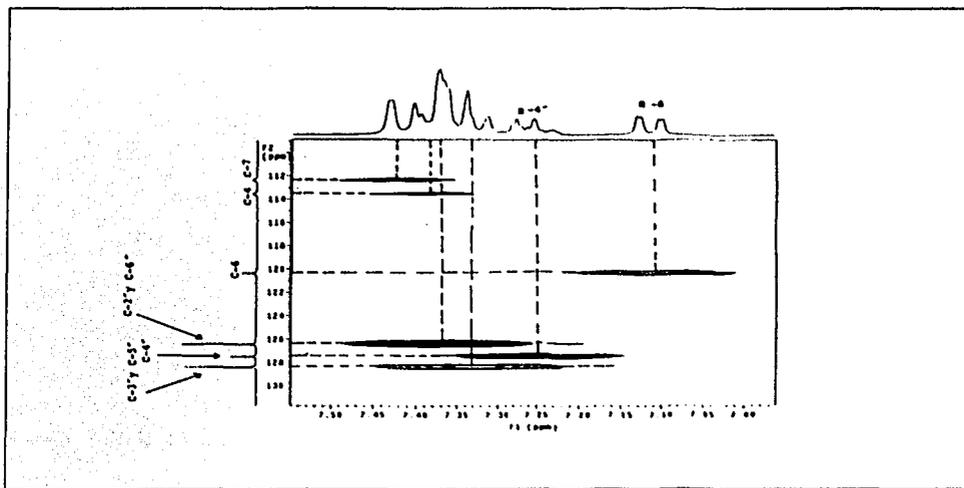
- En el Espectro Infrarrojo en KBr para el compuesto **2** (Espectro 7), se presentó una banda en  $1733\text{ cm}^{-1}$  y se asignó al carbonilo del acetilo ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ), señal que no se encontró presente en el Espectro Infrarrojo del compuesto **1** (Espectro 3). La presencia de esta banda, indicó que en este compuesto existe un grupo acetilo. Las bandas adicionales encontradas en este espectro, indican que los grupos funcionales presentes en el compuesto **1** y Mebendazol, se presentan en el compuesto **2**.
- Respecto al Espectro de Masas por impacto electrónico (IE) del compuesto **2** (Espectro 8), se observó  $m/z$  339 para el ión molecular con una intensidad de 66 %. La señal en  $m/z$  280,  $[\text{M}-59]^+$  se originó por la pérdida del acetoxi o bien del  $\text{O}=\text{COCH}_3$ , del carbamato. El pico base (100 %) del espectro es  $m/z$  247,  $[\text{M}-92]^+$ .
- Referente al Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica del compuesto **2**, (Espectro 9), en 2.137 ppm se presentó un singulete que integró para 3 protones y se asignó al metilo del acetilo ( $\text{O}=\text{CCH}_3$ ); en 3.760 ppm se presentó otro singulete que integró para 3 protones y se asignó al metoxilo ( $\text{O}-\text{CH}_3$ ) presente a campo bajo por estar unido directamente a un átomo electronegativo, oxígeno; en 6.866 ppm se presentó un singulete que integró para 1 protón y se asignó al metino unido al acetoxi ( $\text{CH}-\text{OC}=\text{O}$ ); se presentó un doble de dobles centrado en 7.114 ppm, con  $J_{\text{orto}} = 8.1\text{ Hz}$  y  $J_{\text{meta}} = 1.5\text{ Hz}$ , integró para un protón y se asignó como H-6, en el espectro COSY (correlación  $^1\text{H}-^1\text{H}$  a un enlace de distancia), Espectro 11b, y cuya ampliación se muestra en el Esquema 21, se observa que el H-6 se acopló con los protones presentes cerca de 7.4 ppm, teóricamente se acopló con los protones H-4 (acoplamiento meta) y H-7 (acoplamiento orto), pero no es posible designar cada uno de estos protones debido a que presentan desplazamientos muy cercanos; se observó un triple de triples centrado en 7.253 ppm,  $J_{\text{orto}} \sim 6.9\text{ Hz}$  y  $J_{\text{meta}} \sim 1.5\text{ Hz}$ , se asignó al H-4'; Entre 7.312 y 7.430 se observó un multiplete que integró para 6 protones y se asignó a los protones aromáticos: H-4, H-7, H-2', H-3', H-5' y H-6, sobre la base de desplazamientos teóricos, ya que con el Espectro COSY (Espectro 11b) no es posible designar acoplamiento entre estos protones aromáticos por la cercanía de los desplazamientos producidos; el singulete que se presentó en 11.929 ppm integró para 2

protones, los cuales se asignaron a la amina secundaria presente en el imidazol y la amina del grupo carbamato (NH-CO<sub>2</sub>).

- En el Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (Espectro 10a y 10b), la señal en 21.024 ppm se asignó al metilo del acetoxi (O=CCH<sub>3</sub>); la señal en 52.505 ppm se asignó al metoxilo (O-CH<sub>3</sub>); la señal en 76.886 se asignó al metino unido al acetoxi (CH-OC=O); en todos los casos las señales asignadas correlacionaron con los respectivos protones designados en dichos carbonos, como se muestra en el espectro HETCOR (correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a un enlace de distancia, Espectro 12a), el cual se presenta ampliado en el Esquema 22; la señal en 112.343 ppm se asignó al C-7 y la señal en 113.552 ppm se asignó al C-4, ya que ambos carbonos correlacionaron con los protones aromáticos como se muestra en el espectro HETCOR; la señal en 120.355 ppm se asignó al C-6, debido a que en el Espectro HETCOR correlacionó con el doble de doble asignado al protón en este carbono; la señal en 126.453 ppm se asignó a los C-2' y C-6', debido a que la señal es intensa y al parecer se debe a dos carbonos simétricos, además de que en el Espectro HETCOR, esta señal correlacionó con la señal producida por los protones aromáticos presentes cerca de 7.37 ppm; la señal en 127.513 ppm se asignó al C-4', ya que como se puede ver en el Espectro HETCOR correlaciono con el triple de triple asignado al protón H-4'; la señal en 128.847 ppm se asignó a los C-3' y C-5' de manera similar a la asignación a los C-2' y C-6'; la señal en 135.847 ppm se asignó al C-3a y la señal en 136.179 ppm al C-7a, como se muestra en el espectro HETCOR, ambas carbonos no correlacionaron con ningún protón indicando carbonos cuaternarios, lo cual también se apoya en la intensidad de la señal producida (poca intensidad); la señal en 154.809 ppm se asignó al carbonilo el grupo carbamato, desplazamiento similar al designado para el mismo carbonilo presente en el compuesto **1** y al correspondiente en el Mebendazol;<sup>82</sup> la señal en 169.596 ppm se asignó al carbonilo presente en el grupo acetoxi (O-COCH<sub>3</sub>), como se muestra en el espectro HETCOR, este carbono no correlacionó con ningún protón.

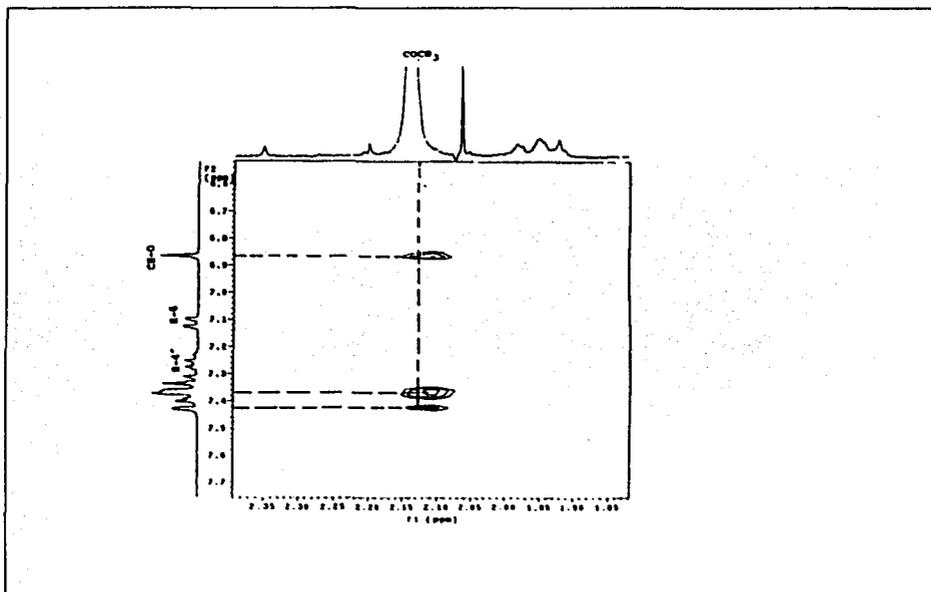


Esquema 21. Espectro bidimensional COSY, del compuesto 2.

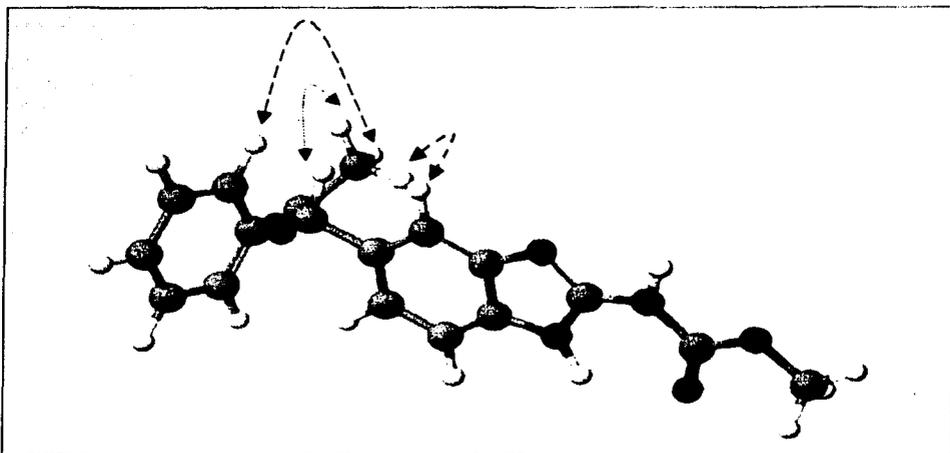


Esquema 22. Espectro bidimensional HETCOR del compuesto 2.

- Respecto al Espectro NOESY (correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , debido a interacciones espaciales) designado como Espectro 13, presenté en el Esquema 23, se mostró que el protón del metino unido al acetoxi ( $\text{CH-OC=O}$ ), en 6.866 ppm, correlacionó con los protones presentes en el metilo del acetilo ( $\text{O=CCH}_3$ ), en 2.137 ppm; dicha correlación se realiza a 5 enlaces de distancia y nos confirma que la acetilación se realizó en el hidroxilo y no en el imidazol, que también es nucleófilico. La interacción que se presenta entre estos protones se puede observar en el Esquema 24, en el cual se presenta la estructura tridimensional del compuesto 2. A partir del Esquema anterior es posible mostrar las interacciones que se realizan entre los protones aromáticos H-4 y H-2' con los protones del metilo del acetilo, interacción que también se puede observar en el Espectro NOESY del compuesto. Cabe aclarar, que para facilitar la representación, las flechas indican la interacción entre un protón específico del grupo metilo, pero dicha interacción se realiza con cualquiera de los protones del metilo, ya que son equivalentes.



Esquema 23. Espectro bidimensional NOESY, del compuesto 2.



Esquema 24. Representación tridimensional del compuesto (*R*)(*S*)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-1*H*-benzimidazol (2), en el que se muestra la interacción  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  que se observa en el Espectro NOESY (Espectro 13b). Las flechas indican los protones que se encuentran formando parte de la interacción.

### 6.3. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Giardia lamblia*

Respecto a la actividad giardicida del metabolito hidroxilado del Mebendazol (Compuesto 1), los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13. Estos resultados muestran que el compuesto 1 presentó menor potencia *in vitro* ( $\text{CL}_{50} = 0.895 \mu\text{M}$ ), contra *Giardia lamblia*, que el Mebendazol ( $\text{CL}_{50} = 0.203 \mu\text{M}$ ), y nos indican que para inhibir el crecimiento de la misma cantidad de trofozoítos se requiere una concentración mayor de 1 en comparación con la concentración del Mebendazol. En la misma Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos para el Albendazol y el Metronidazol; respecto al Albendazol se puede observar que muestra una mayor potencia giardicida, que el Mebendazol y el metabolito hidroxilado; con relación al Metronidazol, que es el medicamento de elección en el tratamiento de la giardiosis en la población mexicana, se muestra que resulta ser el menos potente que los compuestos analizados ( $\text{CL}_{50} = 1.220 \mu\text{M}$ ).

Por otra parte, el cociente  $CL_{90}/CL_{50}$  nos indica que tan alejados se encuentran los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ , considerando que lo ideal es presentar cocientes entre 1 y 2, ya que estos valores indican mayor eficacia del compuesto.<sup>91</sup> Los resultados presentados en la Tabla 14 muestran, por lo tanto que ninguno de los compuestos analizados presenta mayor eficacia que el Albendazol. A pesar de los resultados obtenidos, el compuesto 1 se puede utilizar como fármaco para la síntesis del profármaco del Mebendazol, debido a las consideraciones planteadas anteriormente en el diseño del derivado biorreversible (Apartado 6.1).

#### 6.4. Determinación de solubilidad

En la Tabla 14 se presentan los resultados de solubilidad obtenidos para el Mebendazol y los compuestos sintetizados. Debido a que el Mebendazol y el Compuesto 1 son completamente insolubles en agua, se determinó su solubilidad en un disolvente orgánico polar, etanol, para tener una aproximación de su solubilidad acuosa de manera indirecta. Los resultados obtenidos indican que el compuesto 1 presentó mayor solubilidad (45.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que el Mebendazol (33.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en etanol.

En la determinación de solubilidad del compuesto 2 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se utilizó como medio de disolución una mezcla de agua/etanol, en la cual el etanol se encontraba en muy poca cantidad (1.6%), concentración que nos hace estimar que el agua se encuentra en mayor proporción en la mezcla de disolventes. El resultado obtenido indica que el compuesto 2, presentó mayor solubilidad acuosa que el Mebendazol y el compuesto 1. Por lo que se puede decir que el objetivo de aumentar la solubilidad acuosa del Mebendazol a partir de la síntesis de un derivado biorreversible se cumplió, aunque el resultado obtenido no sea el establecido como meta al utilizar la estrategia de síntesis de derivados biorreversibles para incrementar la solubilidad acuosa, basada en la dosis, en la cual se plantea que el objetivo es obtener una solubilidad de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para el Mebendazol.

La solubilidad acuosa del derivado biorreversible (2), resulta sumamente importante, ya que al estar en solución en la mucosa de duodeno y yeyuno, será sustrato de las enzimas carboxilesterasas, liberando al compuesto 1, y de esta manera se tendrá una mayor concentración del compuesto en el espacio extracelular, provocando un gradiente de concentración entre el interior y exterior del microorganismo, facilitando la entrada del compuesto 1, o bien del Mebendazol, para tratar de igualar las concentraciones dentro y fuera de la membrana celular del parásito, llevando a cabo la acción giardicida.

### 6.5. Evaluación de estabilidad del derivado biorreversible (2).

En el Esquema 20 se presentan los resultados cualitativos de la evaluación del derivado biorreversible en presencia de las enzimas esterasa y tripsina, en soluciones amortiguadoras a dos valores de pH para cada enzima. En dicho Esquema se indica el tiempo necesario para la degradación del 50 y 100 % del derivado biorreversible en solución, apreciado cualitativamente mediante c.c.f. Se obtuvieron los mismos resultados en presencia y ausencia de enzima, indicándonos que el derivado biorreversible es inestable en soluciones acuosas independientemente del pH de la solución y de la enzima presente; lo anterior es debido a que la molécula de agua actúa como un nucleófilo, en pH ácido o básico, para hidrolizar el enlace ester presente en el derivado biorreversible. Además es posible apreciar que en ninguno de los casos analizados se logró alcanzar el tiempo de tránsito intestinal (3 horas) necesario para permitir que el derivado biorreversible alcance el sitio blanco en forma estructuralmente íntegra.<sup>80</sup>

Se estima que las enzimas no participaron en la hidrólisis del derivado biorreversible, debido a que el tiempo necesario para la hidrólisis total del derivado biorreversible, fue mayor al obtenido cuando se evaluó la actividad de las enzimas (sección 4.5.2.1. y 4.5.2.2.), en dichas evaluaciones se observó hidrólisis inmediata de los sustratos utilizados, esperándose ese mismo resultado en la evaluación del derivado biorreversible, ya que las determinaciones se realizaron con concentraciones similares de sustratos, derivado biorreversible y enzimas (cantidades equimoleculares), considerando que sean sustratos de estas enzimas.

Además, es posible apreciar a partir de los resultados obtenidos, que el derivado biorreversible sintetizado resultó ser más estable a pH 5.0 (135 minutos, 100 % de degradación) y menos estable a pH 7.4 (60 minutos, 100 % de degradación).

### 6.6. Determinación de log P.

En la Tabla 15 se presentan los valores de log P teóricos, obtenidos mediante el programa computacional ACD Lab Log P. Estas determinaciones teóricas se realizaron con la finalidad de estimar la liposolubilidad de los compuestos sintetizados, con el conocimiento que existe buena correlación entre los datos proporcionados por el programa y los obtenidos experimentalmente. El valor de log P experimental para el Mebendazol a pH 5.0 es de 2.83, este dato nos permite confirmar la aseveración antes mencionada, ya se encuentra entre el rango de resultado obtenido por el programa computacional, log P de 1.53 a 3.31.

La estimación de la liposolubilidad de un compuesto resulta importante cuando se desea conocer su capacidad para atravesar membranas biológicas (permeabilidad). En el presente trabajo este dato resulta importante debido a que una vez que el fármaco (Mebendazol o su metabolito) se sea liberado del profármaco y se encuentre en solución en el sitio blanco, es necesario que pueda atravesar la membrana plasmática de *Giardia lamblia* a través de transporte pasivo, para poder llevar a cabo la acción giardicida. La membrana plasmática de *Giardia lamblia*, al igual que la de la mayoría de los eucariotes, se encuentra constituida por componentes lipídicos (La evidencia actual sugiere que tal membrana es un mosaico fluido compuesto de proteínas embebidas en una bicapa lipídica) que la hacen impermeable al paso de sustancias hidrofílicas;<sup>92</sup> por lo cual resulta primordial que el fármaco con acción giardicida presente un balance entre sus propiedades hidrofílicas y lipofílicas. Como se mencionó en el Apartado 1.3.4.3., la velocidad con que difunda el fármaco a través de esta membrana plasmática dependerá del gradiente de concentración en ambos lados de la membrana, el cual influye de manera directamente proporcional,<sup>33</sup> factor que se considera resuelto en virtud de haber aumentado la solubilidad acuosa del Mebendazol a partir de su derivado biorreversible, el compuesto 2; por lo cual el aspecto a considerar a continuación es su liposolubilidad a través de los valores de log P obtenidos en forma teórica.

A partir de los resultados obtenidos, los cuales se presentan en la Tabla 15, se puede observar que tanto el compuesto 1 (log P = 1.37 a 2.61), como el compuesto 2 (log P 2.26 a 3.5), presentan valores de log P entre 1 y 3, lo cual sugiere que presentan una lipofilia adecuada para poder atravesar membranas biológicas a través de difusión pasiva, ya que dicho rango de valores de log P se ha establecido como una ventana óptima para absorción pasiva de fármacos.<sup>93</sup>

Cabe aclarar que en la determinación de log P teórica no se considera la ionización del compuesto a un determinado pH, es decir no se determina el valor del log  $D_{pH}$ . En el caso de los bencimidazoles este dato no es necesario ya que estos compuestos se encuentran en forma neutra a pH intestinal, por lo cual el valor de log P realmente está indicando su partición entre la membrana biológica y el medio extracelular acuoso.

Otro punto importante de aclarar, es que al utilizar la estrategia de abatir el punto de fusión para aumentar la solubilidad acuosa, se logró no disminuir la liposolubilidad del derivado biorreversible, como se muestra por los resultados obtenidos en la Tabla 15, en los cuales se muestra que el Mebendazol presentó un log P similar al del derivado biorreversible, situación que no se hubiera presentado al adicionar un grupo iónico o ionizable en condiciones fisiológicas.

### **6.7. Síntesis de un derivado biorreversible sobre la base de la estrategia adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas.**

Como se especificó en el Apartado 1.3.4.5.1. del capítulo de antecedentes, una de las estrategias para la síntesis de derivados biorreversibles hidrosolubles consiste en la adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas. El objetivo de sintetizar un derivado biorreversible sobre la base de esta estrategia no proporcionó buenos resultados. El modificador que se pretendía adicionar al metabolito hidroxilado del Mebendazol consistía en un aminoácido con un átomo quiral, L-alanina, el cual se encontraba protegido por del lado del grupo amino con el grupo protector t-BOC, es decir t-butoxicarbonilo  $[(CH_3)_3COCO]$ , permitiendo que únicamente se encontrara disponible el grupo carboxilo del alfa aminoácido y de esta forma se llevará a cabo una reacción de esterificación.

Los compuestos que se pretendían sintetizar se obtendrían en forma de diastereoisómeros. síntesis que al mismo tiempo permitiría la separación de la mezcla racémica, originada al sintetizar el metabolito del Mebendazol, debido a que los enantiomeros en la mezcla racémica presentan las mismas propiedades físicas tales como punto de fusión, presión de vapor, punto de ebullición, índice de refracción, densidad, espectros ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética nuclear. propiedades que no permiten su separación, en tanto que los diastereoisómeros presentan propiedades físicas diferentes, que facilitan su separación.<sup>94</sup>

Para poder llevar a cabo la formación del enlace ester se utilizaron dos agentes acoplantes, Carbonildiimidazol y Diciclohexilcarbodimida, con los cuales no se obtuvieron los resultados deseados.

## CONCLUSIONES

- La síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (1), principal metabolito del Mebendazol, se llevó a cabo mediante métodos químicos, obteniendo un 50 % de rendimiento. El compuesto sintetizado se caracterizó por sus constantes físicas (aspecto, p.f.,  $R_f$ , solubilidad), sus datos espectroscópicos y espectrométricos, los cuales en conjunto permitieron confirmar su estructura.
- Aunque el rendimiento, de la reacción anterior no fue alto, esta síntesis permitió preparar la materia prima para el derivado biorreversible del Mebendazol y debido a los intentos fallidos por llevar a cabo la síntesis mediante otros métodos, se puede decir que los resultados obtenidos fueron satisfactorios. Se sugiere la posterior optimización de la metodología de síntesis con la finalidad de aumentar el rendimiento y también disminuir el tiempo de reacción que probablemente influyo en el rendimiento.
- La síntesis de (R)(S)-5(6)-(1-Acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2), permitió obtener un derivado biorreversible del metabolito hidroxilado del Mebendazol, con un buen rendimiento (85%). Este compuesto también fue caracterizado por sus constantes físicas, datos espectroscópicos y espectrométricos, para corroborar su estructura.
- Respecto a la evaluación *in vitro* de la actividad giardicida del compuesto 1, podemos decir que el resultado obtenido no resultó del todo satisfactorio, debido a que presentó una potencia y eficacia menor a la del Mebendazol y Albendazol.
- Respecto a la actividad giardicida del derivado biorreversible, no fue posible realizarla, debido a que como se observó, resulta ser bastante inestable en soluciones acuosas, disolvente en el cual se llevan a cabo las diluciones del compuesto para colocarlo en los medios de cultivo en presencia de los trofozoítos de *Giardia lamblia*. A pesar de ello resulta importante determinar su actividad giardicida (*in vitro*), ya que por definición un

profármaco en un compuesto farmacológicamente inactivo y resulta necesario comprobar esta aseveración.

- Respecto a la solubilidad acuosa de los compuestos sintetizados, los resultados obtenidos nos muestran que el objetivo principal de este trabajo se consiguió, ya que se logró aumentar la solubilidad del Mebendazol, en gran proporción, a partir de la estrategia de profármacos, mediante la síntesis de un derivado biorreversible en base a la estrategia de adición de un modificador para abatir el punto de fusión.
- La utilización de la estrategia anteriormente mencionada, permitió mejorar la solubilidad acuosa del Mebendazol a partir de la síntesis del derivado biorreversible, y al mismo tiempo permitió mantener las características lipofílicas idóneas, consideración necesaria para que el agente giardicida pueda difundir al interior del microorganismo y de esta manera pueda ejercer su acción biológica.
- A pesar de haber mejorado la solubilidad acuosa del Mebendazol, a partir del derivado biorreversible, los resultados obtenidos indican que este último es un compuesto bastante inestable en soluciones acuosas, ya que la liberación del 100 % del metabolito hidroxilado se llevó a cabo en un tiempo mínimo de 60 minutos a pH 7.2 y en un tiempo máximo de 135 minutos a pH 5.0, resultados que nos indican que no es posible alcanzar la mucosa de duodeno y yeyuno, en condiciones óptimas, es decir estructuralmente íntegro, ya que se requiere mínimo 3 horas y media teóricamente.
- Se sugiere que este compuesto puede ser utilizado como un profármaco tópico, en alguna infección cutánea, ya que al administrarse de manera local, no necesita ser muy estable y con la misma humedad de la zona de aplicación puede dar lugar al fármaco y llevar a cabo su actividad antimicrobiana. Se debe de considerar realizar previamente la evaluación de actividad antimicrobiana del metabolito hidroxilado del Mebendazol, que en este caso sería el principio activo de interés.

- Como una consideración adicional, respecto al compuesto **1**, el cual se obtuvo como una mezcla racémica, la síntesis de uno de los enantiómeros se podría realizar mediante una reducción estereoselectiva, con la utilización de microorganismos en los cuales se encuentran sistemas enzimáticos que son estereoselectivos y estereoespecíficos, y pueden llevar a cabo la reducción del grupo carbonilo. Reacciones que permiten que se produzca sólo uno de los enantiómeros, el cual, posteriormente se puede evaluar para conocer si la actividad biológica se debe a alguno ellos, o bien se debe la mezcla racémica.
- El presente trabajo de tesis permitió utilizar una de las estrategias de la Química Farmacéutica, la optimización farmacocinética, en la cual se busca mejorar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos, en este caso su absorción, para con ello mejorar sus propiedades biológicas, tal como la actividad biológica, mediante la síntesis de un derivado biorreversible hidrosoluble con potencial actividad giardicida.

1. Gardner, T.B; Hill, D.R. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001, 14(1), 114-121.
2. Atlas, R.M. Survey of Fungi, algae and protozoa. En *Microbiology. Fundamentals and Applications*, 2ª Edición, Singapore, 1989, pp 336-337.
3. Romero, C.R. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. En *Microbiología y Parasitología Humana*, Editorial Médica panamericana, México D.F., 1999, pp 11, 586, 587, 604-778.
4. Brock, T.D.; Madigan, M.T. En *Microbiología*, 6ª Edición, Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, México D.F., 1993, pp 9, 887-890.
5. Lim, D.V. En *Microbiology*, Editorial West Publishing Company, New York, U.S.A., 1989, pp 42-42, 329.
6. <http://www.msu.edu/course/zol/316/glamyax.htm>
7. Thompson R.C.A.; Reynoldson J. A.. Giardia and Giardiasis. *Advances in Parasitology* 1993, 32, 70-131.
8. Faust, E. C.; Russel P. F. Protozoarios e infecciones por protozoarios. En *Parasitología Clínica*. Editorial Salvat, Barcelona, España, 1984, pp 16, 20, 35, 59-61.
9. Goodman y Gilman. Fármacos antiprotozoarios. En *Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica*, Editorial Medico Panamericana, México D.F., 1996, 2, pp 1017-1019. 1049-1060.
10. Brown, H.W; Neva, F. A. Protozoarios intestinales y lumbales. En *Parasitología Clínica*, 5ª Edición, Editorial Interamericana, México D.F., 1990, pp 46,48,49.
11. En centers for disease control and prevention. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/giardiasis.htm>. 12/07/2001.
12. Brown, D.M.; Upcroft, J.A.; Edwards, M.R. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *International Journal of Parasitology* 1998, 28, 149-164.
13. Tay, Z. J.; Lara, A. R.; Velasco, C. O.; Gutierrez, Q. M. Giardiasis. En *Parasitología Médica*. Mendez Editores, 1995, pp 77-82.
14. Markell, E. K.; Voge, M. Protozoos del lumen intestinal. En *Parasitología Médica*, 6ª Edición, Editorial Interamericana, 1990, pp 55.
15. Upcroft J.A.; Upcroft P. Future therapeutic alternatives for combating anaerobic protozoa. *Parasitology Today* 1998, 14, 212-214.
16. González De La Rosa, J.B.; Barbadillo, I. F.; Merino, A. J. M; Sánchez, M.J. Parasitosis Intestinales, Protocolo Diagnostico Terapéutico. *Boletín Pediátrico* 1999, 39 (168), 106-111.
17. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Medical Microbiology* 1992, 37, 221-224.

18. PLM Latina. <http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/productos/6305.ht>. 08/02/2002
19. Contrera, J.F.; Jacobs, A.C.; DeGeorge, J.J. Carcinogenicity testing and the evaluation of regulatory requirements for pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1997, 25, 130-145.
20. Horton, R.J. Bencimidazoles in a Wormy World. *Parasitology Today* 1990, 6 (4), 106
21. Townsend, L.B.; Wise, D.S. The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitology Today* 1990, 6 (4), 107.
22. Valdez, G.J. Diseño, síntesis y actividad biológica de 1-*H*-bencimidazoles. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 2000, pp 1-4.
23. Casi, T.; Cordero del Campillo, M.; Euzebey, J.; Gaafar, S. *Veterinary Parasitology*, 1988, 29 299-326.
24. Navarrete, V. J. G. Síntesis y actividad biológica de 2-(Trifluorometil)bencimidazoles. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 2000, pp 6-8.
25. Cedillo, R. R.; Chavez, B.; Martínez, P. A. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of The In vitro Effect of Benzimidazoles. *Journal Protozoology* 1992, 39 (4), 510-515.
26. Meloni, B. P.; Thompson, R. C. A.; Reynoldson, J. A.; Seville, P. Albendazole: a more effective antigardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1990, 84, 375-379.
27. Rodríguez, G. R.; Rodríguez, G. L. M.; Cruz, D. C. A. H. Eficacia y Seguridad de Mebendazol contra Nitazoxanida en el Tratamiento de *Giardia lamblia* en Niños. *Revista de Gastroenterología Mexicana* 1999, 64(3): 122-126.
28. Hernández, L. F.; Preparación de Derivados Hidrosolubles del Albendazol. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Farmacia), Facultad de Química, UNAM, 1999.
29. Singh, S.K.; Shawkat, N. S.; Sharma, S. Studies in Antiparasitic Agents: Part 8-Synthesis of 2-Substituted Amino-5(6)-Benzoylbenzimidazoles as Structural Analogs of Mebendazole Metabolites. *Indian Journal of Chemistry* 1988, 27B, 1015-1018.
30. Gottschall D.W.; Theodorides, V.J.; Wang, R. The Metabolism of Benzimidazole Anthelmintics. *Parasitology Today* 1990, 6 (4), 120, 121, 123, 124.
31. Lacey, E.; Watson, R. T. Structure-activity Relationships of Benzimidazole Carbanates as Inhibitors of Mammalian Tubulin, *in vitro*. *Biochemical Pharmacology* 1985, 34 (7), 1073-1077
32. Kesterson, J.W. Preclinical drug discovery and development. *En Clinical Drug Trial and Tribulations*. Allen E. Cato Edit. Marcel Dekker Inc. New York, 1988, pp 34, 17-49.
33. Rieley, Thomas N. The prodrug concept and new drug and development. *Journal Chemical Education* 1988, 65 (11), 947-953.

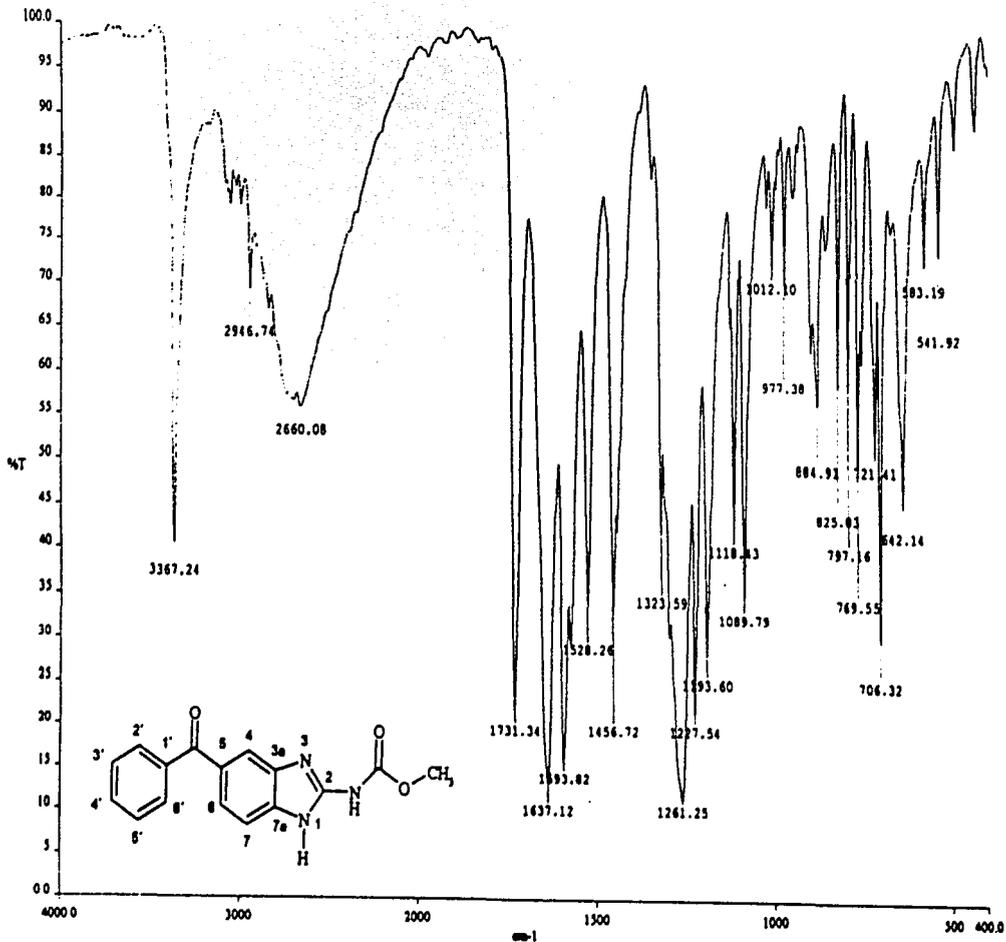
34. Sinkula, A.A.; Yalkowski, S.H: Rationale for Design of Biologically Reversible Drug Derivates: Prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1975, 64, 183-205.
35. Bundgaard H. Design and application of prodrug. En *a Textbook of Drug Design and Development*. Editado por Krosggaard-Larsen P., Bundgaard H. Harwood Academic Publishers, Great Britain, 1991, pp 173-191.
36. Kellway, I.W. The influency of formulation on drug availability. En *Introduction to the Principles of Drug Design*. Editado por Smith J., Williams H. Wrihth. Psg. Great Britain, 1983, pp 39-52.
37. Balant, L.P.; Doelker, E. Metabolic consideration in prodrug design. En *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. 5ª Edición, Editado por Manfred E. Wolf. John Wiley and Sons, Inc., USA., 1995, 1, pp 949-982.
38. Austel V. The medicinal chemist's approach. En *Modern Drug Research. Path to Better an Safe Drugs*. Editado por Connolly Martin. Medicinal Research Ser. Marcel Dekkerr, Inc., USA, 1989, 12, pp 266-307.
39. Lien E.J. Improvement of therapeutic agents by molecular modification. En *Sar. Side effects and Drug Design*, Medicinal Research Ser. Marcel Dekkerr, Inc., USA, 1987, 11, pp 25-38.
40. Sharma, S. Design of new drugs for helminth disease: lead optimization in benzimidazoles. En *Advances in Drug Research*, 1994, 25, pp 103-172.
41. Singh, S.K.; Sharma, S. Current Status of medicinal research in helminth disease, *Medicinal Research Reviews* 1991, 11(6), 581-615.
42. Wermunth, C. G. En *The practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, Great Britain, 1996, pp 3-5, 371.
43. Korolkovas, A. Drug development, En *Essentials of Medicinal Chemistry*, John Wiley and Sons, 2ª Edición. U.S.A, 1988, pp 97-118.
44. Collis A.J. Drug access and prodrugs. En *Medicinal Chemistry. The Role of Organic Chemistry in Drug Research*, 2ª Edición, Editado por Ganellin, C.R.; Roberts, S.M., Academic Press, Great Britain, 1993, pp 61-81.
45. Macdonald, C.M.; Turcan, G.R. Sites of drug metabolism, prodrug activation. En *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Editado por Hancsh, Sammer. Taylor. Pergamon Press, Great Britain, 1990; 5, pp 122-138.
46. Bodor, N. Design of biologically safer chemicals, *Chemtech* 1995, 22-32.
47. Testa, B.; Caldwell, J. Prodrugs revisited: The "ad hoc" approach as a complement to ligand design, *Medicinal Research Reviews* 1996, 16(3), 233-241.
48. Wermunth C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. En *Drug Design. Fact or Fantasy*, Editado por Jolles G, Academic Press, U.S.A., 1984, pp 47-72.

49. Hernández-Luis, F.; Castillo, R. Los Profármacos. Una alternativa en la investigación química farmacéutica. Parte I. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 1993, 24(2), 25-30.
50. Bundgaard, H.A. The double prodrug concept and its applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1989, 3, 39-65.
51. Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* 1988, 15(7), 886-927.
52. Delatour, P.; Cure, M.C.; Benoit, E. Garnier, F. Netobimin (totabin-SCH) preliminary investigation on metabolism and pharmacology. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutic* 1993, 16, 38-47.
53. Benchavoi, H.A.; Scott E.W.; McKellar, Q.A. Pharmacokinetics of albendazole, albendazole sulphoxide and netobimin in goats. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutics* 1993, 16, 237-240.
54. Lanusse, C.E.; Gascon, L.H.; Prichard, R.K. Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutics* 1993, 16, 38-47.
55. McKellar, Q.A.; Jackson, F.; Coop, R.L.; Baggot, J.D. Plasma profiles of albendazole metabolites after administration of netobimin and albendazole in sheep: effects of parasitism and age. *British Veterinary Journal* 1993 149, 101-113.
56. Lanusse, C.E.; Trudeau, C.; Ranjan, U.S.; Prichard, R.K. Pharmacokinetic profiles of netobimin metabolites after oral administration of zwitterions and trisamine formulation of netobimin to cattle. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutics* 1991, 14, 101-106.
57. Dawson, M.; Watson, T.R. 4-Amino-3-(3'-methoxycarbonyl-2'-thioureido)benzophenone a prodrug of Mebendazole. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 1983, 8(4), 329-334.
58. Welchshofer, N.; Delabre-Defayolle, I.; Paris, J.; Petavy, A.F. In vivo morphological damage induced by a new benzimidazole prodrug in *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990, 79(7), 606-608.
59. Nielsen, L.S. Improved peroral bioavailability of mebendazole in rabbits by administration of various N-Alkoxycarbonyl derivatives of mebendazole. *International Journal of Pharmaceutic*, 1994, 104, 175-179.
60. Bozler, G.; Schmid, J. Principles of pharmacokinetics and drug metabolism. En *Modern Drug Research. Path to Better and Safe Drugs*. Editado por Connolly Martin, Medicinal Research Ser. Marcel Dekker, Inc., U.S.A., 1989, 12, pp 77-79.

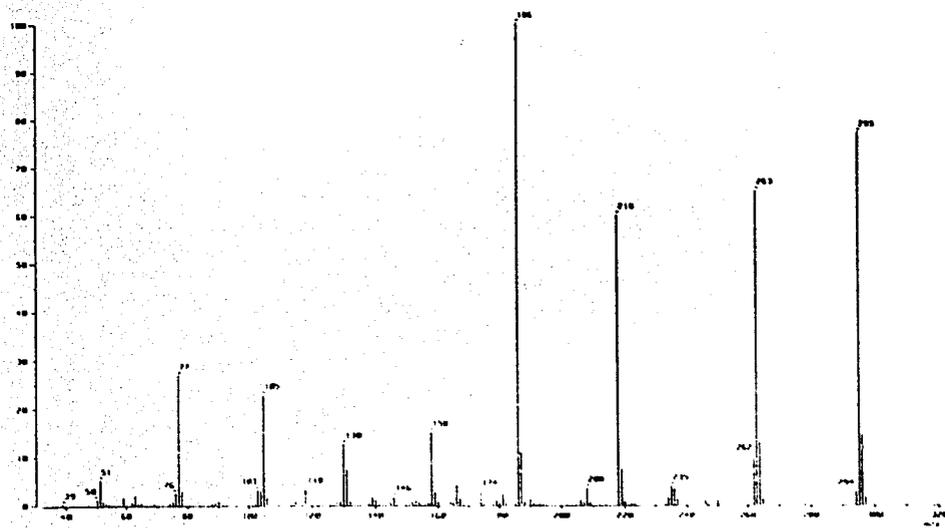
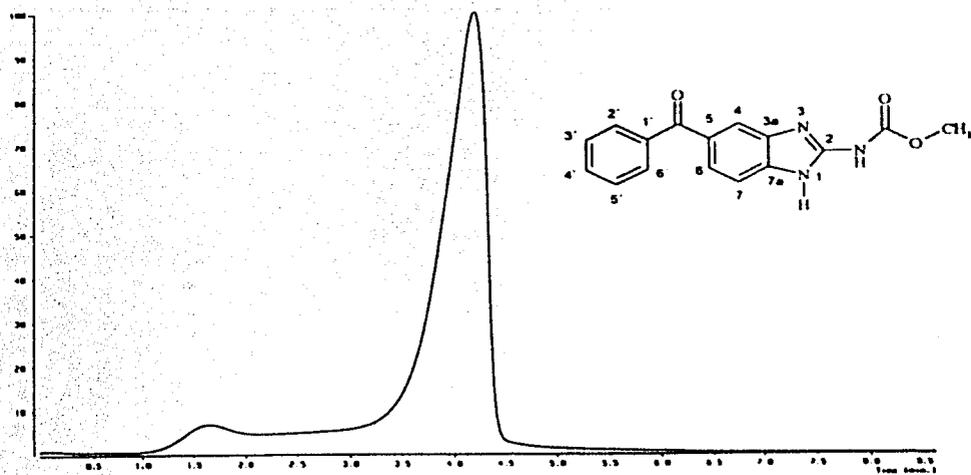
61. Hillgren, K.M.; Kato, A.; Borchardt, R.T. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. En *Medicinal Research Reviews* 1995, 15(2), 83-109.
62. Yalkowsky, S.H.; Morozowich, W. A physical chemical basis for the design of orally active prodrugs. En *Drug Design*, Academic press, Netherlands, 1980, IX, pp 122-183.
63. Leo, A.J. Methods of calculating partition coefficients. En *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Editado por Hansch, Sammer, Taylor, Pergamon Press, Great Britain, 1990, 5, pp 295-317.
64. Bodor, N.; Huang, M.J. An extended version of a novel method for the estimation of partition coefficient. *Journal Pharmaceutical Sciences* 1992, 81, 273-281.
65. Leo, A.J. Calculating log P cot from structures. *Chemical Reviews* 1993, 93(4), 1281-1305.
66. Hunch, C.; Leo A. J. En *Exploring QSAR, Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, Editado por ACS professional Reference Book, USA, 1995, 2, pp. 139.
67. Takacs-novak, K.; Miklos, J.; Szasz, G.; Lipophilicity of amphoteric molecules expressed by true partition coefficient. *International Journal of Pharmaceutics* 1995, 113, 47-55.
68. Wells, J.I. Solubility. En *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances*, John Wiley and sons, Great Britain, 1988, pp 21-85.
69. Yalkowsky S.H.; Benerjee S. En *Aqueous Solubility. Methods of Estimation for Organic Compounds*, Marcel Dekker, Inc., U.S.A., 1992, pp 2-12, 41-47.
70. Amidon, G.L. Drug derivatization as a means of solubilization: Physicochemical and biochemical strategies. En *Techniques of Solubilization of Drug.*, Editado por Yalkowsky S.H. Drugs and Pharmaceutical Sciences, Marcel Dekker Inc., U.S.A., 1981, 12, pp 183-211.
71. Torrado, S.; Cadorniga, R.; Torrado, J.J. Formulation parameters of albendazole solution-oral bioavailability and efficacy evaluation. *International Journal Pharmaceutics* 1997, 156(2), 181-187.
72. Mertin, L.A.; Pandha, H.S.; Sikora, K. Genetic prodrug activation therapy: a novel treatment for cancer. *Drugs of the Future* 1998, 23(3): 279-298.
73. Hoensh H.P.; Schwenk M. Intestinal Absorption And Metabolism Of Xenobiotics in Humans. En *Intestinal Toxicology*, Editado por C. M. Schiller Raven Press, New York; 1994, pp 169-175.
74. Amidon, G.L.; Stewart, B.H.; Pogany, S. Improving the intestinal mucosal cell uptake of water insoluble compounds. En *Advances in Drug Delivery System*, Elsevier, The Netherlands. 1986, pp 13-25.
75. Fox, M.A.; Whitseller, J.K. Adición nucleofílica al grupo carbonilo. En *Química Orgánica*, 2ª edición, Editorial Adisson Wesley, México D.F., 2000, pp 592-593, 597-599.

76. Jonhstone, R.A.W.; Wilby, A.H.; Endtwistle, I.D. Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation an its relation to other methods for reduction of organic compounds. *Chemical Review* 1985, 85, 132-133.
77. Wade, JR.L.G. Derivados de ácidos carboxílicos. En *Química Orgánica*. 2ª edición, Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, México D.F., 1993, pp 1025-1026.
78. Heymann E.; Mentlen R. Carboxylesterasas-Amidasas. En *Methods in Enzymology*, Editorial Acedemic Press, Inc., U.S.A., 1981, 77, pp 333-335.
79. Hoffman E.D.; Stroobant, C.J. En *Mass spectrometry, Principles and Application*, Editorial John Wiley and sons, 2000, pp 21-24.
80. Dressman, B. Jennifer; Lennernäs, Hans. Gastrointestinal variables. En *Oral Drug Absorption*, Editorial Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, pp 5.
81. Gelder, J.V; Schafiee, M.; Clercq, E.D.; Penninckx, F.; Mooter, G.V.; Kinget, R.; Augustijns, P. Species-dependent and site-specific intestinal metabolism of ester prodrugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2000, 205, 93-100.
82. Al-Badr, A.A. Tariq, M. Mebendazole. En *Analytical Profiles of Drug Substances*. Florey K. Editorial Academic Press, Inc.Orlando Florida, U.S.A., 1987, 16, pp 291-326.
83. March, J. En *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure*. 3ª edición, Editorial Jonh Wiley and sons, 1985, pp 220-222.
84. En *The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 12ª edición, Editorial Merck & Co., Inc., 1989, pp 206, 904.
85. Nieminen, T.E.A.; Hasee, A.T. Selective reduction of ketones with sodium borohydride-acetic acid. *Tetrahedron Letters* 1987, 28 (40), 4725-4728.
86. Brown,C.H.; Rao,B.C.S. A new powerful reducing agent-sodium borohydride in the presence of aluminum chloride and other polyvalent metal halides. *Organic Synthesis* 1955, 78, 2582-2588.
87. Ram, S.; Spicer, D. Temperatura and solvent dependent catalytic transfer hydrogenolysis in aromatic aldehydes and ketones via ammonium formate. *Synthetic communications* 1982, 22(18), 2673-2682.
88. Gilman, H.; Blatt. A.H. *Organic Syntheses*. 2ª Edición, Editorial John Wiley and sons, 1941, 1, pp 90-91.
89. Barker, J. Ando, D.J. En *Mass spectrometry*, Editorial John Wiley and sons, 1999, pp 40-44.
90. Hesse, M. Meier, H. Zech, B. En *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Editorial Offizin Andersen Nexo, Alemania, 1997, pp 109.
91. Katzung, B.G. En *Farmacología Básica y Clínica*, Editorial el Manual moderno, México D.F., 1994, pp 35,37.

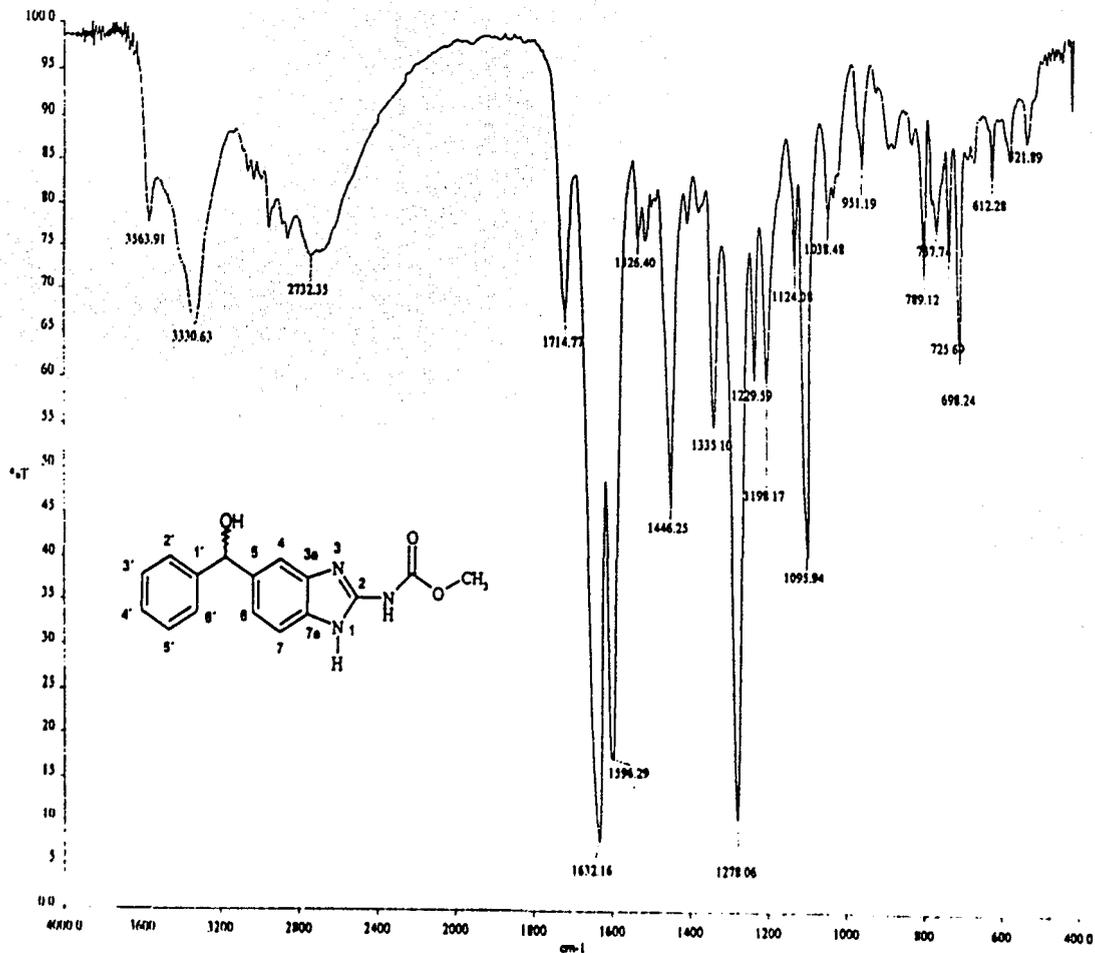
92. Sleight, M.A. En *Protozoa and Other Protists*. 1ª Edición, Editorial Edward Arnold, New York, U.S.A., 1989, pp 113-15.
93. Panchagnula, R.; Thomas, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics* 2000, 201, 131-150.
94. Eliel, E.L. En *Elementos de estereoquímica*. 1ª reimpresión, Editorial Limusa, México, 1975, pp 20-23



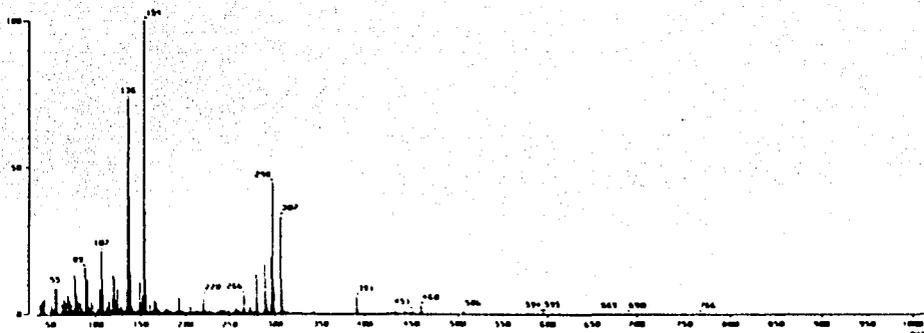
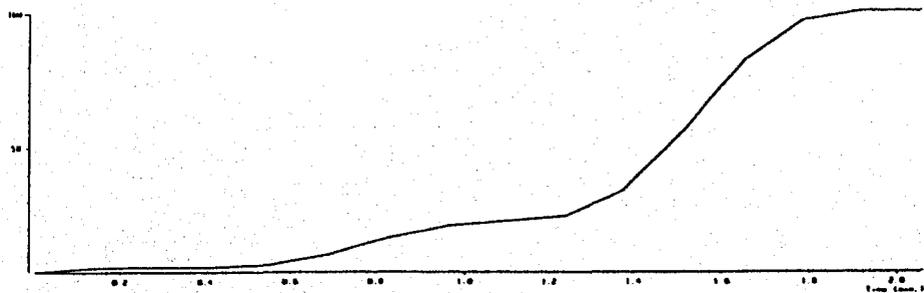
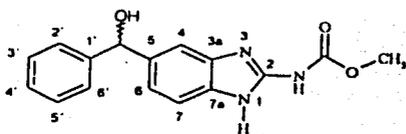
Espectro 1: IR (KBR) de Mebendazol



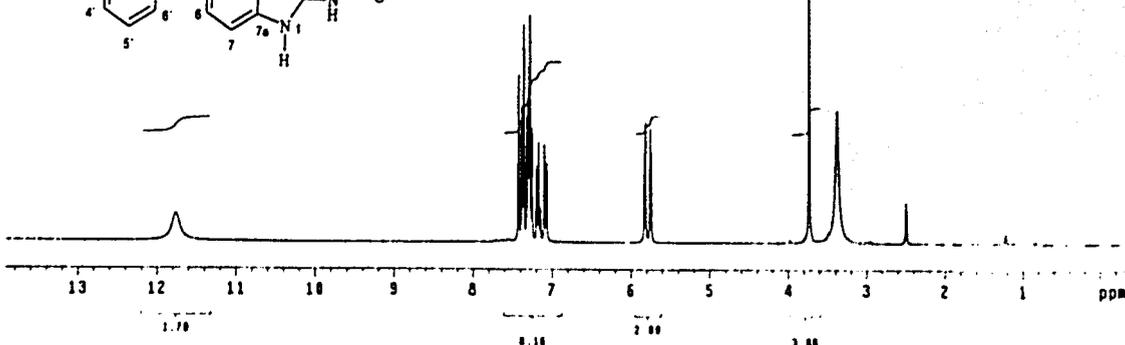
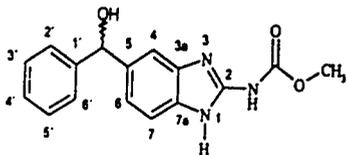
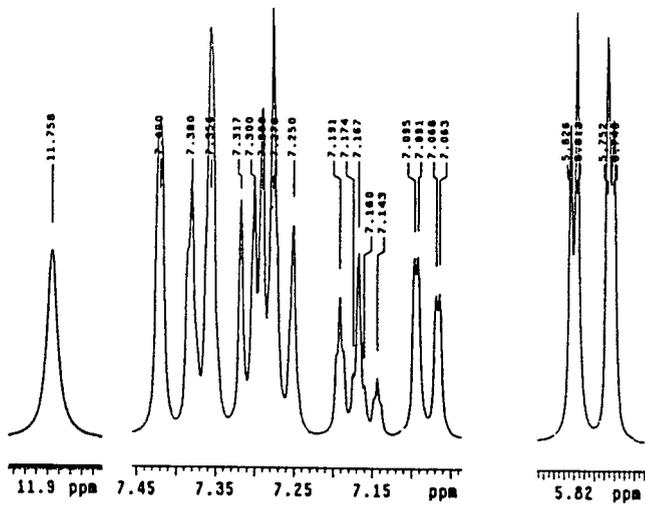
Espectro 2: EM (EI) de Mebendazol



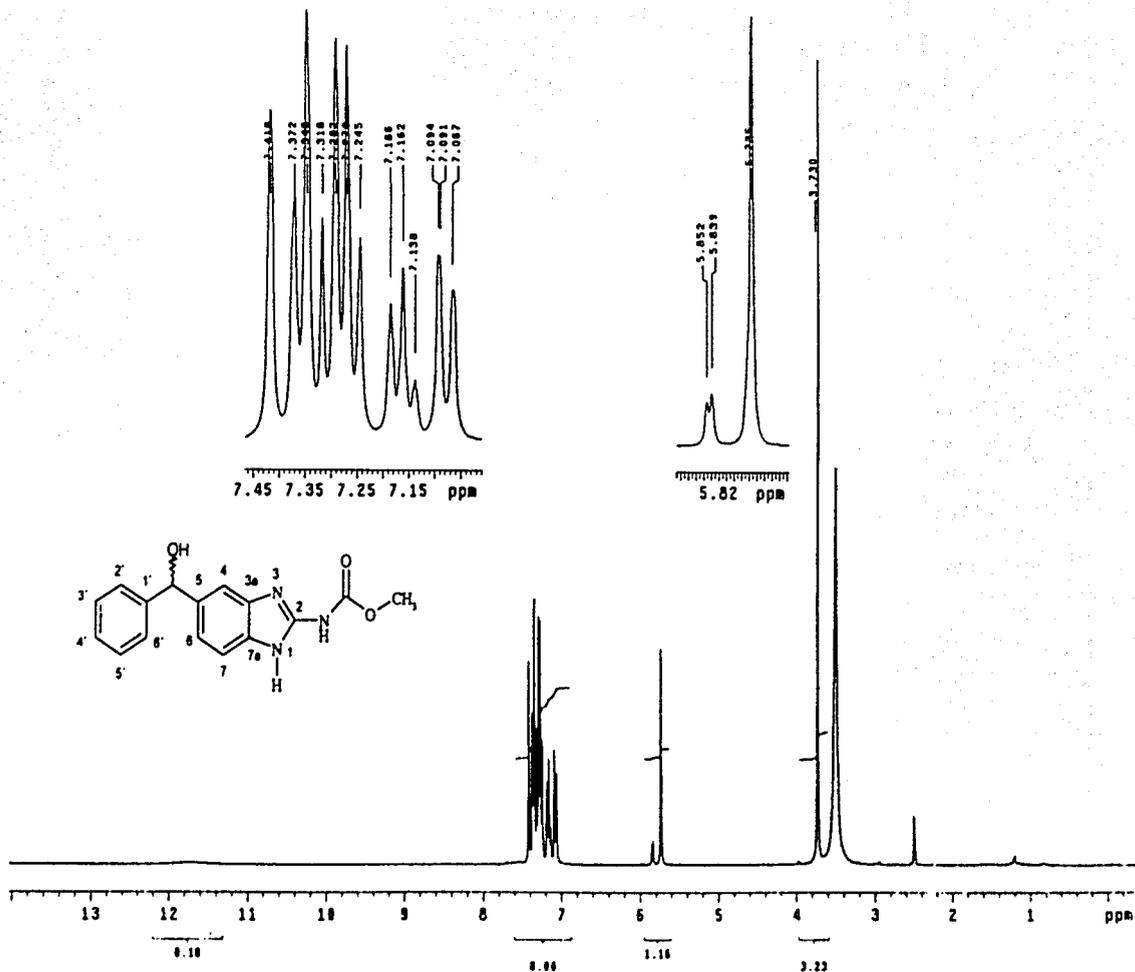
Spectro 3: IR (KBr) de (R,S)-5(6)-(1-fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol (1)



Espectro 4: EM (FAB) de *(R,S)*-5(6)-(1-fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino 1*H*-bencimidazol (1)

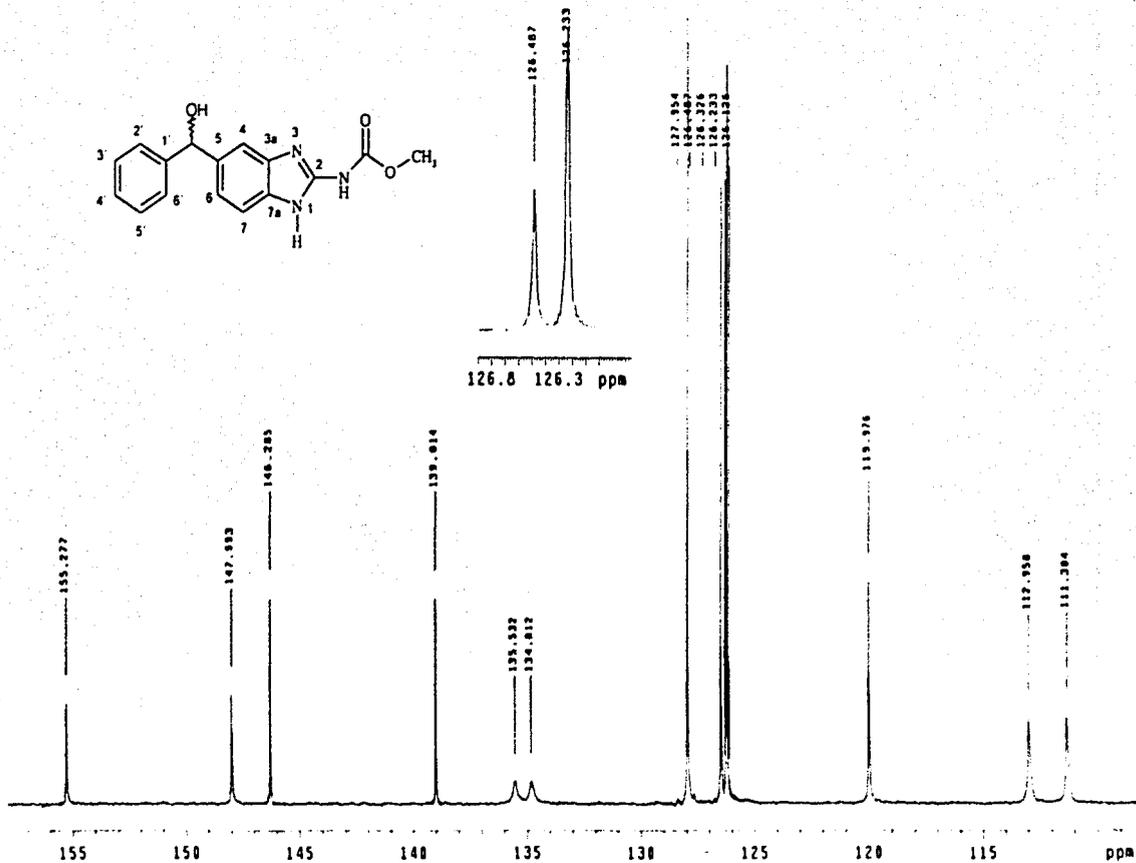
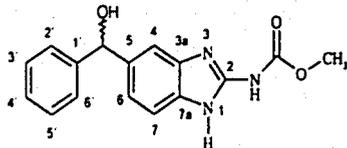


Espectro 5a:  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ ) de (*R,S*)-5-(6-(1-fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol (1)

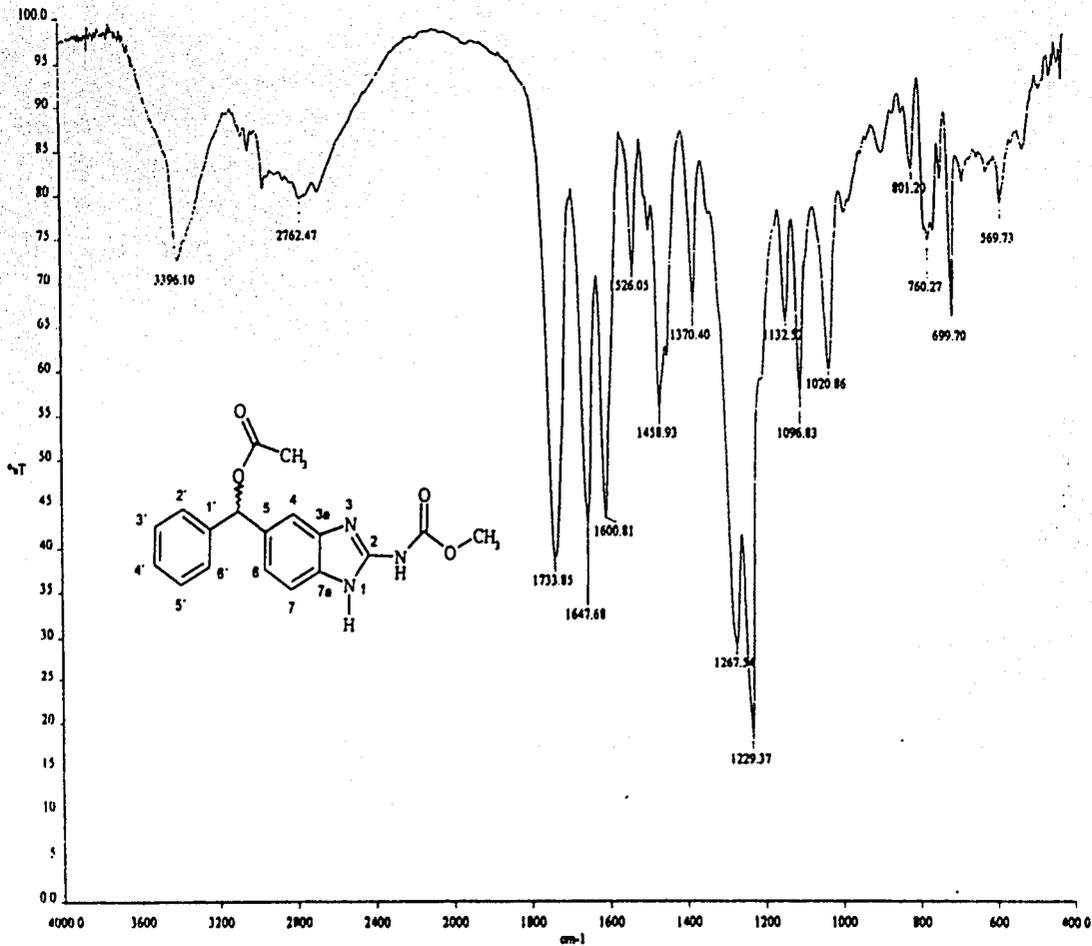


Espectro 5b:  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ ) de *(R,S)*-5(6)-(1-fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (1)

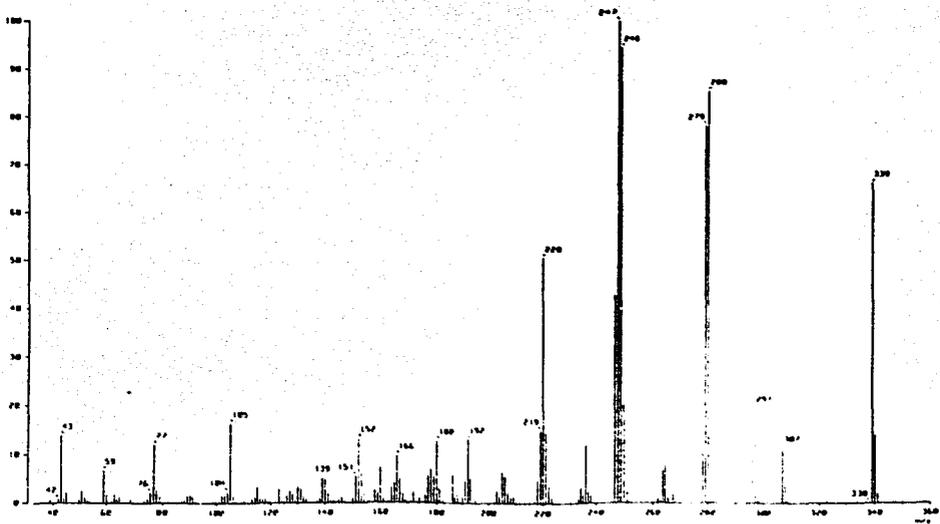
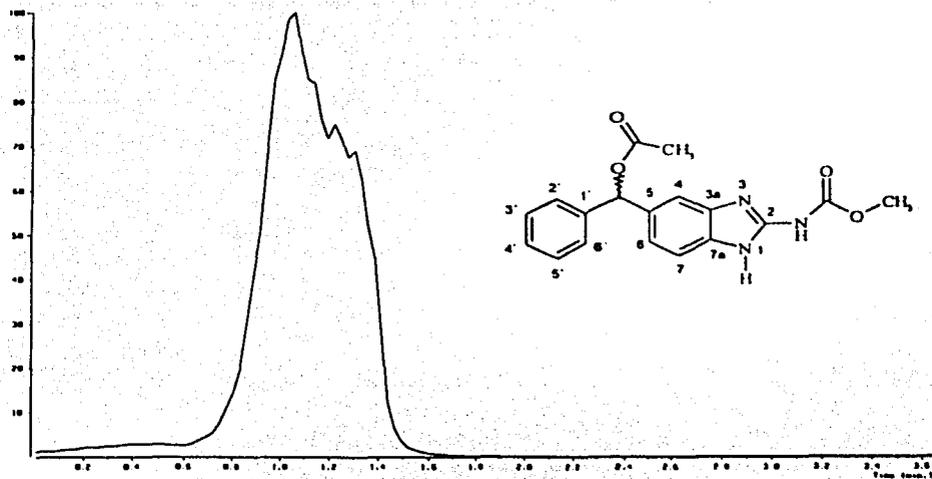




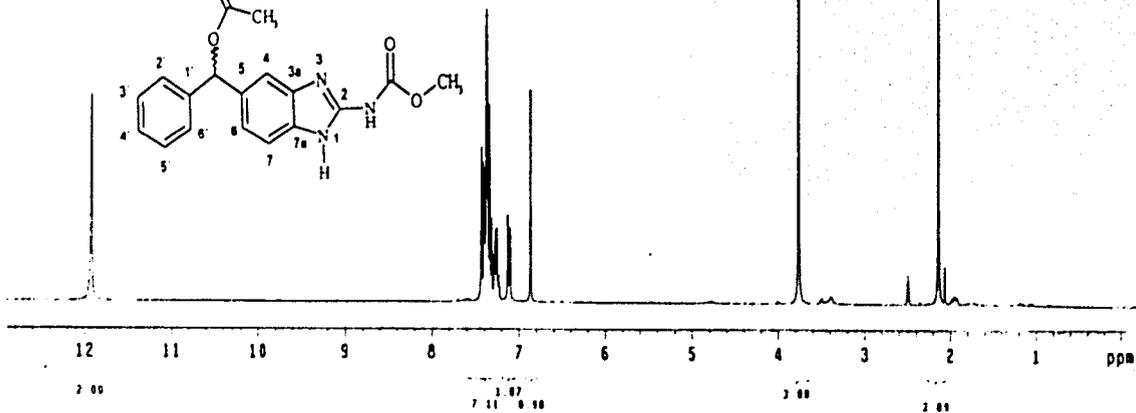
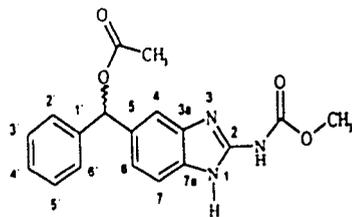
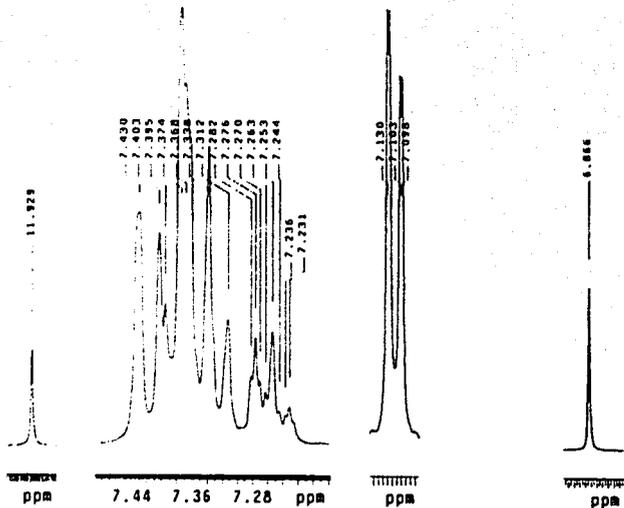
Espectro 6b:  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ ) de (R,S)-5(6)-(1-fenil-1-hidroxi)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol (1)



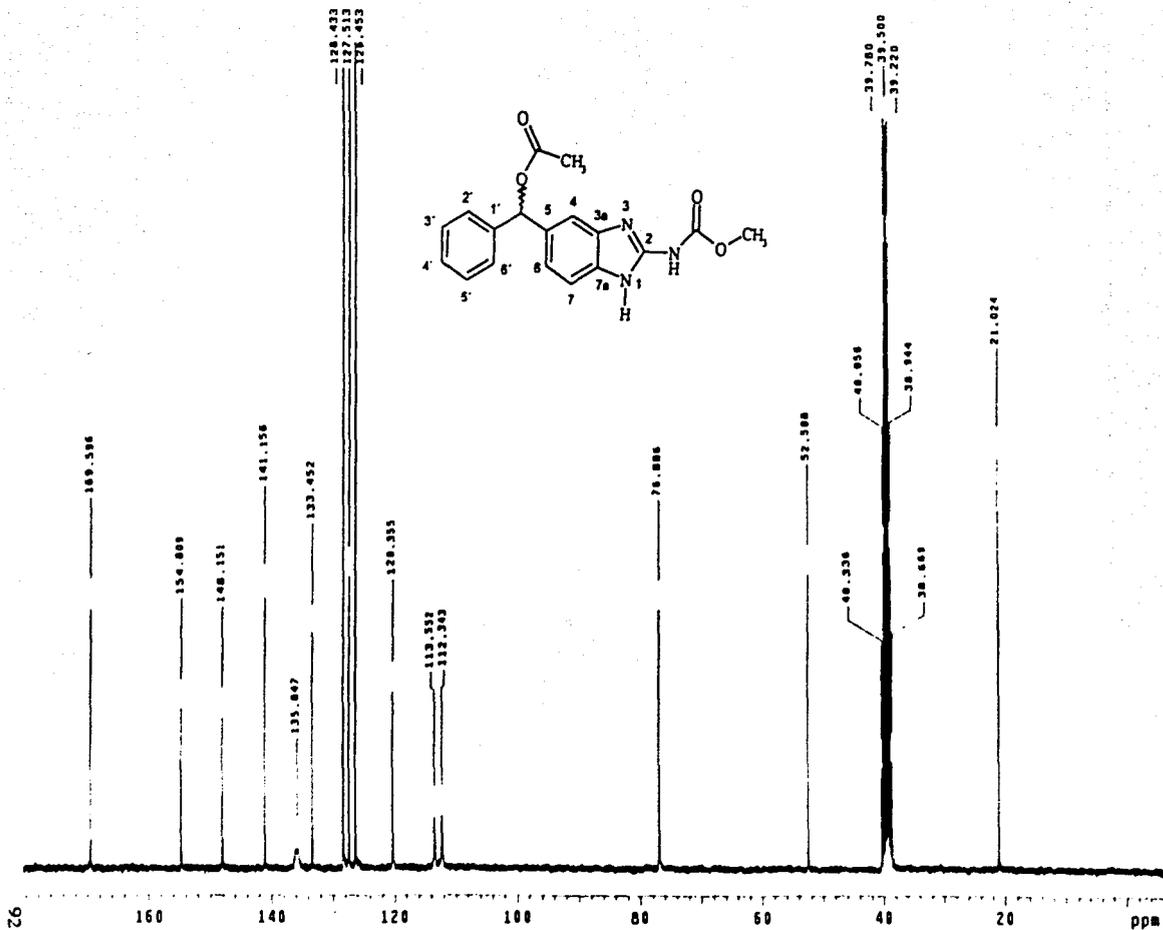
Espectro 7: IR (KBR) de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2)



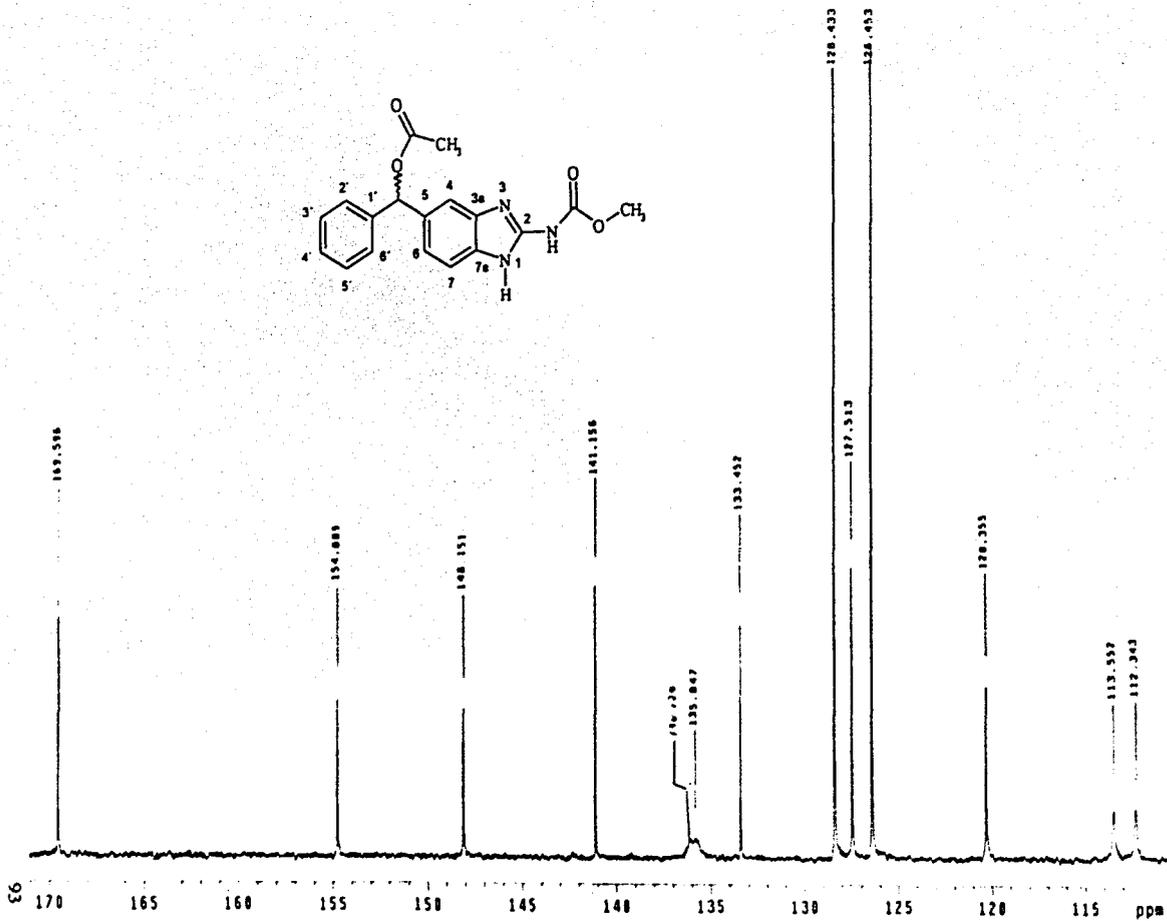
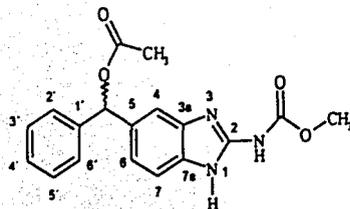
Espectro 8: EM (EI) de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2)



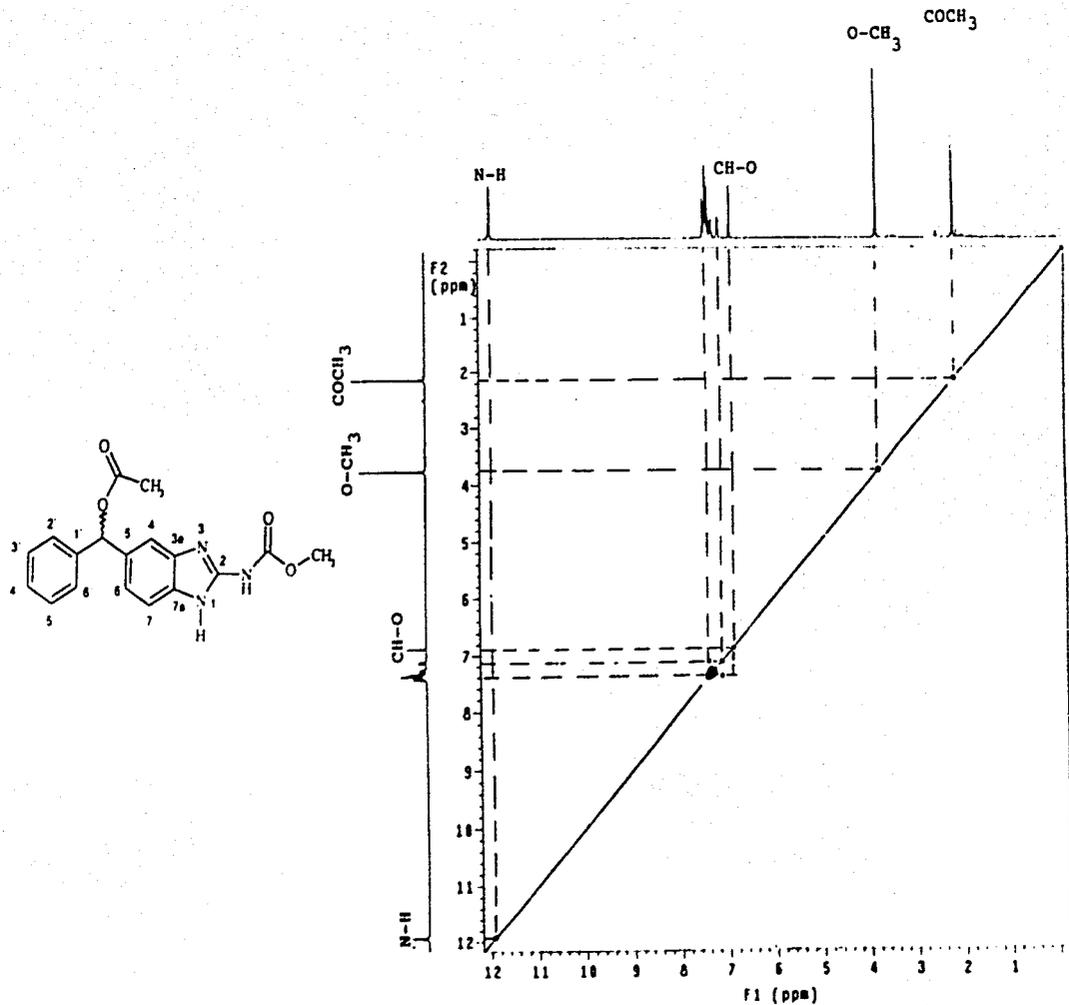
Spectro 9 :  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ ) de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2)



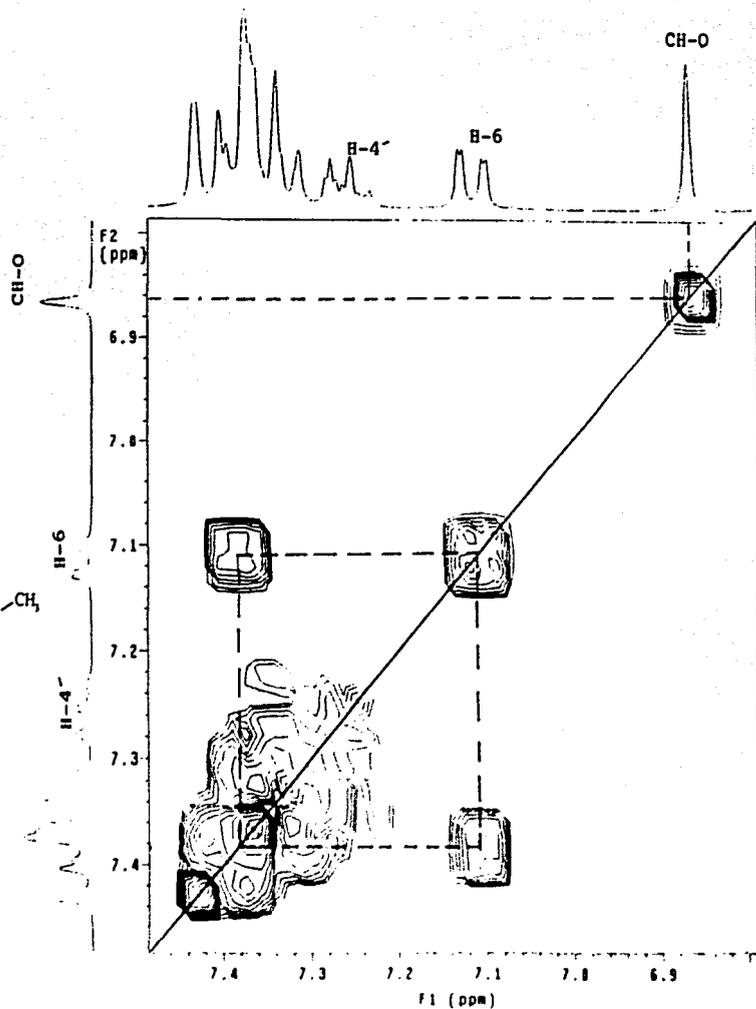
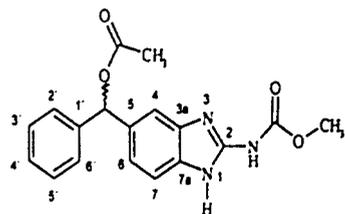
Espectro 10a: <sup>13</sup>C RMN (DMSO d<sub>6</sub>) de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2)



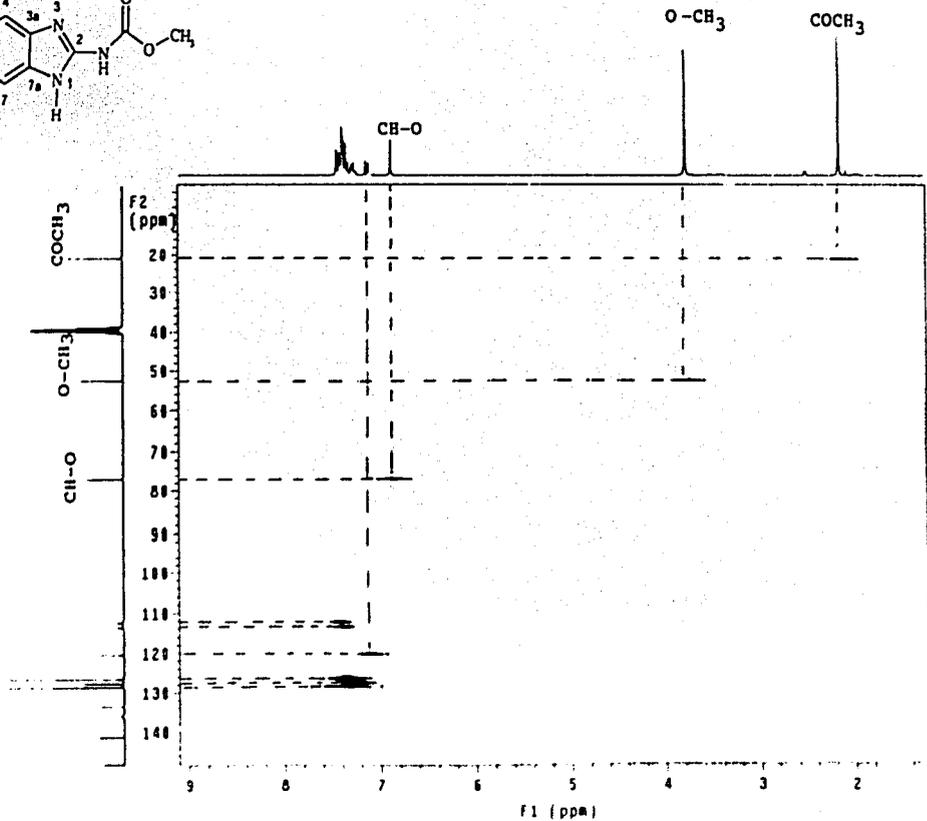
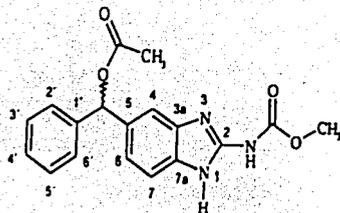
Espectro 10b: <sup>13</sup>C RMN (DMSO d<sub>4</sub>) de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxil-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2)



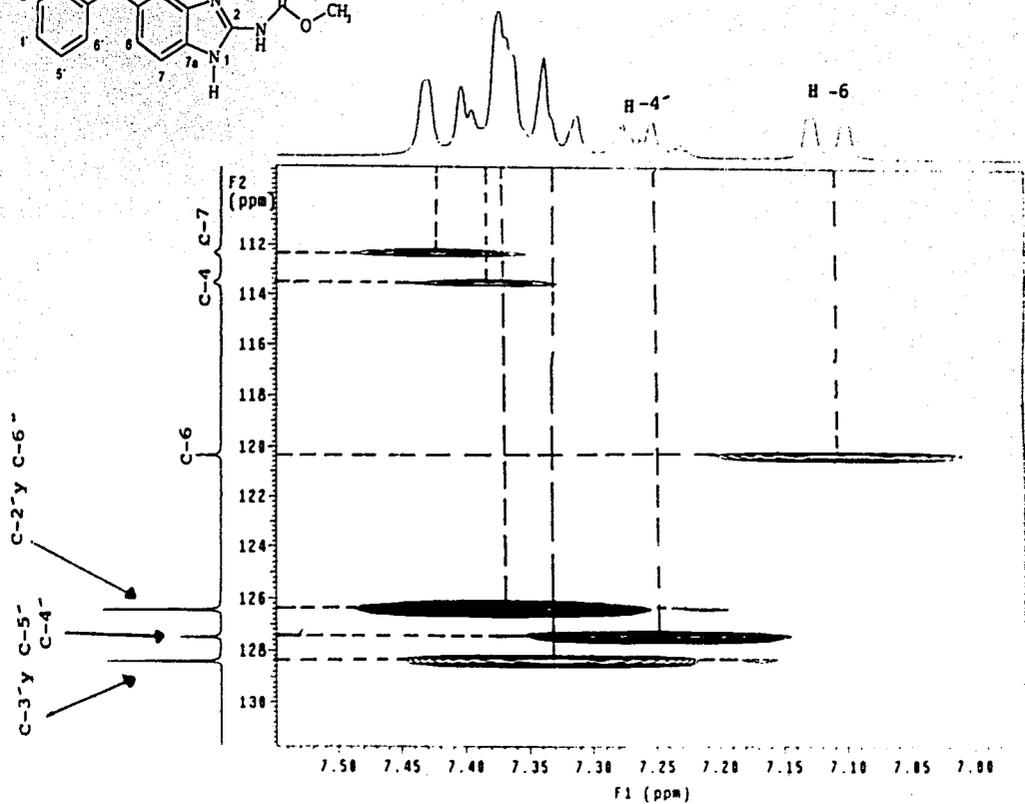
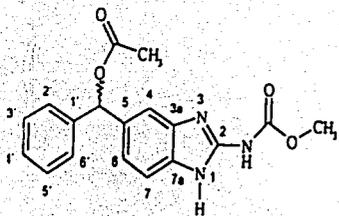
Espectro 11a:  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ , COSY de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxy-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol (2)



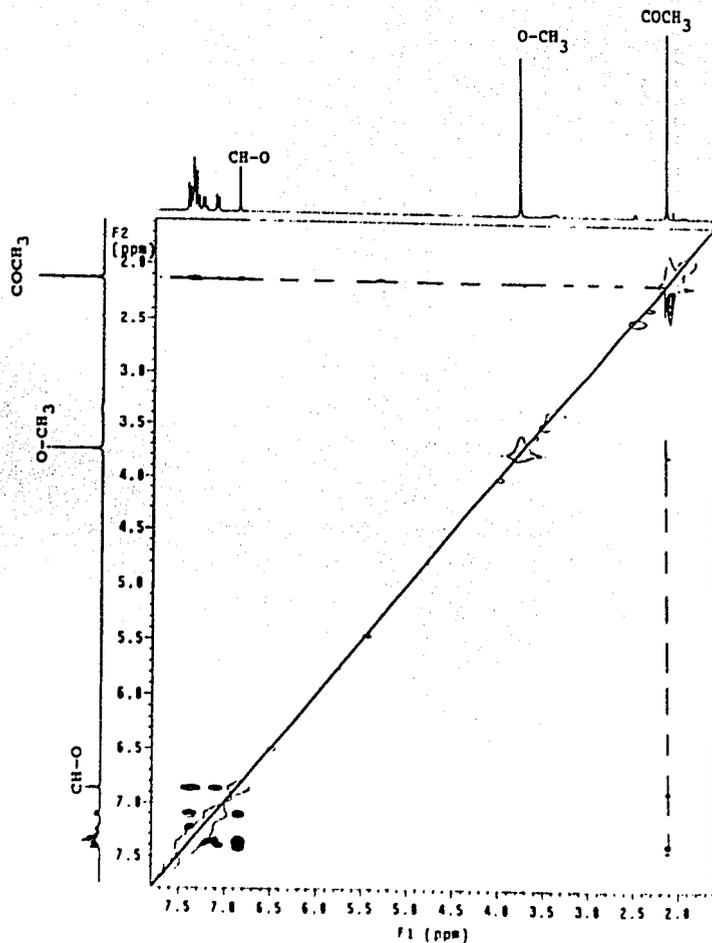
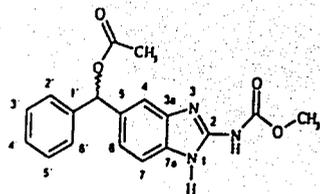
Espectro 11b:  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ , COSY de (R/S)-5-(6-(1-acetoxi-1-fenil)metil-1H-benzimidazol) (2)



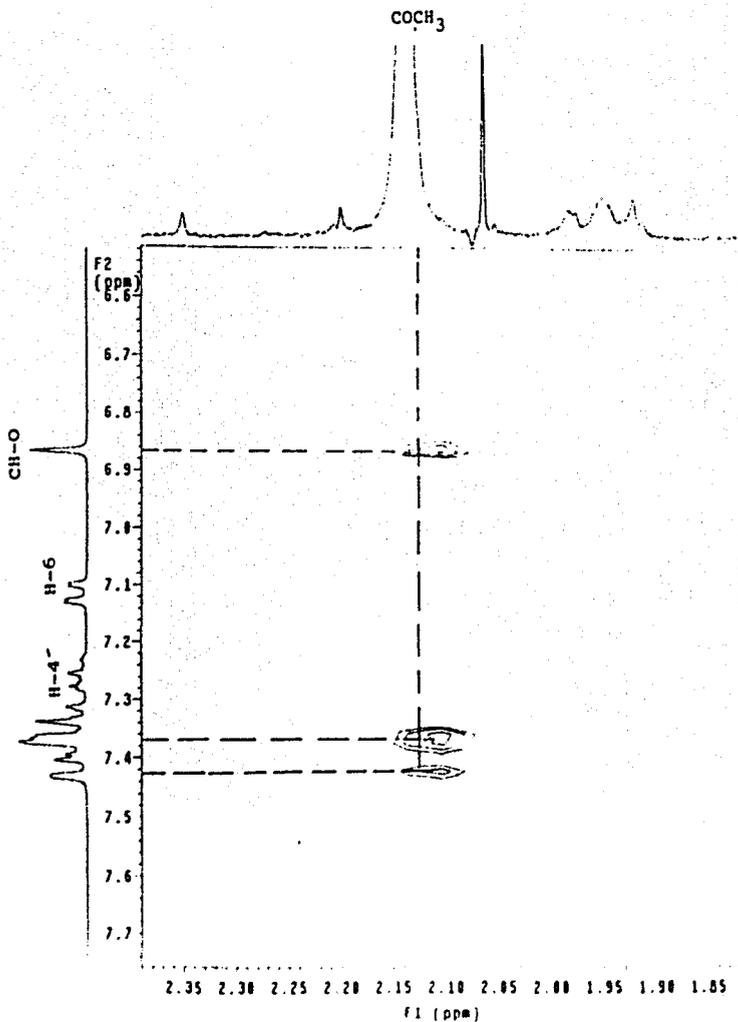
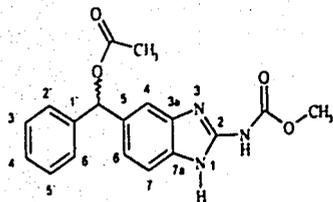
Espectro 12a:  $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ , HETCOR de (R/S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol (2)



Espectro 12b:  $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ , HETCOR de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol (2)



Spectro 13a:  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ , NOESY de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol (2)



Espectro 13b:  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$ , NOESY de (R)(S)-5(6)-(1-acetoxi-1-fenil)metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol (2)

