

00524
138



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

"PREPARACION DE TRES PROFARMACOS DEL ACIDO
2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5-
CARBOXILICO."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
BLANCA ESTELA PIÑA GALLARDO



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D.F.

2003

A





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

PRESIDENTE: Prof. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Prof. María de Lourdes García Peña
SECRETARIO: Prof. Francisco Hernández Luis
1er. SUPLENTE: Prof. Juan Gómez Dueñas
2do. SUPLENTE: Prof. Margarita Romero Ávila

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 :



Blanca Estela Piña Gallardo

« A mi madre »

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Hernández Luis por todo el apoyo brindado durante la elaboración del presente trabajo de tesis, pero sobre todo por la motivación y el desce de superación que da a cada uno de sus alumnos para alcanzar las metas planteadas.

Al Dr. Rafael Castillo y a la Maestra Alicia Hernández por su ayuda desinteresada, así como a mis compañeros del laboratorio 122: Maricela, Miguel, Paty, Luis, Sergio y Gabriel por sus consejos, ayuda y amistad.

A Lalo, por ser mas que un compañero de laboratorio, por ser un amigo excepcional.

Al personal del USAI: Rosa Isela del Villar, Margarita Guzmán, Maricela Gutiérrez y Georgina Duarte, por el apoyo brindado en la realización de los espectros de RMN, IR y Masas.

Al proyecto PAPIIT IN 203101 (DGAPA-UNAM) por el apoyo proporcionado en la compra de reactivos y disolventes ocupados en el presente trabajo de tesis.

A la UNAM por darme la oportunidad de crecer como persona, así como a todos mis maestros, por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis amigos de la facultad: Sonia, Samia, Diana C., Diana R., Tere, Fer, Rafael, Pablo, Deyanira, Pili, Jessica, Rubén y demás, que compartieron conmigo esta etapa.

A Aidee por ser mi mejor amiga, y a Paola, Guillermo y Juan Pablo porque de alguna u otra forma hemos vencido la adversidad de la distancia.

A mis padrinos por ser mis segundos padres, por su amor, cariño y comprensión, así como a Auri y a Iñaki por su lealtad.

A mis tíos y tías, por su apoyo y consejos, y a todos mis primos en especial a Luis y a Israel por compartir más que un parentesco, una amistad verdadera.

A Mauricio, no sólo por tu amor, sino por tu amistad, tus consejos, tu paciencia y sobre todo, por toda la alegría que me has dado.

Por último y no por eso menos importante a ti mamá por hacer que cada uno de mis sueños se hiciera realidad, por tus consejos, por tu cariño, por la educación que me has dado, pero sobre todo por tu ayuda incondicional.

"PREPARACIÓN DE TRES PROFÁRMACOS DEL ÁCIDO 2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENZIMIDAZOL-5-CARBOXÍLICO."

Contenido

	Pag.
Introducción.....	1
1. Antecedentes	
1.1 <i>Giardia lamblia</i> , agente causal de la giardiosis.....	3
1.1.1 Taxonomía.....	5
1.1.2 Morfología.....	6
1.1.3 Ciclo de vida.....	8
1.1.4 Epidemiología.....	10
1.1.5 Patogenia.....	10
1.1.6 Sintomatología.....	12
1.1.7 Tratamiento.....	12
1.2 Los bencimidazoles como agentes giardicidas.....	14
1.2.1 Generalidades sobre bencimidazoles.....	14
1.2.2 Los bencimidazoles como antihelmínticos.....	15
1.2.3 Mecanismo de acción de los bencimidazoles.....	16
1.2.4 Los bencimidazoles como antiprotozoarios.....	17
1.2.5 Derivados del 2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.....	19
1.3 Desventajas de las moléculas que presentan un grupo carboxílico en su estructura.....	20
1.3.1 Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y sus efectos adversos gastrointestinales.....	20
1.3.1.1 Mecanismo de gastrolesividad de los AINE.....	21
1.4 Los profármacos, una alternativa en la investigación Química Farmacéutica.....	23
1.4.1 Los profármacos, su conceptualización y clasificación.....	24
1.4.1.1 Los profármacos del tipo derivados biorreversibles.....	25
1.4.2 Criterios para la elaboración de profármacos.....	25
1.4.3 Los pro-bencimidazoles.....	27

2	Planteamiento del problema e hipótesis de trabajo	
2.1	Planteamiento del problema.....	29
2.2	Hipótesis de trabajo.....	30
3	Objetivos	
3.1	Objetivo general.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	Metodología	
4.1	Metodología para la síntesis de los compuestos.....	33
4.2	Evaluación de la solubilidad de los compuestos sintetizados.....	35
4.2.1	Solubilidad en agua desionizada.....	35
4.2.2	Solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica de 0.6 M.....	36
4.3	Estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras.....	36
4.4	Evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas.....	37
4.4.1	Evaluación empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.....	37
4.4.2	Evaluación empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.....	38
4.5	Proteínas totales.....	38
5	Resultados	
5.1	Síntesis de los compuestos.....	39
5.2	Caracterización de los compuestos sintetizados.....	39
5.3	Evaluación de la solubilidad de los compuestos sintetizados.....	42
5.4	Estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras.....	43
5.4.1	Evaluación empleando solución amortiguadora de fosfatos pH 7.....	43
5.4.2	Evaluación empleando solución amortiguadora de Tris (hidroximetil) aminometano, HCl pH 8.....	45
5.5	Evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas.....	47

H

5.5.1	Evaluación empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.....	47
5.5.2	Evaluación empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.....	49
6	Discusión	
6.1	Consideraciones para la elección del Ácido 2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico, como principio activo y su optimización.....	53
6.2	Síntesis de los compuestos.....	55
6.3	Caracterización de los compuestos sintetizados.....	59
6.3.1	Espectroscopia de Infrarrojo.....	59
6.3.2	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.....	61
6.3.3	Espectrometría de Masas.....	64
6.4	Evaluación de la solubilidad de los compuestos sintetizados.....	65
6.5	Estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras.....	66
6.6	Evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas.....	68
7	Conclusiones	70
	Bibliografía	72
	Apéndice A. Procedimientos experimentales	78
	Apéndice B. Espectros	93

Índice de figuras

	Pag.
Figura 1.1 Tasas de morbilidad de las enfermedades por parásitos intestinales más prevalentes en nuestro país en el año 2000.....	3
Figura 1.2 Tasas de morbilidad por Giardiosis en nuestro país (1995-2000).....	5
Figura 1.3 Esquema del trofozoito y quiste de <i>Giardia lamblia</i>	7
Figura 1.4 Esquema el ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	9
Figura 1.5 Comportamiento ácido-base y equilibrio tautomérico del bencimidazol....	14
Figura 1.6 Mecanismos de acción de los bencimidazoles.....	17
Figura 1.7 AINE mas ampliamente utilizados.....	21
Figura 1.8 Algunos pro-bencimidazoles con acción antiparasitaria.....	27
Figura 3.1 Principio activo y profármacos propuestos a sintetizar.....	31
Figura 5.1 Esquema comparativo de los resultados de la evaluación de solubilidad (µg/mL) de los compuestos en los sistemas probados.....	43
Figura 5.2 Gráfica del log del porcentaje de absorbencia residual vs. tiempo empleando solución amortiguadora de fosfatos pH 7.....	44
Figura 5.3 Gráfica del log del porcentaje de absorbencia residual vs. tiempo empleando solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8.....	46
Figura 5.4 Gráfica del log % de compuesto 2 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.....	47
Figura 5.5 Gráfica del log % de compuesto 3 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.....	48
Figura 5.6 Gráfica del log % de compuesto 4 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.....	49
Figura 5.7 Gráfica del log % de compuesto 2 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.....	50
Figura 5.8 Gráfica del log % de compuesto 3 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.....	51

Figura 5.9	Gráfica del log % de compuesto 4 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.....	52
Figura 6.1	Mecanismo propuesto para la liberación del fármaco a partir del profármaco, en la cercanía del lumen intestinal.....	54
Figura 6.2	Mecanismo de reacción propuesto para el compuesto 1.....	56
Figura 6.3	Mecanismo de reacción propuesto para los compuestos 2 y 3.....	57
Figura 6.4	Mecanismo de reacción propuesto para el compuesto 4.....	58
Figura 6.5	Región de $\pm 3000\text{ cm}^{-1}$ de los espectros de infrarrojo.....	59
Figura 6.6	Espectro de RMN- ^1H de los hidrógenos del anillo benzimidazólico del compuesto 1.....	62
Figura 6.7	Asignaciones dadas por el programa ACD/Labs-CNMR para RMN- ^{13}C del compuesto 1.....	64

K

Índice de tablas

	Pag.
Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de <i>Giardia lamblia</i>	6
Tabla 1.2 Algunos bencimidazoles usados en la terapéutica contra enfermedades parasitarias.....	16
Tabla 1.3 Derivados de 2-trifluorometil bencimidazoles con actividad antiprotozoaria.....	19
Tabla 1.4 Características de los efectos locales y sistémicos ocasionados por los AINE en la parte alta del tracto gastrointestinal.....	22
Tabla 1.5 Criterios de clasificación para los profármacos.....	24
Tabla 5.1 Resultados de la síntesis y propiedades físicas de los compuestos.....	39
Tabla 5.2 Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos sintetizados.....	40
Tabla 5.3 Resultados de las pruebas de solubilidad en agua desionizada a las 2 h.....	42
Tabla 5.4 Resultados de las pruebas de solubilidad en agua desionizada a las 24 h.....	42
Tabla 5.5 Resultados de las pruebas de solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7, fuerza iónica 0.6 M a las 2 h.....	42
Tabla 5.6 Resultados de las pruebas de solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7, fuerza iónica 0.6 M a las 24 h.....	43
Tabla 5.7 Resultados de la evaluación de la estabilidad de los profármacos en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.....	44
Tabla 5.8 Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de estabilidad empleando solución amortiguadora de fosfatos pH 7.....	45
Tabla 5.9 Resultados de la evaluación de la estabilidad de los profármacos en solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8... ..	46
Tabla 5.10 Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de estabilidad empleando solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8.....	47

L

Tabla 5.11	Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 2 frente la enzima esterasa de hígado de cerdo.....	47
Tabla 5.12	Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 3 frente la enzima esterasa de hígado de cerdo.....	48
Tabla 5.13	Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 4 frente la enzima esterasa de hígado de cerdo.....	48
Tabla 5.14	Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de liberación del principio activo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.....	49
Tabla 5.15	Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 2 frente la enzima tripsina de páncreas de cerdo.....	50
Tabla 5.16	Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 3 frente la enzima tripsina de páncreas de cerdo.....	50
Tabla 5.17	Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 4 frente la enzima tripsina de páncreas de cerdo.....	51
Tabla 5.18	Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de liberación del principio activo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.....	52
Tabla 6.1	Similitudes encontradas en los espectros de IR de los compuestos sintetizados.....	60
Tabla 6.2	Similitudes encontradas en los espectros de RMN- ¹ H, entre los hidrógenos del anillo benzimidazólico de los compuestos sintetizados.....	61
Tabla 6.3	Señales más distintivas encontradas en los espectros de RMN- ¹ H para los compuestos sintetizados.....	63
Tabla 6.4	% de absorbencia residual de los compuestos sintetizados al realizar el estudio de estabilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.....	67
Tabla 6.5	% de absorbencia residual de los compuestos sintetizados al realizar el estudio de estabilidad en solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8.....	67

M

Tabla 6.6	% de principio activo liberado de los compuestos por la presencia de la enzima esterasa de hígado de cerdo.....	68
Tabla 6.7	% de principio activo liberado de los compuestos por la presencia de la enzima tripsina de páncreas de cerdo.....	69

Introducción

Las infecciones por parásitos intestinales constituyen un importante problema de salud, por sus altas tasas de prevalencia y amplia distribución mundial, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales en donde las condiciones de higiene y alimentación son precarias.

De acuerdo con algunos datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS),¹ las parasitosis intestinales son consideradas las enfermedades infecciosas más comunes en todo el mundo. Se estima que aproximadamente 3500 millones de personas son afectadas y 450 millones están enfermas a causa de dichas infecciones siendo, niños en su mayoría.

De entre las principales parasitosis intestinales en nuestro país se encuentran la amebiasis, la ascariasis, la giardiosis y la oxiuriasis.²

Este trabajo centrará su atención en el protozooario *Giardia lamblia*, el cual es un parásito flagelado que produce la infección intestinal conocida con el nombre de giardiosis. Este protozooario intestinal es el más frecuentemente diagnosticado a escala mundial, y su prevalencia varía entre un 2 y 5% en países industrializados y entre un 20 y 30% en países en vías de desarrollo; los reportes de trabajos hechos en México indican que varía entre 0.7 a 66%.^{3,4}

La giardiosis, se produce en el intestino delgado del hombre y otros animales. Afecta con mayor frecuencia a la población infantil; su forma de transmisión es a través de alimentos o agua contaminada con materia fecal que contengan quistes de *Giardia lamblia* (forma infectante del parásito); o también por transmisión directa de persona a persona, cuando una de ellas tiene la parasitosis y no lleva a cabo las medidas básicas de higiene.^{11,13-15,17}

Para el tratamiento de la giardiosis, los fármacos de elección son el metronidazol, quinacrina, furazolidona, tinidazol, entre otros. Sin embargo, hay evidencias de que dichos fármacos presentan efectos colaterales indeseables, como son: reacciones de hipersensibilidad, dolor abdominal, vértigo, discrasias sanguíneas, etc.; también se ha documentado que el metronidazol es carcinogénico en roedores y mutagénico en bacterias.^{2,6,17} Por este motivo actualmente se investigan otras alternativas de tratamiento.

Recientemente se ha demostrado la eficacia giardicida de los bencimidazoles como el albendazol y el mebendazol, en estudios *in vitro*. Sin embargo, dichos compuestos presentan problemas de solubilidad en condiciones fisiológicas, lo cual ocasiona que gran parte de la dosis no esté disponible en solución para ser absorbida por el parásito.^{25,28,29}

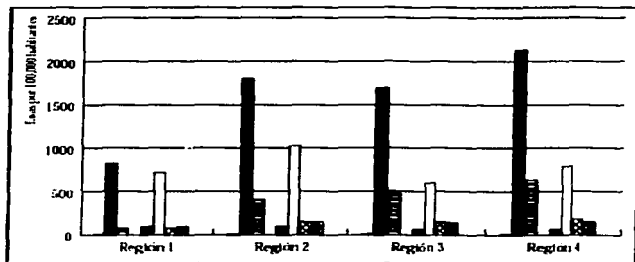
En este contexto se ubica el objetivo del presente trabajo, el cual busca obtener nuevos compuestos bencimidazólicos, que ofrezcan mejores perfiles de biodisponibilidad, sean potencialmente activos contra *Giardia lamblia* y presenten un mínimo de efectos adversos, aplicando la estrategia que en la Química Farmacéutica se conoce como profármacos y, a su vez, permitan aportar nuevos conocimientos y otras alternativas terapéuticas hacia este padecimiento.

1. Antecedentes

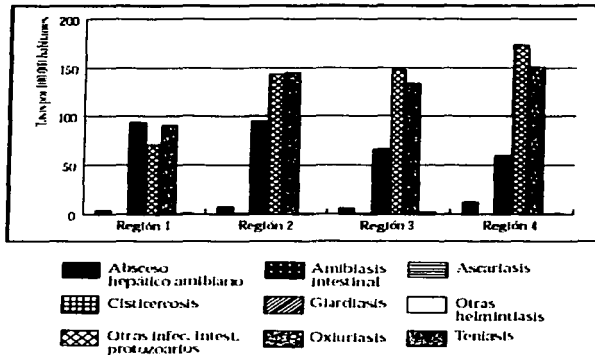
En este apartado se encuentra la información que da sustento al presente trabajo de tesis. La información está dividida en cuatro secciones principales: la primera contiene los aspectos más relevantes de *Giardia lamblia* y de la giardiosis, enfermedad que causa dicho parásito; en la segunda se encuentran generalidades sobre los bencimidazoles y su eficacia ante el parásito, en la tercera sección se presentan las desventajas de las moléculas que presentan un grupo carboxílico en su estructura, como es el caso de nuestro principio activo y, en el cuarto apartado se encuentran los conceptos básicos y ventajas de la elaboración de profármacos.

1.1 *Giardia lamblia*, agente causal de la giardiosis

Las enfermedades por parásitos intestinales continúan siendo un problema de salud pública en el mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo como México, en el cual, debido a su diversidad geográfica, y a su desarrollo demográfico y socioeconómico, presenta frecuencias variables de enfermedades parasitarias en sus diferentes regiones. De las enfermedades más frecuentes causadas por parásitos intestinales se encuentran: la amibiasis, la ascariasis, la giardiosis y la oxiuriasis (Figura 1.1).²



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Región 1: Nivel de desarrollo alto

Distrito Federal, Baja California Norte, Baja California Sur, Coahuila, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas.

Región 2: Nivel de desarrollo medio alto

Aguascalientes, Colima, Chihuahua, Jalisco, Estado de México, Durango, Morelos, Nayarit, Sinaloa, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.

Región 3: Nivel de desarrollo medio bajo

Guanajuato, Michoacán, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas.

Región 4: Nivel de desarrollo bajo

Guerrero, Hidalgo, Puebla, Chiapas, Oaxaca.

Figura 1.1 Tasas de morbilidad de las enfermedades por parásitos intestinales más prevalentes en nuestro país en el año 2000.⁴

Como observamos, la giardiosis es una de las principales parasitosis que afecta la salud de nuestro país; reportes de trabajos hechos en México refieren que la frecuencia varía del 0.7 al 66%.⁴

La giardiosis es una infección producida por el protozoo flagelado *Giardia lamblia*, conocido también como *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*. La infección se localiza en el intestino delgado, afecta a individuos de todas las edades, aunque las infecciones son

mas frecuentes en niños e inmunosuprimidos (Figura 1.2); se caracteriza por la producción de cuadros gastrointestinales agudos y crónicos de intensidad variable que incluso puede llegar a producir un síndrome de malabsorción. En adultos por lo general es asintomática.^{5,6} A continuación se describen las características más importantes sobre este protozooario, así como los aspectos más significativos de la enfermedad que produce y su terapéutica.

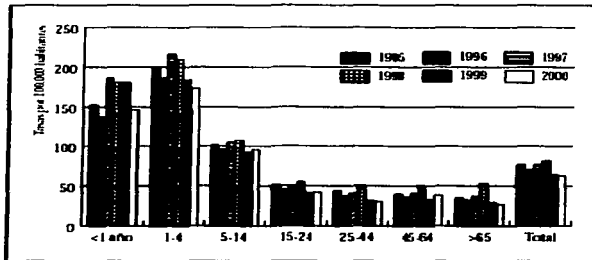


Figura 1.2 Tasas de morbilidad por Giardiosis en nuestro país (1995-2000)²

TESIS CON
LIBRO DE ORIGEN

1.1.1 Taxonomía

Los protozoarios o protozoos, son microorganismos eucarióticos unicelulares que carecen de pared celular. Generalmente no tienen pigmentación, son móviles y pueden vivir libres o en asociaciones simbióticas y parasíticas.^{7,8}

Los protozoarios se clasifican en el reino Protista dentro del subreino Protozoa, en el cual se han reconocido siete phylum: *Sarcomastigophora*, *Labyrinthomorpha*, *Apicomplexa*, *Microspora*, *Asctospora*, *Mixospora* y *Ciliophora*.^{8,9} El phylum *Sarcomastigophora* a su vez se divide en dos subphylum: *Mastigophora* y *Sarcodina*. *Giardia lamblia* se localiza dentro del primero, ya que es una especie que se mueve mediante estructuras especializadas denominadas flagelos; y pertenece a la clase

Zoomastigophora por carecer de clorofila y por obtener su fuente de nutrición heterotróficamente.⁹ En la Tabla 1.1 se muestra la clasificación taxonómica completa de *Giardia lamblia*.

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de *Giardia lamblia*.^{3,10}

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Diplomonadida
Suborden	Diplomonadina
Familia	Hexamitidae
Género	<i>Giardia</i>
Especie	<i>lamblia</i>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.1.2 Morfología

Giardia lamblia es un protozoo flagelado que se presenta en dos formas: trofozoito, que corresponde a la forma vegetativa, y quiste que es la forma de resistencia del protozoo hacia condiciones adversas del medio ambiente y también constituye la forma infectante (Figura 1.3).^{8,11}

El trofozoito es piriforme, tiene una cara dorsal convexa y una ventral plana, mide 10-20 μm de longitud, 5-15 μm de ancho y 2-4 μm de espesor. Posee simetría bilateral y su cuerpo es dividido por dos engrosamientos citoplasmáticos, llamados axostilos o axonemas, que actúan como citoesqueleto axial. Perpendicular a los axostilos se encuentran los cuerpos parabasales también conocidos como cuerpos medios, a los cuales no se les ha atribuido ninguna función específica sin embargo, se piensa que pueden servir como reserva de proteínas del citoesqueleto, antes de que se lleve a cabo la mitosis o la enquistación. En el extremo anterior presenta dos núcleos grandes, vesiculares que contienen un cariosoma central compuesto de cromatina, no existe cromatina periférica. En los 2/3 anteriores por su cara ventral se encuentra el disco suctor, el cual funciona de manera semejante a una ventosa, tiene capacidad contráctil y esta compuesto por microtúbulos constituidos principalmente por dos proteínas, tubulina y giardina; esta

estructura permite que el parásito se adhiera al epitelio intestinal del huésped. A distintas alturas de la superficie celular del parásito sobresalen cuatro pares de flagelos, los cuales nacen de estructuras denominadas blefaroplastos y, de acuerdo con su disposición, se designan en: anterior, posterior, neutral y caudal; dichos flagelos son los que le otorgan movilidad al parásito. Los blefaroplastos también marcan el origen de los axostilos^{4-6,8,10,12-15}.

Los quistes son ovalados, miden de 8 -12 μm de longitud y de 7 - 10 μm de ancho, poseen una pared quística refringente, en el interior del citoplasma se pueden observar de dos a cuatro núcleos con cariosoma característico, restos flagelares, cuerpos parabasales y de axostilo, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentre.^{5,6,8,10}

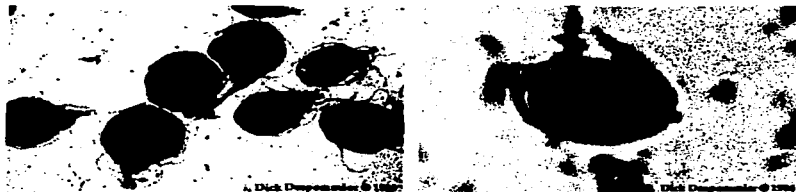


Figura 1.3 Esquema del trofozoito y quiste de *Giardia lamblia*.¹⁶

Con base en los cuerpos parabasales se han diferenciado tres especies: *Giardia agilis* presente en anfibios, *Giardia muris* presente en aves, roedores y reptiles y *Giardia lamblia* en el hombre, mamíferos, aves y reptiles. Las diferencias se basan en la secuencia de los ácidos nucleicos del DNA. Se han mencionado alrededor de 40 variedades de este protozoo, basadas en su morfología, transmisión cruzada en forma experimental, crecimiento y desarrollo *in vitro*, infectividad, virulencia y patogenicidad, características antigénicas, electroforesis de proteínas, enzimas, sitios de restricción, hibridación del DNA y cariotipo molecular.^{3,5,10}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Giardia lamblia tiene pocos organelos membranosos, carece de mitocondrias, peroxisomas, glicosomas e hidrogenosomas. Los organelos que se han encontrado en el citoplasma de los trofozoitos de *Giardia* son ribosomas, lisosomas, los cuales contiene hidrolasas, DNasas, RNasas, cistein-proteasas, etc. y el retículo endoplasmático; así como vacuolas periféricas o vesículas que podrían constituir parte del sistema lisosomal-endolisosomal de los trofozoitos, las cuales contiene fosfatasa ácida, estas enzimas al parecer colaboran en la degradación de macromoléculas ingeridas por el parásito. Por otra parte el aparato de Golgi solo se ha encontrado en trofozoitos durante el proceso de enquistación, formando las vesículas específicas de este proceso.^{5,10,12}

1.1.3 Ciclo de vida

El hábitat de *Giardia lamblia* se encuentra en el intestino delgado, particularmente en la superficie de la mucosa del duodeno y la parte alta del yeyuno y algunas veces en los conductos biliares y la vesícula.^{10,12,14,17}

Este parásito presenta dos fases en su ciclo de vida, las cuales se adaptan eficazmente a distintas condiciones ambientales. Una de las fases esta constituida por los quistes, que además de constituir la forma de resistencia, constituyen la forma de diseminación del parásito, pudiendo sobrevivir en el agua de 2 a 3 meses. Cuando son ingeridos por el hombre, ya sea por agua o alimentos contaminados, o por las manos sucias, atraviesan el estómago en el cual se reblandece la pared quística por la exposición a la alta acidez gástrica; posteriormente acceden al duodeno donde la pared se rompe por la elevación del pH propia del intestino delgado, dando lugar a dos trofozoitos por cada quiste, los cuales constituyen la segunda fase del ciclo de vida. Los trofozoitos comienzan a reproducirse activamente por fisión binaria longitudinal, que incluye la división del núcleo, del aparato neuromotor (blefaroplastos, axostilos y flagelos) y del disco suctor seguida de la separación del citoplasma, de tal manera que se forman dos trofozoitos hijos; este proceso se ve favorecido por el pH alcalino del epitelio intestinal. Los trofozoitos permanecen firmemente unidos a las microvellosidades por medio del disco suctor, envueltos en el moco que recubre la pared intestinal, lo cual le permite resistir el peristaltismo; o bien,

pueden encontrarse libres dentro de la luz intestinal; muy raramente invaden aquélla y únicamente se pueden visualizar en las heces blandas o líquidas.^{5,6,11-14,17}

Cuando las condiciones del medio intestinal le son adversas, como por ejemplo la deshidratación que sufre el bolo fecal en el colon, la forma vegetativa se enquistas y sale al exterior con las heces del huésped, y a diferencia de lo que ocurre con los trofozoitos, los quistes se suelen encontrar en las heces de consistencia normal o dura, siendo capaces de infectar a un huésped susceptible o de reinfectar al mismo huésped (Figura 1.4).^{5,6,8,13,17}

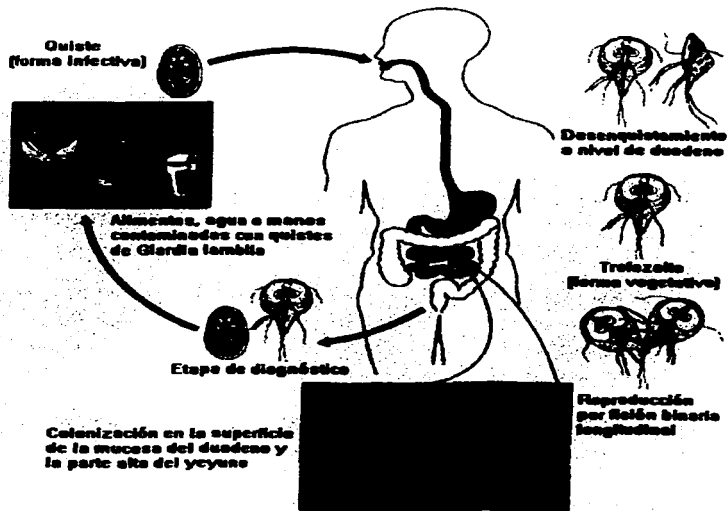


Figura 1.4 Esquema el ciclo biológico de *Giardia lamblia*.^{18,19}

1.1.4 Epidemiología

La giardiosis es una infección cosmopolita, la cual tiene una amplia distribución mundial, su prevalencia varía entre un 2 y 7% en países industrializados y entre un 20 y 30% en países en vías de desarrollo; en México, como ya se mencionó, varía entre 0.7 a 66%, siendo las regiones tropicales y subtropicales las más afectadas, sobre todo aquellas en donde las condiciones de higiene y alimentación son precarias.^{3,4,11}

Como ocurre con otras parasitosis intestinales, la giardiosis afecta a individuos de todas las edades, aunque las infecciones son más frecuentes en niños que en adultos. La enfermedad puede adquirirse directamente por contagio de persona a persona por la vía fecal-oral, siendo ésta vía la más observada en guarderías e instituciones similares; o bien, por alimentos o agua contaminada con materia fecal que contengan quistes de *Giardia lamblia*. Otro mecanismo de transmisión es mediante el contacto ano-boca utilizado por personas con hábitos homosexuales. En estos individuos, la giardiosis es significativamente superior que en la población general.^{10,11,13-15,17}

Por otro lado, si tomamos en cuenta que esta parasitosis puede afectar a algunos animales domésticos, como el perro y el gato, podríamos pensar en estos como otra vía de contagio.^{2,5,10,17}

Se ha planteado que la facilidad de transmisión de *Giardia lamblia* quizás se deba a que la dosis infectante es tan baja como sólo 10 quistes.^{10,11,17}

1.1.5 Patogenia

El daño producido por *Giardia lamblia* es muy variable, ya que se han observado pacientes que presentan alteraciones mínimas de la mucosa intestinal, así como pacientes que muestran atrofia parcial o total de las vellosidades del intestino delgado. En estos últimos, se produce una seria deficiencia en la absorción de nutrientes, lo que trae como consecuencia una repercusión en el estado nutricional.^{6,11,15}

Al parecer hay una correlación entre la magnitud del daño microscópico del intestino y la intensidad de la sintomatología, ya que, cuando la giardiosis cursa de manera asintomática, el daño histológico es mínimo; pero, en casos graves en los que se presenta con malabsorción, las vellosidades intestinales presentan una configuración anormal cuando son observadas bajo microscopia óptica y bajo microscopia electrónica, en las cuales se muestran alteraciones del epitelio intestinal tanto a nivel de las microvellosidades como en el citoplasma. Las microvellosidades que rodean las células epiteliales aumentan su superficie de absorción y, aparecen achatadas, engrosadas o emergiendo unas de otras. En las células epiteliales, el citoplasma presenta alteraciones en las que se manifiestan un gran número de vacuolas, lo que conduce al daño celular y, conlleva a que la célula epitelial sea eliminada al lumen intestinal, con lo que se acelera la velocidad del recambio celular y la repoblación con células predominantemente inmaduras desde el punto de vista enzimático y de transporte. Estos hechos conducen a un síndrome de malabsorción, que afecta a principalmente a lípidos y en menor forma a carbohidratos y proteínas. Estudios clínicos han demostrado que la absorción intestinal de caroteno, D-xilosa, ácido fólico, vitamina A, vitamina B₁₂ y lactosa es deficiente en individuos con giardiosis. El daño de las células del epitelio intestinal también podría explicar la disminución de la actividad de las disacaridasas y otras enzimas de la mucosa, así como de la actividad trípica encontrada en pacientes infectados, la cual mejora después del tratamiento específico.^{3,4,6,10,11,14}

También se ha asociado en personas con giardiosis, un incremento en el número de bacterias anaerobias y aerobias en la parte proximal del intestino delgado, lo que puede provocar cambios en su arquitectura histológica. Este crecimiento bacteriano también se ha asociado con la desconjugación de sales biliares presentes en el duodeno, ocasionando trastornos en la solubilización de los lípidos y una malabsorción de las grasas; por su parte, las sales biliares libres son membranotóxicas y pueden causar secreción intestinal y, de esta forma contribuyen a la patogénesis de la diarrea.^{4,6,11,13,15}

Predisponen a la infección sintomática de *Giardia lamblia*, la aclorhidria, la hipogammaglobulinemia de las clases IgG e IgM o concentraciones bajas o nulas de IgA secretoria en el intestino delgado.^{6,14,15,17}

1.1.6 Sintomatología

La sintomatología de la giardiasis depende de tres factores principalmente, entre los cuales se encuentran: número de quistes infectantes, cepa parasitaria y estado nutricional e inmunológico del huésped. De acuerdo a estos la sintomatología puede cursar de manera asintomática, la cual es presentada por la mayoría de las personas infectadas por este protozooario; o de manera sintomática, en la cual la giardiasis puede cursar de manera aguda o crónica.^{2-4,6,10,11}

En los casos sintomáticos, tras un periodo de incubación promedio de diez días, las molestias más frecuentes en la fase aguda son: náusea, vómito, dolor abdominal epigástrico, flatulencias, distensión abdominal, anorexia y diarrea, observándose las evacuaciones acuosas, fétidas, flotantes, sin moco ni sangre. Esta fase dura 3 a 4 días y, si no es atendida, la giardiasis pasa a su fase crónica, en la cual se presentan cuadros diarreicos persistentes, pastosos, de mal olor; la anorexia y los dolores abdominales persisten y el paciente sufre una importante pérdida de peso; el cuadro puede persistir así por un lapso indefinido si no se recibe atención médica. Cuando es muy grave la infección, se desarrolla el síndrome de malabsorción intestinal, en el que se observan evacuaciones frecuentes de heces con elevado contenido de moco y grasa, pero no sangre; estatorrea, desnutrición y retraso en el crecimiento.^{2-4,6,11,17}

En algunos pacientes se ha observado que *Giardia lamblia* invade la vesícula biliar, en cuyo caso se presenta irritación y edema de la ampulla de Vater, con obstrucción al paso de la bilis, cólico e ictericia.^{4,13}

1.1.7 Tratamiento

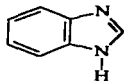
Dentro de los fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis se encuentran:

- El metronidazol, el cual es el fármaco de primera elección. La dosis en tabletas para administración oral en adultos es de 250 mg/3 veces al día/5-7 días y en niños es de 5 mg/kg de peso/3 veces al día/5-7 días.^{2,13,17}

- La quinacrina parece ser la más eficiente, ya que se obtienen tasas de curación hasta del 95%, las dosis recomendadas son 100 mg/3 veces al día/7 días en adultos, y 2 mg/kg de peso/3 veces al día/7 días en niños. Desafortunadamente tiene efectos secundarios serios, dentro de los cuales están náusea, vómito, diarrea, cólicos abdominales, fiebre y en el 1.5% de adultos tratados se pueden presentar cuadros sicóticos, depresión o excitación.^{2,17}
- La furazolidona es otro de los fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiosis, sin embargo, las tasas de curación obtenidas están sólo entre el 75-90%; las dosis en adultos son de 2 g en dosis única y en niños de 30-35 mg/kg de peso, también en dosis única; este fármaco es mucho mejor tolerado, y por su presentación en suspensión es la más recetada en niños.^{2,17}
- Otro anti-giardiasico que puede utilizarse es el tinidazol, ya que al ser un fármaco de larga vida media, se administra en dosis única de 30-35mg/kg de peso en niños. Este fármaco aunque es eficaz no es muy bien tolerado. Otros derivados nitromidazólicos de larga vida media utilizados son: secnidazol, ornidazol y nimirazol, igualmente administrados a dosis únicas.^{2,10,17}
- El sulfato de paromomicina es otro fármaco de elección, que, aunque es más específico para el tratamiento de la amibiasis y de la disentería bacilar, parece estar dando buenos resultados en la giardiosis, ya que en estudios clínicos realizados se han obtenido resultados que muestran una efectividad de un 60-70% de los casos a la dosis de 25-35 mg/kg/3 veces al día/5 días. Además, por ser su absorción intestinal prácticamente nula, es el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiosis en mujeres embarazadas.¹⁷
- En la actualidad, a causa de los fallos terapéuticos frecuentes frente a este protozoo y a las reacciones adversas que presentan los fármacos de elección, se están utilizando nuevos fármacos con éxito variable, entre ellos están el albendazol, el mebendazol, la nitazoxanida, algunas tetraciclinas como la doxiciclina y la tiaciclina; y el DL-propranolol.^{11,17}

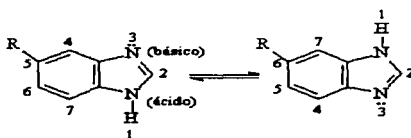
1.2 Los bencimidazoles como agentes giardicidas

1.2.1 Generalidades sobre bencimidazoles



Los bencimidazoles son moléculas cuya estructura consiste en un sistema anular bicíclico, en el cual un anillo de benceno se encuentra unido a las posiciones 4 y 5 de un anillo de imidazol.

Cuando la molécula no se encuentra sustituida en los átomos de nitrógeno del anillo de imidazol, presenta un comportamiento ácido-base, así como el fenómeno de tautomería, en el cual el protón de la posición 1 puede migrar hacia la posición 3 por procesos intermoleculares o por solventes próticos, lo que da como resultado que los sustituyentes de las posiciones 4 y 7, así como 5 y 6, tengan equivalencia química (Figura 1.5).²⁰



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

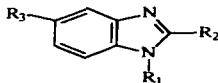
Figura 1.5 Comportamiento ácido-base y equilibrio tautomérico del bencimidazol.²⁰

El interés por la molécula del bencimidazol, como núcleo para desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos potenciales, se estableció en 1950 cuando se encontró que el 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofurasonil)bencimidazol forma parte de la estructura de la vitamina B₁₂; este descubrimiento trajo como consecuencia un extenso desarrollo en la síntesis de estas moléculas y sus derivados.^{20,21} De las acciones biológicas más relevantes de los compuestos sintetizados destacan: la acción antihistamínica, hipertensiva, anticonvulsiva, anestésica, antipirética, antibiótica, antibacteriana, antimicótica, antimalárica, antihelmíntica, antiprotozoaria, reductora del tono muscular esquelético, así como agentes estimulantes del crecimiento.²¹

1.2.2 *Los bencimidazoles como antihelmínticos*

El uso de los bencimidazoles como agentes antihelmínticos data desde los años 60 y se considera al tiabendazol como el primer antihelmíntico de amplio espectro, el cual fue utilizado tanto en animales como en humanos. Sin embargo, se encontró que este compuesto tiene la desventaja de ser metabolizado rápidamente dando lugar al 5-hidroxitiabendazol, un metabolito inactivo que se elimina rápidamente. Este inconveniente dio pauta al desarrollo del cambendazol, el cual tiene un sustituyente isopropiloxicarbonilamino en la posición 5; este compuesto posee una mejor actividad antihelmíntica, pero desafortunadamente presentó efectos teratogénicos en algunos animales.^{20,22}

Después de estos acontecimientos, aparecieron nuevas generaciones de bencimidazoles, ya que debido a su capacidad de experimentar reacciones electrofílicas, nucleofílicas y de ciclocondensación, fue posible sintetizar una amplia variedad de bencimidazoles sustituidos, como los 2-acilaminobencimidazoles, los 2-bencimidazolcarbamatos de alquilo y las 2-bencimidazolilureas, todos con una marcada actividad antihelmíntica,^{20,22} sin embargo, los derivados 2-bencimidazolcarbamatos de metilo fueron los que presentaron una óptima actividad, por lo que varios compuestos con un grupo carbamato de metilo en la posición 2 y sustituidos en la posición 5 (para prever la hidroxilación enzimática) fueron sintetizados (Tabla 1.2).²² Este patrón de sustitución confiere a la molécula mayor vida media y alta polaridad. Así surgieron compuestos activos como el albendazol, mebendazol y flubendazol entre otros, para uso veterinario.²³ La baja o nula toxicidad de estos compuestos también permitió su uso en medicina humana para el tratamiento de helmintosis del tracto gastrointestinal.²⁴ En la actualidad, el albendazol es utilizado como el antihelmíntico por excelencia, ya que con sólo una dosis es efectivo en la mayoría de estas parasitosis.²⁵ La desventaja de los bencimidazolcarbamatos de metilo radica en su escasa solubilidad acuosa, debida a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, lo que trae como consecuencia una baja biodisponibilidad y, por consiguiente, una respuesta terapéutica poco favorable, por lo que su uso se limita al tratamiento de helmintosis intestinales.²⁶

Tabla 1.2. Algunos bencimidazoles usados en la terapéutica contra enfermedades parasitarias.²²

Nombre genérico	R ₁	R ₂	R ₃	Inventor/fabricante
Tiabendazol	H	4-tiazolil	H	MSD
Cambendazol	H	4-tiazolil	NHCOO/-Pr	MSD
Carbendazim	H	NHCOOCH ₃	H	SKF
Lobendazol	H	NHCOOC ₂ H ₅	H	SKF
Parbendazol	H	NHCOOCH ₃	<i>n</i> -Bu	Janssen
Mebendazol	H	NHCOOCH ₃	COC ₆ H ₅	Janssen
Flubendazol	H	NHCOOCH ₃	COC ₆ H ₄ F-4	Janssen
Ciclobendazol	H	NHCOOCH ₃	COC ₃ H ₅	Janssen
Nocodazol	H	NHCOOCH ₃	CO-tien-2-il	Janssen
Fenbendazol	H	NHCOOCH ₃	SC ₆ H ₅	Hoechst
Oxfendazol	H	NHCOOCH ₃	SOC ₆ H ₅	Syntex
Albendazol	H	NHCOOCH ₃	<i>S_n</i> -Pr	SKF
Oxibendazol	H	NHCOOCH ₃	<i>On</i> -Pr	SKF
Luxabendazol	H	NHCOOCH ₃	OSO ₂ C ₄ H ₆ F-4	Hoechst
Triclabendazol	H	SCH ₃	OC ₆ H ₃ Cl ₂ -2,4	Ciba-Geigy
Ricobendazol	H	NHCOOCH ₃	<i>SO_n</i> -Pr	Robert Young

1.2.3 Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Debido a que los bencimidazoles representan una clase de antihelmínticos de amplio espectro, no se conoce con precisión cuál es su mecanismo de acción; investigaciones realizadas indican que éstos pueden ejercer su acción antihelmíntica al inhibir la enzima fumarato reductasa localizada en la membrana mitocondrial, trayendo como consecuencia una inhibición en el metabolismo de glucosa; otro mecanismo sugerido ha sido la inhibición en la captación de glucosa, lo que disminuye el transporte de glucosa y por consiguiente reduce la síntesis de ATP, por lo que las fuentes de energía del parásito se limitan. Sin embargo estudios realizados indican que el principal mecanismo de acción de

estas moléculas es la inhibición de la polimerización de tubulina*, y los mecanismos anteriores son consecuencia de éste (Figura 1.6).²²

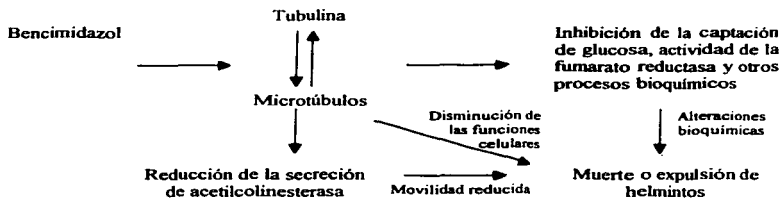


Figura 1.6 Mecanismos de acción de los bencimidazoles.²²

Estudios realizados indican que el albendazol y otros bencimidazoles actúan produciendo la pérdida selectiva de microtúbulos citoplasmáticos de células tegumentarias e intestinales de los helmintos, y altera las sustancias secretoras del aparato de Golgi, la secreción de acetilcolinesterasa, el consumo de glucosa y el agotamiento de glucagón, produciendo primero inmovilización del parásito y luego la muerte.²⁷

1.2.4 Los bencimidazoles como antiprotozoarios

Debido a su gran capacidad antihelmíntica en infecciones del tracto gastrointestinal y asumiendo su mecanismo de acción como inhibidores de la tubulina, se pensó que los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo podrían también presentar actividad antiprotozoaria, ya que algunos de estos organismos, como *Giardia lamblia*, poseen un prominente citoesqueleto constituido principalmente por microtúbulos, los cuales contienen como proteína principal tubulina, la cual también forma parte de su disco sector.

* Tubulina: Proteína que forma parte de los microtúbulos y organelos intracelulares, tienen una variedad de funciones, entre las cuales se encuentran el movimiento de los cromosomas durante la división celular, movilización de partículas intracelulares e intervención en la exocitosis. Esta proteína se encuentra tanto en animales, plantas, hongos, protozoarios y en algunas bacterias.

Con base en lo anterior, se han realizado distintos estudios de susceptibilidad con la finalidad de evaluar a los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo como agentes giardicidas. Dichos estudios han demostrado que el mebendazol y el albendazol *in vitro* son 30 y 50 veces más activos que el metronidazol y de 10 a 40 veces más activos que la quinacrina respectivamente.^{25,28,29}

Además se ha observado por microscopía electrónica de transmisión que, al incubar trofozoitos de *Giardia lamblia* a bajas concentraciones de albendazol, producen notables alteraciones en el citoesqueleto, desaparición del disco suctor y la eventual pérdida de la viabilidad.³⁰

Sin embargo, cuando el albendazol se evaluó *in vivo*, su eficacia giardicida fue prácticamente la misma que la del metronidazol.²⁵ Estos resultados se han atribuido a diferentes factores como son: los diferentes tiempos de exposición del parásito con el fármaco; para el ensayo *in vitro* este tiempo es de 24 h,³¹ y en el ensayo *in vivo* la permanencia de un fármaco a nivel de duodeno y yeyuno es de aproximadamente de 1-3 h. Otros factores que provocan la disminución de la concentración de los fármacos en el lumen intestinal son el peristaltismo, la absorción y el metabolismo del fármaco. Aunque el peristaltismo es un factor que se puede controlar fácilmente en la giardiosis por medio de la administración de antidiarreicos, la absorción y el metabolismo que sufren este tipo de fármacos son factores difíciles de controlar.³²

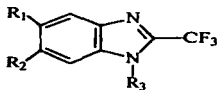
Por lo anterior y asumiendo la principal desventaja que presentan los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, su insolubilidad acuosa, nuestro grupo de trabajo ha realizado el diseño y la síntesis de diferentes moléculas bencimidazólicas,³³⁻³⁵ así como profármacos de éstas,^{36,37} con el propósito de que sean más eficaces no sólo como antihelmínticos, sino como antiprotozoarios, y a su vez, lograr que se reduzca la duración de los tratamientos y mejore el costo-beneficio.

1.2.5 Derivados del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol

La síntesis de 2-trifluorometil bencimidazoles fue publicada en 1953, y desde entonces se han sintetizado diferentes derivados de estas moléculas con diferentes actividades biológicas, entre ellas se encuentran: actividad antibacterial, antiviral, herbicida, insecticida y moluscocida, entre otras.³⁸

En nuestro grupo de trabajo estos bencimidazoles fueron investigados como agentes antiprotozoarios,³⁹ algunas de las moléculas sintetizadas y probadas contra los protozoarios *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1.3 Derivados de 2-trifluorometil bencimidazoles con actividad antiprotozoaria.³⁹



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
A	H	H	H
B	Cl	H	H
C	Cl	Cl	H
D	H	H	CH ₃
E	Cl	H	CH ₃
F	H	Cl	CH ₃
G	Cl	Cl	CH ₃

Los ensayos biológicos de estas moléculas mostraron que todos los compuestos con excepción de B fueron más activos contra *Giardia lamblia* que el metronidazol, siendo el compuesto E más activo que el propio albendazol. En el caso de *Entamoeba histolytica* todos los compuestos fueron más activos que el metronidazol e inclusive el albendazol, siendo el compuesto F el de mayor actividad.³⁹

En este ensayo también se observó que estos compuestos no afectan la inhibición de la tubulina como lo hace el albendazol, lo que sugiere que estos compuestos tienen un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mecanismo de acción diferente a los de los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, lo que significa que el hidrógeno en posición 1 y el sustituyente metoxicarbonilamino en la posición 2 son importantes para la unión de los bencimidazoles en la tubulina, pero no para el efecto antiparasitario.³⁹

Con base en los resultados anteriores y con el fin de mejorar aún más su solubilidad en agua, nuestro grupo de trabajo ha diseñado y sintetizado distintas moléculas entre ellas el Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, la cual mostró mayor actividad giardicida que el metronidazol al igual que sus congéneres (CL_{50} 0.656 μ M).³² Sin embargo esta molécula, al tener en su estructura un grupo carboxílico, podría ocasionar irritación gástrica y su uso podría quedar limitado.

1.3 Desventajas de las moléculas que presentan un grupo carboxílico en su estructura

Dado que los antiinflamatorios no esteroideos son ácidos débiles al igual que nuestro principio activo, se tomarán como ejemplo para describir el daño que puede causar una molécula que contiene un ácido carboxílico en su estructura química en tratamientos prolongados.

1.3.1 Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y sus efectos adversos gastrointestinales

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un grupo de fármacos químicamente heterogéneos que suele tener en común una actividad antipirética, analgésica y antiinflamatoria y un perfil cualitativamente similar de efectos adversos. Son ampliamente utilizados en diferentes situaciones clínicas, de tal forma que, en dosis únicas o tratamientos cortos, son analgésicos efectivos en el tratamiento del dolor leve a moderado de origen somático (músculo-esquelético), dolor postoperatorio, dolor visceral (dismenorrea, cólico renal) y dolor óseo metastásico. A dosis antiinflamatorias mantenidas, se usan para el tratamiento sintomático del dolor e inflamación en enfermedades reumáticas (artritis reumatoide, espondiloartropatías inflamatorias, artrosis, reumatismos de partes blandas y

otros procesos). Por lo anterior, los AINE son fármacos ampliamente demandados por los pacientes y utilizados por los médicos.^{40,41}

Entre los AINE más ampliamente utilizados en el país se encuentran: el ácido acetil salicílico, el naproxen, el diclofenaco y el ibuprofeno, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1.7.

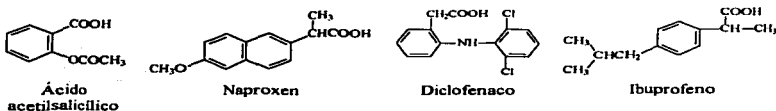


Figura 1.7 AINE más ampliamente utilizados.⁴²

Como se puede observar desde el punto de vista químico, todos se relacionan entre sí por ser ácidos débiles; además comparten la propiedad de inhibir la biosíntesis de las prostaglandinas, y pueden disminuir la producción de radicales libres y de superóxido. También pueden interactuar con la adeniliclasa para alterar la concentración celular de AMPc.⁴²

Sin embargo, estos medicamentos también presentan una gran variedad de efectos adversos como son: fallo renal, hepatitis, anemia, síndrome de Stevens-Johnson y otras reacciones anafilácticas, aunque los más conocidos por su frecuencia, y que son objeto de revisión en el presente trabajo, son los gastrointestinales. Destacan por su importancia las úlceras y erosiones gastroduodenales, hemorragias digestivas y perforación. Estos efectos también pueden aparecer en tramos distales del tubo digestivo, así como inflamación y cambios en la permeabilidad del mismo (colitis, enfermedad inflamatoria intestinal).⁴¹

1.3.1.1 Mecanismo de gastrolesividad de los AINE

Los AINE lesionan la mucosa gastroduodenal por dos mecanismos, un efecto local que es pH-dependiente, que varía notablemente entre los diferentes AINE y sus preparaciones,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y un efecto sistémico que es menos específico de cada principio activo y en el que no interviene un contacto directo con la mucosa (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Características de los efectos locales y sistémicos ocasionados por los AINE en la parte alta del tracto gastrointestinal.⁴¹

Efectos locales	Efectos sistémicos
Daño químico local	Inhibición sistémica de la síntesis de prostaglandinas
Se necesita contacto tópico	Ocurre con cualquier vía de administración
pH dependiente	pH independiente
Varía con el pKa del medicamento	Independiente del pKa del medicamento
Se puede evitar con el recubrimiento entérico o con profármacos	Ocurre independientemente de la forma de administración
Ocurre de una forma aguda (en horas)	Ocurre con el tratamiento crónico (semanas)
El daño es superficial	Ulceraciones profundas
Raramente ocasiona sangrado significativo o perforación	Puede ocasionar sangrado grave o perforación

Dado que los daños sistémicos se deben al mecanismo de acción propio de estos fármacos, nuestra atención se centrará en el daño local, el cual es el que presenta la molécula *per se*.

Daño local. La mayoría de los AINE son ácidos débiles con un pKa entre 3-5, lo que determina que en un medio ácido se encuentren en forma no ionizada, que es altamente liposoluble, por lo que atraviesan las membranas celulares con gran rapidez. Una vez dentro del citoplasma celular, el pH neutro hace que éstos sean disociados a su forma ionizada, produciéndose una retención de iones hidrógeno que origina lesión celular directa. Mediante endoscopia se observa que este daño local aparece como una gastritis superficial y hemorragia de la submucosa. Los AINE también pueden causar daño tópico por disminución de la hidrofobicidad del moco gástrico, lo que permite el paso del HCl y la pepsina hasta las células epiteliales, lesionándolas. El daño tópico puede ocurrir como resultado de mecanismos indirectos a través de la secreción biliar y el posterior reflujo duodenogástrico de metabolitos activos.^{41,43}

El daño local se ha pretendido evitar utilizando formulaciones galénicas tamponadas o con recubrimiento entérico, utilizando profármacos no ácidos o administrando antisecretores tipo anti H_2 u omeprazol.⁴¹

Por lo anterior, y tomando en cuenta que en el tratamiento de la giardiosis, utilizando como agente terapéutico al albendazol, la dosis es de 400 mg diarios durante 5 días, podría presentarse irritación gástrica como en el caso de los AINE. Por lo cual en el presente trabajo se realizarán profármacos del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico, con el fin de eliminar estos posibles efectos adversos y potenciar más a la molécula como agente giardicida.

1.4 Los profármacos, una alternativa en la investigación Química Farmacéutica

En ciertas ocasiones, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos que presentan alguna actividad biológica de interés terapéutico no son siempre satisfactorias. Los grupos funcionales que poseen en su estructura química pueden inducir 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, trayendo como consecuencia perfiles farmacocinéticos inadecuados. Ante esta situación, la administración de estos compuestos se encuentra limitada y su utilidad clínica es de ámbito restringido.^{44,45}

Para la optimización del comportamiento biológico de fármacos se han utilizado recursos biológicos, físicos y químicos,⁴⁶ siendo estos últimos los de mayor interés para el presente trabajo, ya que ofrecen el mayor grado de flexibilidad para lograr eliminar los inconvenientes que presentan algunos fármacos en su comportamiento biológico.^{46,47}

En los recursos químicos pueden considerarse dos alternativas de trabajo: la optimización farmacodinámica y la optimización farmacocinética.^{48,49} La primera y más utilizada se caracteriza por realizar modificaciones estructurales a un principio activo, con el propósito de obtener derivados con mayor potencia terapéutica o índice terapéutico más amplio.^{50,51} Sin embargo, estos cambios no siempre cumplen con su objetivo de

optimización, ya que en ocasiones provocan la pérdida total de la actividad biológica o el encuentro de una nueva molécula con propiedades farmacológicas diferentes.⁵⁰

En la segunda alternativa, las modificaciones están orientadas a lograr una mejor eficiencia 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 o en etapa de investigación preclínica. Dentro de este ámbito, existe el diseño de los profármacos, el cual se encuentra cualitativamente bien establecido; y 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.^{49,52,53}

1.4.1 Los profármacos, su conceptualización y clasificación

Un profármaco es un compuesto farmacológicamente inactivo que requiere de una transformación, ya sea espontánea o enzimática dentro del organismo, para poder liberar o generar el fármaco, para que éste ejerza su acción terapéutica.^{49,53}

Los profármacos son utilizados en principios activos con problemas de formulación, absorción, metabolismo o selectividad de acción.⁵⁴

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; en la Tabla 1.5 se muestran algunos de los criterios de clasificación.⁵⁵

Tabla 1.5 Criterios de clasificación para los profármacos

Clasificación	Tipo
Química	<ul style="list-style-type: none"> • Bioprecusores • Derivados biorreversibles • Sistemas de liberación química selectiva • Profármacos macromoleculares • Profármacos secuenciales: terapia anticuerpo-enzima:profármaco (ADEPT)

Continuación de la Tabla 15

Mecanismos de activación	<ul style="list-style-type: none">• Enzimáticos Presentan variabilidad biológica Dificultades de optimización• No enzimáticos No variabilidad biológica Menos dificultades para optimizar Dificultades por inestables
Direccionamiento	<ul style="list-style-type: none">• Mediante la bioactivación selectiva en un tejido (ADEPT)• Mediante un sistema de liberación química selectiva• Mediante un sistema de transporte selectivo hacia un tejido

En el presente trabajo se hará énfasis en los profármacos del tipo derivados biorreversibles, ya que de este tipo son los profármacos que se van a preparar.

1.4.1.1 Los profármacos del tipo derivados biorreversibles

Uno de los tipos de profármacos que se han considerado como la primera alternativa para la optimización de las propiedades de un fármaco son los derivados biorreversibles.⁵⁶

Los derivados biorreversibles son compuestos que presentan la estructura del principio activo, al cual se le ha adicionado una porción estructural, denominada modificador, el cual cambiará temporalmente las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Este tipo de compuestos liberan al principio activo mediante reacciones de hidrólisis, oxidaciones o reducciones.^{45,49,52}

1.4.2 Criterios para la elaboración de profármacos.⁵⁷

Los criterios que deben tomarse en cuenta para el diseño y la elaboración de los profármacos son:

1. Identificar el problema de comportamiento biológico del fármaco.
2. Identificar las propiedades fisicoquímicas requeridas para la eficiencia máxima y liberación óptima del fármaco.

3. Planear las modificaciones estructurales del fármaco que sean necesarias para reducir o eliminar el efecto indeseable en particular. El cambio químico propuesto modificará las propiedades fisicoquímicas del fármaco, con lo cual se afectará su absorción, distribución y metabolismo enzimático.
4. Ponderar las condiciones que son disponibles *in vivo* (enzimas, pH, etc.) para la transformación del profármaco en fármaco, después que el primero ha sido administrado. Esta bioconversión del profármaco se lleva a cabo mediante la intervención de enzimas hidrolasas, reductasas u oxidasas, o por reacciones intramoleculares.
5. Proponer estructuras de profármacos en los cuales se espere que el compuesto diseñado sea inactivo o menos activos biológicamente que el fármaco de origen.
6. Tratar que la preparación de profármacos se lleve a cabo en la menor cantidad de pasos posibles.
7. Seleccionar de los profármacos propuestos, aquellos que tengan las propiedades físicas y químicas adecuadas y que puedan ser potencialmente biotransformados en el comportamiento biológico deseado como candidatos a evaluaciones de biodisponibilidad, toxicidad, etc.

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

1. La unión entre el fármaco y el modificador es generalmente un enlace covalente.
2. La unión entre el fármaco y el modificador debe ser rota *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.

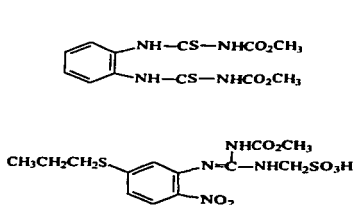


Figura 1.8 Algunos pro-benzimidazoles con acción antiparasitaria

Por lo expuesto anteriormente, es factible utilizar la estrategia de los profármacos para tratar de optimizar el comportamiento biológico de nuevos benzimidazoles antiparasitarios.

Tiofanato. Profármaco del 2-benzimidazolcarbamato de etilo, introducido en 1970 como pesticida; posteriormente se encontró que presentaba actividad contra nematodos invasores del tracto gastrointestinal del ganado.

Netobimin. Un producto de Shering Plough, desarrollado como antihelmintico veterinario de gran actividad contra nematodos cestodos y trematodos que parasitan animales domésticos. El perfil antihelmintico de netobimin es muy parecido al del albendazol.

2. Planteamiento del problema e hipótesis de trabajo

2.1 Planteamiento del problema

Para que un compuesto activo pueda producir su efecto terapéutico, es necesario que alcance su sitio de acción dentro del organismo en cantidad suficiente. 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, distribución, metabolismo y excreción no constituyan las etapas críticas de su comportamiento biológico.

En el caso de los bencimidazoles giardicidas, es necesario tomar en cuenta que éstos tengan características de solubilidad y liposolubilidad que les permitan alcanzar su sitio de acción (el parásito) a nivel de duodeno y yeyuno, además de no ser rápidamente metabolizados. En este contexto se escogió como principio activo al Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, ya que esta molécula, por sus características estructurales, tiene el potencial de ejercer su efecto giardicida mejor que sus congéneres los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, debido a que muestra una mayor posibilidad de ser soluble en agua. Sin embargo, al tener en su estructura a un grupo carboxílico, puede provocar irritación gástrica por la cantidad de fármaco que se tiene que administrar y el tiempo de tratamiento, generalmente de 5-7 días para la giardiosis, lo cual podría limitar su uso. Por lo anterior surge la interrogante de si ¿es posible que mediante modificaciones moleculares se pueda abatir el comportamiento adverso del grupo carboxilo a nivel de estómago, sin comprometer la actividad giardicida del compuesto seleccionado?

2.2 Hipótesis de trabajo

La modificación del grupo carboxilo del Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, sin comprometer la actividad giardicida del compuesto, se logrará mediante la preparación de profármacos de tipo derivados biorreversibles que liberen al principio activo en presencia de enzimas presentes en duodeno y yeyuno.

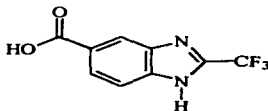
3. Objetivos

3.1 Objetivo general

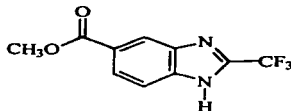
El presente trabajo tiene como propósito, modificar características moleculares del Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, molécula que ha demostrado tener actividad giardicida, mediante la preparación de tres profármacos potenciales, de la modalidad de derivados biorreversibles.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar el Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, el 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo, el 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol 5-carboxilato de etilo y el 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo como profármacos potenciales del primero (Figura 3.1).

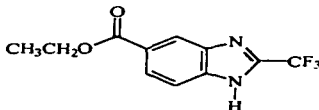


Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (1)

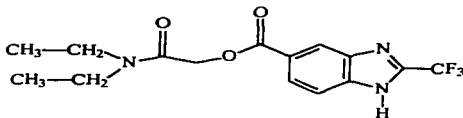


2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (2)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol 5-carboxilato de etilo (3)



2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(diethylamino)-2-oxoetilo (4)

Figura 3.1 Principio activo y profármacos propuestos a sintetizar

- Caracterizar los compuestos sintetizados, mediante sus propiedades físicas: aspecto, punto de fusión y R_f cromatográfico, así como por métodos espectroscópicos (IR y RMN) y espectrometría de masas.
- Evaluar la solubilidad de los compuestos en agua desionizada y en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica de 0.6 M.
- Evaluar la estabilidad de los profármacos en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y solución amortiguadora de Tris(hidroximetil)aminometano, HCl pH 8.
- Evaluar la bioconversión *in vitro* de los profármacos en presencia de las enzimas esterasa de hígado de cerdo y tripsina de páncreas de cerdo.

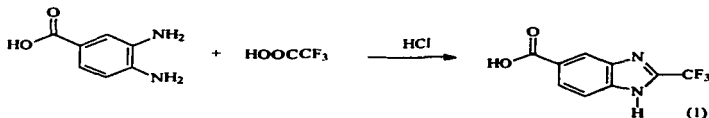
4. Metodología

En el presente capítulo se muestran en forma de esquemas los diversos procedimientos utilizados en la síntesis de los compuestos, así como una breve descripción de los mismos. También se encuentran descritos los procedimientos empleados para la evaluación de la solubilidad de los cuatro compuestos sintetizados, la evaluación de estabilidad de los tres profármacos en soluciones amortiguadoras y la evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas. Los detalles de cada procedimiento se describen en el apartado de procedimientos experimentales.

4.1 Metodología para la síntesis de los compuestos

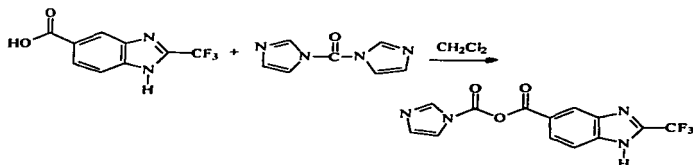
Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos propuestos en los objetivos se siguió la siguiente secuencia de reacciones:

Síntesis del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (1).³⁹

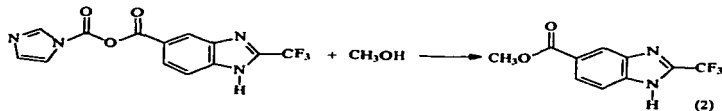


Para obtener el compuesto (1) se calentó a reflujo una solución de ácido 3,4-diaminobenzoico y ácido trifluoroacético, utilizando como catalizador ácido clorhídrico. La reacción procede vía el acil derivado, el cual cicliza bajo la influencia de exceso de ácido.

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2).⁶⁰

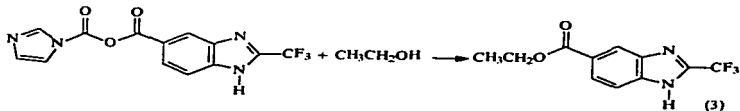


Para la síntesis del compuesto (2) se hizo reaccionar el compuesto (1) con 1,1-carbonildiimidazol, utilizando como disolvente cloruro de metileno; la mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo condiciones anhidras. El producto de la reacción fue el intermediario anhídrido 1H-imidazol-1-carboxílico-2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico, el cual favoreció el segundo paso de la reacción que consistió en la esterificación del mismo.



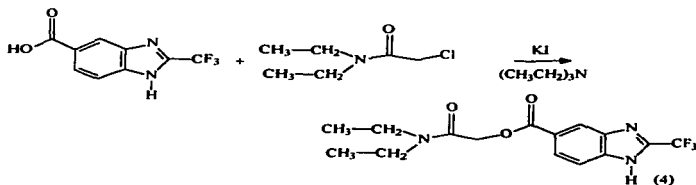
Para llevar a cabo la reacción de esterificación se hizo reaccionar el intermediario con metanol absoluto.

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol 5-carboxilato de etilo (3).⁶⁰



El compuesto (3) se obtuvo de manera similar que el compuesto (2), la única variante fue que en la reacción de esterificación se agregó etanol absoluto en lugar de metanol absoluto.

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (4)^{61,62}



Para obtener el compuesto (4) se hizo reaccionar el compuesto (1) con 2-cloro-*N,N*-diethylacetamida, teniendo como resultado una sustitución nucleofílica de tipo S_N2. En esta reacción se utilizó como disolvente etilenglicol dimetil eter, KI como catalizador y trietilamina como base.

4.2 Evaluación de la solubilidad de los compuestos sintetizados

4.2.1 Solubilidad en agua desionizada

A los cuatro compuestos sintetizados se les determinó su solubilidad en agua desionizada empleando el siguiente procedimiento:^{63,64}

En tubos de ensayo de 13 x 100 se colocaron 5 mg de cada compuesto (por triplicado) y se agregaron 3 mL de agua desionizada. Posteriormente se adaptaron tapones de hule en todos los tubos y se colocaron en un termomezclador, el cual los agitó por 2 h. a 1000 rpm a 37 °C. Este mismo experimento se realizó por 24 h. siguiendo las mismas condiciones, con el fin de alcanzar el equilibrio de saturación de la solución acuosa.

Terminando el tiempo de agitación establecido, se procedió a separar por filtración el compuesto que no se logró disolver en cada tubo, empleando filtros de membrana de celulosa (Ederol 100, calidad 15). Posteriormente se determinó la concentración de los compuestos por espectrofotometría a la longitud de onda máxima de absorción para cada compuesto. Los datos de absorbencia fueron extrapolados a datos de concentración mediante curvas de calibración previamente realizadas y que se presentan, junto con los datos de longitud de onda máxima, en el apartado de procedimientos experimentales.

4.2.2 Solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica de 0.6 M

El procedimiento utilizado para esta evaluación fue el mismo que se utilizó para la evaluación de la solubilidad de los compuestos en agua desionizada; la única variante fue que en este ensayo se agregó solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica de 0.6 M, cuya preparación se encuentra especificada en el apartado de procedimientos experimentales.

4.3 Estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras

Este estudio se realizó con el fin de observar la influencia del pH en la degradación de los profármacos. La estimación se realizó por espectrofotometría, para la cual se determinó el cambio de absorbencia de los compuestos en función del tiempo.

Para el estudio se prepararon soluciones patrones de los tres profármacos con las soluciones amortiguadoras, tanto de fosfatos pH 7 como de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8, cuyas concentraciones no excedieron de una absorbencia de 2.00.

Posteriormente, se ajustó el espectrofotómetro a la longitud de onda máxima del compuesto en estudio y a 0.0 de absorbencia, utilizando como blanco la solución amortiguadora en uso. El grado de estabilidad de los profármacos se evaluó, como ya se mencionó anteriormente, con el cambio de la absorbencia versus el tiempo, el cual fue de 3 h. para cada compuesto, a temperatura ambiente (20 °C).

Para estimar los parámetros cinéticos de los profármacos, se graficó el logaritmo del porcentaje de absorbencia residual ($\log \%A$) del profármaco en estudio contra el tiempo. El $\log \% A$ se calculó de la siguiente forma:⁶⁵

$$\log \% A = \frac{A_t}{A_0} \times 100$$

donde A_t es la absorbencia registrada a un tiempo determinado, y A_0 es la absorbencia inicial.

Asimismo se calcularon K_{ob} , para ambas soluciones amortiguadoras, con el fin de establecer el tiempo de vida media de los compuestos.

4.4 Evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas

4.4.1 Evaluación empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.

Para esta determinación, se prepararon soluciones patrones de los tres profármacos con la solución amortiguadora fosfatos pH 7, cuyas concentraciones no excedieron de una absorbencia de 2.00. También se preparó una solución patrón de la enzima*, para la cual se utilizaron 30 μ L de la enzima, los cuales se colocaron en un matraz aforado de 10 mL; la solución se llevó al aforo con agua destilada.

Posteriormente se ajustó el espectrofotómetro a la longitud de onda máxima del compuesto en estudio y a 0.0 de absorbencia, utilizando como blanco la solución patrón del mismo compuesto. Una vez ajustado el espectrofotómetro, se procedió a colocar en una celda de cuarzo 2.5 mL de la solución patrón del compuesto en estudio y 100 μ L de la solución patrón de la enzima; la mezcla se agitó por inversión y la liberación del principio activo (Ácido 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico) de los profármacos se

* La capacidad de hidrólisis enzimática de la esterasa de hígado de cerdo, empleada en esta evaluación, se estableció previamente; los detalles del experimento se presentan en el apartado de procedimientos experimentales

monitoreó a través del cambio de la absorbencia en función del tiempo, el cual fue de 1 h. para cada compuesto, a temperatura ambiente (20 °C).

4.4.2 Evaluación empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.

El procedimiento utilizado para la evaluación de la liberación del principio activo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo fue el mismo que se utilizó en la evaluación anterior; las únicas variantes fueron que en este ensayo las soluciones patrones de los compuestos, se realizaron con solución amortiguadora de Tris(hidroximetil)aminometano, HCl pH 8 en lugar de solución amortiguadora de fosfatos pH 7, y que la solución patrón de la enzima** se preparó con 10 mg de la enzima disueltos en 1 mL de agua destilada.

4.5 Proteínas totales.⁶⁶

A cada una de las enzimas empleadas en las evaluaciones de liberación del principio activo, se les determinó el contenido de proteínas totales por el método de Bradford, empleando el kit BioRad®. Para la solución de esterasa de hígado de cerdo se determinó 0.3298 mg de proteína/mL y para la tripsina de páncreas de cerdo 0.3735 mg de proteína/mL. Los detalles del experimento se encuentran en el apartado de procedimientos experimentales.

** La capacidad de hidrólisis enzimática de la tripsina de páncreas de cerdo, empleada en esta evaluación fue determinada previamente; los detalles del experimento se describen en el apartado de procedimientos experimentales

5. Resultados

5.1 Síntesis de los compuestos

En la Tabla 5.1, se muestran los resultados obtenidos de las síntesis de los compuestos, así como algunas de sus propiedades físicas como son: aspecto, punto de fusión y R_f cromatográfico.

Tabla 5.1 Resultados de la síntesis y propiedades físicas de los compuestos

Compuesto	Rendimiento del producto crudo	Rendimiento del producto purificado	p.f.	R_f	Aspecto
1	73.7 %	68.6 %	276.7-278.2 °C	0.2 ^{F1}	Sólido fino color rosa claro
2	66.3 %	48.3 %	163.8-167.5 °C	0.43 ^{F1}	Sólido fino color blanco
3	59.7 %	39.8 %	142.7-144.4 °C	0.49 ^{F1}	Sólido fino color blanco
4	75.8 %	22.9 %	151-153 °C	0.37 ^{F2}	Cristales color blanco

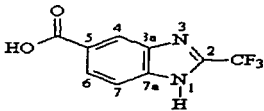
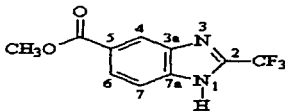
F1= Fase móvil Cloroformo/Acetona/Éter de petróleo/Ácido acético (10:6:15:0.6)

F2= Fase móvil Cloroformo/Metanol (95:5).

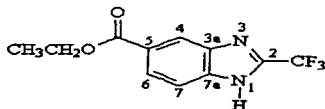
5.2 Caracterización de los compuestos sintetizados

Los resultados espectroscópicos y espectrométricos con los cuales fue posible la caracterización de los compuestos sintetizados, se muestran en la Tabla 5.2. Los espectros de donde se obtuvieron estos datos, se encuentran en el Apéndice B.

Tabla 5.2 Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos
 <p>Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (1)</p>	<p>IR ν_{\max} (KBr/Pastilla) 3659.21 (Ar-NH-R), 3089.24 (OH), 1677.66 (C=O), 1328.38 (Ar-NH-R), 1163.68 (C-F) cm^{-1}</p> <p>RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆) δ 7.765 (dd, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.965 (dd, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, H-6) 8.304 (d, <i>J</i> = 0.9 Hz, 1H, H-4) 12.296 (sa, 1H, COOH) ppm</p> <p>RMN-¹³C (DMSO-<i>d</i>₆) 113.487, 117.073, 120.659, 124.245 (CF₃), 116.013 (C-7), 119.169 (C-5), 125.202 (C-4), 126.743 (C-6), 138.257 (C-3a), 140.311 (C-7a), 141.464, 141.987, 142.515, 143.038 (C-2), 167.453 (C=O) ppm.</p> <p>EM (IE) <i>m/z</i>: 230 (100%, M⁺)</p>
 <p>2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2)</p>	<p>IR ν_{\max} (KBr/Pastilla) 3240.67 (C-H insat.), 1697.39 (C=O), 1321.95 y/o 1290.22 (Ar-NH-R), 1193.41 (R-CO-OCH₃), 1146.9 (C-F) cm^{-1}</p> <p>RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆) δ 3.871 (s, 3H, -OCH₃), 7.84 (dd, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.96 (dd, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, H-6) 8.30 (d, <i>J</i> = 0.9 Hz, 1H, H-4) ppm.</p> <p>RMN-¹³C (DMSO-<i>d</i>₆) 52.214 (CH₃O-), 113.375, 116.965, 120.551, 124.142 (CF₃), 116.111 (C-7), 119.197 (C-5), 124.875 (C-4), 125.375 (C-6), 138.238 (C-3a), 140.348 (C-7a), 141.632, 142.155, 142.683, 143.206 (C-2), 166.257 (C=O) ppm.</p> <p>EM (IE) <i>m/z</i>: 244 (45%, M⁺), 213 (100% M-31 CH₃-O)</p>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de etilo (3)

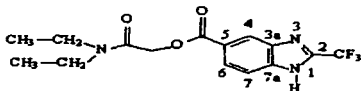
IR ν_{\max} (KBr/Pastilla) 2985.63, 2912.29, 2853.21 (C-H sat.), 1722.71 (Ar-CO-O), 1327.87 y/o 1289.48 (Ar-NH-R), 1192.62 (R-CO-OR), 1138.52 (C-F) cm^{-1}

RMN- ^1H (DMSO- d_6) δ 1.36 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ -) 4.36 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ -), 7.775 (dd, $J = 8.7$ Hz 1H, H-7), 7.96 (dd, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6) 8.294 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H-4)

ppm.

RMN- ^{13}C (DMSO- d_6) 14.16 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ -), 60.827 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ -), 114.732, 117.424, 120.116, 122.812 (CF_3), 116.083 (C-7), 119.125 (C-5), 124.839 (C-4), 125.662 (C-6), 138.248 (C-3a), 140.344 (C-7a), 141.803, 142.197, 142.592, 143.986 (C-2), 165.743 (C=O)

EM (IE) m/z : 258 (31%, M^+), 213 (100% $\text{M}-45$ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O}$)



2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(diethylamino)-2-oxoetilo (4)

IR ν_{\max} (KBr/Pastilla) 3433.64 (Ar-NH-R), 2978.79 (C-H sat.), 1719.09 (C=O), 1623.54 (CO-N<), 1322.13 y/o 1291.01 (Ar-NH-R), 1187.73 (R-CO-O-R), 1132.46 (C-F) cm^{-1}

RMN- ^1H (DMSO- d_6) δ 1.018 (t, 3H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$) 1.16 (t, 3H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$), 3.3 (m, 4H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$), 5.3 (s, 2H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$), 7.83 (dd, $J = 8.4$ Hz 1H, H-7), 8.01 (dd, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6) 8.35 (d, 1H, H-4) 14.334 (sa, 1H, N-H)

ppm

RMN- ^{13}C (DMSO- d_6) 12.903 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$), 13.958 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$), 39.5 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$), 61.985 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-OCO-}$), 113.363, 116.955, 120.542, 124.129 (CF_3), 125.081 (C-4), 125.337 (C-6), 141.668, 142.193, 142.723, 143.248 (C-2), 165.07 (C=O), 165.448 (>N-C=O)

EM (IE) m/z : 343 (1%, M^+), 213 (100% $\text{M}-130$ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_2\text{N-CO-CH}_2\text{-O}$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3 Evaluación de la solubilidad de los compuestos sintetizados

Los resultados de la evaluación de la solubilidad tanto en agua desionizada como en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica 0.6 M se muestran en las siguientes tablas, así como un esquema comparativo de los resultados con ambas variantes.

Tabla 5.3 Resultados de las pruebas de solubilidad en agua desionizada a las 2 h

Compuesto	λ_{\max} .	ϵ ($\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Solubilidad (μM) \pm DE	Solubilidad ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE
1	291.0	3.9745	1.4210 \pm 0.1139	326.46 \pm 26.16
2	294.5	3.3016	2.3788 \pm 0.1071	581.78 \pm 26.20
3	292.5	5.5700	0.7176 \pm 0.0229	185.05 \pm 5.91
4	293.5	4.8775	0.2472 \pm 0.0081	84.91 \pm 2.78

ϵ = Coeficiente de absorptividad molar.

* = Los datos de solubilidad son un promedio de tres determinaciones realizadas

DE = Desviación estándar.

Tabla 5.4 Resultados de las pruebas de solubilidad en agua desionizada a las 24 h.

Compuesto	λ_{\max} .	ϵ ($\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Solubilidad (μM) \pm DE	Solubilidad ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE
1	291.0	3.9745	1.5336 \pm 0.0191	352.33 \pm 4.38
2	294.5	3.3016	1.9043 \pm 0.2990	465.73 \pm 73.12
3	292.5	5.5700	0.7038 \pm 0.0208	181.50 \pm 5.37
4	293.5	4.8775	0.2870 \pm 0.0127	98.60 \pm 4.38

ϵ = Coeficiente de absorptividad molar

* = Los datos de solubilidad son un promedio de tres determinaciones realizadas.

DE = Desviación estándar.

Tabla 5.5 Resultados de las pruebas de solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7, fuerza iónica 0.6 M a las 2 h.

Compuesto	λ_{\max} .	ϵ ($\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Solubilidad (μM) \pm DE	Solubilidad ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE
1	291.0	3.9745	7.1868 \pm 0.2286	1651.10 \pm 52.52
2	294.5	3.3016	1.0714 \pm 0.0152	262.02 \pm 3.73
3	292.5	5.5700	0.2741 \pm 0.0178	70.69 \pm 4.58
4	293.5	4.8775	0.1084 \pm 0.0202	37.23 \pm 6.93

ϵ = Coeficiente de absorptividad molar

* = Los datos de solubilidad son un promedio de tres determinaciones realizadas

DE = Desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.6 Resultados de las pruebas de solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7, fuerza iónica 0.6 M a las 24 h

Compuesto	λ_{max}	ϵ ($\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Solubilidad (μM) \pm DE	Solubilidad ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE
1	291.0	3.9745	7.3814 \pm 0.1807	1695.80 \pm 41.51
2	294.5	3.3016	0.6928 \pm 0.0093	169.43 \pm 2.26
3	292.5	5.5700	0.2065 \pm 0.0027	53.26 \pm 0.71
4	293.5	4.8775	0.1029 \pm 0.0059	35.36 \pm 2.04

ϵ = Coeficiente de absortividad molar

* = Los datos de solubilidad son un promedio de tres determinaciones realizadas.

DE = Desviación estándar.

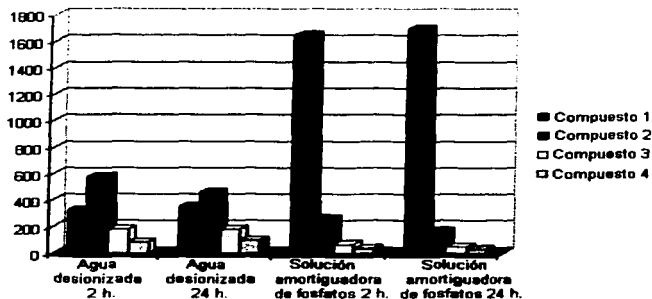


Figura 5.1 Esquema comparativo de los resultados de la evaluación de solubilidad ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos en los sistemas probados

5.4 Estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras

5.4.1 Evaluación empleando solución amortiguadora de fosfatos pH 7.

En la Tabla 5.7 se muestra los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad de los profármacos en solución amortiguadora de fosfatos pH 7, en donde se observan los

cambios de absorbencia versus tiempo, así como el porcentaje de absorbencia residual. Posteriormente se muestra la gráfica (Figura 5.2), en la que se observa la tendencia que siguen los profármacos cuando se grafica el porcentaje de absorbencia residual versus tiempo.

Tabla 5.7 Resultados de la evaluación de la estabilidad de los profármacos en solución amortiguadora de fosfatos pH 7

Compuesto	2	3	4
Abs. inicial	1,601	1,319	1,945
Abs. 0.5 h después.	1,467	1,250	1,683
Abs. 1.0 h después.	1,372	1,184	1,537
Abs. 1.5 h después.	1,308	1,150	1,450
Abs. 2.0 h después.	1,274	1,123	1,399
Abs. 2.5 h después.	1,250	1,108	1,350
Abs. 3.0 h después.	1,238	1,100	1,335
log % A 0.5 h.	1,9620	1,9767	1,9372
log % A 1.0 h.	1,9330	1,9531	1,8978
log % A 1.5 h.	1,9122	1,9405	1,8724
log % A 2.0 h.	1,9008	1,9301	1,8569
log % A 2.5 h.	1,8925	1,9243	1,8414
log % A 3.0 h.	1,8883	1,9211	1,8366

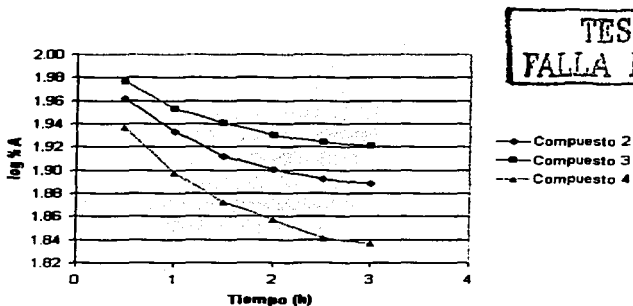


Figura 5.2 Gráfica del log del porcentaje de absorbencia residual vs. tiempo empleando solución amortiguadora de fosfatos pH 7

El valor de K_{obs} , se determinó como la constante de velocidad de descomposición para una cinética de primer orden

$$\log \% A = 2 - K_{obs} \cdot t$$

por lo cual, se ajustaron por mínimos cuadrados las tres semirectas obtenidas y de la ecuación de la línea recta obtenida en cada caso, se tomaron las pendientes, que corresponden a K_{obs} . Posteriormente se calculó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), con la ecuación

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{obs}}$$

los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8 Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de estabilidad empleando solución amortiguadora de fosfatos pH 7

Compuesto	K_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h.)
2	0.0286	24.2308
3	0.0214	32.3832
4	0.0393	17.6336

5.4.2 Evaluación empleando solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8.

En la Tabla 5.9, se muestra los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad de los profármacos en solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8, en donde se observan los cambios de absorbencia versus tiempo, así como el porcentaje de absorbencia residual. Posteriormente se muestra la gráfica (Figura 5.3), en la que se observa la tendencia que siguen los profármacos cuando se grafica el porcentaje de absorbencia residual versus tiempo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.9 Resultados de la evaluación de la estabilidad de los profármacos en solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8

Compuesto	2	3	4
Abs. inicial	1.936	1.591	1.694
Abs. 0.5 h después.	1.738	1.475	1.558
Abs. 1.0 h después.	1.630	1.385	1.441
Abs. 1.5 h después.	1.567	1.333	1.363
Abs. 2.0 h después.	1.526	1.294	1.315
Abs. 2.5 h después.	1.500	1.263	1.288
Abs. 3.0 h después.	1.482	1.258	1.260
log % A 0.5 h.	1.9531	1.9671	1.9637
log % A 1.0 h.	1.9253	1.9398	1.9298
log % A 1.5 h.	1.9082	1.9232	1.9056
log % A 2.0 h.	1.8966	1.9103	1.8898
log % A 2.5 h.	1.8892	1.8997	1.8810
log % A 3.0 h.	1.8839	1.8980	1.8715

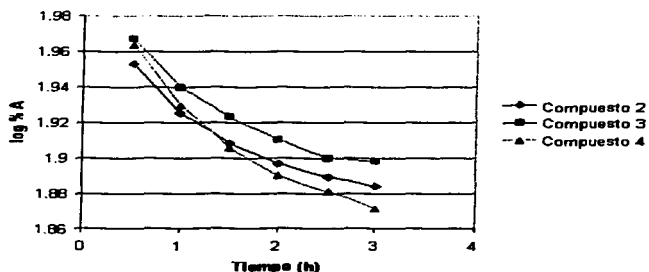


Figura 5.3 Gráfica del log del porcentaje de absorción residual vs. tiempo empleando solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8

En la Tabla 5.10, se muestran los resultados obtenidos de los valores de K_{ob} , y tiempo de vida media, los cuales fueron calculados de la misma forma que en la evaluación anterior.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.10 Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de estabilidad empleando solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8

Compuesto	K_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h.)
2	0.0266	26.0526
3	0.0273	25.3846
4	0.0356	19.4663

5.5 Evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas

5.5.1 Evaluación empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.

En las siguientes tablas, se muestran los resultados obtenidos de esta evaluación, así como las gráficas obtenidas de log % compuesto residual versus tiempo.

Tabla 5.11 Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 2 frente la enzima esterasa de hígado de cerdo.

Tiempo (min.)	Abs.	Concentración (μ M)	% Compuesto 2	log % compuesto 2
0	1.563	0.4151	100.0000	2.0000
20	1.55	0.4111	99.0446	1.9958
30	1.525	0.4036	97.2204	1.9878
40	1.508	0.3984	95.9800	1.9822
50	1.492	0.3936	94.8125	1.9769
60	1.475	0.3884	93.5721	1.9711

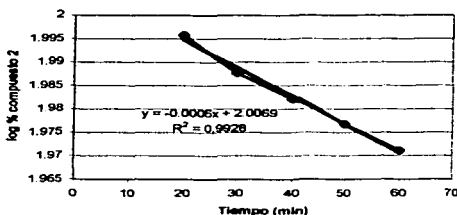


Figura 5.4 Gráfica del log % de compuesto 2 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.

Tabla 5.12 Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 3 frente la enzima esterasa de hígado de cerdo.

Tiempo (min.)	Abs. Concentración (μM)	% Compuesto 3	log % compuesto 3
0	1.192	100.0000	2.0000
10	1.175	98.3097	1.9926
20	1.167	97.5214	1.9891
30	1.150	95.8463	1.9816
40	1.125	93.3829	1.9703
50	1.113	92.2005	1.9647
60	1.100	90.9195	1.9587

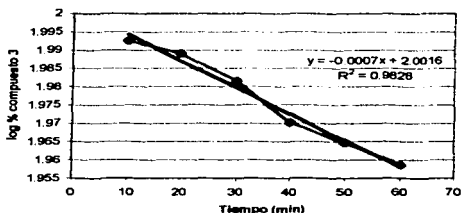


Figura 5.5 Gráfica del log % de compuesto 3 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.

Tabla 5.13 Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 4 frente la enzima esterasa de hígado de cerdo.

Tiempo (min.)	Abs. Concentración (μM)	% Compuesto 4	log % compuesto 4
0	1.406	100.0000	2.0000
10	1.333	94.1994	1.9740
20	1.283	90.2260	1.9553
30	1.233	86.2527	1.9358
40	1.200	83.6303	1.9224
50	1.150	79.6570	1.9012
60	1.125	77.6704	1.8903

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

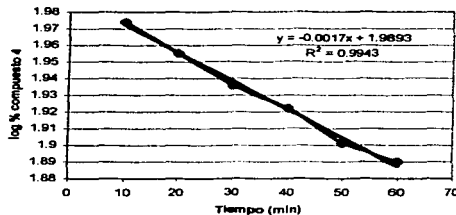


Figura 5.6 Gráfica del log % de compuesto 4 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo.

En la Tabla 5.14, se muestran los resultados obtenidos de K_{obs} y $t_{1/2}$, de la evaluación de la liberación del principio activo de cada profármaco frente a la enzima esterasa de hígado de cerdo, los cuales se calcularon de igual forma que en la evaluación de estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras.

Tabla 5.14 Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de liberación del principio activo empleando como enzima hidrolítica esterasa de hígado de cerdo

Compuesto	K_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min.)	$t_{1/2}$ (h.)
2	0.0006	1155	19.25
3	0.0007	990	16.5
4	0.0017	407.6471	6.7941

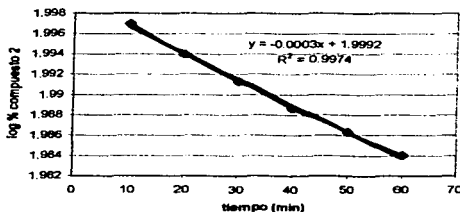
5.5.2 Evaluación empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.

En las siguientes tablas, se muestran los resultados obtenidos de esta evaluación, así como las gráficas obtenidas de log % compuesto residual versus tiempo.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.15 Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 2 frente la enzima tripsina de páncreas de cerdo.

Tiempo (min.)	Abs. Concentración (μM)	% Compuesto 2	log % compuesto 2
0	1.357	100.0000	2.0000
10	1.349	99.3066	1.9970
20	1.341	98.6196	1.9940
30	1.334	98.0185	1.9913
40	1.327	97.4173	1.9886
50	1.321	96.9021	1.9863
60	1.315	96.3868	1.9840

**Figura 5.7** Gráfica del log % de compuesto 2 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.**Tabla 5.16** Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 3 frente la enzima tripsina de páncreas de cerdo.

Tiempo (min.)	Abs. Concentración (μM)	% Compuesto 3	log % compuesto 3
0	1.040	100.0000	2.0000
10	1.033	99.1779	1.9964
20	1.025	98.2507	1.9923
30	1.025	98.2507	1.9923
40	1.017	97.3235	1.9882
50	1.017	97.3235	1.9882
60	1.012	96.7439	1.9856

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

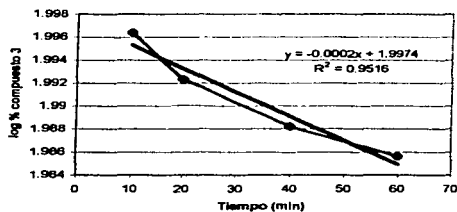


Figura 5.8 Gráfica del log % de compuesto 3 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.

Tabla 5.17 Resultados obtenidos de la evaluación de liberación del principio activo del compuesto 4 frente la enzima tripsina de páncreas de cerdo.

Tiempo (min.)	Abs.	Concentración (μM)	% Compuesto 4	log % compuesto 4
0	1.479	0.2730	100.0000	2.0000
10	1.433	0.2635	96.5336	1.9847
20	1.400	0.2568	94.0553	1.9734
30	1.367	0.2500	91.5770	1.9618
40	1.350	0.2465	90.3003	1.9557
50	1.325	0.2414	88.4228	1.9466
60	1.308	0.2379	87.1461	1.9402

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

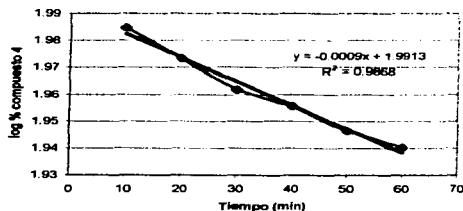


Figura 5.9 Gráfica del log % de compuesto 4 vs. tiempo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo.

En la Tabla 5.18, se muestran los resultados obtenidos de K_{obs} y $t_{1/2}$, de la evaluación de la liberación del principio activo de cada fármaco frente a la enzima tripsina de páncreas de cerdo, los cuales se calcularon de igual forma que en la evaluación de estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras.

Tabla 5.18 Resultados obtenidos de los valores de K_{obs} y tiempo de vida media de la evaluación de liberación del principio activo empleando como enzima hidrolítica tripsina de páncreas de cerdo

Compuesto	K_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min.)	$t_{1/2}$ (h.)
2	0.0003	2310	38.5
3	0.0002	3465	57.75
4	0.0009	770	12.8333

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Discusión

6.1 Consideraciones para la elección del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico, como principio activo y su optimización

Tomando en cuenta que los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo tienen como principal desventaja la insolubilidad en agua, lo cual limita su biodisponibilidad, se pensó en hacer modificaciones moleculares al anillo del bencimidazol, con las cuales se potenciara la solubilidad en este medio, sin comprometer su actividad antiparasitaria. Con este propósito, se diseñó la molécula Ácido 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico, la cual al presentar un grupo carboxilo en la posición 5 le confiere a la molécula mayor solubilidad acuosa, además de que promueve que la molécula no sea metabolizada con facilidad.

Por otra parte, el ácido carboxílico es un sustituyente que permite realizar distintas modificaciones estructurales en la molécula, por la diversidad de reacciones que puede presentar. En el presente trabajo, estas modificaciones se realizaron con el fin de optimizar la acción giardicida de la molécula y disminuir sus efectos adversos, como se mencionó anteriormente.

Para el diseño de los profármacos que se sintetizaron, se consideró la vía de administración de los bencimidazoles antiparasitarios, los cuales se administran oralmente; así como los factores que están involucrados en el proceso de absorción gastrointestinal, ya que éstos de manera particular o en conjunto, pueden influir en la eficiente respuesta antiparasitaria.

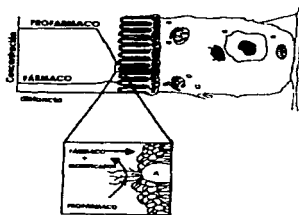
Por otra parte, se sabe que los bencimidazoles antiparasitarios utilizan la difusión simple como medio de transporte a través de las membranas biológicas, por lo que hay que tomar en cuenta los elementos que influyen en la velocidad a la que ocurre dicho proceso, como son: el gradiente de concentración, 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. Así como los parámetros que afectan la facilidad para que la

molécula del fármaco pueda moverse al interior lipofílico de la membrana, entre los cuales se encuentra: la liposolubilidad, el tamaño molecular y el grado de ionización.⁶⁷

Para tratar de optimizar el comportamiento de una sustancia activa que se administra por vía oral, también se debe 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.⁶⁸

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, se tiene como candidatos a la porción del modificador de los profármacos a los ésteres, cuyos derivados son los profármacos más conocidos debido a la cantidad de moléculas que contienen en su estructura un grupo carboxílico o hidroxilo. Además, la presencia de enzimas en el organismo capaces de hidrolizar la mayoría de los ésteres, los hacen los profármacos de primera elección debido a la amplia distribución de esterasas y sus diferentes tipos, las cuales se pueden encontrar en sangre, hígado, así como en otros órganos y tejidos.⁶²

En el caso de nuestros profármacos, se espera que se disuelvan en la fase acuosa del contenido luminal del duodeno y posteriormente sean convertidos de profármacos a fármacos por las hidrolasas, las cuales se encuentran unidas en la membrana de las células del intestino delgado (enterocitos). Figura 6.1^{69,70}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6.1 Mecanismo propuesto para la liberación del fármaco a partir del profármaco, en la cercanía del lumen intestinal.⁷⁰

Entre las hidrolasas de los enterocitos, se espera que las carboxilesterasas sean las que hidrolicen mayoritariamente a los profármacos, debido a que estas enzimas hidrolizan ésteres de diversos ácidos carboxílicos. Las carboxilesterasas, provienen del citoplasma de los enterocitos y son liberadas después del daño celular ocasionado al establecerse *Giardia lamblia*. Una vez que el principio activo se encuentre en solución, es posible que pueda entrar al interior del parásito a través de difusión pasiva y lleve a cabo su acción giardicida.⁷⁰

Además, los ésteres metílicos, etílicos y los de *N,N*-dietilacetamidas disminuyen la posibilidad de irritación gástrica, debido a que en diferentes estudios se ha visto que los profármacos que contienen estos sustituyentes son muy estables en soluciones acuosas en diferentes pH.

Por lo anterior, se cree que con estos modificadores se optimizará la acción giardicida de los compuestos y se disminuirán sus efectos adversos.

6.2 Síntesis de los compuestos

Síntesis del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (I)

Para la síntesis del compuesto **1** se utilizó la reacción clásica de formación de bencimidazoles, en la cual se calienta a reflujo una solución de *o*-fenilendiamina, que en este caso fue el ácido 3,4 diaminobenzoico en ácido trifluoroacético, dando como resultado la ciclación del anillo bencimidazólico. En esta técnica además se implementó la adición de HCl como catalizador y agua en relación 1:2 con respecto a este ácido, lo cual mejoró el rendimiento de la reacción, ya que la presencia de protones en el medio favorece que el oxígeno del carbonilo del ácido trifluoroacético, así como el del acil derivado se protonen, provocando que el carbono sea más electrofílico, ya que presenta una carga parcial positiva, lo que favorece el ataque de los nitrógenos del ácido 3,4 diaminobenzoico, permitiendo así el avance de la reacción (Figura 6.2). Por otra parte el agua favorece la solubilización del ácido 3,4 diaminobenzoico, e imposibilita que dicha materia se carbonice por el exceso de ácido.

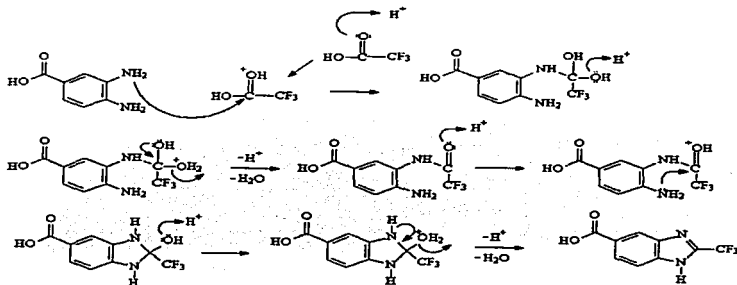


Figura 6.2 Mecanismo de reacción propuesto para el compuesto 1

En esta síntesis también se observó que el exceso de ácido trifluoroacético forma el contraión fluoroacetato en la molécula, por lo que es necesario realizar varios lavados con agua y posteriormente neutralizar la solución y extraer.

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2) y del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (3)

Para la síntesis de los compuestos 2 y 3 se siguió un procedimiento publicado previamente, en el cual se procede inicialmente a formar un anhídrido, ya que como es sabido los anhídridos de ácidos son más reactivos que los ácidos carboxílicos en sí. Para realizar este paso, se hizo reaccionar el compuesto 1 con 1,1-carbonildiimidazol, utilizando como disolvente cloruro de metileno; la reacción procede vía el ataque del grupo hidroxilo del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico al carbonilo del 1,1-carbonildiimidazol, dando como resultado el anhídrido 1H-imidazol-1-carboxílico-2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico más imidazol. El punto más crítico de la reacción fue mantener en todo momento condiciones anhidras, ya que el 1,1-carbonildiimidazol es altamente higroscópico. Por otra parte, los anhídridos son fácilmente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

atacados por el agua, por lo que en la reacción de esterificación fue necesario agregar metanol y etanol absoluto, además de proseguir con condiciones anhidras (Figura 6.3).

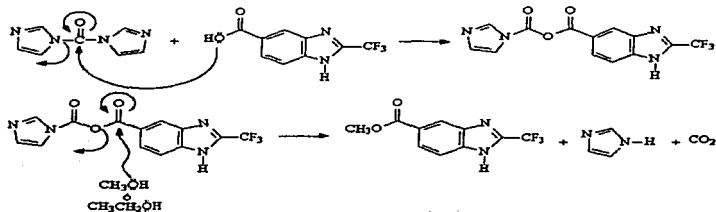


Figura 6.3 Mecanismo de reacción propuesto para los compuestos 2 y 3

En esta reacción también fue importante realizar varios lavados con agua, ya que los subproductos de la reacción (Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico e imidazol) son solubles en ésta y nos permite obtener un solo producto al final de la extracción.

Con base en lo anterior, se puede suponer que el rendimiento de la reacción está en función del correcto manejo de las condiciones anhidras que se le den a la reacción.

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetil (4)

Para la síntesis del compuesto 4 también se adaptó una técnica previamente publicada para ésteres de glicolamidas; esta síntesis procede vía una reacción de sustitución nucleofílica de tipo S_N2. La síntesis da inicio con el ataque del ioduro del KI al carbono α del 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida, desplazando así al ión cloruro; este paso se realiza con el fin de favorecer el ataque del hidroxilo del grupo carboxilo del Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, al carbono α de la *N,N*-dietilacetamida, ya que el iodo es mejor grupo saliente que el cloro. Una vez formado el 2-iodo-*N,N*-dietilacetamida prosigue

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la reacción de sustitución nucleofílica, en la cual el carboxilo interacciona con el carbono α de dicho compuesto desplazando al ión yoduro. En esta reacción se utiliza como base trietilamina, para neutralizar la formación de HCl y HI (Figura 6.4).

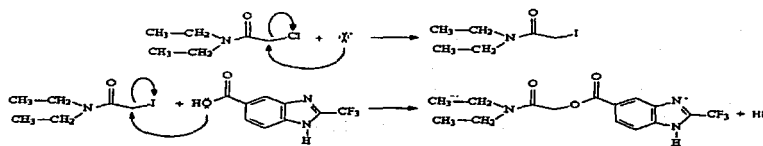


Figura 6.4 Mecanismo de reacción propuesto para el compuesto 4

A la técnica propuesta en la literatura se le hicieron dos modificaciones: en lugar de utilizar dimetilformamida como disolvente se utilizó etilenglicol dimetil éter y las extracciones realizadas se hicieron con cloruro de metileno en vez de acetato de etilo; estos cambios se realizaron debido a los problemas que se presentaron durante la obtención del compuesto, ya que al utilizar dimetilformamida como disolvente se dificultó su eliminación, por ser un disolvente miscible en agua y de alto punto de ebullición. En el caso de las extracciones con acetato de etilo, se observó la formación de una emulsión la cual no era posible romper, trayendo como consecuencia un descenso significativo en el rendimiento del compuesto. Por lo anterior, se procedió a probar con los disolventes antes mencionados, los cuales no presentaron los problemas de sus antecesores y proporcionaron mejores resultados.

El único inconveniente observado durante esta síntesis fue la purificación del compuesto, ya que la recrystalización con acetato de etilo provocó una gran disminución en el rendimiento del producto, lo cual se observó cuando ya había sido purificado todo el producto. En este caso, no se probaron otros disolventes para la purificación debido a que se obtuvo la cantidad suficiente para las pruebas siguientes, sin embargo es un punto importante que se debe considerar para síntesis posteriores.

TESTIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.3 Caracterización de los compuestos sintetizados

A continuación se detallan los datos espectroscópicos y espectrométricos que permitieron caracterizar y corroborar las estructuras químicas de los compuestos sintetizados.

6.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo

En los espectros de infrarrojo (KBr/pastilla), se observó que las principales diferencias de los compuestos sintetizados se localizan en la región de $\pm 3000 \text{ cm}^{-1}$, en la cual encontramos las bandas que diferencian a cada uno de los compuestos (Figura 6.5).

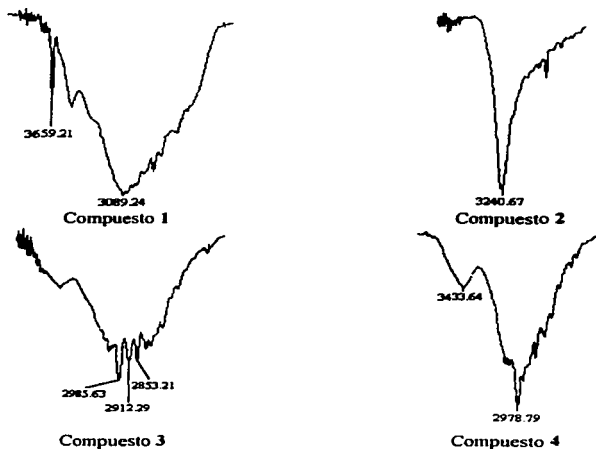


Figura 6.5 Región de $\pm 3000 \text{ cm}^{-1}$ de los espectros de infrarrojo

Como muestra la Figura 6.5, el Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico mostró en esta región una banda de alargamiento a 3659.21 cm⁻¹, característica del enlace N-H, y a 3089.24 cm⁻¹ se observó una banda de estiramiento ancha (debido a la asociación por puente de hidrógeno), que corresponde al enlace O-H. Para el caso del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo se apreció sólo una banda a 3240.67 cm⁻¹, que corresponde a la absorción por alargamiento del enlace =C-H; sin embargo, esto no se observó para el 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de etilo, ya que en este caso se apreciaron tres bandas a 2985.63, 2912.29 y a 2853.21 cm⁻¹, características de metilos y metilenos; este comportamiento es debido al diferente número de carbonos que presenta el etoxilo en comparación con el metoxilo. Para el 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(dicetilamino)-2-oxoetilo, se observó una banda a 3433.64 cm⁻¹ que corresponde al enlace N-H del bencimidazol y a 2978.79 cm⁻¹ se estableció la banda de alargamiento para carbonos saturados.

Las otras señales que se observaron en los espectros muestran cierta semejanza, esto se debe a que los grupos funcionales del anillo bencimidazol son los mismos para los cuatro casos y a que los compuestos son esteres. En la siguiente tabla se muestran las similitudes en el bandeado que existe entre dichos grupos.

Tabla 6.1 Similitudes encontradas en los espectros de IR de los compuestos sintetizados

Compuesto	Banda de estiramiento del enlace C=O	Banda de estiramiento del enlace Ar-NH-R	Banda de estiramiento del enlace R-CO-OR	Banda de estiramiento del enlace C-F.
1	1677.66 cm ⁻¹	1328.38 cm ⁻¹	-	1163.68 cm ⁻¹
2	1697.39 cm ⁻¹	1321.95 y/o 1290.22 cm ⁻¹	1193.41 cm ⁻¹	1146.90 cm ⁻¹
3	1722.71 cm ⁻¹	1327.87 y/o 1289.48 cm ⁻¹	1192.62 cm ⁻¹	1138.52 cm ⁻¹
4	1719.09 cm ⁻¹	1322.13 y/o 1291.01 cm ⁻¹	1187.73 cm ⁻¹	1132.46 cm ⁻¹

Algunas observaciones que se encontraron son: para el caso del compuesto **1**, la banda que se encontró a 1328.38 cm⁻¹, no se sabe con certeza si corresponde al enlace Ar-NH-R ó si corresponde al enlace C-O, debido a los desplazamientos tan semejantes que se reportan

para ambos. Para el caso de la banda de estiramiento del enlace Ar-NH-R, se desconoce si ambas bandas pertenecen al enlace o sólo una de ellas. En el espectro del compuesto **4** se observó otra banda a 1623.54 cm^{-1} , que corresponde al enlace -C=O-N< , siendo ésta la más distintiva para este compuesto.

6.3.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

En los espectros de Resonancia Magnética Protónica, los hidrógenos del anillo bencimidazólico fueron asignados de la misma forma para los cuatro compuestos, ya que estos hidrógenos no sufrieron ningún cambio estructural, por lo que sus características se consideraron idénticas.

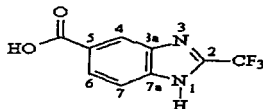
En la Tabla 6.2, se muestran las similitudes que se encontraron en los espectros de RMN- ^1H entre los hidrógenos del anillo bencimidazólico, que justifica que la asignación de los hidrógenos fuera la misma para los cuatro compuestos.

Tabla 6.2 Similitudes encontradas en los espectros de RMN- ^1H , entre los hidrógenos del anillo bencimidazólico de los compuestos sintetizados

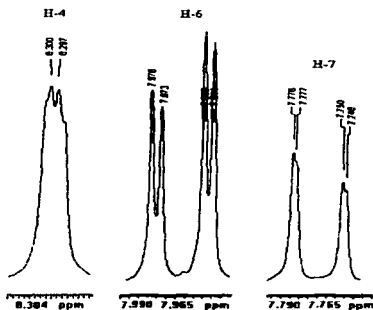
Compuesto	Número de hidrógeno	Desplazamiento químico	Cte. de acoplamiento (J)	Forma de la señal	Integración
1	H-7	7.765 ppm	8.4 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-6	7.795 ppm	8.4 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-4	8.304 ppm	0.9 Hz	Doblete	1 H
2	H-7	7.84 ppm	8.4 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-6	7.96 ppm	8.4 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-4	8.30 ppm	0.9 Hz	Doblete	1 H
3	H-7	7.775 ppm	8.7 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-6	7.96 ppm	8.7 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-4	8.294 ppm	0.9 Hz	Doblete	1 H
4	H-7	7.83 ppm	8.4 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-6	8.01 ppm	8.7 Hz	Doble de dobles	1 H
	H-4	8.35 ppm	-	Doblete	1 H

A los hidrógenos del anillo bencimidazólico se les asignaron los números 4, 6 y 7 tomando en cuenta las siguientes consideraciones; para la explicación se tomó como ejemplo al compuesto **1**:

- Si se numera la molécula como se muestra en la figura, se observa que los hidrógenos del anillo benzimidazólico corresponden a los números 4, 6 y 7.



- Los hidrógenos con desplazamiento químico 7.965 y 7.765 ppm fueron asignados como H-6 y H-7 respectivamente, debido a que el desplazamiento químico de H-6 es mayor que el de H-7 por encontrarse este en posición orto del sustituyente carboxílico. Además sus señales mostraron una constante de acoplamiento idéntica, las señales para ambos son dobles de dobles (Figura 6.6) y estructuralmente se observó que los únicos hidrógenos que se pueden encontrar acoplados son éstos.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6.6 Espectro de RMN-¹H de los hidrógenos del anillo benzimidazólico del compuesto 1

- El hidrógeno con desplazamiento químico 8.304 ppm se asignó como H-4, debido a que esta señal no se encuentra acoplada con ninguna otra, y por mostrar un desplazamiento químico más alto con respecto al de los otros hidrógenos.

Como cabe esperar, las principales diferencias que distinguieron la estructura de cada compuesto corresponden a los distintos grupos funcionales que se encuentran en la posición 5 del anillo. En la Tabla 6.3, se muestran las señales más distintivas de los espectros de RMN-¹H para cada compuesto:

Tabla 6.3 Señales más distintivas encontradas en los espectros de RMN-¹H para los compuestos sintetizados

Compuesto	Señales y características
1	Singlete ancho a 12.296 ppm, que corresponde al hidrógeno del ácido carboxílico.
2	Singlete a 3.871 ppm, que conforma a los hidrógenos del metoxilo
3	Triplete a 1.36 ppm y cuatriplete a 4.36 ppm, que corresponden respectivamente al metilo y al metileno del grupo etoxilo
4	Tripletes a 1.018 y 1.16 ppm multiplete a 3.3 ppm, que pertenecen respectivamente a los metilos y metilenos de la fracción (CH ₂ CH ₂) ₂ N-CO-CH ₂ -OCO-, y singlete a 5.3 ppm, que conforma a los hidrógenos del metileno que a continuación se muestra señalado -CO-CH ₂ -OCO-

Para el caso de la Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13, las asignaciones para los carbonos fueron dadas con base en desplazamientos teóricos, los cuales se calcularon con el programa ACD/Labs-CNMR; las asignaciones dadas por el programa se muestran en el siguiente espectro, el cual corresponde al compuesto 1.

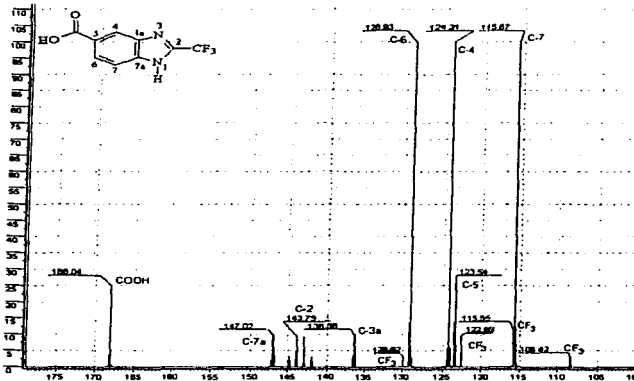


Figura 6.7 Asignaciones dadas por el programa ACD/Labs-CNMR para $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ del compuesto 1

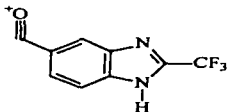
En los espectros de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de los cuatro compuestos se encontraron las mismas observaciones que para $\text{RMN-}^1\text{H}$, por lo cual ya no se ejemplifican los resultados.

6.3.3 Espectrometría de masas

Las principales observaciones encontradas en los distintos espectros son:

- En todos los casos se observó que el ión molecular corresponde al peso molecular de los compuestos sintetizados.
- La estructura más estable de los compuestos sintetizados corresponde al Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol-5-carboxílico, ya que en el espectro esta estructura muestra al ión molecular como pico base.
- Para los compuestos 2, 3 y 4, se observó que en todos los casos el pico base corresponde a la siguiente estructura

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



- La porción añadida al Ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol-5-carboxílico, más inestable es la del *N,N*-dietilacetamida del compuesto 4, ya que en el espectro se observa que el ión molecular muestra una abundancia relativa del 1%.
- En la cromatografía de gases acoplada en este estudio, se observó que los compuestos sintetizados se encuentran puros, ya que sólo se observó una banda bien definida en todos los casos.

6.4 Evaluación de la solubilidad de los compuestos sintetizados

En los ensayos de solubilidad, tanto en agua desionizada como en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica 0.6 M, se observó que la disolución máxima de los compuestos se alcanza a las 2 h., ya que al comparar los resultados de los ensayos a las 2 h. con los de 24 h. observamos que los datos de concentración son muy semejantes, lo que indica que el equilibrio de disolución para estos compuestos fue alcanzado a las 2 h. y que después de éstas no es posible que se disuelvan más. En estos datos también se observó que en algunos casos las concentraciones a las 24 h. eran menores que a las 2 h.; esto probablemente se debió a que en el ensayo no se homogeneizó el tamaño de partícula de los distintos compuestos, por lo que la velocidad de disolución no es la misma entre ensayos; este hecho trae como consecuencia que haya algunos valores altos en las desviaciones estándar.

El compuesto más soluble en el ensayo con agua desionizada fue el compuesto 2; sin embargo se esperaba que el compuesto con la mayor solubilidad fuera el compuesto 1, debido a que éste tiene en su estructura un ácido carboxílico, el cual tiene una polaridad mayor y es capaz de formar puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo y el agua, por lo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que se esperaba que éstas características le confirieran mayor solubilidad. Lo anterior pudo deberse a que este compuesto fue el que presentó mayor variedad en su tamaño de partícula.

Para el caso de los compuestos 3 y 4, se observó que al aumentar el tamaño del sustituyente en la posición 5 del anillo bencimidazólico disminuye la solubilidad del compuesto.

En el ensayo de solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica 0.6 M, se observó que la solubilidad de los compuestos presenta el siguiente orden $1 > 2 > 3 > 4$, el cual se esperaba por las características de polaridad que muestran los sustituyentes de la posición 5. En este ensayo también se observó que las concentraciones obtenidas son menores a las que se producen en el ensayo con agua desionizada; esto se debe a la presencia de las sales en la solución amortiguadora, las cuales abaten su solubilidad; sin embargo esto no ocurre para el compuesto 1, ya que se observó que quintuplica su solubilidad, esto se debió a que el ácido carboxílico se encuentra en su forma ionizada lo que le confiere mayor solubilidad.

6.5 Estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras

Tanto en la evaluación con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 como con la solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8, se estableció que los compuestos son muy estables a estos valores de pH, ya que si se observan las Tablas 6.4 y 6.5, donde se muestran los resultados del % de absorbancia residual, se puede apreciar que los cambios son mínimos; esta aseveración se corrobora con los resultados de tiempo de vida media obtenidos, los cuales muestran que se necesita un gran número de horas para alcanzar la mitad de la concentración inicial de cada compuesto.

Tabla 6.4 % de absorbencia residual de los compuestos sintetizados al realizar el estudio de estabilidad en solución amortiguadora de fosfatos pH 7

Tiempo (h.)	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4
0,5	91.6 %	94.8 %	86.5 %
1	85.7 %	89.8 %	79.0 %
1,5	81.7 %	87.2 %	74.6 %
2	79.6 %	85.1 %	71.9 %
2,5	78.1 %	84.0 %	69.4 %
3	77.3 %	83.4 %	68.6 %

Tabla 6.5 % de absorbencia residual de los compuestos sintetizados al realizar el estudio de estabilidad en solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8

Tiempo (h.)	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4
0.5	89.8 %	92.7 %	92.0 %
1	84.2 %	87.1 %	85.1 %
1.5	80.9 %	83.8 %	80.5 %
2	78.8 %	81.3 %	77.6 %
2.5	77.5 %	79.4 %	76.0 %
3	76.5 %	79.1 %	74.4 %

De estos resultados, se determinó que el compuesto con mayor predisposición para liberar el principio activo es el compuesto 4, lo que puede atribuirse a su complejidad molecular. Los compuestos 2 y 3 mostraron distintos resultados en los estudios, es decir, en el estudio con solución amortiguadora de fosfatos pH 7, el compuesto 3 muestra mayor estabilidad que el compuesto 2, y en el estudio con solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8, el compuesto 2 muestra mayor estabilidad que el compuesto 3; sin embargo este hecho no es significativo a nivel *in vivo*, ya que las estererasas, son enzimas capaces de hidrolizar ésteres de diversos ácidos carboxílicos, sin importar el tamaño molecular de éstos.

Por otra parte, se determinó que estas soluciones amortiguadoras son aptas para la evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas, ya que estas soluciones por sí solas no degradan a los compuestos de una manera significativa (aproximadamente 15% de degradación en 1 h.), por lo que se podrá apreciar de manera tangible el efecto que tienen éstas sobre los compuestos.

6.6 Evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas

En las Tablas 6.6 y 6.7 se muestra el % de principio activo que se liberó de los compuestos 2, 3 y 4 bajo la influencia de las enzimas esterasa de hígado de cerdo y tripsina de páncreas de cerdo; como se puede observar, la mayor influencia en la liberación del principio activo la tiene la enzima esterasa de hígado de cerdo, ya que los resultados que se obtuvieron al emplear esta enzima son mayores que cuando se emplea la enzima tripsina de páncreas de cerdo; esto se debe a que todas las estructuras poseen grupos ésteres en su composición, lo que hace que sean más susceptibles a la hidrólisis por esta enzima. La menor influencia de la enzima tripsina de páncreas de cerdo se debe a que ésta es una endopeptidasa que rompe de manera específica enlaces peptídicos de aminoácidos básicos, de manera especial las uniones vecinas a la arginina y la lisina; por lo tanto, los ésteres de los compuestos no son un blanco específico de esta enzima; sin embargo tiene importancia en este estudio, por ser una de las enzimas que se encuentra presente en el duodeno, lugar donde se localiza el hábitat de *Giardia lamblia*.

Tabla 6.6 % de principio activo liberado de los compuestos por la presencia de la enzima esterasa de hígado de cerdo.

Tiempo (min.)	% Principio activo liberado del compuesto 2	% Principio activo liberado del compuesto 3	% Principio activo liberado del compuesto 4
0	0.0000	0.0000	0.0000
10	-	1.6903	5.8006
20	0.9554	2.4786	9.7740
30	2.7796	4.1537	13.7473
40	4.0200	6.6171	16.3697
50	5.1875	7.7995	20.3430
60	6.4279	9.0805	22.3296

Tabla 6.7 % de principio activo liberado de los compuestos por la presencia de la enzima tripsina de páncreas de cerdo

Tiempo (min.)	% Principio activo liberado del compuesto 2	% Principio activo liberado del compuesto 3	% Principio activo liberado del compuesto 4
0	0.0000	0.0000	0.0000
10	0.6934	0.8221	3.4664
20	1.3804	1.7493	5.9447
30	1.9815	1.7493	8.4230
40	2.5827	2.6765	9.6997
50	3.0979	2.6765	11.5772
60	3.6132	3.2561	12.8539

Al igual que en la evaluación anterior, se observa que el compuesto 4 es el profármaco que libera la mayor cantidad de principio activo; sin embargo su tiempo de vida media es alto con respecto al tiempo de residencia que tienen los fármacos al nivel de duodeno y yeyuno, el cual varía de 1-3 h.

Pese al punto anterior, se espera que este tiempo de vida media disminuya *in vivo*, ya que tanto las enzimas como los distintos valores de pH de los diferentes segmentos del aparato digestivo actuarán de manera conjunta sobre el compuesto, por lo que se espera que el principio activo sea liberado en menor tiempo y haya suficiente cantidad para absorberse en el duodeno y yeyuno. También se espera que estas condiciones fisiológicas mejoren el tiempo de vida media de los compuestos 2 y 3, los cuales son mucho mayores que los del compuesto 4, y tengan una posibilidad de ser empleados como profármacos.

7. Conclusiones

- Las síntesis de los compuestos propuestos se obtuvieron en general con buenos rendimientos; en todos los casos se obtuvieron sólidos fáciles de purificar por recristalización y con puntos de fusión y R_f cromatográfico bien definidos; sólo en el caso del compuesto 4 se requiere optimizar el método de purificación, ya que el que se realizó en el presente trabajo no es adecuado, debido a que disminuye considerablemente el rendimiento del producto.
- En todos los casos se logró establecer la estructura química de los compuestos sintetizados, mediante el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos.
- Respecto a la solubilidad de los compuestos, tanto en agua desionizada como en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica de 0.6 M, se observó que las concentraciones alcanzadas por los compuestos en estos medios son mayores que las del albendazol (4.3 $\mu\text{g/mL}$), con lo cual estos compuestos pueden mejorar la biodisponibilidad *in vivo*. Además, se observó que el tiempo máximo de disolución es de dos horas, por lo cual los compuestos estarán en solución cuando lleguen a la mucosa del duodeno y yeyuno y se facilitará el transporte de éstos a través de las membranas.
- En la evaluación de la estabilidad de los compuestos en soluciones amortiguadoras, se observó que éstos se comportan de manera estable ante estos valores de pH, por lo cual estas soluciones amortiguadoras son candidatas para la evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas.
- Un punto interesante, que podría estudiarse posteriormente con esta prueba de estabilidad, es la demostración de la estabilidad de los compuestos al pH del estómago, y con esto comprobar que efectivamente no van a causar daño a la mucosa gástrica.
- En la evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas, se observó que sólo el compuesto 4 tiene posibilidades de liberar el principio activo, en el tiempo de residencia que tienen los fármacos al nivel

de duodeno y yeyuno, el cual varía de 1-3 h. Los compuestos 2 y 3, debido a que presentaron tiempos de vida media muy grandes, no son profármacos atractivos para la terapéutica de esta enfermedad. Sin embargo, antes de descartarlos, es necesario comprobar que estos compuestos no presenten actividad *per se*, ya que en este caso podrían convertirse en compuestos interesantes, si consideramos que el grupo éster que se añadió a la molécula podría facilitar no sólo el transporte a través de las membranas de duodeno y yeyuno, sino también la difusión a través de las membranas de *Giardia lamblia*, además de reducir el riesgo de irritación gástrica. Por lo anterior, estos compuestos se están probando actualmente contra *Giardia lamblia in vitro*, en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI del IMSS.

Bibliografía

1. Intestinal Parasites. <http://www.who.int/ctd/intpara/index.html>. Noviembre-2002
2. Ximénez, C. Las parasitosis intestinales en México. *Cuadernos Fundsalud* **2002**, 36, 17-55.
3. Thompson, R.C.A.; Reynoldson, J.A.; Lymbery, A.J.; *Giardia From Molecules to Disease*. CAB INTERNATIONAL. **1994**, pp 3-31, 71-72, 293-309, 317-323, 329-335, 339-347, 368-379
4. Tay, J.; Lara, R.; Velasco, O.; Gutiérrez, M. *Parasitología Médica*. Méndez editores. México. **1995**, pp 77-82
5. Personal académico y no académico
http://www.parasitologia.uchile.cl/apuntes_de_clases/_PRIVATE/Medicina/apuntes_medicina/parasitosis/giardiosis.htm. Noviembre-2002
6. Atías, A.; Neghme, A. *Parasitología Clínica*. Editado por Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Chile **1988**, pp 146-150
7. Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. *Brock Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall. España. **1998**, pp 780-784
8. Romero, R. *Microbiología y Parasitología Humana*. Editorial Panamericana. México. **1999**, pp 586-587, 604-607
9. Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. *Microbiology*. Editorial Mc Graw Hill. USA. **1986**, pp 403-405
10. http://www.scime.org/control/revi_Para/pdf7Giardia.pdf. Noviembre-2002
11. Almirall, P.; Escobedo, A.A.; Núñez, F.A.; Carmenate, A. Infección por *Giardia lamblia*. *Boletín Epidemiológico Semanal del Ipk*. **2001**, 11(9).
<http://www.ipk.sld.cu/bolepid/bol09-01.htm#art1>
12. Gillin, F.D.; Reiner, D.S.; McCaffery, J.M. Cell Biology Of The Primitive Eukaryote *Giardia Lamblia*. *Annual Review of Microbiology*. **1996**, 50, 679-705.
13. Chester, P.; Clifton, R.; Wayne, E. *Parasitología Clínica*. Salvat editores. México. **1992**, pp 52-56
14. Brown, H.A.; Neva, F.A. *Parasitología Clínica*. Editorial Interamericana. México. **1995**, pp 46-49

15. Markell, E.K.; Voge, M.; John, D. *Parasitología Médica*. Editorial Interamericana. México. 1990, pp 54-59
16. *Giardia lamblia* images. <http://medlib.med.utah.edu/parasitology/glambim.html>. Noviembre-2002
17. Díaz, J.V.; Fernández-Alonso, M.E. Giardiasis: Una breve revisión. Perspectivas diagnósticas en el laboratorio clínico. *Anales Españoles de Pediatría*. 1996, 44, 87-91. <http://aeped.es/anales/anales96-99/suma/vol44/44-2/44-2-1.pdf>
18. DPDx-Giardiasis- <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>. Noviembre-2002
19. No Slide Title. http://www.hhmi.ucla.edu/C168/giardia/giardia_files/frame.htm. Noviembre-2002
20. Townsed, L.B.; Wise, D.S. The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitology Today*. 1990, 6(4), 107-112
21. Wright, J.B. The Chemistry of the Benzimidazoles. *Chemicals Reviews*. 1951,48, 519-524
22. Shama, S. Design of new drugs for helminth disease: lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug research*. 1994, 25, 103-172
23. Campbell, W.C. Benzimidazoles: Veterinary Uses. *Parasitology Today*. 1990, 6(4), 130-133
24. Cook, G.C. Use of Benzimidazoles Chemotherapy in Human Helminthiasis: Indications and Efficacy. *Parasitology Today*. 1990, 6(4), 133-136
25. Reynoldson, J.A.; Thompson, R.C.A.; Horton, R.J. Albendazol as a Future Antigiardial Agent. *Parasitology Today*. 1990, 8(12), 412-414
26. Navarrete, J.G. Síntesis y actividad biológica de 2-(trifluorometil) benzimidazoles. Tesis de Maestría en Química Farmacéutica. Facultad de Química, U.N.A.M. 1991: 6-11
27. Lacey, E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today*. 1990, 6(4), 112-115
28. Edlind, T.D.; Hang T.L. Activity of the Anthelmintic Benzimidazoles against *Giardia lamblia* In Vitro. *Journal of Infections Diseases*. 1990, 162, 1408-1411

29. Rodríguez-García, R.; Aburto-Bandala, M.; Sánchez-Maldonado, M.I. Eficacia del albendazol en el tratamiento de giardiasis en niños. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. **1996**, 53(4), 173-177
30. Chávez, B.; Cedillo-Rivera, R.; Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: Ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *Journal of Protozoology*. **1992**, 34(4), 510-515.
31. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazol, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*. **1992**, 37, 221-224
32. Soriano, F. N. Síntesis del 5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol, un bioprecursor y un análogo de tipo carboxamida. Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, U.N.A.M. **2002**: 13-17
33. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-benzimidazole Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2002**, 12, 2221-2224
34. Hernández-Campos, A.; Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Rivera-Fernández, N.; Castillo, R. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylloxy)-1H-benzimidazole. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **2002**, 50(5), 649-652
35. Castillo, R.; Sánchez, R.; Cedillo, R.; Tapia, A.; Chávez, B.; Hernández-Campos, A.; Hernández-Luis, F.; Yépez, L.; Onofre, M. Synthesis and Giardicidal Activity of 1-Methylbenzimidazoles, *213th American Chemical Society Meeting*. San Francisco, C.A., U.S.A. Abril 13 al 17, **1997**; pp 259
36. Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Cedillo, R.; Castillo, R. Synthesis and Hydrolytic Stability Studies of Albendazole Carrier Prodrugs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2001**, 11, 1359-1362
37. Aguilar, M. Síntesis de un derivado biorreversible del (R) (S)-5(6)-(1-fenil-1-hidroxi) metil-2-metoxicarbonilamino-1H-benzimidazol, metabolito del mebendazol, con potencial actividad giardicida. Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, U.N.A.M. **2002**

38. Burton, D.E.; Lambie, A. J.; Ludgate, J.C.L.; Newbold, G.T.; Percival, A.; Sagers, D.T. 2-Trifluoromethylbenzimidazoles: A New Class of Herbicidal Compounds. *Nature*. **1965**, 208, 1166-1169
39. Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl)benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2001**, 11, 187-190
40. <http://www.svmfyc.org/Revista/Num8-2000/AINEs.pdf>. Marzo-2003
41. Antiinflamatorios no esteroideos y efectos adversos gastrointestinales. Un problema sin resolver. <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/n2/revis2a.html>. Marzo-2003
42. Katzung, B. *Farmacología básica y clínica*. El manual moderno. México, D.F. **1999**, pp 669 –682
43. Gastropatía por antiinflamatorios no esteroideos. <http://www.encolombia.com/medicina/gastroenterologia/gastro15400actualizacion.htm>. Marzo-2003
44. Kesterson, J.W. Preclinical drug discovery and development En *Clinical Drug Trial and Tribulations*. Allen E. Cato Edit. Marcel Dekker Inc. New York, USA. **1988**, pp 34, 17-49
45. Riley, Thomas N. The prodrug concept and new drug design and development. *Journal Chemical Education*. **1988**; 65 (11), 947-953
46. Sinkula, A.A.; Yalkowski, S.H. Rationale for design of biologically reversible drug derivates: Prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1975**, 64, 183-205
47. Kellway, I.W. The Influcency of formulation on drug availability. En *Introduction to the Principles of Drug Design*. Editado por Smith J., Williams H. Wright. Psg. Great Britain. **1983**, pp 39-52
48. Balant, L.P.; Doelker, E. Metabolic consideration in prodrug design. En *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Quinta edición. Editado por Manfred E. Wolf. John Wiley and Sons, Inc. USA. **1995**; pp 949-982
49. Wermunth, C.G. En *The practice of Medicinal Chemistry*. Academic Press, Great Britain, **1996**, pp 3-5,371

50. Austel V. The medicinal chemist's approach. En *Modern Drug Research. Path to better and safe drugs*. Editado por Connolly Martin. Medicinal Research Ser. Marcel Dekker, Inc. USA, 1989; pp 266-307
51. Lien E.J. Improvement of Therapeutic agents by molecular modification. En *SAR. Side effects and drug design*. Medicinal Research Ser. Marcel Dekker, Inc. USA. 1987, pp 25-38
52. Korolkovas, A. Drug development, En *Essentials of Medicinal Chemistry*. John Wiley and Sons. Segunda edición. USA. 1988, pp 97-118
53. Collis A.J. Drug access and prodrugs. En *Medicinal Chemistry. The role of organic chemistry in drug research*. Editado por Ganellin, C.R.; Roberts, S.M. Segunda edición. Academic Press. Great Britain. 1993, pp 61-81
54. Bodor, N. Design of biologically safer chemicals. *Chemtech*. 1995, 22-32
55. Testa, B.; Caldwell, J. Prodrugs revisited: The "ad hoc" approach as a complement to ligand design. *Medicinal Research Reviews*. 1996, 16(3), 233-241
56. Wermuth C.G. Designing prodrugs and bioprecusores. En *Drug Design. Fact or Fantasy*. Editado por Jolles G. Academic Press. USA. 1984, pp 47-72
57. Hernández-Luis, F.; Castillo R. Los profármacos. Una alternativa en la investigación química farmacéutica. Parte 1. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 1993, 24 (2), 25-30
58. Singh, S.K.; Sharma, S. Current Satus of medicinal research in helminth disease. *Medicinal Research Reviews*. 1991, 11 (6), 581-615
59. Bishop, B.C.; Jones, A.S.; Tatlow, J.C. The Synthesis of Some Perfluoroalkylbencimidazoles. *Journal of Chemical Society*. 1964, 3076-3080
60. Otha, S.; Shimabayashi, A.; Aono, M.; Okamoto, M. A General Convenient One-Pot Procedure for the Conversion of Carboxylic Acids into their *t*-Butyl Esters, which is also Applicable to Aliphatic Carboxylic Acids. *Synthesis*. 1982, 10,833-834
61. Steffansen, B.; Mork, N.; Bundgaard, H. Stability and enzymatic hydrolysis of glycolamie and alkyl esters of tyrosine. *Acta of Pharmaceutical Nordica*. 1989, 2(1), 47-56

62. Mork, N.; Bundgaard, H. Glicolamide Esters as Biolabile Prodrugs of Carboxylic Acids Agents: Synthesis, Stability, Bioconversion, and physicochemical Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1988**, 77(4), 285-298
63. James Wells. *Pharmaceutical Preformulation. The Physicochemical properties of drug substances*. John Wiley and Sons. Great Britain. **1988**, pp 21-25
64. Peter Taylor. Hydrophobic properties of drugs. En *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Edit. Hansch, Sammer, Taylor. Pergamon. Press. Great Britain. **1990**, 5, pp 268-269
65. Beall, H.D.; Pranker, R.J.; Sloan, K.B. 1-Alkylcarbonyl-5-fluoroacil prodrugs: synthesis, thermal and hydrolytic stability. *Drug Development Industrial Pharmacy*. **1996**, 22(2), 85-90
66. Heymann E.; Mentle, R. Carboxylesterasas-Amidasas. En *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. USA. **1981**, 77, pp 333-335
67. Bundgaard H. Desing and application of prodrug. En *A Textbook of Drug Design and Development*. Editado por Krogsgaard-Larsen P., Bundgaard H. Harwoud Academic Publishers. Great Britain. **1991**, pp 173-191
68. 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
69. Hoensch, 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
70. 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**, 13-25

Apéndice A. Procedimientos experimentales

Instrumentación

La regulación de la agitación llevada a cabo durante la síntesis de los compuestos se realizó mediante Parrillas Corning modelo PC-220.

La regulación de la temperatura de las canastillas de calentamiento utilizadas en las síntesis de los compuestos, se realizó por medio de un regulador de voltaje Staco Energy Products Co., tipo 2 PF 1010.

Para concentrar las soluciones se empleó un rotaevaporador Büchi modelo R-114, con baño Büchi modelo B-480 y condensador marca VWR Scientific modelo 1107, acoplado a una bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F-G582DX.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi modelo B-540 usando capilares abiertos. Los puntos de fusión no están corregidos.

Para las pruebas de solubilidad en agua desionizada y en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica 0.6 M, se utilizó un termomezclador marca Eppendorf modelo R.

Las determinaciones espectrofotométricas realizadas para las pruebas de solubilidad, estabilidad de los profármacos en soluciones amortiguadoras y evaluación de la liberación del principio activo frente a enzimas hidrolíticas se realizaron en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1601.

Cromatografía

El monitoreo de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizaron por cromatografía en capa fina, utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF₂₅₄

(Merck). Para visualizar los cromatogramas se empleó una lámpara de luz ultravioleta marca UVP Inc., modelo UVGL-25. Las fases móviles empleadas fueron: Cloroformo/Acetona/Éter de petróleo/Ácido acético (10:6:15:0.6) y Cloroformo/Metanol (95:5).

Reactivos y disolventes

En la siguiente tabla se muestran los reactivos y disolventes ocupados durante el desarrollo del trabajo experimental, así como las marcas a las que corresponden.

Tabla A1 Reactivos y disolventes empleados en el trabajo experimental

Reactivos y disolventes	Marca
Ácido 3,4-diaminobenzoico	Aldrich
Ácido trifluoroacético	J. T. Baker
Ácido clorhídrico	J. T. Baker
1,1-Carbonilimidazol	Aldrich
2-cloro-N,N-dietilacetamida	Aldrich
Metanol	J. T. Baker
Etanol	J. T. Baker
EtilenglicoldimetilÉter	Aldrich
Trietilamina	J. T. Baker
Cloruro de metileno	J. T. Baker
Benceno	Técnica Química
Tolueno	J. T. Baker
Acetato de etilo	J. T. Baker
Acetonitrilo	Merck
Carbón activado	Hycl de México
Yoduro de potasio	Merck
Cloruro de potasio	Sigma
Cloruro de calcio	Merck
Carbonato de sodio	Barsa
Sulfato de sodio anhidro	J. T. Baker
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	Merck
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	Merck
Tris (hidroximetil)amonio metano	Pharmaceuticals Chemicals
Acetato de 4-nitrofenol	Sigma
N _ω -benzoi-DL-arginato de 4-nitroanilida	Sigma
Esterasa de hígado de cerdo	Aldrich
Tripsina de páncreas de cerdo	Sigma
Albúmina bovina	Sigma

Síntesis del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico

En un matraz bola de 250 mL de una boca, equipado con magneto, se colocaron 5 g (0.0329 moles) del ácido 3,4 diaminobenzoico, 25 mL de HCl concentrado y 10 mL de agua, los cuales se agitaron hasta que se observó una solución homogénea. Posteriormente se adicionaron 5 mL (0.0673 moles) del ácido trifluoroacético y se adaptó al matraz un refrigerante de agua en posición de reflujo; la mezcla de reacción se calentó con una canastilla de calentamiento a reflujo durante 24 h. con agitación constante.

Una vez transcurrido el tiempo, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente; la emulsión formada se filtró al vacío en un matraz de vidrio poroso y después se lavó varias veces con agua.

El filtrado se llevó a pH 7 con carbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 mL); las fases orgánicas se juntaron y secaron con sulfato de sodio anhidro y posteriormente se concentraron a presión reducida. El sólido obtenido se juntó con el anterior y se secaron al vacío.

Para la purificación del producto se realizaron varias decoloraciones con carbón activado al 5%, en las cuales se procedió a disolver el producto en metanol y después se agregó el carbón activado; la solución se calentó a ebullición durante 30 min. con agitación constante. Transcurrido el tiempo, se filtró la emulsión en un embudo de vidrio poroso y posteriormente se concentró a presión reducida; el sólido obtenido se secó al vacío.

El producto final se observó como un sólido rosado muy fino, cuyo rendimiento fue del 68.6%; presentó un punto de fusión de 276.7-278.2 °C y un R_f cromatográfico de 0.2 con la fase móvil Cloroformo/Acetona/Éter de petróleo/Ácido acético (10:6:15:0.6).

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo

En un matraz bola de 100 mL de dos bocas, adaptado con un refrigerante de agua en posición de reflujo unido a una trampa anhidra, con un tapón de hule y equipado con magneto, se colocaron 2 g (0.0087 moles) del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico, 2.1 g (0.013 moles) de 1.1-carbonildiimidazol y 20 mL de cloruro de metileno. La mezcla de reacción se calentó a reflujo con una canastilla de calentamiento durante 2 h. con agitación constante.

Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar la mezcla de reacción y se agregó con jeringa 0.4 mL (0.009 moles) de metanol absoluto y se dejó en agitación constante durante 72 h. a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron a la mezcla de reacción 20 mL de cloruro de metileno y se lavó con agua (5 x 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y concentró a presión reducida.

El sólido obtenido se recrystalizó de tolueno, del cual se obtuvo un sólido fino de color blanco cuyo rendimiento fue del 48.3%; presentó un punto de fusión de 163.8-167.5 °C y un R_f cromatográfico de 0.43 con la fase móvil Cloroformo/Acetona/Éter de petróleo/Ácido acético (10:6:15:0.6).

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de etilo

En un matraz bola de 100 mL de dos bocas, adaptado con un refrigerante de agua en posición de reflujo unido a una trampa anhidra, con un tapón de hule y equipado con magneto, se colocaron 2 g (0.0087 moles) del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico, 2.1 g (0.013 moles) de 1.1-carbonildiimidazol y 20 mL de cloruro de metileno. La mezcla de reacción se calentó a reflujo con una canastilla de calentamiento durante 2 h. con agitación constante.

Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar la mezcla de reacción y se agregó con jeringa 0.5 mL (0.009 moles) de etanol absoluto y se dejó en agitación constante durante 72 h. a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron a la mezcla de reacción 20 mL de cloruro de metileno y se lavó con agua (5 x 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida.

El sólido obtenido se recrystalizó de benceno, del cual se obtuvo un sólido fino de color blanco cuyo rendimiento fue del 39.8%; presentó un punto de fusión de 142.7-144.4 °C y un R_f cromatográfico de 0.49 con la fase móvil Cloroformo/Acetona/Éter de petróleo/Ácido acético (10:6:15:0.6).

Síntesis del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo

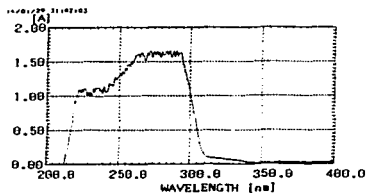
En un matraz bola de 100 mL de una boca, equipado con magneto, se colocaron 2.3 g (0.01 moles) del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico, 1.4 mL (0.01 moles) de 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida, 1.4 mL (0.01 moles) de trietilamina, 0.166 g (0.001 moles) de KI y 10 mL de etilenglicol dimetil éter. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante durante 24 h. a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de reacción, se filtró la emulsión formada y se agregaron 40 mL de cloruro de metileno; posteriormente se realizaron lavados con carbonato de calcio (2 x 20 mL) y agua (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida.

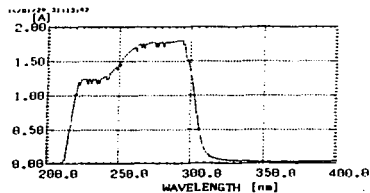
El sólido obtenido se recrystalizó de acetato de etilo y se obtuvieron cristales de color blanco cuyo rendimiento fue del 22.9%; presentó un punto de fusión de 151-153 °C y un *R_f*-cromatográfico de 0.37 con la fase móvil Cloroformo/Metanol (95:5).

Determinación de la longitud de onda máxima

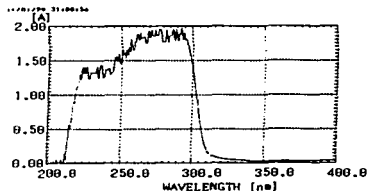
Para esta determinación se hicieron soluciones stock 0.001 M de los cuatro compuestos sintetizados, para las cuales se pesaron lo correspondiente a 0.0001 moles de cada compuesto y se disolvieron en 100 mL de metanol absoluto; posteriormente se hizo la determinación espectrofotométrica para cada uno.



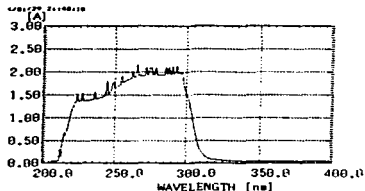
Barrido del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico



Barrido del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo



Barrido del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de etilo



Barrido del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De los barridos anteriores se obtuvieron los siguientes resultados

Compuesto	λ max.	Abs.
1	291.0	1.673
2	294.5	1.808
3	292.5	1.977
4	293.5	2.127

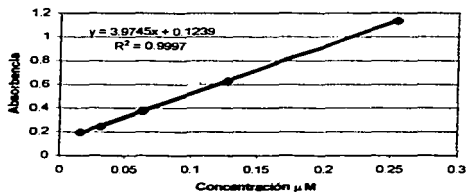
Curva de calibración del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico

Longitud de onda de lectura: 291 nm

Solución patrón 23400 $\mu\text{g/mL}$ (1000 μM)

Concentración μM	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
0.0159	3.6563	0.197
0.0318	7.3125	0.242
0.0636	14.625	0.374
0.1272	29.250	0.629
0.2543	58.500	1.136

Curva de calibración del compuesto 1



El cálculo de ϵ (absortividad molar) se realizó mediante la ecuación de Lambert-Beer

$$A = \epsilon l [\text{concentración}]$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde A es la absorbencia, l es la longitud de la celda (1 cm) y ϵ es el coeficiente de absortividad molar. Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de $\epsilon = 3.9745 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

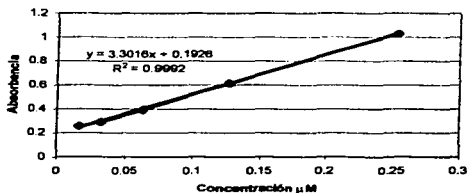
Curva de calibración del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo

Longitud de onda de lectura: 292 nm

Solución patrón 24700 $\mu\text{g/mL}$ (1000 μM)

Concentración μM	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbencia
0.0158	3.8594	0.257
0.0316	7.7188	0.291
0.0633	15.4375	0.391
0.1265	30.8750	0.614
0.2531	61.7500	1.029

Curva de calibración del compuesto 2



Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de $\epsilon = 3.3016 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

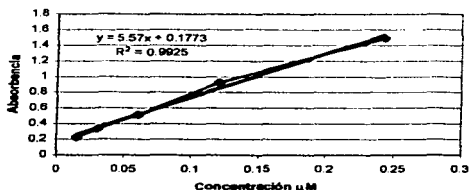
Curva de calibración del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de etilo

Longitud de onda de lectura: 294 nm

Solución patrón 25000 µg/mL (1000 µM)

Concentración µM	Concentración µg/mL	Absorbancia
0.0151	3.9063	0.231
0.0303	7.8125	0.336
0.0606	15.6250	0.514
0.1211	31.2500	0.928
0.2422	62.5000	1.492

Curva de calibración del compuesto 3



Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de $\epsilon = 5.57 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

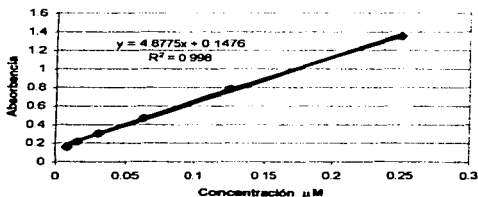
Curva de calibración del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo

Longitud de onda de lectura: 293 nm

Solución patrón 34300 µg/mL (1000 µM)

Concentración µM	Concentración µg/mL	Absorbancia
0.0078	2.6797	0.158
0.0156	5.3594	0.220
0.0313	10.7188	0.306
0.0625	21.4375	0.468
0.1250	42.8750	0.784
0.2500	85.7500	1.350

Curva de la calibración del compuesto 4



Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de $\epsilon = 4.8775 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Preparación de las soluciones amortiguadoras

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y fuerza iónica de 0.6 M

Para la preparación de esta solución amortiguadora se pesaron 7.164 g (0.02 moles) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y 2.76 g (0.02 moles) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, los cuales se colocaron en un mortero y se trituraron finamente; posteriormente se colocaron en un vaso de precipitados 150 mL, en el cual se agregaron 3.8909 g de KCl para ajustar la fuerza iónica. Para facilitar la disolución, en este mismo vaso se adicionaron 50 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente hasta su disolución total; después la solución se trasladó a un matraz aforado de 100 mL y la solución se llevó al aforo con agua destilada.

El cálculo de la fuerza iónica (μ) se realizó con la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot [\text{X}_1](z^2) + [\text{M}_1^+](z^2) + \dots + [\text{X}_n](z^2) + [\text{M}_n^+](z^2)$$

donde [] es la concentración molar de la especie iónica y (z) es el valor de su carga.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7

Para la solución amortiguadora de fosfatos pH 7 se partió de las soluciones patrones de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 M (7.164 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada) y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 M (2.76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada), de las cuales se tomaron 18.8 mL de la solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 M y 31.3 mL de la solución $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 M, se colocaron en un matraz aforado de 100 mL y la solución se llevó al aforo con agua destilada.

Solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8

Para la preparación de esta solución amortiguadora, previamente se preparó una solución de HCl 0.04 M (0.3 mL de HCl al 37.9% en 100 mL), de la cual se tomaron 11.7 mL y se colocaron en un vaso de precipitados de 150 mL; posteriormente fueron colocados en este mismo vaso 0.4846 g (0.004 moles) del Tris (hidroximetil)aminometano, 0.1776 g (0.0016 moles) de CaCl_2 , y 50 mL de agua destilada; se agitó vigorosamente hasta disolución y después la solución se trasladó a un matraz aforado de 100 mL y la solución se llevó al aforo con agua destilada.

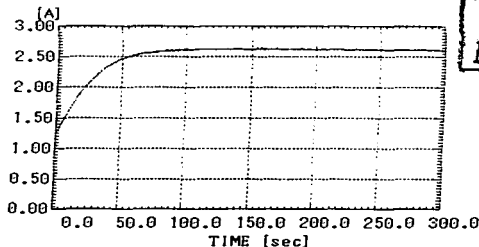
Evaluación de la capacidad de hidrólisis enzimática de la esterasa de hígado de cerdo

Hidrólisis del acetato de 4-nitrofenol

Antes de ser utilizada la enzima esterasa de hígado de cerdo, se evaluó su capacidad de hidrólisis enzimática. Para esta determinación se utilizó como sustrato acetato de 4-nitrofenol, del cual se pesaron 18.1 mg (0.0001 moles) y se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo; posteriormente la solución se llevó a un aforo final de 100 mL con agua destilada.

La determinación se evaluó espectrofotométricamente, para la cual se ajustó el espectrofotómetro a 405 nm y a 0.0 de absorbencia con un blanco que contenía 0.9 mL de

la solución de acetato de 4-nitrofenol y 0.1 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7, los cuales se mezclaron por inversión. Para la evaluación de la hidrólisis se colocó en otra celda de metacrilato las mismas porciones de las soluciones del blanco y 100 μ L de la solución patrón de la enzima, los cuales también se mezclaron por inversión; la liberación del 4-nitrofenol se monitoreo por 5 min.



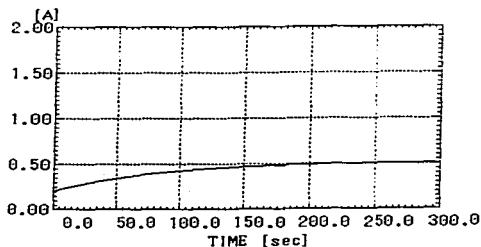
Liberación del 4-nitrofenol por la hidrólisis enzimática de la esterasa de hígado de cerdo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Evaluación de la capacidad de hidrólisis enzimática de la tripsina de páncreas de cerdo

Hidrólisis del N_{α} -benzoyl-DL-arginato de 4-nitroanilida (BAPNA)

El procedimiento utilizado para esta evaluación fue el mismo que se utilizó en la evaluación de la capacidad de hidrólisis enzimática de la esterasa de hígado de cerdo; las únicas variantes fueron que en este ensayo se utilizó como sustrato N_{α} -benzoyl-DL-arginato de 4-nitroanilida (BAPNA), del cual se pesaron 43.5 mg (0.0001 moles) y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. La otra variante fue que la solución amortiguadora que se ocupó en esta evaluación fue el Tris (hidroximetil)aminometano, HCl pH 8 en lugar de solución amortiguadora de fosfatos pH 7. Las lecturas se realizaron a 410 nm.



Liberación de la 4-nitroanilida por la hidrólisis enzimática de la tripsina de páncreas de cerdo

Determinación de proteínas totales

Para este ensayo se utilizó el kit BIO-RAD® (catalogo 500-0002), el cual utiliza el método de Bradford para la cuantificación de proteínas totales. La determinación se realizó como se indica a continuación:

Se preparó una solución del colorante BIO-RAD®, para la cual se utilizaron 25 mL de este y disolvieron en 100 mL de agua destilada. Para la remoción de partículas suspendidas la solución se pasó por un papel filtro Whatman # 1.

Posteriormente se preparó una solución patrón de albúmina para la cual se pesaron 50 mg de la proteína y se disolvieron en 25 mL de agua destilada. A partir de esta, se prepararon 5 soluciones con concentraciones de 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.7 mg/mL para realizar la curva patrón; por lo que se tomaron 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mL de la solución patrón y se aforaron a 10 mL cada una, con agua destilada.

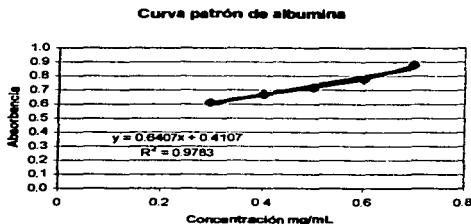
En series de tres tubos de ensayo se colocaron 60 µL de cada una de las soluciones anteriores, así como de las soluciones patrones de las enzimas, posteriormente se agregaron

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

3 mL de la solución del colorante BIO-RAD® en cada tubo, los cuales se agitaron en un termomezclador durante 1 min. a temperatura ambiente.

Las muestras se leyeron a 595 nm en celdas de metacrilato de 1 cm de longitud y 1.5 mL de capacidad.

Concentración (mg/ ml)	Absorbencia	Absorbencia	Absorbencia	Promedio
0.3	0.605	0.613	0.62	0.6127
0.4	0.676	0.668	0.661	0.6683
0.5	0.747	0.707	0.699	0.7177
0.6	0.754	0.798	0.783	0.7783
0.7	0.899	0.872	0.863	0.8780



Los datos de las muestras de las enzimas se presentan a continuación:

Enzima	Abs.	Concentración (mg/mL)
Solución de esterasa de hígado de cerdo	0.622	0.3298
Solución de tripsina de páncreas de cerdo	0.650	0.3735

Apéndice B. Espectros

Instrumentación

Los espectros de infrarrojo (IR) se elaboraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer de transformadas de Fourier modelo FT-IR 1605 en pastilla de bromuro de potasio.

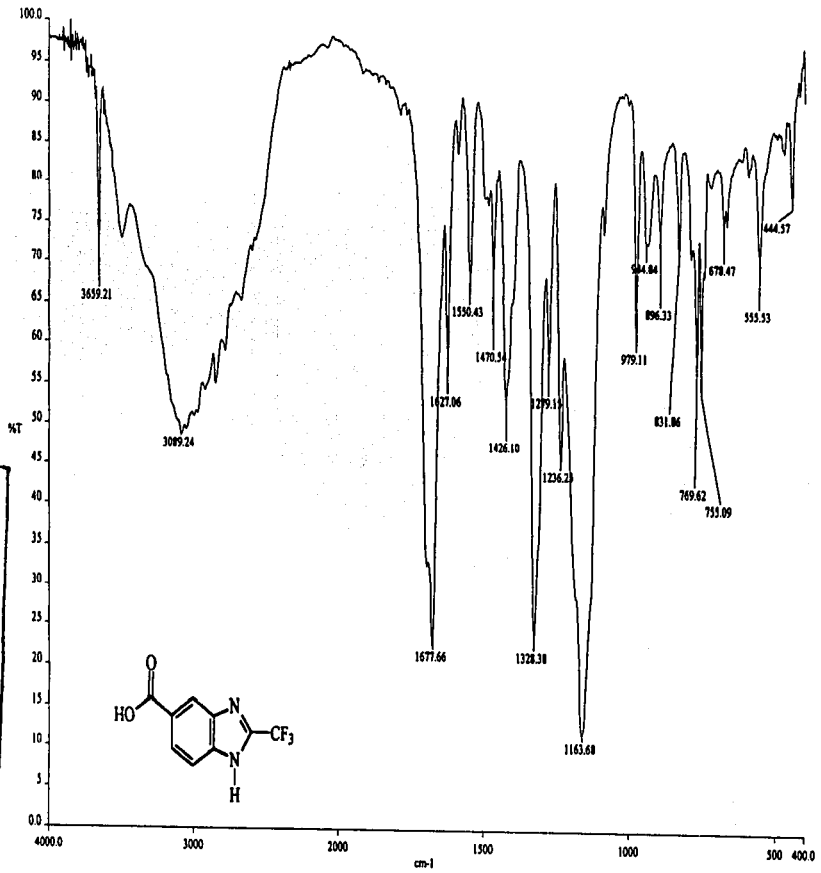
Los espectros de resonancia magnética protónica (RMN- ^1H) se realizaron a 300 MHz y los de resonancia magnética de carbono 13 (RMN- ^{13}C) a 75 MHz, en un espectrofotómetro Varian modelo Unity Inova, usando como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) y tetrametilsilano como referencia interna.

Los espectros de masas se hicieron en un espectrómetro Jeol modelo SX-102 A. Todas las muestras se introdujeron por cromatografía de gases, para lo cual se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 Serie II. El método de ionización fue impacto electrónico a 70 eV.

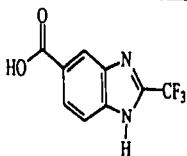
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

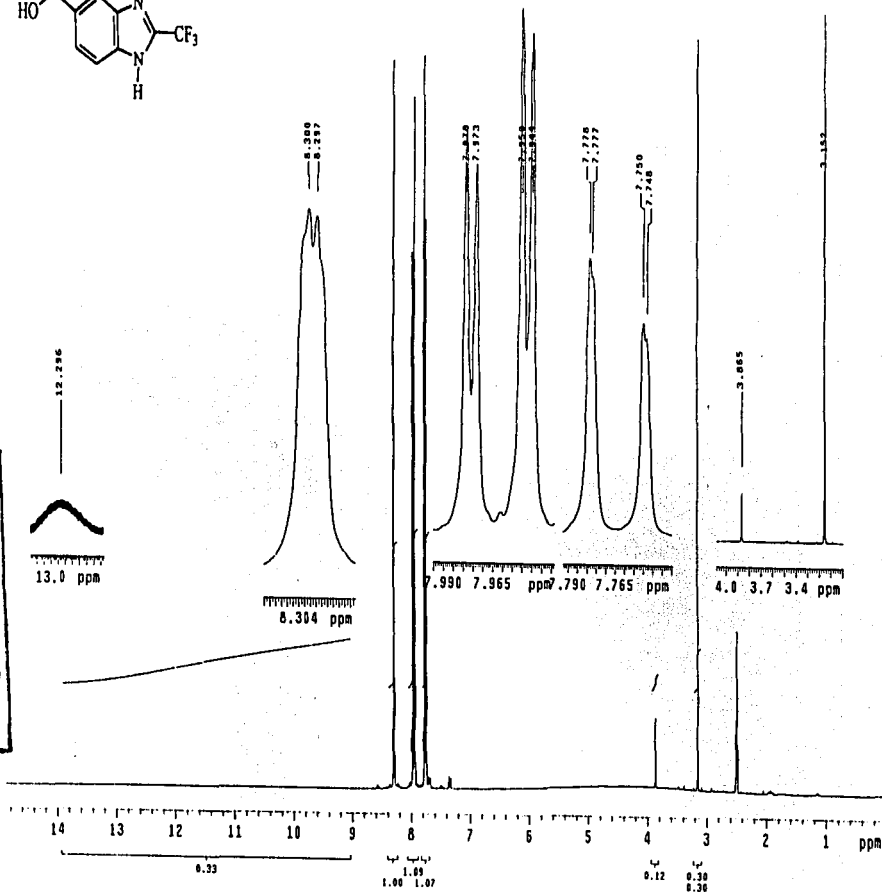
94



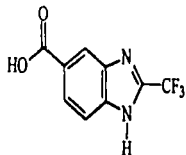
Espectro de IR del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (1)



TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

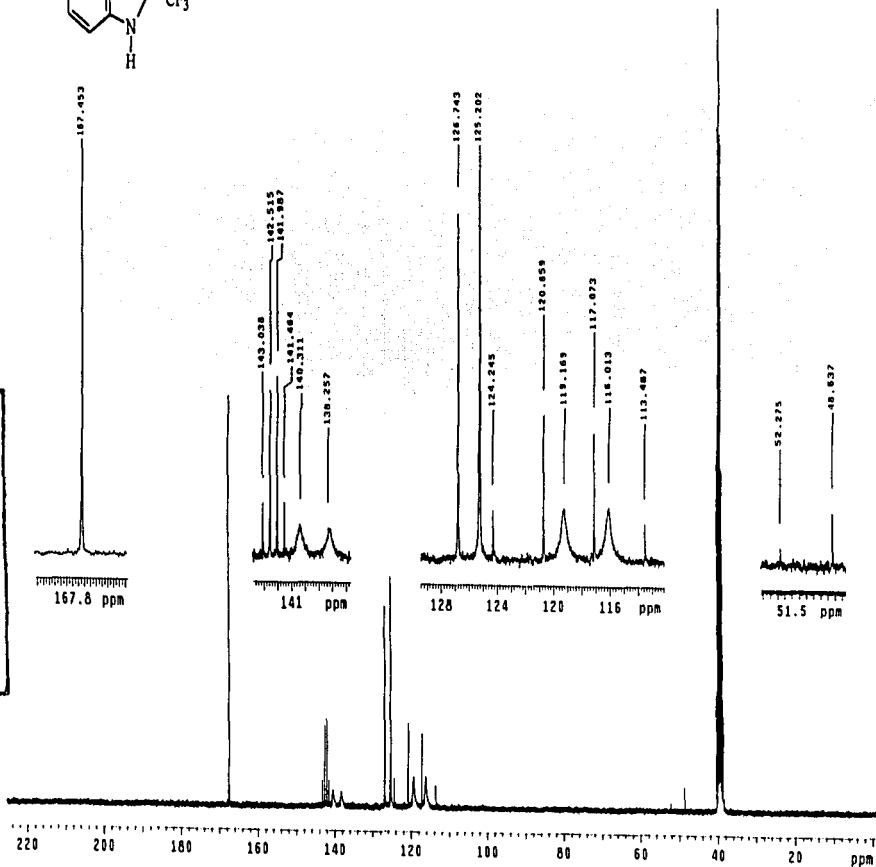


Espectro de RMN-¹H del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (I)



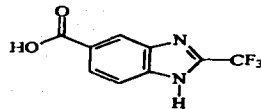
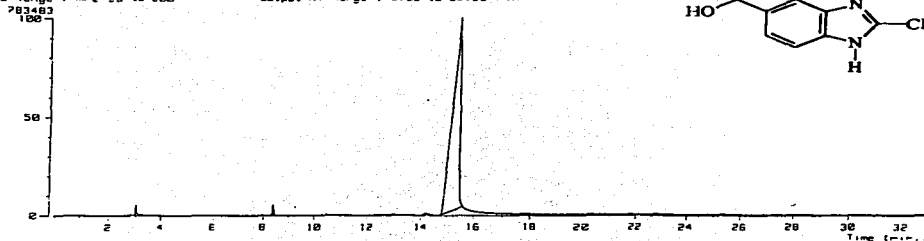
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

96

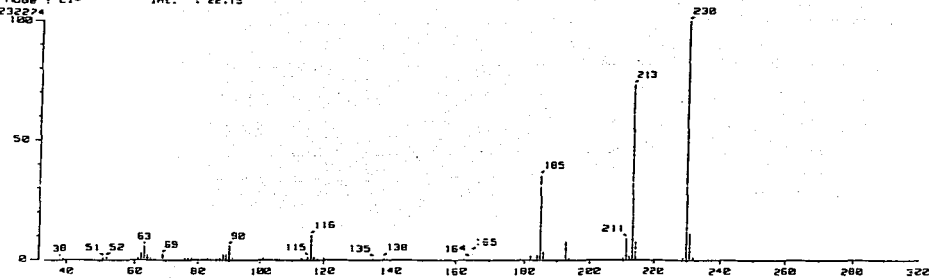


Espectro de RMN.¹³C del Ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (I)

Note : LSRI, Fac. de Quimica, UNPA.
Inlet : GC Ion Mode : E1-
Ion Species : Normal Ion (M⁺-Linear) Output RT Range : 2.00 to 32.98 min
TIC Range : m/z 33 to 690



Mass Spectrum :
RT : 15.43 min Scan : 561-536-567 Temp : 29.2 deg.C
Ion Mode : E1- Int. : 22.15

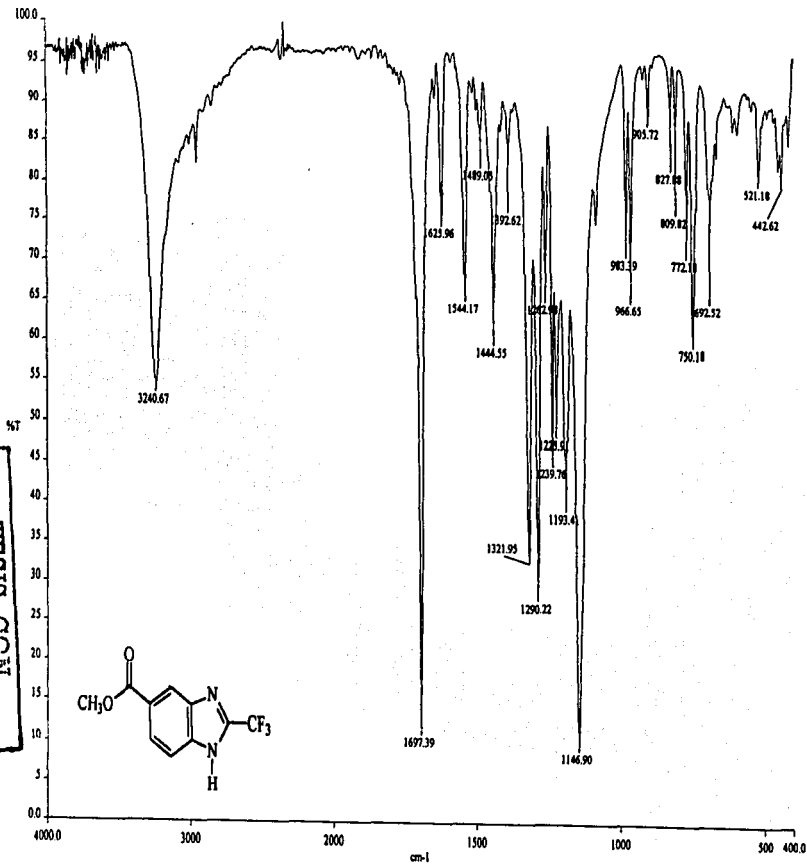


Espectro de Masas acoplado a Cromatografía de Gases del Ácido 2-(trifluorometil)-
1H-benzimidazol-5-carboxílico (I)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

97

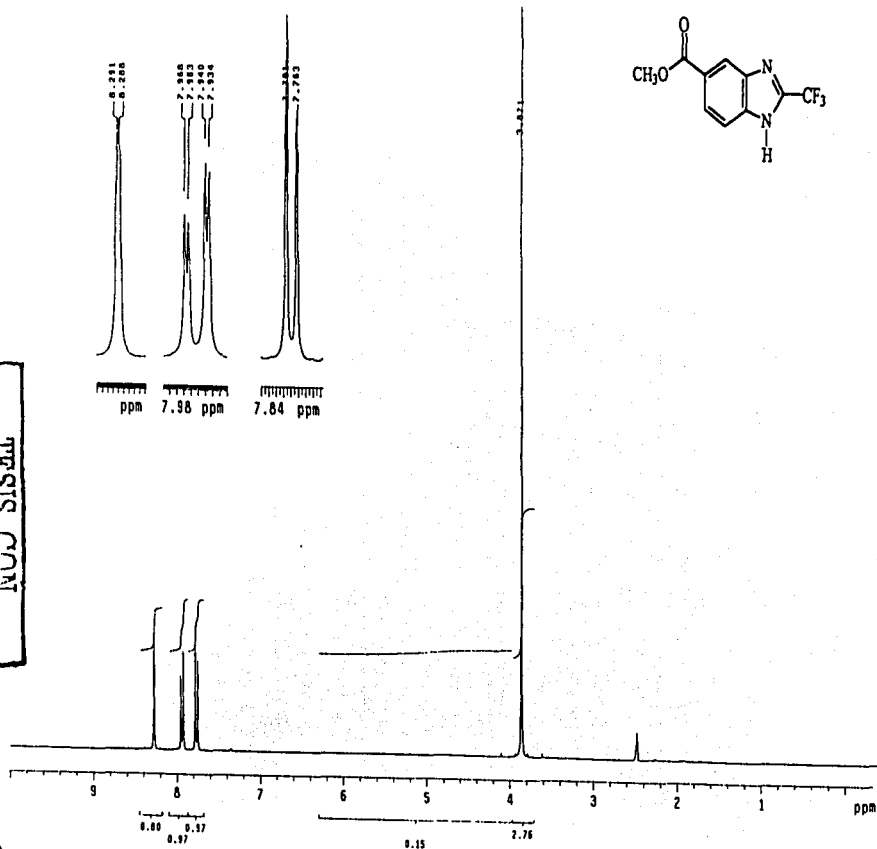
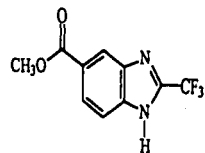
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



98

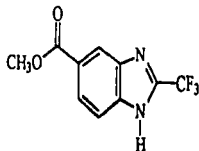
Espectro de IR del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2)

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



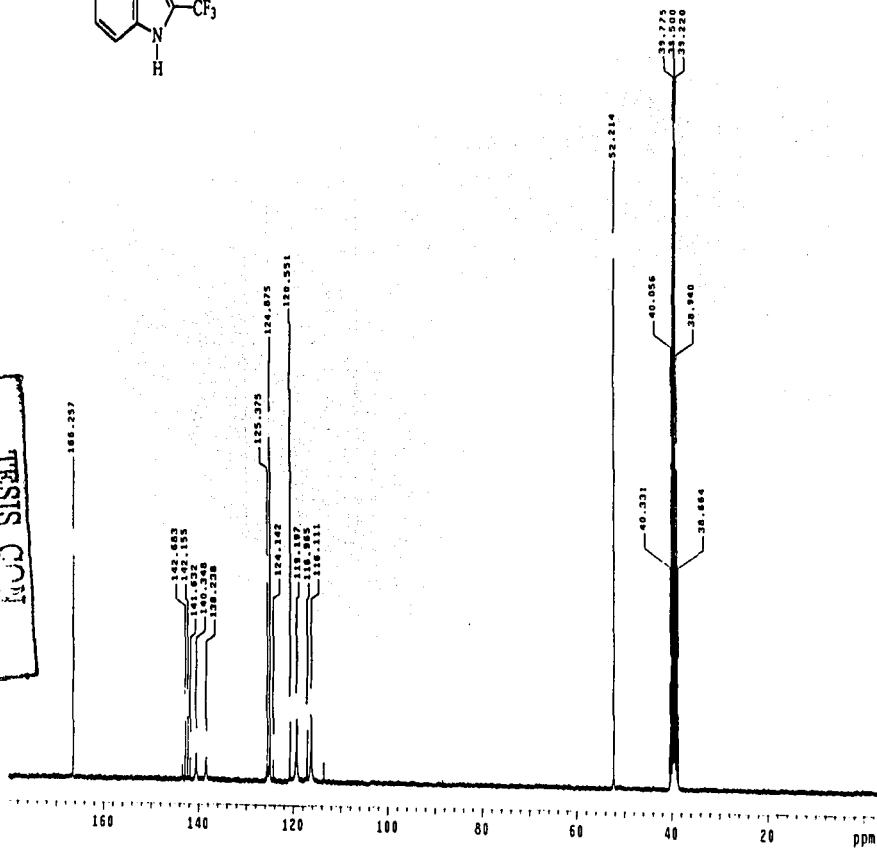
99

Espectro de RMN-¹H del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2)

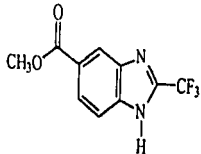


TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

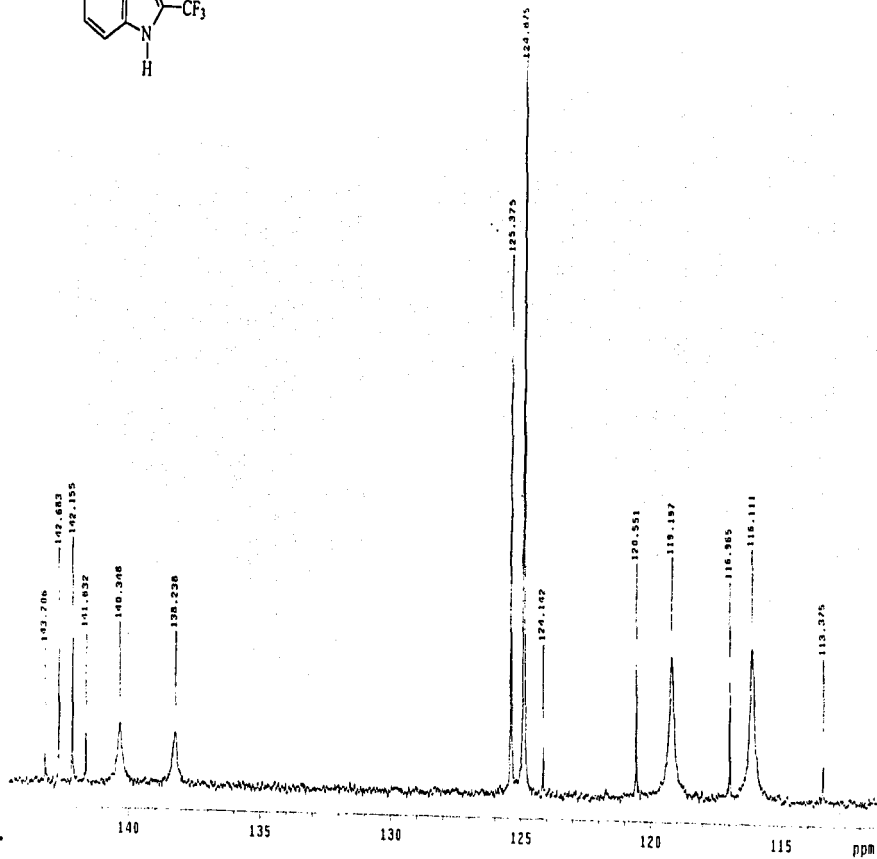
160



Espectro de RMN-¹³C del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro de RMN-¹³C del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2) (continuación)

104

Note : USRI, Fac. de Quimica, UNFM.

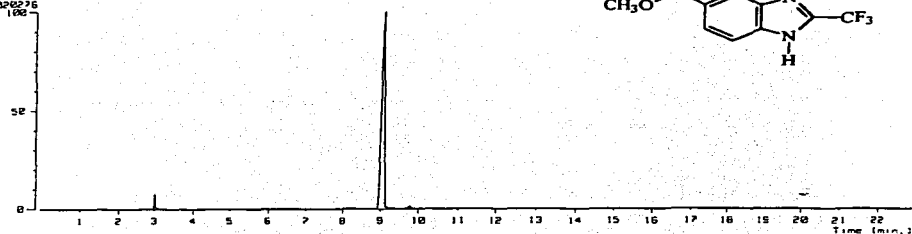
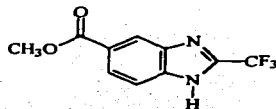
Intes : GC

Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)

TIC Range : m/z 33 to 888

Ion Mode : EI*

Output RI Range : 8.98 to 22.95 min



[Mass Spectrum]

RT : 9.00 min

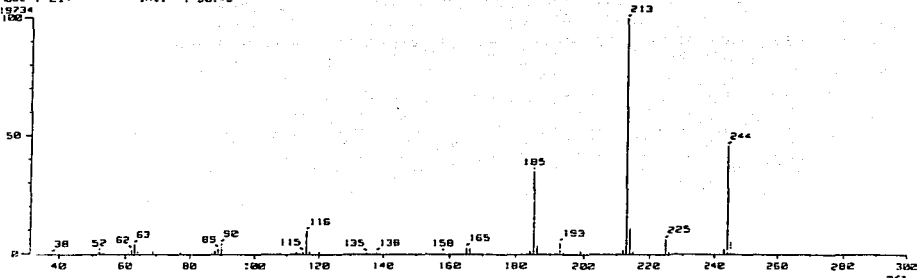
Ion Mode : EI*

319234

Scan# : (329,331)

Temp : 6.4 deg.C

Int. : 38.45

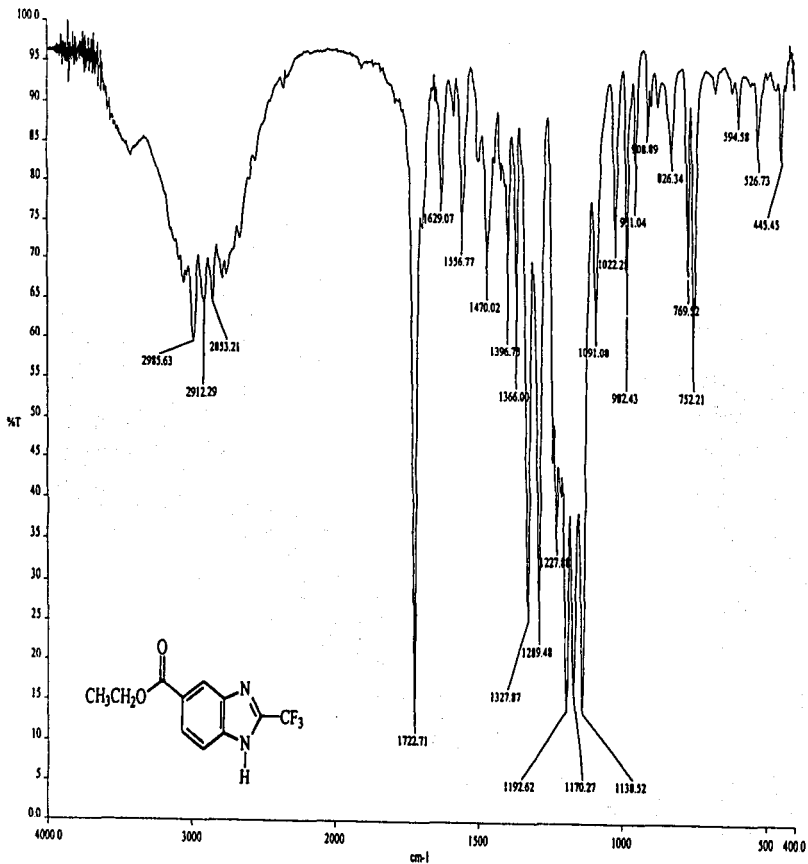


Espectro de Masas acoplado a Cromatografía de Gases del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (2)

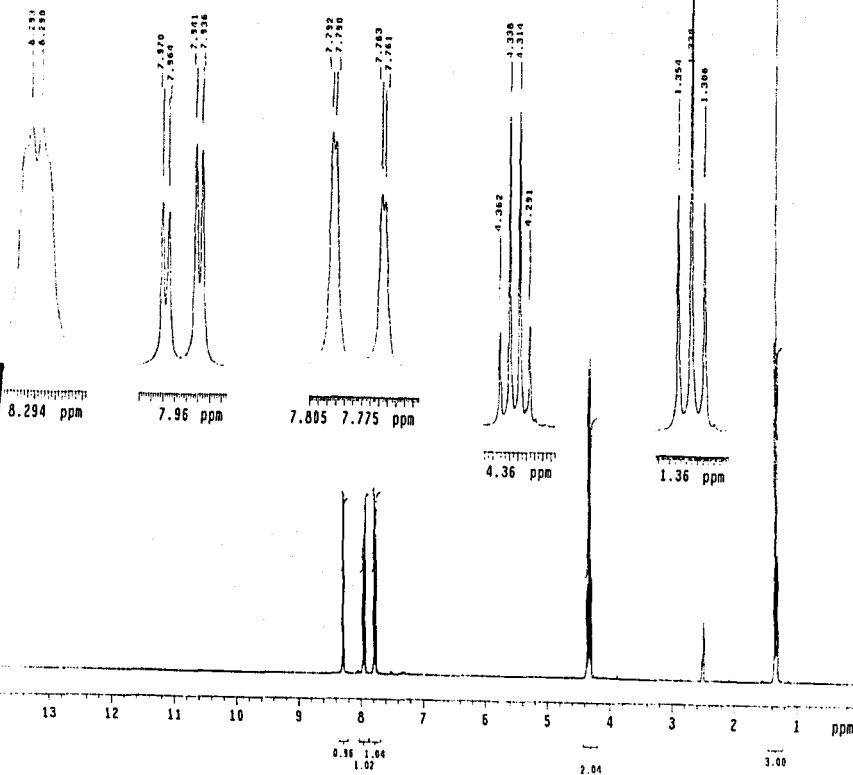
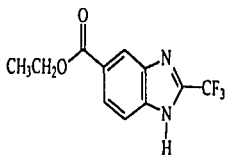
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

102

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



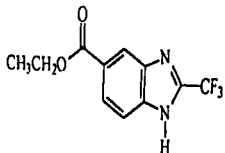
Espectro de IR del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol 5-carboxilato de etilo (3)



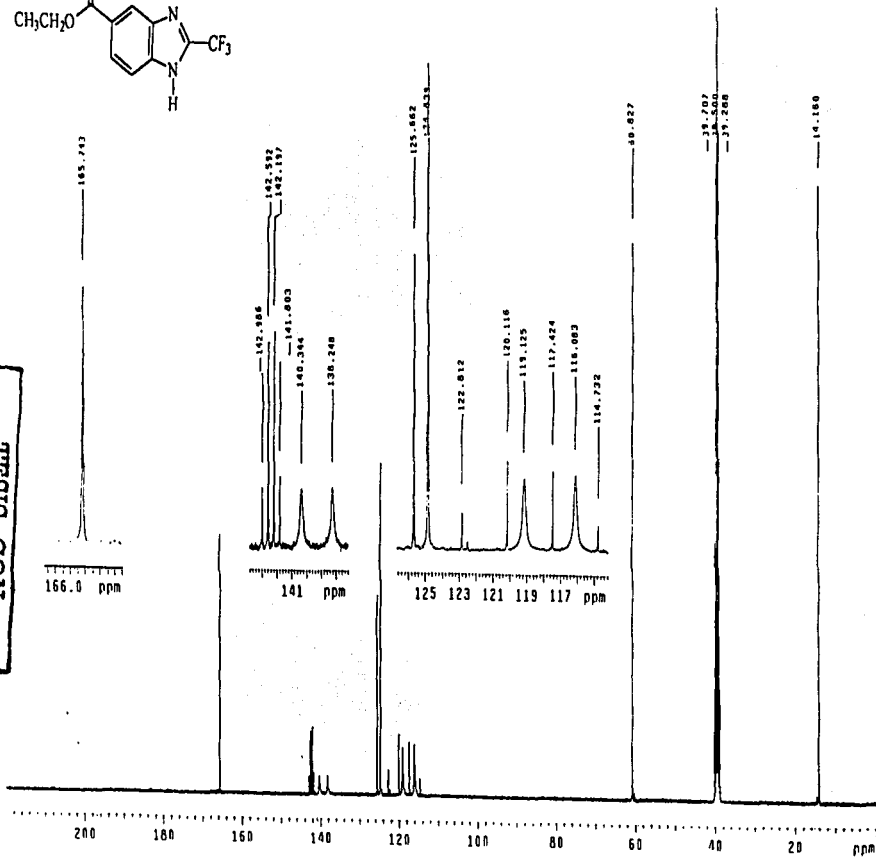
TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

107

Espectro de RMN-¹H del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de etilo (3)

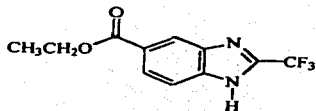
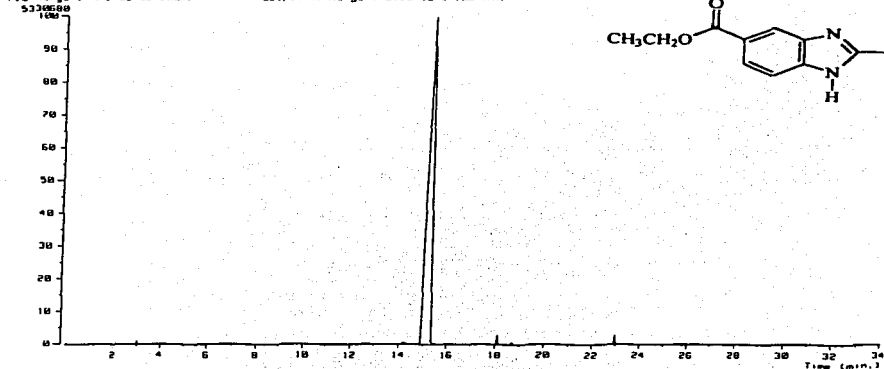


TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

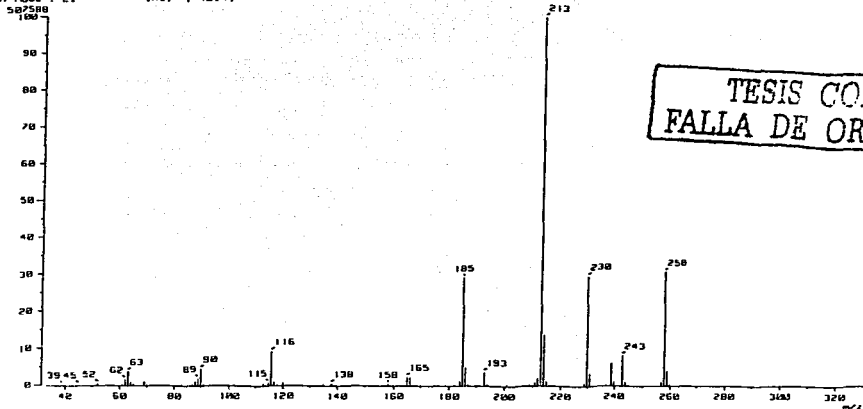


Espectro de RMN-¹³C del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de etilo (3)

Ion Species : Selected Ion Monitoring
TIC Range : m/z 33 to 990 Output RI Range : 0.00 to 34.99 min



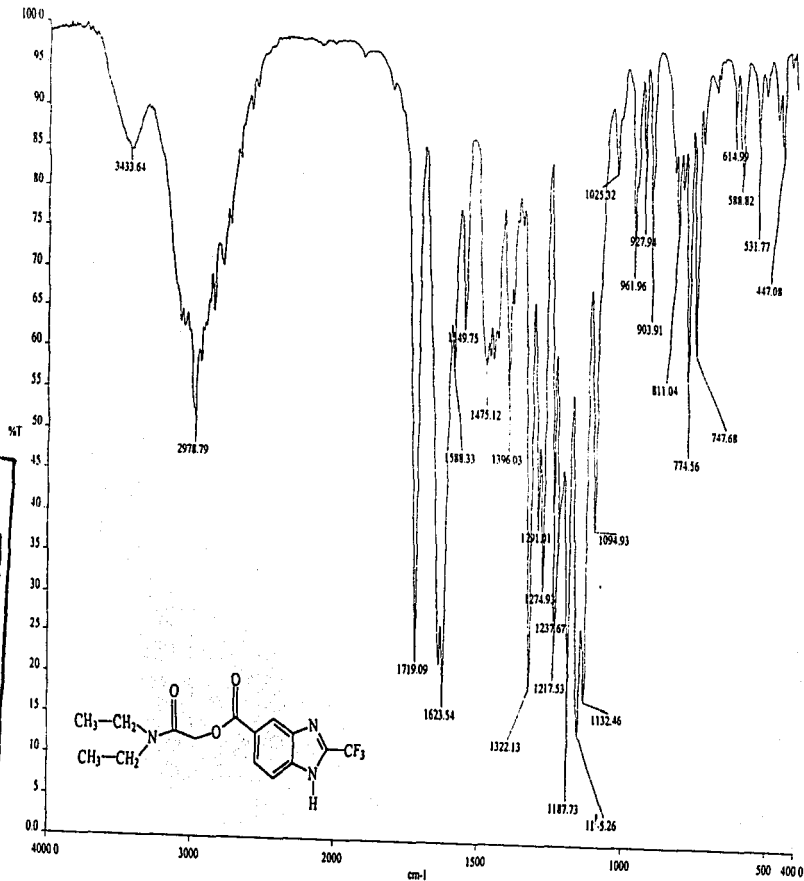
Mass Spectrum 1
RT : 15.55 min
Ion Mode : E1-
Scan : (543,543)
Int. : 48.41
Temp : 6.4 deg.C



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro de Masas acoplado a Cromatografía de Gases del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol 5-carboxilato de etilo (3)

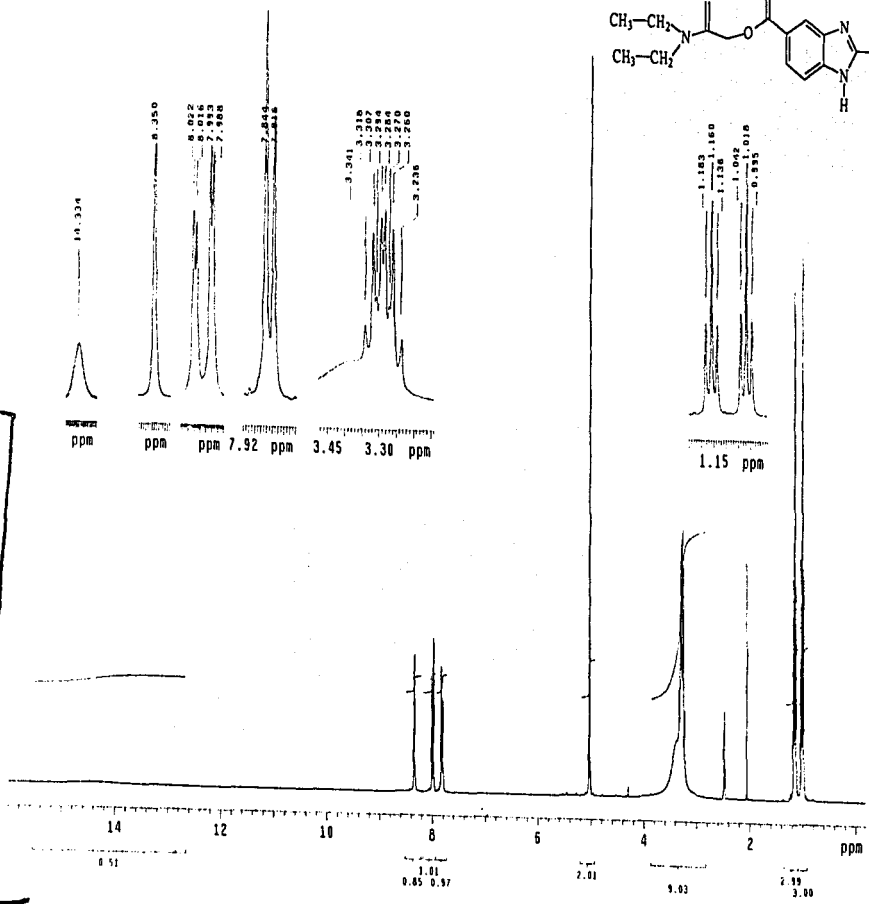
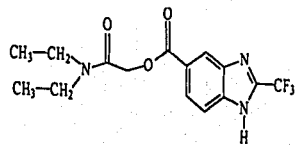
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Espectro de IR del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetil (4)

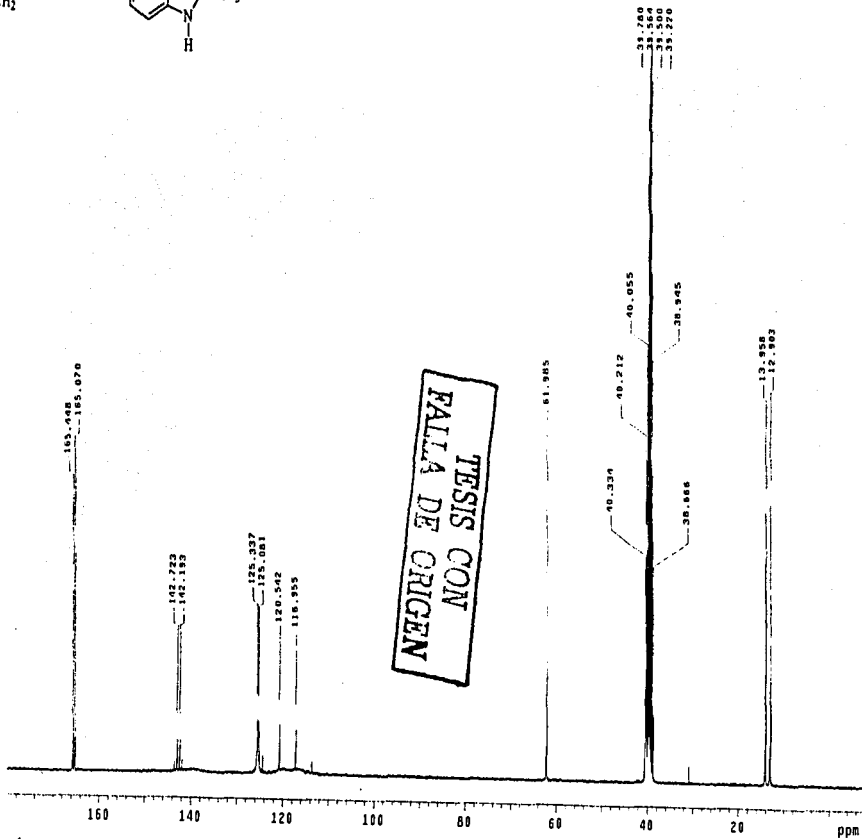
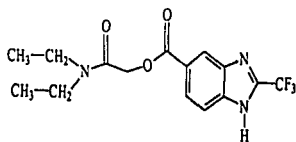
107

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



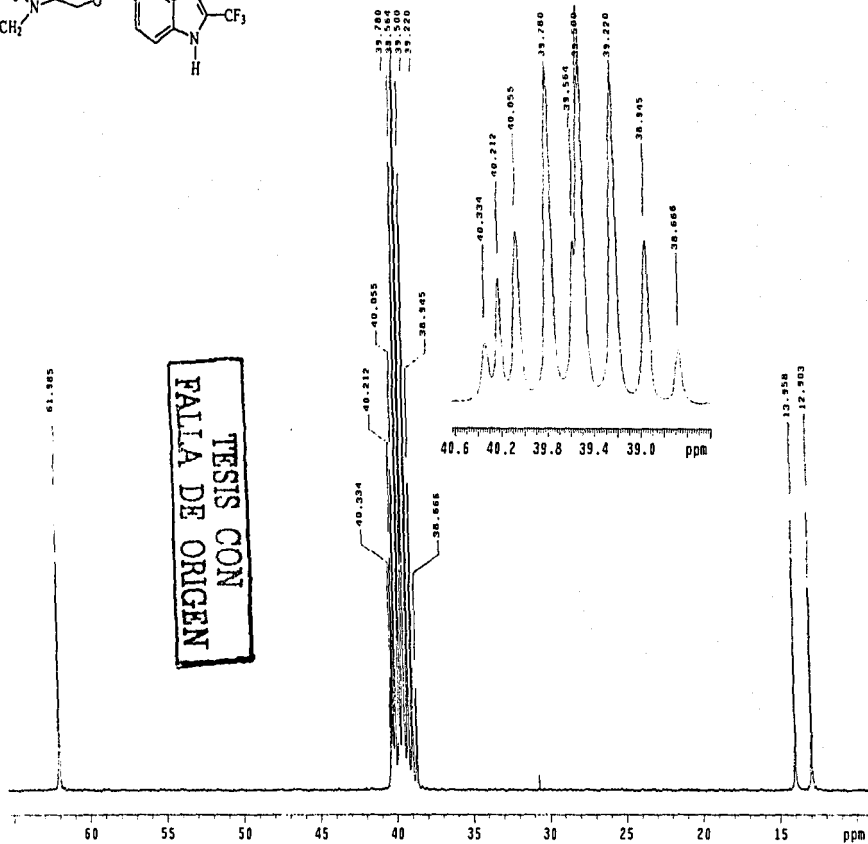
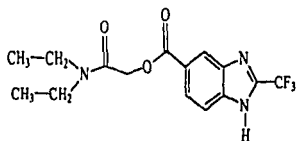
Espectro de RMN-¹H del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetil (4)

108



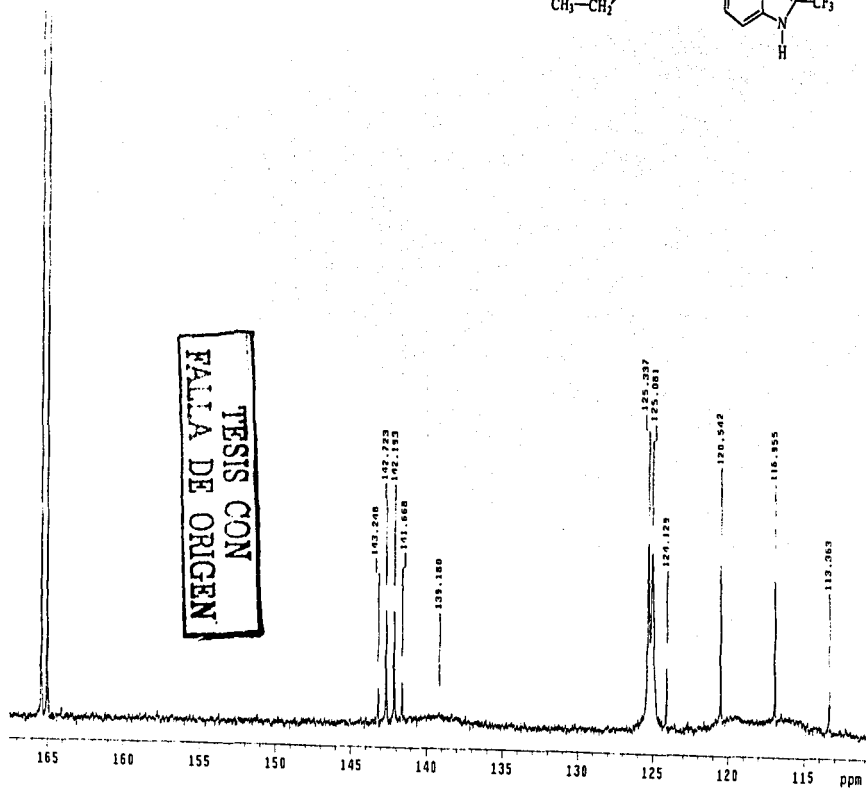
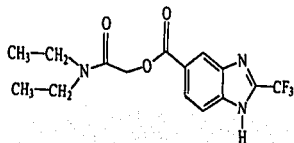
Espectro de RMN¹³C del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetil (4)

109



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro de RMN-¹³C del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 2-(diethylamino)-2-oxoetil (4) (continuación)

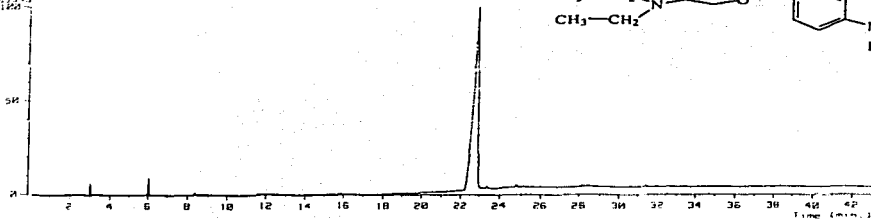
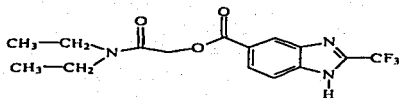


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

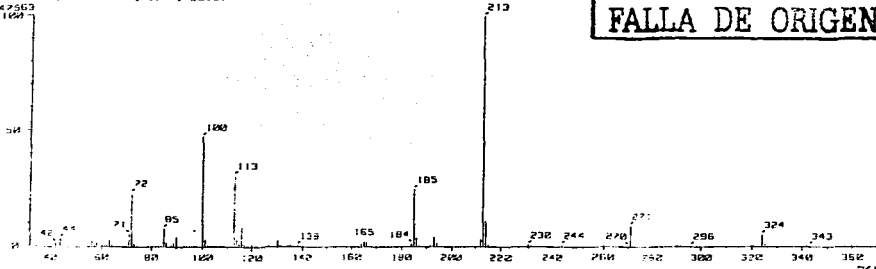
Espectro de RMN.¹³C del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 2-(diethylamino)-2-oxoetil (4) (continuación)

111

Date: (2011, Feb. de Quimica, UNFM). Ion Mode: EI+
 Inlet: 150 Ion Species: Normal Ion (M+-L, Linear)
 TIC Range: 22.33 to 22.82 Output RT Range: 22.22 to 22.98 min
 (22.984)



Mass Spectrum: Scan: (829,833) Temp: 6.4 deg.C
 RT: 22.82 min Ion Mode: EI+ Int.: 23.61



TESIS C
FALLA DE ORIGEN

Espectro de Masas acoplado a Cromatografía de Gases del 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 2-(diethylamino)-2-oxoetil (4)

112