

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

Síntesis, actividad giardicida y permeabilidad aparente de
derivados del 2-(trifluorometil) bencimidazol

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. MIGUEL ANGEL VILCHIS REYES



TUTOR: DR. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

2004



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.

0730

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 122 conjunto E, Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Agradecemos al personal de la USAI, en especial a Rosa Isela del Villar, Oscar Yáñez, Margarita Guzmán, Marisela Gutiérrez, Nayeli López y Georgina Duarte por la determinación de los espectros; a Amparo Tapia por la determinación de la actividad giardílica y a Julio César Rivera por el apoyo en los estudios de permeabilidad.

Adicionalmente a la DGEP y al proyecto PAPIIT IN203101 por el apoyo económico brindado.

estudio

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo intelectual.

NOMBRE: Miguel Ángel Vilchus Pérez

FECHA: 30.08.04

FIRMA: [Firma]

Índice general

Resumen 1

Introducción 2

1. Antecedentes 4

1.1. *Giardia intestinalis* y giardiasis 4

1.2. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis 8

1.3. Los bencimidazoles como agentes antiparasitarios 11

1.3.1. Los 2-(trifluorometil)bencimidazoles 15

1.4. Permeabilidad 17

1.4.1. Métodos para predecir la permeabilidad 20

1.4.1.1. Uso de la línea celular Caco-2 para estimar la permeabilidad 22

1.5. Glicoproteína P (P-gp) 25

1.5.1. P-gp y bencimidazoles 28

1.5.2. Cooperación entre la P-gp y el citocromo P-450 3A4 (CYP3A4) 29

2. Planteamiento del problema 31

3. Objetivo e hipótesis 32

3.1 Hipótesis 32

3.2 Objetivo 32

4. Parte experimental 34

4.1. Parte química 34

4.2. Parte biológica 38

4.2.1. Determinación de la permeabilidad aparente (Papp) en la línea celular Caco-2 38

4.2.2. Evaluación in vitro de la actividad antiprotozoaria contra *Giardia intestinalis* 39

5. Resultados 40

6. Análisis de resultados 50

6.1. Parte química 50

6.2. Actividad giardicida 58

6.3. Permeabilidad 60

7. Conclusiones 63

Apéndice 1. Parte química 64

- A.1.1. Obtención de los compuestos **1, 2, 3 y 7** 64
- A.1.1.1. Síntesis de ácido 4-acetamidobenzoico (**12**) 64
 - A.1.1.2. Síntesis de ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (**13**) 64
 - A.1.1.3. Síntesis de ácido 4-(metilamino)-3-nitrobenzoico (**15**) 65
 - A.1.1.4. Síntesis de ácido 3-amino-4-(metilamino)benzoico (**16**) 66
 - A.1.1.5. Síntesis de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazol carboxílico (**1**) 66
 - A.1.1.6. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de metilo (**2**) 67
 - A.1.1.7. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (**3**) 67
 - A.1.1.8. Síntesis de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxamida (**7**) 68
- A.1.2. Obtención de los compuestos **4, 5, 6 y 8** 68
- A.1.2.1. Síntesis de 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (**18**) 68
 - A.1.2.2. Síntesis de ácido 3-(metilamino)-4-nitrobenzoico (**19**) 69
 - A.1.2.3. Síntesis de ácido 4-amino-3-(metilamino)benzoico (**20**) 70
 - A.1.2.4. Síntesis del ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6- bencimidazolcarboxílico (**4**) 70
 - A.1.2.5. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6- bencimidazolcarboxilato de metilo (**5**) 71
 - A.1.2.6. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6- bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (**6**) 71
 - A.1.2.7. Síntesis de *N*-metil-3-(metilamino)-4-nitrobenzamida (**21**) 71
 - A.1.2.8. Síntesis de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxamida (**8**) 72
- A.1.3. Obtención del compuesto **9** 73
- A.1.3.1. Síntesis de 4-hidroxi-3-nitrobenzoato de metilo (**23**) 73
 - A.1.3.2. Síntesis de 3-amino-4-hidroxibenzoato de metilo (**24**) 73

A.1.3.3. Síntesis de 4-hidroxi-3-[(trifluoroacetil)amino] benzoato de metilo (25)	73
A.1.3.4. Síntesis de ácido 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9)	74
A.1.4. Obtención del compuesto 10	74
A.1.4.1. Síntesis de 3-hidroxi-4-nitrobenzoato de metilo (26)	74
A.1.4.2. Síntesis de 4-amino-3-hidroxibenzoato de metilo (27)	75
A.1.4.3. Síntesis de 3-hidroxi-4-[(trifluoroacetil)amino]benzoato de metilo (28)	75
A.1.4.4. Síntesis de ácido 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo (10)	76
Apéndice 2. Parte biológica	77
A.2.1 Materiales	77
A.2.2. Ensayos de transporte apical-basolateral (AB) y basolateral-apical (BA)	78
Apéndice 3. Espectroscopia y espectrometría	81
Espectro 1a. IR (KBr) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5-bencimidazol- carboxílico (1)	82
Espectro 1b. EM (IE) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5-bencimidazol- carboxílico (1)	82
Espectro 2. RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5-benci- midazolcarboxílico (1)	83
Espectro 3. NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5-benci- midazolcarboxílico (1)	84
Espectro 4a. IR (KBr) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5-bencimidazolcarboxilato de metilo (2)	85
Espectro 4b. EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5-bencimidazolcarboxilato de metilo (2)	85
Espectro 5 RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5-bencimidazol- carboxilato de metilo (2)	86
Espectro 6a. IR (KBr) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -5- bencimidazolcarbo-	

- xilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (3) 87
- Espectro 6b. EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (3) 87
- Espectro 7. RMN ¹H(DMSO-d₆) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (3) 88
- Espectro 8a. IR (KBr) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxílico (4) 89
- Espectro 8b. EM (IE) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxílico (4) 89
- Espectro 9. RMN ¹H de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxílico (4) 90
- Espectro 10. NOE diferencial de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxílico (4) 91
- Espectro 11a. IR (KBr) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de metilo (5) 92
- Espectro 11b. EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de metilo (5) 92
- Espectro 12. RMN¹H (DMSO-d₆) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de metilo (5) 93
- Espectro 13a. IR (KBr) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (6) 94
- Espectro 13b. EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (6) 94
- Espectro 14. RMN ¹H de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (6) 95
- Espectro 15a. IR (KBr) de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxamida (7). 96
- Espectro 15b. EM(IE) de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxamida (7). 96
- Espectro 16. RMN ¹H de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxamida (7) 97

Espectro 17a. IR (KBr) de <i>N</i> ,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -6-bencimidazolcarboxamida (8).	98
Espectro 17b. EM (IE) de <i>N</i> ,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -6-bencimidazolcarboxamida (8).	98
Espectro 18. RMN ¹ H de <i>N</i> ,1-dimetil 2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -6-bencimidazolcarboxamida (8)	99
Espectro 19a. IR (KBr) de 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9)	100
Espectro 19b. EM (IE) de 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9)	100
Espectro 20. RMN ¹ H de 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9)	101
Espectro 21a. IR (KBr) de 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo (10)	102
Espectro 21b. EM (IE) de 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo (10)	102
Espectro 22. RMN ¹ H de 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo (10)	103

Bibliografía 104

Índice de tablas, esquemas y figuras

Figura 1.1. Trofozoíto de <i>Giardia intestinalis</i>	6
Figura 1.2. Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i>	7
Figura 1.3. Algunos fármacos utilizados contra <i>G. intestinalis</i>	10
Figura 1.4. Mecanismo de reducción de los 5-nitroimidazoles y nitrofuranos	11
Figura 1.5. Estructura del anillo de bencimidazol	12
Figura 1.6. Mecanismos de absorción a través de una monocapa celular	22
Figura 1.7. Patrón de reconocimiento estructural de la glicoproteína P	27
Figura 1.8. Estructura del 5-(3-aminofenoxi)-1 <i>H</i> -2-bencimidazolcarbamato de metilo	28

Figura 1.9. Efecto de la cooperación entre P-gp y CYP3A4	30
Figura 3.1. Estructura de los compuestos sintetizados	33
Figura 4.1. Estructura de los compuestos seleccionados para evaluar su permeabilidad aparente (Papp)	38
Figura 5.1. Comparación de la actividad contra <i>G. intestinalis</i> de los compuestos 1-10 con la actividad de albendazol y metronidazol	40
Figura 5.2. Perfiles de permeabilidad de los compuestos 1, 4, 7, BRR-A y ABZ	45
Figura 6.1. Productos obtenidos de la metilación directa de BRR-A con CH ₃ I	51
Figura 6.2. Síntesis de monometilanilinas en un solo paso	52
Figura 6.3. EM obtenido por FAB del compuesto 3	54
Figura 6.4. Catálisis básica en la síntesis del compuesto 19	55
Esquema 4.1. Ruta sintética del compuesto 1	35
Esquema 4.2. Ruta sintética de los compuestos 2, 3 y 7	35
Esquema 4.3. Ruta sintética de los compuestos 6, 5 y 8	36
Esquema 4.4. Ruta sintética de los compuestos 9 y 10	36
Tabla 1.1. Propiedades físicas y biológicas del tracto gastrointestinal	14
Tabla 1.2. Estructura de 2-(trifluorometil)bencimidazoles con actividad giardicida	16
Tabla 1.3. Factores que afectan el arribo de un fármaco con su sitio de acción (blanco molecular)	18
Tabla 1.4. Características estructurales que tienen influencia en la permeabilidad de un fármaco a través de la mucosa intestinal	20
Tabla 1.5. Métodos para estimar la permeabilidad	21
Tabla 5.1. Constantes físicas de los compuestos sintetizados	41
Tabla 5.2. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos sintetizados	42
Tabla 5.3. Efecto antiprotozoario de los compuestos 1-10, albendazol, metronidazol y nitazoxanida contra <i>G. intestinalis</i>	44
Tabla 5.4. Cinética de aparición de los compuestos 1, 4, 7, BRR-A y ABZ en el lado	

receptor durante el ensayo apical-basolateral (AB) 48

Tabla 5.5. Cinética de aparición de los compuestos **1**, **4**, **7**, **BRR-A** y **ABZ** en el lado receptor durante el ensayo basolateral-apical (BA) 48

Tabla 5.6. Valores de permeabilidad aparente (Papp cm/seg) y log Papp de los compuestos **1**, **4**, **7**, **BRR-A** y **ABZ**, su relación de Papp AB/BA y BA/AB y su logP 49

Abreviaturas

AB	<i>Permeabilidad apical a basolateral</i>
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADME	<i>Administración, distribución, metabolismo y excreción</i>
ADMET	<i>Administración, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
ATP	<i>Trifosfato de adenosina</i>
BA	<i>Permeabilidad basolateral a apical</i>
c	<i>Cuadruplete</i>
Cmax	<i>Concentración máxima en plasma</i>
CoA	<i>Coenzima A</i>
CYP3A4	<i>Citocromo P450 3A4</i>
d	<i>Doblete</i>
D.E.	<i>Desviación estándar</i>
dd	<i>Doble de dobles</i>
DMEM	<i>Medio de Eagle modificación de Dulbecco</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
EDTA	<i>Ácido etilendiamino tetra acético</i>
EGTA	<i>Ácido [etilenglicol-bis-(β-aminoetileter)N,N,N',N'-tetra acético</i>
EM	<i>Espectrometría de masas</i>
eq.	<i>Equivalentes</i>
FAB	<i>Bombardeo atómico rápido</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>

HBSS	<i>Solución salina de Hank</i>
HEPES	<i>Ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)</i>
HPLC	<i>Cromatografía de líquidos de alta resolución</i>
IAM	<i>Membranas artificiales inmovilizadas</i>
CI ₅₀	<i>Concentración inhibitoria cincuenta</i>
IR	<i>Espectroscopia de infrarrojo</i>
J	<i>Constante de acoplamiento</i>
LY	<i>Sal de litio del compuesto Lucifer Yellow CH</i>
m	<i>Multiplete</i>
m/z	<i>Relación masa carga</i>
M ⁺	<i>Ión molecular</i>
MLC	<i>Cromatografía miscelar líquida</i>
NADH	<i>Dinucleótido de niacina-adenina reducido</i>
NEAA	<i>Aminoácidos no esenciales</i>
NOE	<i>Efecto nuclear Overhauser</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PAMPA	<i>Ensayo de permeabilidad de membranas artificiales paralelas</i>
Papp	<i>Permeabilidad aparente</i>
PFOR	<i>Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa</i>
P-gp	<i>Glicoproteína P</i>
PPA	<i>Ácido polifosfórico</i>
SAR	<i>Relación estructura actividad</i>
R.A.	<i>Reactivo analítico</i>
RMN ¹ H	<i>Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón</i>
rpm	<i>Revoluciones por minuto</i>
s	<i>Singulete</i>
SAR	<i>Relación estructura actividad</i>
SEM	<i>Escaneo por microscopía electrónica</i>
SFB	<i>Suero fetal bovino</i>
t	<i>Triplete</i>
TEER	<i>Resistencia eléctrica transepitelial</i>

Resumen

En este trabajo se sintetizaron ocho compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxílico (**BRR-A**) y dos compuestos 2-(trifluorometil)-1,3-benzoxazólicos. Se determinó la actividad giardicida *in vitro* de los mismos así como la permeabilidad aparente de cuatro compuestos en la línea celular Caco-2.

Ocho de los compuestos sintetizados fueron más potentes que el metronidazol, fármaco de elección contra *Giardia intestinalis*, siendo el 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo (**10**) el compuesto más efectivo contra el parásito. Los resultados obtenidos incrementaron el conocimiento sobre los requerimientos estructurales de este tipo de moléculas para la actividad giardicida.

Por otra parte, los estudios de permeabilidad mostraron que los compuestos evaluados se absorben pasivamente y no están sujetos a sistemas de reflujo. Adicionalmente, se estableció que la presencia de un grupo ácido en la posición 5 ó 6 y de un hidrógeno en la posición 1, fue desfavorable para la absorción de estos compuestos.

Introducción

Giardia intestinalis es un protozooario enteropatógeno que infecta a un gran número de personas a nivel mundial, y causa la muerte de aproximadamente 2.5 millones de personas anualmente; lo cual es equiparable con el número de muertes causadas por *Ascaris lumbricoides*.

La giardiasis se presenta con mayor frecuencia en países con clima tropical donde afecta a la población infantil, causando problemas en el desarrollo. El elevado número de casos registrados indican que el tratamiento y la prevención de esta enfermedad son inadecuados.

Aunque hay varios fármacos activos contra *G. intestinalis*, el metronidazol es el fármaco de elección contra este parásito; sin embargo, presenta una serie de efectos secundarios que pueden ser en algunos casos severos.

A pesar de los avances en el estudio de la biología de este parásito los compuestos utilizados en el tratamiento son utilizados empíricamente y el desarrollo de nuevos medicamentos es escaso. Adicionalmente, ningún fármaco utilizado contra este parásito está libre de presentar resistencia. La exploración de nuevas alternativas en el tratamiento es un aspecto primordial en la lucha contra *G. intestinalis*.

Los 2-metoxicarbonilaminobencimidazoles, como el albendazol y mebendazol, han mostrado ser efectivos contra *G. intestinalis*. No obstante, el tratamiento con albendazol requiere de administraciones repetidas durante varios días para que sea efectivo. Esto se debe a dos factores principales, la insolubilidad acuosa de ambos compuestos y a su corta permanencia (3 horas) en duodeno y yeyuno, sitio de infección de *G. intestinalis*. Por esta razón se requiere administrar dosis mayores a 7.5 mg/Kg durante 7 días.

Estudios recientes han mostrado que los 2-(trifluorometil)bencimidazoles poseen actividad contra *G. intestinalis* y otros protozoarios. Dentro de este tipo de compuestos se sabe que el ácido 2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxílico (**BRR-A**) posee actividad giardicida *in vitro*.

Algunos fármacos presentan problemas de biodisponibilidad debido a que

la absorción de éstos se encuentra limitada por sistemas de reflujo, principalmente por la participación de la glicoproteína P (P-gp). Se postula que un compuesto que es sustrato de la P-gp se mantiene en recirculación entre el lumen intestinal y las células del intestino, este proceso de recirculación hace que los compuestos permanezcan por más tiempo en la luz intestinal.

De esta manera si los 2-(trifluorometil)bencimidazoles son sustratos de la P-gp podrían mantenerse en recirculación dentro del intestino ejerciendo su actividad giardicida por un tiempo mayor y se lograría disminuir la posología.

El propósito de este trabajo fue sintetizar una serie de 2-(trifluorometil)bencimidazoles (**1-8**) y 2-(trifluorometil)benzoxazoles (**9** y **10**) derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxílico (**BRR-A**), determinar su actividad contra *G. intestinalis* y su permeabilidad aparente en la línea celular Caco-2 para establecer si son sustratos de la P-gp. Adicionalmente, se obtuvo información básica de los requerimientos estructurales de los 2-(trifluorometil)bencimidazoles para la actividad giardicida y se establecieron otros requerimientos estructurales para mejorar la actividad *in vivo*.

1. Antecedentes

Las enfermedades parasitarias causadas tanto por protozoarios como por nematodos se encuentran entre los principales problemas de salud pública.

El detrimento en la salud causado por parásitos es considerable y esta problemática se ve reflejada en la salud de los individuos, y también en la economía de los países endémicos de la enfermedad (Horton, 1990). Las infecciones parasitarias contribuyen a hacer más grandes las desigualdades sociales, e inclusive este tipo de enfermedades pueden incapacitar a un individuo en edad productiva para toda la vida (Evans y cols., 1994).

El interés en protozoarios intestinales se ha incrementado debido a que son enfermedades difíciles de tratar sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. Por otro lado, los estragos ocasionados por estas enfermedades en países en vías de desarrollo, indican que la prevención y terapia actual son inadecuados (Petri, 2003).

1.1. *Giardia intestinalis* y giardiasis

Se ha estimado que aproximadamente 280 millones de personas se infectan anualmente a nivel mundial con *G. intestinalis* (*G. duodenalis* o *G. lamblia*) (Buret, 1994; Upcroft y cols., 2001; Lloyd y cols., 2002). Es la infección por protozoarios más común a nivel mundial, con prevaencia de 2-5 % en países desarrollados y de 20-30 % en países en vías de desarrollo (Farthing, 1994). Esta infección es la principal causante de los casos de diarrea crónica (Upcroft y cols., 2001). La giardiasis se presenta con más frecuencia en la población infantil. En un estudio realizado con 45 niños guatemaltecos, donde se monitorearon desde el nacimiento hasta los tres años de edad, se observó que todos habían presentado la enfermedad y la mayoría de ellos tuvieron infecciones recurrentes (Farthing y cols., 1986).

La transmisión se realiza por la vía oral-fecal y por el consumo de agua o alimentos contaminados con quistes de *G. intestinalis*. La giardiasis es

considerada como contagiosa y el contacto interpersonal puede causar brotes epidémicos en familias, guarderías y asilos (Mineno y cols., 2003). El reservorio principal son los humanos infectados aunque otros animales domésticos pueden estar implicados (Farthing, 1994).

G. intestinalis es un parásito eucariótico anaerobio que infecta a una amplia variedad de vertebrados. *G. intestinalis* posee dos formas, una vegetativa y reproductiva llamada trofozoito, y una infectiva llamada quiste. El trofozoito de *G. intestinalis* tiene forma periforme (Figura 1.1) y posee 4 pares de flagelos: los flagelos anterolaterales, ventrales, posterolaterales y caudales. Adicionalmente posee dos núcleos, cuerpo medio y un disco de adhesión ventral (Meyer, 1994; Adam, 2001).

El ciclo de vida de *G. intestinalis* es relativamente sencillo (Figura 1.2). Los quistes de *G. intestinalis* son ingeridos y llegan al estómago. Son necesarios al menos 10 quistes para iniciar la infección (Gardner y cols., 2001). Después de la ingestión de los quistes de *G. intestinalis* se necesita un periodo de incubación de 7 a 14 días (Upcroft y cols., 2001). El quiste al entrar en contacto con el pH ácido del estómago inicia el proceso de desenquistamiento, el cual es rápido y dura aproximadamente 10 min (Adam, 2001). En el intestino delgado, los trofozoítos se adhieren al epitelio intestinal de duodeno y yeyuno donde se multiplican por división binaria estableciendo de esta manera la infección (Meyer, 1994).

La adhesión de este parásito a las células epiteliales se realiza por el disco de adhesión ventral, posiblemente por la acción de los flagelos ventrales (Mineno y cols., 2003). La adhesión del parásito al epitelio intestinal es un proceso mecánico y hasta la fecha no se han detectado receptores que participen en este fenómeno. El proceso depende de energía y se inhibe a temperaturas menores de 37 °C, concentraciones altas de oxígeno o concentraciones bajas de cisteína. El disco de adhesión ventral es una estructura altamente especializada que está constituida principalmente de estructuras microtubulares (Adam, 2001).

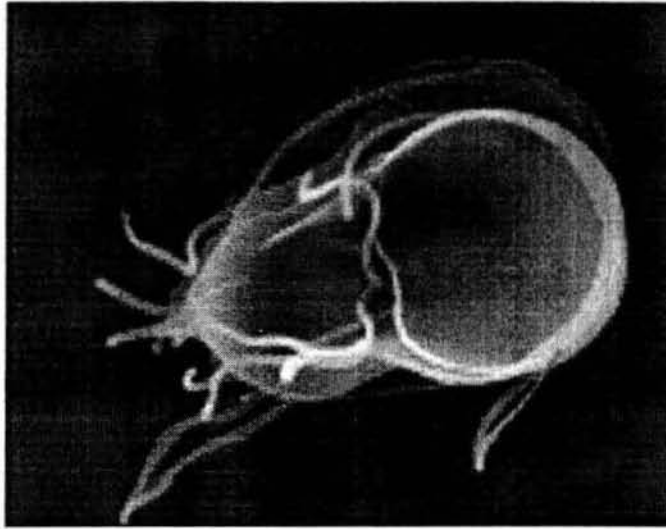


Figura 1.1. Trofozoíto de Giardia intestinalis. Imagen obtenida por SEM donde se observa la forma ovoide de *G. intestinalis*, los flagelos y el disco de adhesión, detrás de él se encuentra otro trofozoíto. (Tomada de Garner y cols., 2001).

Cuando los trofozoítos se despegan del epitelio intestinal pueden ser arrastrados por el movimiento peristáltico (Meyer, 1994). El proceso de enquistamiento inicia cuando el pH del contenido intestinal se vuelve ligeramente alcalino y en el medio se encuentran ácidos grasos, sales biliares conjugadas y concentraciones bajas de colesterol. Este proceso toma 16 h en completarse (Adam, 2001), por lo que en caso de diarrea se observan los trofozoítos en heces. Los quistes de *G. intestinalis* pueden permanecer viables durante meses en agua de lugares con climas fríos (Upcroft y cols., 2001). La cloración del agua no garantiza la remoción total de los quistes (Farthing, 1994).

G. intestinalis es un microorganismo que no posee mitocondria, peroxisomas y enzimas del ciclo de Krebs. Su metabolismo es fermentativo y la síntesis de ATP la realiza únicamente por fosforilación a nivel de sustrato, la glucosa la degrada por glicólisis, utilizando pirofosfato en lugar de ATP. El producto mayoritario en condiciones anaerobias es alanina y en condiciones microaerobias se produce etanol y CO₂ o acetato y CO₂, dependiendo de la concentración de oxígeno (Adam, 2001; Upcroft y cols., 2001; Lloyd y cols., 2002).

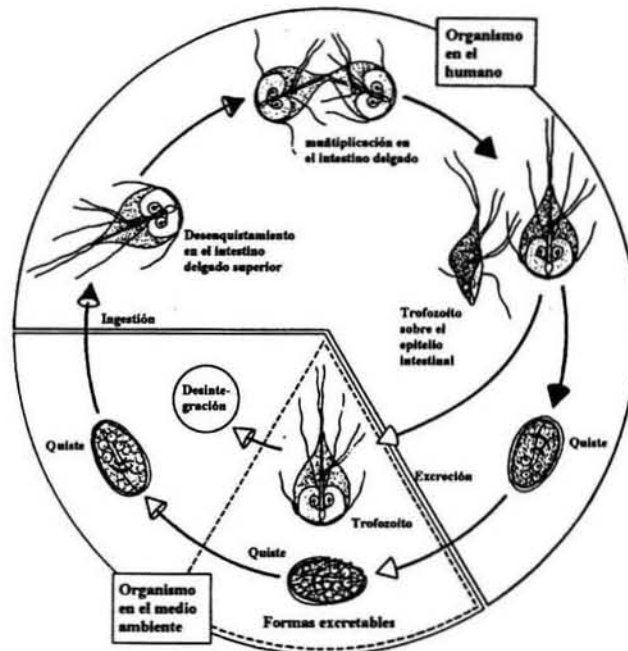


Figura 1.2. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*. (Adaptado de Meyer, 1994).

La producción de acetato es acompañada por la síntesis de ATP y ocurre con la participación de la enzima piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), la cual es dependiente de nucleótidos difosfatados. La cadena de electrones que se produce en la síntesis de acetato tiene como aceptor final al oxígeno (Adam, 2001; Lloyd y cols., 2002).

Las manifestaciones clínicas de la giardiasis incluyen: i) infección asintomática, la cual es la forma más común de la enfermedad, ii) giardiasis aguda, los síntomas principales son diarrea, náusea, esteatorrea, distensión y dolor abdominal y en algunos casos pérdida de peso; la infección es autolimitante dentro de un periodo de 2 a 4 semanas, iii) giardiasis crónica, la cual se caracteriza por presentar esteatorrea y síndrome de mala absorción. La giardiasis crónica puede tener como consecuencia la deficiencia de macro y micronutrientes en adultos, y en niños alteraciones del desarrollo debido a la mala absorción de nutrientes. El impacto de *G. intestinalis* en el crecimiento infantil continúa siendo

tema de debate debido a que la literatura no ha provisto una respuesta definitiva (Farthing, 1994).

Los mecanismos implicados en la enfermedad aún no han sido bien elucidados pero se ha observado atrofia de las microvellosidades del intestino acompañado por hiperplasia de las criptas. También se ha visto que trofozoítos de *G. intestinalis*, íntegros o en extracto, inducen alteraciones de la actividad enzimática; entre las enzimas afectadas se encuentran la lactasa, tripsina, lipasa y amilasa. Probablemente la causa de la diarrea se deba a mala absorción de electrolitos (cloruro, sodio y potasio), solutos (glucosa), y agua. Adicionalmente, la virulencia de la cepa que realiza la colonización es un factor que determina el curso clínico de la enfermedad, aunado con la respuesta inmune del hospedero (Buret, 1994).

Las alteraciones presentes en la mucosa intestinal pueden ser correlacionadas con la cantidad de trofozoítos que invaden el epitelio del intestino (Buret, 1994). Por otro lado, se observa la producción de una toxina por parte de *Giardia* que es homóloga a las sarafotoxinas, la cual se expresa sólo en algunas cepas, así como proteínas de señalización que explican la variabilidad de los síntomas y las alteraciones morfológicas del epitelio (Upcroft y cols., 2001).

1.2. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis

El tratamiento de *G. intestinalis* incluye una serie de compuestos estructuralmente diversos (Figura 1.3), los cuales son utilizados de forma empírica y ninguno de ellos fue diseñado originalmente para tratar esta enfermedad (Boreham, 1994).

A pesar de que la Organización Mundial de la Salud (WHO) ha estimado que hay aproximadamente 2.5 millones de fallecimientos anuales por deshidratación debido a la giardiasis (Upcroft y cols., 2001), el desarrollo de nuevos fármacos contra *G. intestinalis* es escaso.

Los fármacos utilizados para tratar la giardiasis pueden ser clasificados de acuerdo a su supuesto mecanismo de acción.

i) Inhibición de la síntesis de ADN. Con este mecanismo se encuentra la

quinacrina, derivado de acridina sintetizado originalmente para el tratamiento de la malaria. Este compuesto se intercala entre las bases del ADN por medio de puentes de hidrógeno y probablemente inhibe la acción de la ADN polimerasa así como la transcripción y la traducción (Jarroll, 1994). La toxicidad que se presenta primordialmente en *G. intestinalis* se debe a la diferencia en la captación del fármaco por parte de los trofozoítos y células humanas (Gardner y cols., 2001).

ii) *Inhibición de la síntesis de proteínas.* En este grupo se encuentran los aminoglicósidos, las tetraciclinas y algunos macrólidos que han mostrado actividad contra *G. intestinalis*. El fármaco utilizado en la clínica es la paromomicina, un aminoglicósido que se absorbe pobremente y presenta eficiencia regular contra *G. intestinalis*. Este compuesto interacciona con las subunidades ribosomales 50S y 30S inhibiendo la síntesis de proteínas (Mineno y cols., 2003).

iii) *Formación de especies reactivas de oxígeno.* Los 5-nitroimidazoles fueron desarrollados a partir de la observación de que la azomicina era efectiva contra *Trichomonas vaginalis* y otros microorganismos anaerobios. Dentro de este grupo de compuestos se encuentra el metronidazol, tinidazol, ornidazol, secnidazol, benzoilmetronidazol y nimorazol, siendo el metronidazol el compuesto más utilizado en el tratamiento de la giardiasis (Boreham, 1994). El metronidazol interfiere con las vías metabólicas anaerobias de *G. intestinalis* (Figura 1.4). En la formación de acetato a partir de la oxidación del ácido pirúvico participa la enzima PFOR, la cual utiliza ferredoxina como aceptor de electrones; al parecer los 5-nitroimidazoles oxidan a la ferredoxina interfiriendo con la vía metabólica (Mineno y cols., 2003). Por otro lado, el grupo nitro es reducido a anión-radical, el cual puede formar productos citotóxicos que inducen la pérdida de la estructura helicoidal y ruptura del ADN del parásito. La acción tóxica del metronidazol induce detención del ciclo celular de *G. intestinalis* en la fase G2-M (Jarroll, 1994).

Los 5-nitroimidazoles poseen una serie de efectos adversos que incluyen dolor de cabeza, náusea, sabor metálico en la boca, vértigo, dolor abdominal, neutropenia reversible y en algunas ocasiones cuando la dosis es alta, toxicidad del sistema nervioso central o pancreatitis. Adicionalmente, inhiben a la aldehído deshidrogenasa causando reacciones tipo disulfiram (Gardner y cols., 2001).

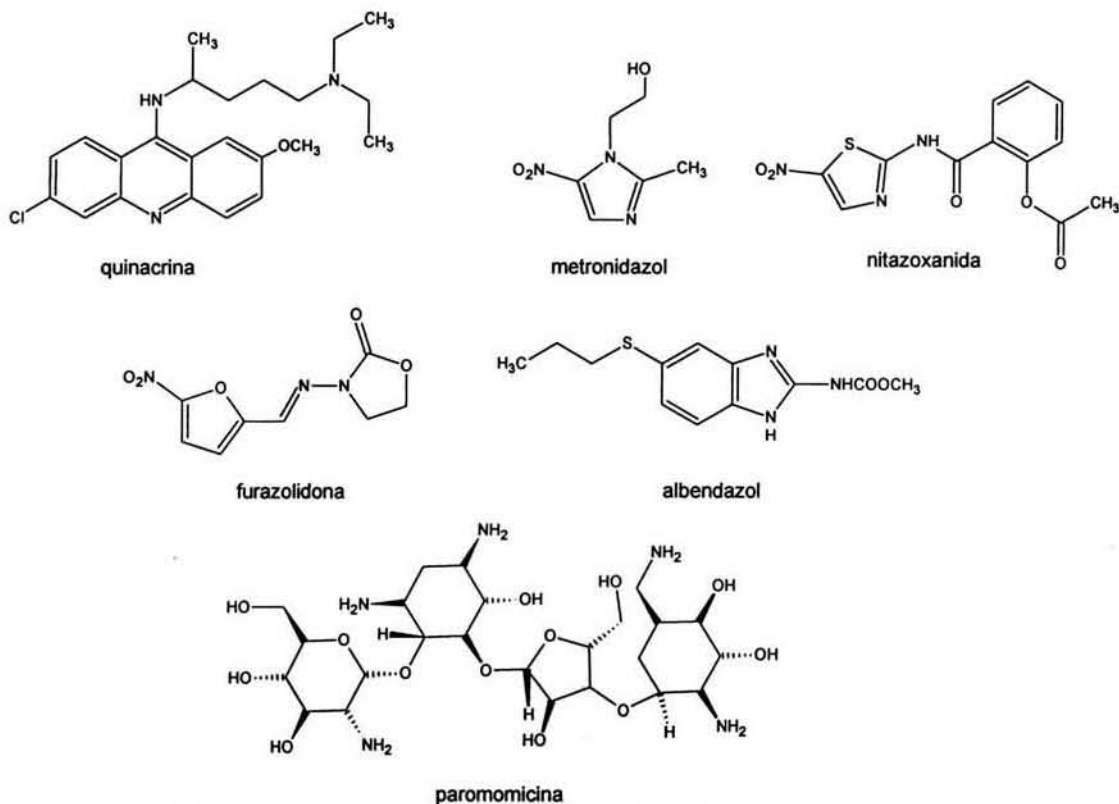


Figura 1.3. Algunos fármacos utilizados contra *G. intestinalis*.

Estos compuestos son mutagénicos en bacterias y carcinogénicos en roedores. Sin embargo, no se ha observado mutagénesis en humanos, lo que se sugiere que su uso es seguro en este aspecto (Roe, 1985).

Otro fármaco utilizado comúnmente es la furazolidona, un nitrofurano que al igual que el metronidazol requiere activación por reducción para ejercer su acción giardicida, pero a diferencia de los 5-nitroimidazoles se activa a través de una NADH oxidasa. Este fármaco posee efectos adversos menos severos que los del metronidazol, adicionalmente posee acción inhibitoria de la monoaminoxidasa. Es mutagénico en bacterias y causa tumores de mama en ratas y de pulmón en ratones (Gardner, 2001). Se ha observado que en *T. cruzi* causa peroxidación de lípidos, inhibición enzimática y daño al ADN; en *G. intestinalis* detiene el ciclo celular en la fase G2-M (Jarroll, 1994).

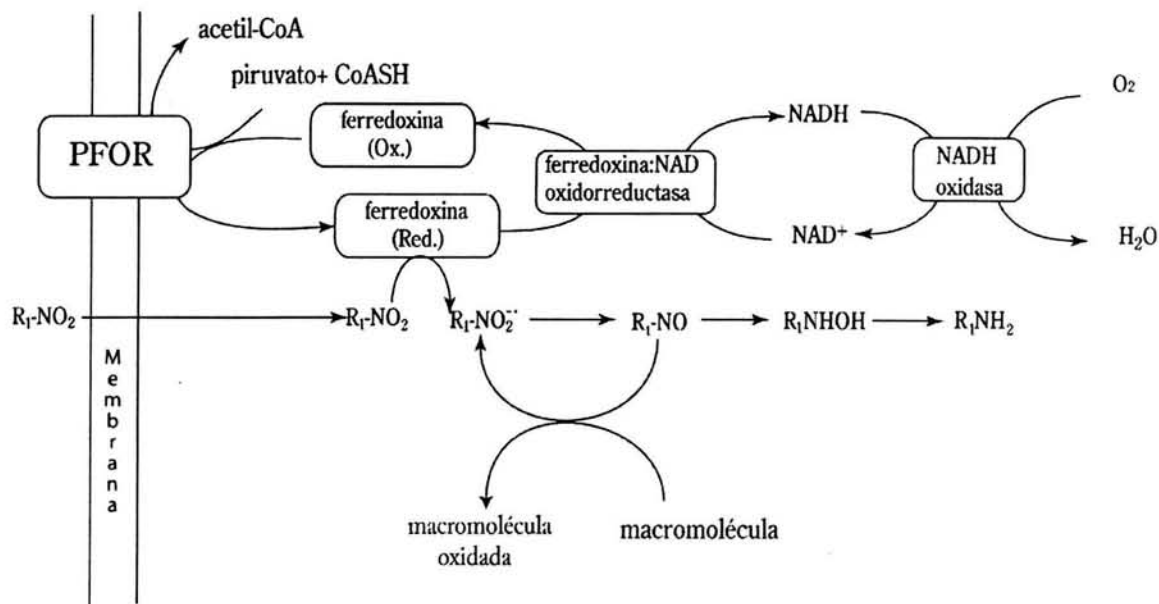


Figura 1.4. Mecanismo de reducción de los 5-nitroimidazoles y nitrofuranos. Los 5-nitroimidazoles son reducidos al nivel de la ferredoxina y los nitrofuranos en la NADH oxidasa. (Adaptado de Upcroft y cols., 2001)

La nitazoxanida ha sido tan activa como el metronidazol y recientemente ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la giardiasis en niños debido a que tiene una formulación líquida (Petri, 2003).

iv) *Interferencia con la polimerización de microtúbulos.* En este apartado se cuenta con los bencimidazoles los cuales se discutirán con detalle en la sección 1.3.

v) *Miscelánea.* Hay compuestos poco utilizados en la clínica con modos de acción poco conocido, por ejemplo el glicobiarsol que inhibe proteínas con grupos tiol. Algunos compuestos o extractos que se han utilizado con éxito son los fármacos antidepresivos tricíclicos, sulfato de berberina, fusidato de sodio, prospolina, propranolol y extractos de ajo (Jarroll E, 1994; Garner, 2001).

1.3. Los bencimidazoles como agentes antiparasitarios

El interés por el anillo bencimidazólico empezó cuando se descubrió que el 5,6-dimetilbencimidazol era parte de la estructura de la vitamina B_{12} , después se realizaron derivados de esta molécula como estimulantes del crecimiento. Posteriormente, el phenzidol (2-fenilbencimidazol) fue utilizado como

antihelmíntico en ovejas, lo que dio paso a la síntesis del tiabendazol (2-(4'-tiazolil)bencimidazol) el cual mostró ser un antihelmíntico de amplio espectro. Sin embargo, era rápidamente metabolizado a su derivado 5-hidroxitiabendazol que posee vida media extremadamente corta y pierde totalmente su actividad antihelmíntica (Figura 1.5) (Sharma, 1994).

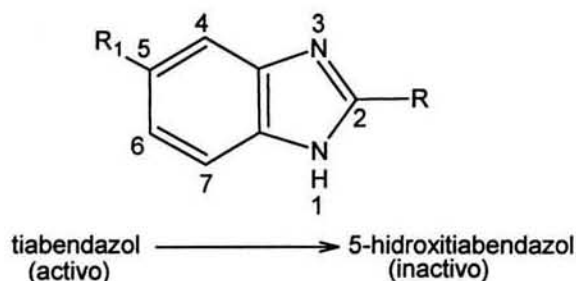


Figura 1.5. Estructura del anillo de bencimidazol. Arriba se muestra la estructura y numeración del anillo de bencimidazol, R y R₁ son los sitios del anillo donde se han hecho las principales modificaciones para mejorar la actividad antiparasitaria. Abajo se esquematiza la inactivación metabólica del tiabendazol.

Para evitar la inactivación metabólica se sintetizaron una serie de derivados 5-sustituídos. Posteriores modificaciones al esqueleto bencimidazólico fueron hechas en la posición 2. Los cambios realizados en estas dos posiciones, 2 y 5, han provisto una serie de fármacos y profármacos efectivos en el tratamiento contra las parasitosis, tanto de humanos como de animales (Figura 1.5) (Townsend y cols., 1990; Sharma, 1994). Se observó resistencia a los bencimidazoles dentro de los 3 años siguientes a su introducción y ahora es un problema en la medicina veterinaria pero no en medicina humana (Lacey, 1994).

De este grupo de compuestos los 2-metoxicarbonilaminobencimidazoles han sido utilizados con éxito en la clínica humana, de ellos el albendazol, mebendazol y flubendazol han mostrado ser muy efectivos contra las helmintiasis intraintraestinales (Horton, 1990).

Los bencimidazoles afectan el equilibrio dinámico de los microtúbulos y se ha encontrado que el tiabendazol es aneugénico en células CI-1 debido a la formación aberrante de asters mitóticos, como consecuencia de la interacción de esta molécula con la tubulina (Pisano y cols., 2000). La vinblastina se une al final

de los microtúbulos con gran afinidad reprimiendo la elongación del polímero, en contraste la colchicina se une a la tubulina libre y los complejos creados se unen al polímero a muy baja concentración, interfiriendo drásticamente con la polimerización de los microtúbulos (Toso y cols., 1993). Estudios de competencia han revelado que los bencimidazoles se unen al mismo dominio que la colchicina en la subunidad β de la tubulina (Lacey, 1990).

Los bencimidazoles muestran toxicidad selectiva por los helmintos. Al parecer esto no se debe a diferencias en afinidad por la tubulina del helminto o la del mamífero, aunque algunos fármacos como el tiabendazol y el oxfendazol previnieron más la polimerización de la tubulina de nematodo que la de mamífero; ni a la estabilidad del complejo formado entre la tubulina y el bencimidazol. Posiblemente la toxicidad selectiva de estas moléculas se deba a diferencias farmacocinéticas entre el hospedero y el parásito (Gull y cols., 1987; Lacey, 1990).

Como consecuencia de su acción sobre la tubulina los bencimidazoles causan la inhibición de la fumarato reductasa, inhibición de la malato deshidrogenasa, variaciones en la utilización de glucosa o su transporte y posiblemente actúan como desaclopadores de la fosforilación oxidativa (Lacey, 1990; Sharma, 1994).

El mebendazol fue el primer bencimidazol utilizado en pacientes infectados con *G. intestinalis* matando a solo el 37 % de los parásitos (De Souza y cols., 1973). Por otro lado, se encontró que *in vitro* los bencimidazoles son giardicidas, el mebendazol es citostático a una concentración de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (0.17 μM) y giardicida a concentraciones de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ (1.01 μM) (Jarroll, 1994). El primer reporte de éxito del albendazol contra *G. intestinalis* en pacientes fue en 1986, con un régimen de administración de varios días (Zhong, 1986). El albendazol inhibe a la NADH oxidasa de *G. intestinalis* a concentraciones considerablemente más altas que la necesaria para impedir la adhesión del parásito al intestino (Jarroll, 1994). La mayor parte del disco ventral de *G. intestinalis* está constituido por tubulina, por lo que esta estructura es un blanco importante de los bencimidazoles. Después de una exposición prolongada a albendazol, el disco ventral de *G. intestinalis* se observa fragmentado y con alteraciones en la estructura de los

microtúbulos. Se presentan también precipitados densos por SEM en otras estructuras que contienen tubulina, como los flagelos y el cuerpo medio. La alteración de estructuras que no contienen tubulina indica que el albendazol se une a otras proteínas (Chavez y cols., 1992).

En estudios *in vitro*, los bencimidazoles actúan a concentraciones mucho más bajas que el metronidazol, pero para que se produzca efecto giardicida se requieren por lo menos 12 horas de contacto con el parásito. El efecto producido persiste por 72 h después de remover el fármaco, indicando que es irreversible (Reynoldson y cols., 1991). El triclabendazol, un 2-metoxicarbonilaminobencimidazol, que no afecta a los microtúbulos no presentó actividad giardicida (Reynoldson y cols., 1991).

En estudios *in vivo* los bencimidazoles se administran durante varios días, por ejemplo, una dosis de albendazol de 200-800 mg/día durante uno a tres días tienen una eficacia del 24 al 81 %, mientras que 200-400 mg/día durante cinco o siete días tiene una eficacia del 94 al 100 % (Garner, 2001). La efectividad de este tipo de fármacos está subestimada *in vivo* debido a que el tránsito gastrointestinal es rápido y el contacto del fármaco con el parásito es corto (Reynoldson y cols., 1991).

La localización anatómica donde se lleva a cabo la infección de *G. intestinalis* lo pone en ventaja, ya que el tiempo máximo de residencia del contenido intestinal en duodeno y yeyuno no sobrepasa las tres horas en humanos (Tabla 1.1.).

Tabla 1.1. Propiedades físicas y biológicas del tracto gastrointestinal

Segmento Gastrointestinal	Área superficial	Longitud del segmento	Tiempo de residencia del contenido intestinal	pH del segmento
Cavidad oral	100 cm ²	-----	Segundos a minutos	6.5
Esófago	200 cm ²	23-25 cm	Segundos	-
Estómago	3.5 m ²	25 cm	1.5 h	1-2
Duodeno	1.9 m ²	35 cm	0.5-0.75 h	4.0-5.5
Yeyuno	184 m ²	280 cm	1.5-2.0 h	5.5-7.0
Ileon	276 m ²	420 cm	5-7 h	7.0-7.5
Colon y recto	1.3 m ²	150 cm	1-60 h (30 h)	7.0-7.5

Tomada de Balimane y cols., 2000.

1.3.1. Los 2-(trifluorometil)bencimidazoles.

Los 2-(trifluorometil)bencimidazoles se sintetizaron por primera vez en 1952, como derivados del 5(6)-fluorobencimidazol y del 4,7-dimetilbencimidazol; se obtuvieron a partir de la *o*-fenilendiamina correspondiente mediante condensación con ácido trifluoroacético en presencia de ácido clorhídrico (Smith, 1953). También se ha reportado la síntesis de estos compuestos a partir de la reducción del grupo nitro y condensación, en un solo paso, a partir de 2,2,2-trifluorometil-*N*-(2-nitrofenil)acetamida debidamente sustituida en el anillo aromático (Bishop, 1964a). Posteriormente se informó de la actividad antibacteriana de los mismos (Bishop 1964b)

Se ha informado sobre la potente actividad herbicida de otra serie de 2-(trifluorometil)bencimidazoles que al evaluarlos biológicamente mostraron actividad insecticida y primordialmente herbicida (Burton y cols., 1965). Estos 2-(trifluorometil)bencimidazoles actuaron como desacopladores de la fosforilación oxidativa y el hidrógeno en la posición uno era importante, ya que derivados *N*-etil-perdían la actividad (Jones, 1965).

La actividad herbicida del 5,6-dicloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol fue abolida al sintetizar el derivado *N*-fenoxicarbonil- el cual tenía actividad acaricida, poca toxicidad en mamíferos y también resultó ser poco tóxico en abejas (Saggers, 1967). Recientemente se publicó la actividad antibacteriana y antimicótica de una serie adicional de éste tipo de compuestos (Wolinowska y cols., 2002). Se ha publicado un estudio de relación estructura actividad (SAR) sobre la toxicidad aguda en rata de este tipo de compuestos donde se encontró que la toxicidad disminuye con la presencia de grupos alquilo, carbonil o sulfonil en posición 5 y que incrementa con la presencia de halógenos (Adamson, 1984).

Por otro lado se informó la actividad antiparasitaria de una serie de 2-(trifluorometil)bencimidazoles (compuestos I-VII Tabla 1.2) los cuales poseían actividad contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. spiralis* (Navarrete-Vázquez y cols., 2001). Todos los compuestos reportados en este estudio fueron más activos contra *G. intestinalis* que el metronidazol, y el compuesto V (Tabla 1.2) fue tan

activo como el albendazol. Los compuestos 1-metilados (**IV-VII**, Tabla 1.2) fueron activos contra el protozooario, lo cual es diferente a lo encontrado en un estudio SAR donde sugiere que el hidrógeno en la posición 1 es determinante para que los bencimidazoles ejerzan su acción antihelmíntica (Sharma, 1994), indicando otro tipo de requerimientos estructurales para los protozoarios. Aunado a que los 2-trifluorometilbencimidazoles no inhibieron la polimerización de la tubulina de cerebro de rata (Navarrete-Vázquez y cols., 2001). Los resultados de este estudio indican que el mecanismo de acción de los 2-(trifluorometil)bencimidazoles es diferente al de los 2-metoxicarbonilaminobencimidazoles. Aspecto importante, cuando se toma en cuenta que la resistencia a los bencimidazoles usados en la clínica, se atribuye a este sustituyente en posición 2.

Por otro lado, el compuesto **BRR-A** (Tabla 1.2) es activo contra *G. intestinalis* con una CI_{50} de 3.01 μM (Soriano-Agaton F. N., 2002). Al realizar el éster metílico de **BRR-A** la CI_{50} disminuyó a 1.19 μM y el éster de 2-dietilamino-2-oxoetilo posee una CI_{50} de 3.12 μM (Piña-Gallardo B. E., 2003) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Estructura de 2-(trifluorometil)bencimidazoles con actividad giardicida

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ (μM)
I ^a	H	H	H	0.107
II ^a	Cl	H	H	1.282
III ^a	Cl	Cl	H	0.078
IV ^a	H	H	CH ₃	0.064
V ^a	Cl	H	CH ₃	0.042
VI ^a	H	Cl	CH ₃	0.127
VII ^a	Cl	Cl	CH ₃	0.260
VIII ^b	Br	Br	H	0.040
IX ^b	NO ₂	NO ₂	H	0.059
BRR-A^c	COOH	H	H	3.010
X ^d	COOCH ₃	H	H	1.190
XI ^d	COOCH ₂ CON(CH ₃ CH ₂) ₂	H	H	3.120

a, tomado de Navarrete-Vázquez y cols. (2001); b, tomado de Andrzejewska y cols. (2002); c, tomado de Soriano-Agaton (2002); d, tomado de Piña-Gallardo (2003).

Otro reporte de la actividad de algunos 2-trifluorometil y 2-pentafluoroetilbencimidazoles halogenados y nitrados ha sido publicado (compuestos VIII y IX, tabla 1.2), estos compuestos fueron activos contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Además tuvieron actividad citotóxica en varias líneas celulares tumorales, siendo los compuestos 2-pentafluoroetilados los más activos (Andrzejewska y cols., 2002).

1.4. Permeabilidad

Actualmente el 90 por ciento de los compuestos en fases clínicas no consiguen ser comercializados principalmente por problemas de baja biodisponibilidad (Thompson, 2001).

La biodisponibilidad de un compuesto depende de su absorción, solubilidad y estabilidad metabólica. La absorción a través de la mucosa intestinal (permeabilidad) está influenciada por factores fisicoquímicos y fisiológicos. La solubilidad de un compuesto puede estar limitada por el volumen, contenido y pH intestinal, por otra parte el tiempo de tránsito intestinal es importante si la dosis administrada se tienen que disolver y absorber en el intestino delgado (Tabla 1.1) (Löbenberg y cols., 2000). Cuando se absorbe el fármaco hay factores biológicos que afectan el contacto de un fármaco con su sitio de acción (Tabla 1.3).

El epitelio intestinal consiste de una capa de células altamente diferenciadas y polarizadas llamadas enterocitos, los cuales están unidos entre sí por medio de estructuras llamadas *zonula occludens* o uniones estrechas (*tight junctions*). El epitelio se encuentra distribuido en dos regiones diferentes, protuberancias conocidas como vellosidades y depresiones llamadas criptas. En las criptas las células se encuentran en mitosis constante y las células son indiferenciadas, aquí se encuentra la mayoría de las células caliciformes, que se encargan de la producción de moco (Madera y col., 1987).

Tabla 1.3. Factores que afectan el arribo de un fármaco con su sitio de acción (blanco molecular)

Estómago pH = 1-2	Estabilidad en medio ácido. <i>-estabilidad en amortiguador.</i>
Intestino pH = 3-8	Estabilidad en medio ácido y estabilidad enzimática. <i>-Estabilidad en amortiguador.</i> Solubilidad. <i>-Solubilidad, pKa, punto de fusión.</i> Metabolismo: CYP3A4 y otros. <i>-Estabilidad metabólica.</i> Permeabilidad: Pasiva, transportadores, Pgp. <i>-LogP(D), PAMPA, Caco-2, IAM ensayos con transportadores.</i>
Hígado	Metabolismo: Fase I y II <i>-Estabilidad metabólica, identificación de metabolitos</i> Excreción biliar <i>-Peso molecular, logP</i>
Sangre	Unión a proteínas <i>-Unión a proteínas plasmáticas, logP</i> Estabilidad enzimática <i>-Estabilidad en plasma</i>
Riñones	Extracción renal <i>-LogP</i> Permeabilidad (órgano específica)
Tejidos	Distribución <i>-logP</i> Permeabilidad: Pasiva, transportadores, Pgp <i>-Estudio de permeabilidad en barrera hematoencefálica</i>
Células	Permeabilidad: Pasiva, transportadores, Pgp <i>-Exposición celular, concentración intracelular.</i> Metabolismo

Para que un fármaco alcance su blanco molecular debe de pasar por una serie de barreras biológicas, las frases en cursiva son algunos ensayos que proporcionan información sobre la posibilidad del fármaco de atravesar exitosamente cada obstáculo.

Por otra parte las células de las vellosidades han perdido la capacidad de dividirse, debido a su alta especialización. Los enterocitos se originan en las criptas y migran al epitelio de las vellosidades, durante esta migración la célula se diferencia. Al llegar a la parte más alta de las vellosidades, llamada zona de exclusión, las células son liberadas al lumen intestinal (Madera y col, 1987). El

recambio completo del epitelio desde el estómago hasta el recto se realiza cada 2-4 días (Madera y col, 1987). Las células del epitelio intestinal poseen microvellosidades (o membranas en borde de cepillo) que incrementa el área de absorción 14-40 veces. La composición de las proteínas de membrana del enterocito es muy heterogénea y el recambio de las proteínas celulares de las microvellosidades ocurre cada 4-6 horas (Madera y col, 1987).

El paso de compuestos a través del epitelio intestinal no se puede explicar solamente por los valores de pKa del compuesto y el pH del contenido intestinal. Al parecer el moco producido por las células caliciformes no sólo tiene propiedades lubricantes, sino que además funciona como regulador del pH cerca de la superficie del epitelio, debido a su naturaleza anfotérica, creando de esta manera un microambiente ácido el cual puede modificar la absorción de moléculas con características ácido-base (Shiau, 1985).

Las propiedades fisicoquímicas que influyen en la permeabilidad de una molécula por transporte pasivo son la lipofilia, hidrofilia, potencial de aceptar o donar puentes de hidrógeno, tamaño, carga, conformación, área de superficie polar y número de enlaces con libre giro. Una molécula puede atravesar el epitelio intestinal de diferentes maneras; cuando la molécula pasa a través de las células se llama transporte transcelular, cuando lo hace por medio de las uniones estrechas que existen entre las células se llama transporte paracelular, esta última ruta de absorción se presenta en moléculas pequeñas y polares. En el transporte transcelular se presentan varias variantes, la más común es aquella donde la molécula atraviesa las células por medio de difusión pasiva, pero también puede estar mediado por acarreadores, por endocitosis y por difusión e incorporación en partículas lipídicas.

El transporte transcelular puede ser modificado por el metabolismo, en este caso la absorción será apreciable sólo cuando los sistemas metabólicos se saturan. Por otro lado, se hallan los sistemas de reflujo donde el fármaco es transportado del interior de la célula al exterior (Figura 1.6) (Löbenberg y cols., 2000; Bohets y cols., 2001; Hidalgo, 2001).

Tabla 1.4. Características estructurales que tienen influencia en la permeabilidad de un fármaco a través de la mucosa intestinal

Vía	Características estructurales importantes	Contribución en la absorción de fármacos
Difusión pasiva transcelular.	Lipofilia (hidrofobicidad), carga, tamaño, conformación.	+++++
Difusión mediada por acarreadores	Afinidad por transportadores polarizados apicales.	++
Difusión pasiva paracelular	Hidrofilia, tamaño, carga, conformación.	+
Difusión transcelular por endocitosis	Afinidad por transportadores apicales, tamaño, carga.	Insignificante
Difusión transcelular por incorporación en partículas de lípidos.	Lipofilia, afinidad por enzimas comprometidas en el metabolismo de lípidos.	+
Difusión transcelular pasiva modificada por sistemas de reflujo apicales	Afinidad por sistemas de reflujo apicales.	++
Transporte pasivo transcelular modificado por metabolismo	Afinidad por enzimas del metabolismo.	++

La fracción final absorbida es una suma de todos los procesos, transcelular y paracelular, y la contribución de cada uno es muy difícil de ponderar (van de Waterbeemd, 2000) (Tabla 1.4, Figura 1.5).

La permeabilidad se ve alterada en estados de enfermedad como en intolerancia y alergia a comidas. En enfermedades infecciosas, se ha observado que personas que padecen giardiasis poseen, permeabilidad intestinal elevada comparada a la de individuos sin enfermedad intestinal (Dagci y cols., 2002).

1.4.1. Métodos para predecir la permeabilidad

La capacidad para predecir la permeabilidad de un compuesto por medio de su estructura y de sus propiedades fisicoquímicas usando métodos computacionales o experimentales ha ganado popularidad recientemente. Los métodos computacionales pueden predecir la solubilidad de un compuesto, el pKa, la toxicidad, permeabilidad intestinal y el paso a través de la barrera

hematoencefálica entre otras propiedades. El avance en la tecnología *in silico* (computacional) e *in vitro* ha sido tan grande que se cree que algún día reemplazarán completamente a las técnicas *in vivo*.

El empleo de animales de laboratorio es extremadamente laborioso. Sin embargo, es un método comúnmente utilizado para predecir la absorción en humanos. Los métodos *in vitro* incluyen a aquellos realizados con tejido intestinal y con monocapas celulares.

De los ensayos para medir permeabilidad que existen hasta la fecha aquellos realizados con líneas celulares han recibido especial atención por permitir la elaboración de estudios para tamizado a baja y mediana escala. Las líneas celulares más utilizadas y estudiadas son la línea celular de cáncer de colón Caco-2 y la línea celular Madin Darby de riñón de perro, MDCK. Algunos métodos para estimar la permeabilidad se presentan en la tabla 1.5.

Tabla 1.5. Métodos para estimar la permeabilidad

Enfoque empírico o computacional	<p>-Regla de cinco^a -Reglas de Veber^b -Software para predecir propiedades ADME y ADMET^{c,d}</p>
Enfoque experimental	<p>-Métodos cromatográficos membranas artificiales inmovilizadas (IAM)^{c, e, f, g} cromatografía miscelar líquida (MLC)^{c, e, f, g} -Métodos fisicoquímicos^{c, e, f, g} Coeficientes de partición: octanol-agua y octanol-amortiguador Ensayo de permeabilidad de membranas artificiales paralelas (PAMPA) Ensayo de permeabilidad de membranas inmovilizadas (IAM) -Métodos <i>in situ</i> Perfusión de segmentos intestinales^{c, e, g} -Métodos <i>in vivo</i> Un solo compuesto o casete (<i>n in one</i>)^h -Métodos <i>in vitro</i>^{c, e, g, i} Vesículas de membrana en borde de cepillo Anillos intestinales invertidos Saco intestinal invertido Cámaras de difusión (Ej. Cámara Ussing) Ensayos con líneas celulares (p. ej. Caco-2, MDCK, IEC)</p>

a) Lipinski y cols., 1997; b) Veber y cols., 2002; c) Bohets y cols., 2001; d) Bolger y cols., 2002; e) Balimane y cols., 2000; f) van de Waterbeemd, 2000; g) Hidalgo, 2001; h) Berman y cols. 1997; i) Tukker, 2000. ADME, absorción, distribución, metabolismo y excreción; ADMET, ADME y toxicidad.

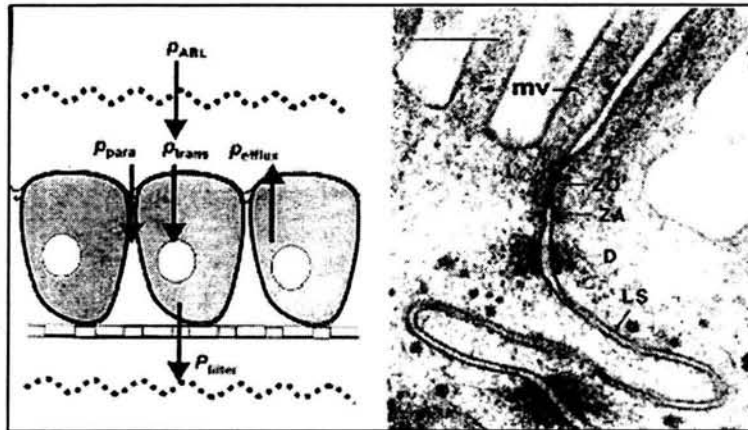


Figura 1.6. Mecanismos de absorción a través de una monocapa celular. A la izquierda se muestra la disposición de las células Caco-2 sobre el soporte poroso donde se cultivan para ensayos de permeabilidad. En el transporte transcelular (P_{trans}) los compuestos pasan a través de la célula, por difusión pasiva u otros mecanismos. En el transporte paracelular (P_{para}) los compuestos atraviesan la monocapa entre las células; adicionalmente hay mecanismos de reflujo (P_{efflux}) que expulsan los compuestos de dentro de la célula al exterior en la parte apical. Por otro lado, la permeabilidad del compuesto tiene contribución de la capa acuosa de flujo no turbulento (P_{ABL}) y del soporte utilizado (P_{filter}). A la derecha se observa la unión intercelular entre dos células Caco-2, por donde ocurre el transporte paracelular. D, desmosoma; LS, espacio lateral; mv, microvello; ZA, zonula adherens; ZO, zonula occludens o unión estrecha. La barra en la parte superior derecha de la fotografía equivale a 200 nm (Fotografía tomada de Adson y cols., 1994).

1.4.1.1. Uso de la línea celular Caco-2 para estimar la permeabilidad

La línea celular Caco-2, derivada de un carcinoma colorrectal humano, ha sido establecida como un modelo *in vitro* para predecir la absorción de fármacos a través de la pared intestinal. Cuando la línea celular Caco-2 es cultivada se diferencia a una barrera epitelial altamente funcionalizada similar, morfológica y bioquímicamente, al epitelio del intestino delgado (Figura 1.6). Las células Caco-2 son inoculadas en soportes porosos y los eventos que se llevan a cabo a partir de la inoculación son proliferación, confluencia y diferenciación. La proliferación empieza 48 horas después del inicio del experimento y la confluencia se alcanza a partir del quinto día (Withington, 2002), después de 21 días de cultivo las células Caco-2 son similares a una célula de intestino delgado y expresan niveles altos de glicoproteína-P (P-gp) (Hosoya y cols., 1996; Anderle y cols., 1998), pero la expresión no es homogénea (Braun y cols., 2000).

El uso de la línea celular Caco-2 y su utilidad en la predicción de la permeabilidad *in vivo* han sido muy estudiados y se han encontrado buenas correlaciones entre la cantidad de compuesto que se absorbe *in vivo* y los valores de permeabilidad aparente obtenidas en este modelo, después de 10 días en cultivo alcanza su máximo valor de resistencia eléctrica transepitelial (TEER), indicando la formación de uniones estrechas, y a partir de este mismo día la monocapa es impermeable a un marcador macromolecular. De esta manera la monocapa de células Caco-2 se puede usar del día 10 al 30 para realizar estudios de permeabilidad pasiva (Artursson, 1990).

Las células Caco-2 permiten discernir entre el transporte transcelular y el transporte paracelular. La exposición de la monocapa celular de células Caco-2 a un agente quelante de calcio (EGTA) por 45 min antes de realizar el ensayo de permeabilidad disminuye el valor de la TEER, y el valor de permeabilidad aparente del atenolol, un fármaco que se absorbe por la vía paracelular, se ve aumentado seis veces, mientras que el propranolol, que se absorbe por vía transcelular, no se observa cambio en el valor de permeabilidad aparente (Artursson y cols., 1990). Otros compuestos que aumentan el diámetro de las uniones estrechas son las citocalasinas B y D. El agregar citocalasina D al medio de transporte causa un incremento de 13 veces en la permeabilidad del manitol, el incremento causado por este compuesto en el radio de las uniones estrechas es el doble del control (Adson y cols., 1994).

Los valores de TEER presentados en esta línea celular son muy altos asemejando mejor al colon que al intestino delgado (Artursson, 1990), la fluctuación en valores de TEER reportados para la línea Caco-2 se encuentran en el rango de 150 a 450 $\Omega \text{ cm}^2$ los cuales sobrepasan a los del intestino delgado que se reportan en el rango de 25-40 $\Omega \text{ cm}^2$ (Tukker, 2000). Esto causa que los valores de permeabilidad de compuestos hidrofílicos sea subestimada (Artursson y cols., 1990; Tukker, 2000).

Además, se presentan contribuciones en la permeabilidad debidas al soporte donde se siembran las células y a las capas de flujo no turbulento que se presentan sobre las células y debajo del filtro. Esta capa de flujo no turbulento ha

mostrado importancia para compuestos lipofílicos, una manera de abolir este parámetro es el uso de agitación orbital. Se ha establecido la dependencia de la permeabilidad aparente de la testosterona con la agitación de las placas de cultivo, entre mayor fue la agitación mayor fue la permeabilidad (Adson y cols., 1995).

Se han observado diferencias sustanciales entre los valores reportados del manitol (2.2 ± 221 nmol/s) dependiendo de la fuente de la línea celular Caco-2 (Walter y cols. 1995). La variabilidad es atribuida a diferencias en las condiciones de cultivo y a la composición de la subpoblación celular (Walter y cols. 1995). Aunque los ensayos realizados con esta metodología no están totalmente estandarizados, varían de laboratorio a laboratorio, generalmente dan correlaciones importantes con la absorción *in vivo*, pero solo cualitativas donde sólo se puede relacionar con pobre, moderada o alta absorción (Braun y cols., 2000; Yamashita y cols., 2000).

Los solventes orgánicos utilizados como cosolventes han mostrado tener repercusiones en los valores permeabilidad aparente de marcadores de integridad en la monocapa aún a concentraciones del 2%, siendo el etanol un disolvente que no alteró la integridad de la monocapa (Yamashita y cols., 2000). Se ha tratado de adecuar las condiciones del ensayo de transporte a aquellas que representan mejor a los sistemas *in vivo*, pero la complicación en el método de análisis y el tiempo para llevarlo a cabo puede ser una limitante (Yamashita y cols., 2000).

Los intentos por aumentar la velocidad del ensayo de permeabilidad con células Caco-2 han sido crecientes en los últimos años. La permeabilidad aparente de ocho fármacos se evaluó en un solo pozo y los valores obtenidos se compararon con la permeabilidad aparente de los fármacos por separado, obteniéndose una correlación buena. Sin embargo siempre hay que tener en mente la posibilidad de interacciones fármaco-fármaco (Markowska y cols., 2001).

Otro modelo es el ensayo de tres días. Las células Caco-2 son inoculadas en insertos recubiertos con una matriz fibrilar de colágena especial, la cantidad de células inoculadas es mayor (~10 veces) a la utilizada en el ensayo de 21 días. Las células son mantenidas con un medio definido, el medio especial y el alto

número de células aseguran tener confluencia en un día. La diferenciación se induce al segundo día por la adición de medio libre de suero complementado con ácido butírico y al tercer día se realiza el ensayo. Las características bioquímicas y morfológicas de las células obtenidas con este protocolo son similares a las del ensayo clásico de 21 días así como los resultados que se obtienen. El escalamiento de esta metodología se ha llevado hasta la utilización de placas de 96 pozos aumentando considerablemente la capacidad de análisis (Withington, 2002).

1.5. Glicoproteína P (P-gp)

La P-gp es una proteína transmembranal de 170 kD que pertenece a la familia de los transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*), la P-gp consiste de dos dominios, cada uno con seis dominios transmembranales y el sitio de unión del sustrato, unidos por una región conectora. Contiene adicionalmente dos dominios de unión a nucleótidos del lado citoplasmático que acoplan la hidrólisis de ATP con la translocación del sustrato, donde la hidrólisis de ATP en ambos dominios es sincronizada. La forma en que este tipo de proteínas acarrear el sustrato a través de la doble capa lipídica es desconocido, se ha propuesto que la proteína atrapa al compuesto mientras pasa por la parte interna de la bicapa lipídica y lo regresa al medio extracelular (Higgins y cols., 2001). La P-gp se encuentra localizada en diferentes regiones del cuerpo, por ejemplo, en la superficie canalicular de los hepatocitos, apicalmente en el intestino y riñón, en el endotelio capilar de la barrera hematoencefálica y en la corteza adrenal.

Antes del descubrimiento de esta proteína se pensaba que los transportadores solo introducían sustancias dentro de la célula y que lo hacían del mismo modo que una enzima reconoce su sustrato. Sin embargo, la P-gp es inusual en que reconoce a una gran variedad de compuestos tanto lipofílicos como hidrofílicos y adicionalmente mueve sus sustratos del interior de la célula hacia fuera. Su función fisiológica es poco conocida, se ha sugerido que su principal función es la eliminación de compuestos a través de riñón e intestino y prevenir el paso de sustancias citotóxicas a través de la barrera hematoencefálica (Deeley y

cols., 1997). Se ha establecido que puede intervenir en otros procesos celulares como son la regulación de canales de cloruro reguladores de volumen, translocación de lípidos, translocación y esterificación de colesterol y regulación en la diferenciación y muerte celular por apoptosis (Johnstone y cols., 2000).

Los requerimientos estructurales por los cuales la glicoproteína reconoce a sus sustratos han sido objeto de ardua investigación. Utilizando análogos de yohimbina y reserpina se ha propuesto que es necesario para el reconocimiento por parte de la P-gp la presencia de dos anillos aromáticos y un nitrógeno básico, donde el volumen molecular y la conformación son importantes para que haya reconocimiento entre el receptor y el ligando (Pearce y cols., 1989). Al realizar un estudio SAR de 25 fármacos se encontró que la solubilidad en lípidos a pH fisiológico y la refractividad molar son importantes, así como la presencia de dos anillos aromáticos y un átomo de nitrógeno básico (Zamora y cols., 1988). Adicionalmente se ha encontrado buena correlación entre la liposolubilidad y la estructura química policíclica en una serie de 23 fármacos lipofílicos (Inaba y cols., 1988). Por otro lado, la interacción con la glicoproteína no sólo involucra un dominio en la proteína y la interacción con diferentes tipos de compuestos puede ser desigual (Scala y cols., 1997).

Se encontró que el factor más importante para que haya interacción entre la P-gp y sus sustratos es la capacidad de éstos para formar puentes de hidrógeno con la proteína (Seelig, 1998). Los átomos donadores de electrones deben poseer un arreglo especial, con distancias entre los átomos definidas. En este reporte reconocen dos tipos de patrones (Figura 1.7), en el patrón tipo I los átomos aceptores de puentes de hidrógeno deben estar separados por 2.5 ± 0.3 Å y en el patrón tipo II la distancia debe ser de 4.6 ± 0.6 Å, en este último tipo también pueden existir tres átomos aceptores de puente de hidrógeno separados por 2.5 ± 0.3 Å siempre y cuando la distancia entre el primer átomo y el último sea de 4.6 ± 0.6 Å.

La generación de un modelo computacional basado en el trabajo anterior predijo en un 50-60 % a los sustratos de P-gp y en un 80 % a los compuestos que no son sustratos (Penzotti y cols., 2002).

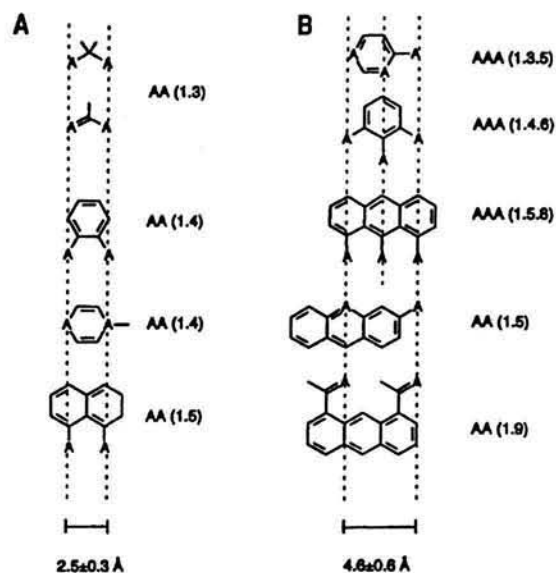


Figura 1.7. Patrón de reconocimiento estructural de la glicoproteína P. El patrón tipo 1 tiene una separación entre dos átomos aceptores de puentes de hidrógeno de 2.4 ± 0.3 Å (A) y el patrón tipo 2 tiene una separación de 4.6 ± 0.6 Å entre los dos átomos (B) (Tomado de Seelig, 1998).

En una serie de propafenonas se encontró que la capacidad de formar puentes de hidrógeno correlaciona mejor que el logP para que un compuesto sea sustrato de P-gp y se encontró conjuntamente que la presencia de un átomo de nitrógeno no es esencial (Ecker y cols., 1999).

Esta proteína se ha asociado principalmente con multirresistencia en tumores y últimamente se ha visto que también disminuye la absorción de algunos fármacos a través de la mucosa intestinal. Algunas veces se ha reconocido que la absorción deficiente de un fármaco se debe a que es sustrato de la P-gp, por ejemplo, se ha observado que el celiprolol *in vivo* presenta una absorción dosis dependiente y su cinética en humanos es no-lineal, presentando picos dobles de C_{max} y se demostró en perros que su absorción puede estar influenciada por mecanismos de reflujo (Lipka y cols., 1998). Utilizando células Caco-2 se encontró que el transporte del celiprolol está influenciado por la P-gp y otros transportadores (Karlsson y cols., 1993).

1.5.1. P-gp y bencimidazoles

El 5-(3-aminofenoxi)-1H-2-bencimidazolcarbamato de metilo (Figura 1.8) y un derivado fotoactivo fueron sustratos de la P-gp en las líneas celulares de linfoma humano CEM/VLB^{0.1} y CEM/VLB^{1.0}. El bencimidazol y el derivado fotoactivo se unieron a la P-gp directamente y al parecer al mismo dominio al que lo hacen otros sustratos de esta proteína. El uso de verapamil, un sustrato de la P-gp, incrementa la concentración intracelular de los bencimidazoles comparando con el control (Nare y cols., 1994).

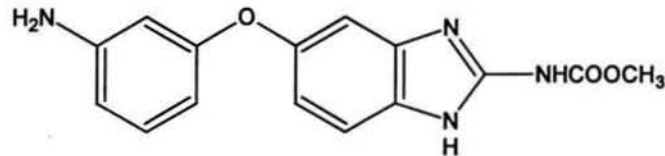


Figura 1.8. Estructura del 5-(3-aminofenoxi)-1H-2-bencimidazolcarbamato de metilo

El tratamiento con albendazol de los parásitos intracelulares *Encephalitozoon hellem*, *E. intestinalis* y *E. cuniculi*, en células de riñón de mono, verde fue ineficaz, pero cuando se trataron las células con albendazol y verapamil o albendazol y ciclosporina A se observó una reducción significativa en la infección, mientras que el verapamil y la ciclosporina A fueron ineficaces por ellos mismos. Además el verapamil, la ciclosporina A y probenecid aumentaron la captura de calceína, un sustrato bien establecido de P-gp. Los hechos anteriores sugieren que la P-gp está involucrada en la quimiorresistencia y que el albendazol está involucrado en un proceso de exclusión (Leitch y cols., 2001).

Lo anterior se contrapone con otro estudio donde midieron el transporte transepitelial del albendazol en células Caco-2, L-MDR1 y LLC-PK1. El transporte apical-basolateral y basolateral-apical fueron casi idénticos y no fueron modificados por digoxina, así como el albendazol tampoco modificó el transporte de la digoxina; por lo cual los autores concluyeron que el albendazol no interacciona con la P-gp, lo cual fue comprobado utilizando ratones *knock-out*

mdr1a/1b (-/-), que no poseen el gen de la P-gp, donde la distribución tisular del albendazol fue idéntica a la presentada en ratones con genotipo silvestre (Merino y cols., 2002).

Por otro lado, realizando estudios *in situ* en ratas, se ha mostrado que los enterocitos de rata metabolizan al albendazol a sulfóxido de albendazol, y que este último está implicado en un proceso de secreción hacia el lumen intestinal mediado posiblemente por un proceso activo (Redondo y cols., 1999).

1.5.2. Cooperación entre la P-gp y el citocromo P-450 3A4 (CYP3A4)

El CYP3A4 es el citocromo con la más amplia selectividad catalítica y muchos de sus sustratos lo son también de la P-gp (Guengerich, 1999; Benet y col, 2001). Esta cooperación genera problemas de biodisponibilidad mayores a los que se presentarían si cada proteína tuviera sustratos diferentes, al parecer la P-gp tiene patrones de reconocimiento estructurales similares a los del CYP3A4 y al interaccionar de forma conjunta son los responsables del metabolismo intestinal de una gran cantidad de fármacos (Benet y cols., 1996; Guengerich, 1999).

El ejemplo clásico de la intervención de la P-gp y su participación con el CYP3A4 en la biodisponibilidad de un compuesto es la ciclosporina A. La mayor parte de la dosis es metabolizada en el epitelio intestinal, y la alta tasa de metabolismo se debe a que la P-gp mantiene bajas concentraciones intracelulares de ciclosporina A, de tal manera que el CYP3A4 no se sature (Benet y col, 1996; Benet y col, 2001; Wachter y col, 2001).

Sin embargo no todos los sustratos de la P-gp son sustratos del CYP3A4 y viceversa (Wang y cols., 2001), un ejemplo claro lo constituye el albendazol el cual es sustrato de CYP3A4 pero no de la P-gp (Redondo y cols., 1999; Merino y cols., 2002). Por otro lado se ha demostrado que algunos metabolitos generados por el CYP3A4 inhiben la función de la P-gp lo cual complica aún más las interacciones fármaco-fármaco (Kato y cols., 2001).

Cuando una molécula que no es sustrato de la P-gp atraviesa las células del epitelio intestinal son absorbidas y este proceso sólo ocurre una vez. Sin

embargo cuando la molécula es sustrato de la P-gp la molécula entra al enterocito y es excluida hacia el lumen intestinal, este proceso se puede repetir varias veces de tal manera que se mantiene recirculando el fármaco entre el interior del enterocito y la luz intestinal. Asimismo el CYP3A4 incrementa su efectividad (Benet y cols., 2001) (Figura 1.9).

Como se ha indicado el tratamiento contra *G. Intestinalis* requiere de múltiples dosis debido a que *in vivo* el tránsito intestinal remueve rápidamente el fármaco de duodeno y yeyuno, exponiendo al parásito a concentraciones inefectivas del fármaco. Esta problemática que se presenta *in vivo* también es la responsable de que compuestos con actividad elevada *in vitro* sean inefectivos contra *G. Intestinalis* al probarse en animales de laboratorio.

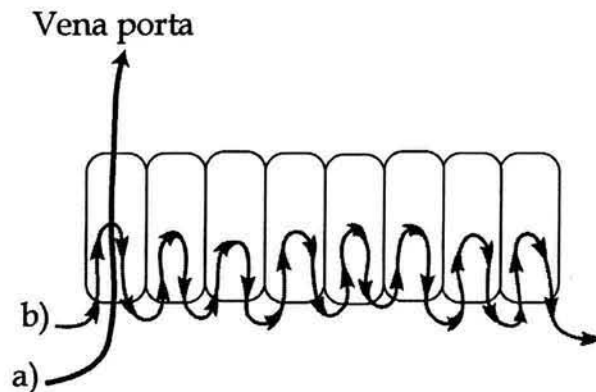


Figura 1.9. Efecto de la cooperación entre P-gp y CYP3A4. Cuando un fármaco no es sustrato de la P-gp pasa por el enterocito solo una vez (a), mientras que cuando es sustrato de esta proteína se mantiene en recirculación dentro del lumen intestinal (b).

2. Planteamiento del problema

La giardiasis es una enfermedad que presenta una morbilidad elevada y la quimioterapia de esta enfermedad involucra una serie de compuestos con toxicidad moderada a severa.

La infección del intestino por parte de *Giardia intestinalis* involucra sólo al duodeno y al yeyuno. Algunos bencimidazoles como el albendazol y mebendazol son activos *in vivo* contra el protozooario. Para que los bencimidazoles ejerzan su efecto giardicida es necesario que estén en contacto con el parásito por lo menos 12 horas. Sin embargo, la actividad *in vivo* de estos compuestos no es óptima debido al tránsito del contenido intestinal. El tiempo de residencia del contenido intestinal es de aproximadamente 3 horas para duodeno y yeyuno.

Dado que *Giardia intestinalis* sólo infecta una parte del intestino delgado superior y a que el tiempo de residencia del contenido intestinal es corto ¿qué propiedades adicionales a la actividad giardicida debe presentar un compuesto para que tenga mayor eficiencia antiparasitaria contra *G. intestinalis*?

3. Objetivo e hipótesis

3.1 Hipótesis

Los compuestos con buena eficiencia giardicida deben presentar adicionalmente a su acción antiprotozoaria, características adecuadas de transporte celular y afinidad por la glicoproteína P de células intestinales.

3.2 Objetivo

Sintetizar una serie de derivados bencimidazólicos y benzoxazólicos del ácido 2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxílico para determinar su actividad giardicida y su comportamiento de transporte en la línea celular Caco-2

3.2.1 Objetivos particulares

1. Sintetizar, purificar y caracterizar por sus características físicas, espectroscópicas y espectrométricas los compuestos que se muestran en la Figura 3.1.
2. Determinar la susceptibilidad *in vitro* de *Giardia intestinalis* contra los compuestos sintetizados.
3. Determinar la permeabilidad aparente de las células Caco-2 a cuatro de los compuestos sintetizados.
4. Determinar si los compuestos son sustrato de la glicoproteína P

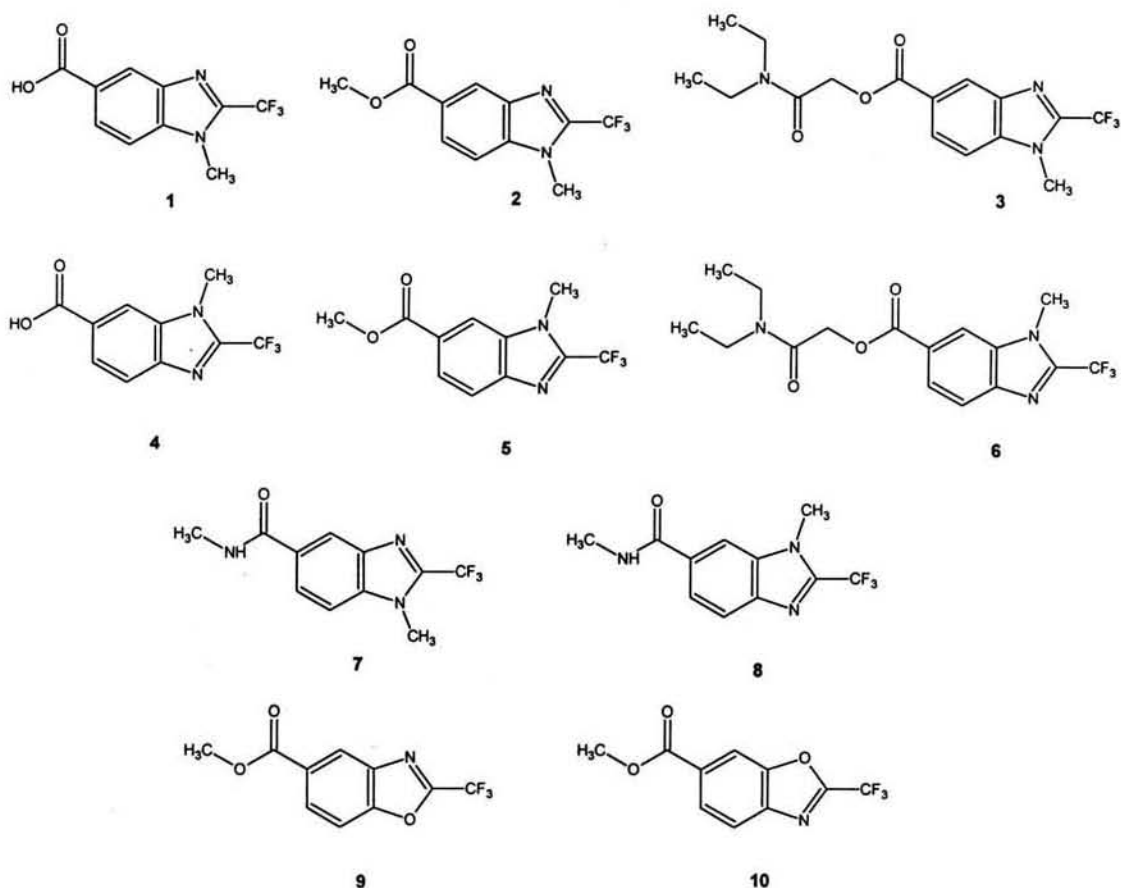


Figura 3.1. Estructura de los compuestos sintetizados. 1, ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxílico; 2, 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de metilo; 3, 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo; 4, ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxílico; 5, 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de metilo; 6, 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo; 7, *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxamida; 8, *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxamida; 9, 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo; 10, 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo.

4. Parte experimental.

4.1. Parte Química

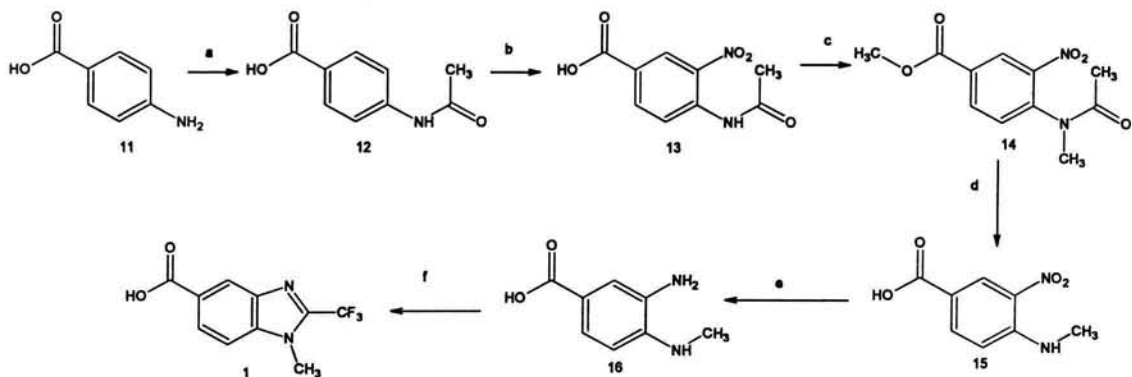
Los compuestos sintetizados se muestran en la Figura 3.1.

Para obtener el compuesto **1** se realizó la ruta sintética que se muestra en el Esquema 4.1. Se partió de ácido *p*-aminobenzoico (**11**), el cual se acetiló con anhídrido acético para posteriormente realizar la nitración con mezcla sulfonítrica en el sitio adyacente al grupo acetamida, obteniéndose el ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (**13**) que posteriormente se esterificó y *N*-metiló en un solo paso utilizando sulfato de dimetilo e hidróxido de sodio para obtener el 4-[acetil(metil)amino]-3-nitrobenzoato de metilo (**14**). La hidrólisis total en medio básico y reducción del grupo nitro, utilizando formiato de amonio y paladio sobre carbono, dio por resultado la *o*-fenilendiamina **15**, la cual se condensó con ácido trifluoroacético en presencia de HCl, obteniéndose el ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxílico (**1**).

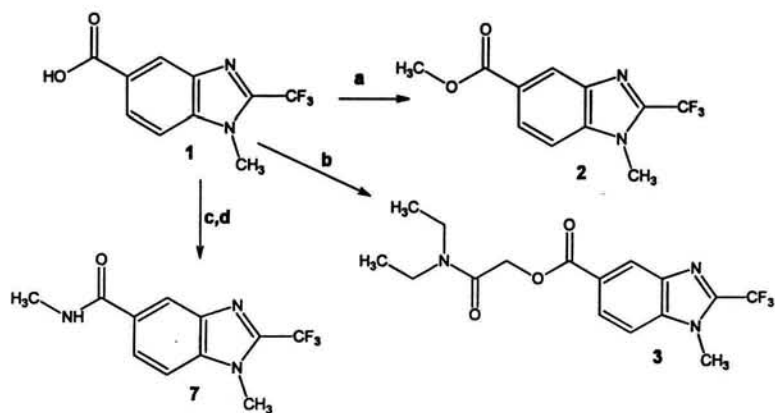
El tratamiento del compuesto **1** con sulfato de dimetilo y carbonato de sodio en dimetilformamida produjo el 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de metilo (**2**) (Esquema 4.2). Por otro lado, la obtención de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (**3**) se llevó a cabo utilizando al compuesto **1** como materia prima, el cual reaccionó con 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida en presencia de trietilamina y KI como catalizador (Esquema 4.2).

Para obtener el compuesto **7** se procedió de la siguiente manera: Se sintetizó el cloruro de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxilo utilizando el compuesto **1** y cloruro de tionilo como reactivo y disolvente, el cloruro de acilo obtenido se disolvió en piridina y se hizo reaccionar con metilamina para obtener la *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxamida (**7**) (Esquema 4.2).

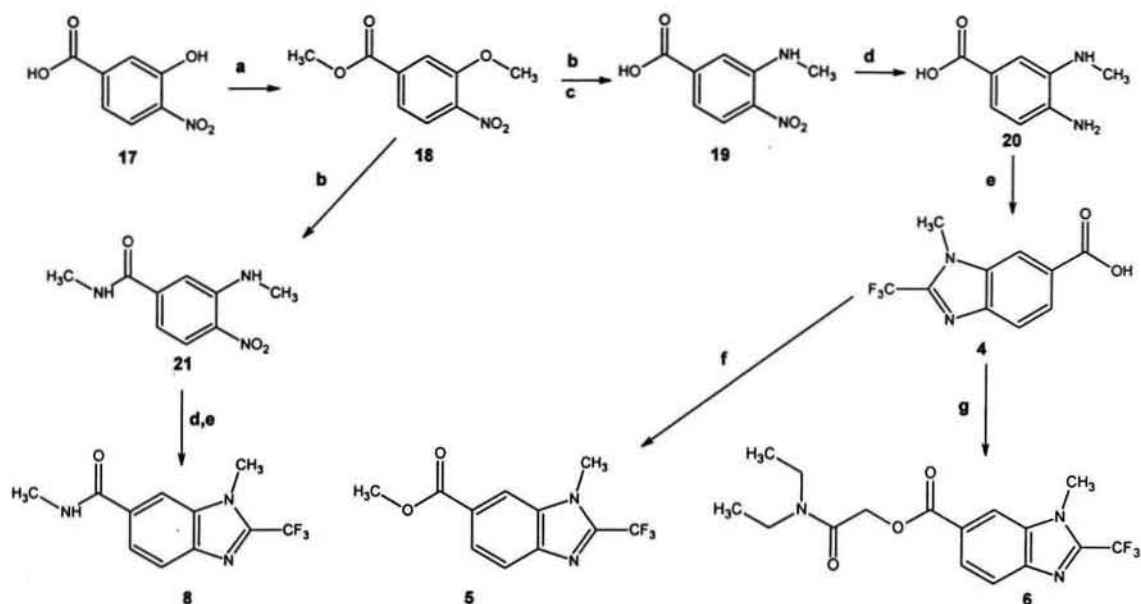
Los pasos sintéticos para obtener el compuesto **2** se pueden observar en el Esquema 4.3. El ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico (**17**) se *O*-metilo y esterificó en un solo paso, mediante el uso de sulfato de dimetilo en medio básico, para obtener el compuesto **18**, el cual fue fácilmente convertido por tratamiento con metilamina al



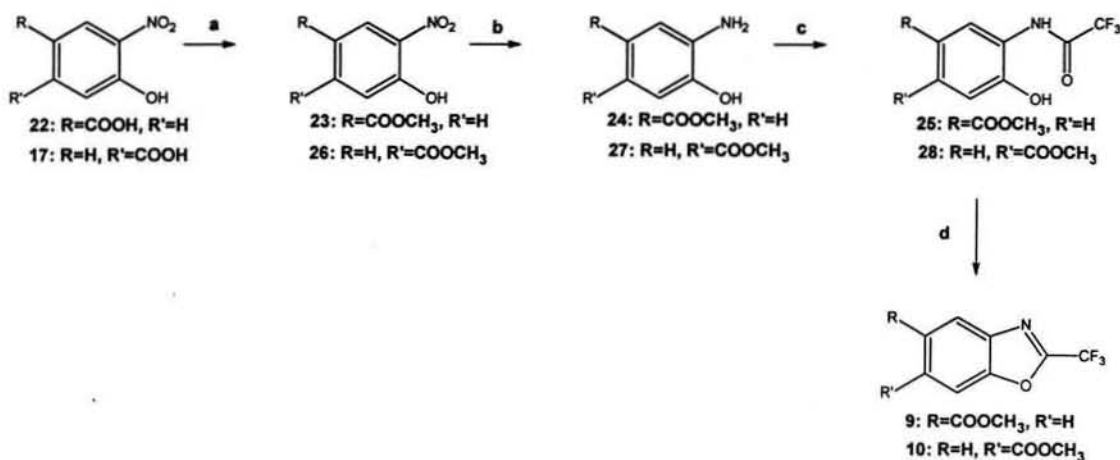
Esquema 4.1. Ruta sintética del compuesto 1. a) anhídrido acético; b) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$; c) NaOH , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$; d) NaOH ; e) HCOONH_4 , Pd/C ; f) CF_3COOH



Esquema 4.2. Ruta sintética de los compuestos 2, 3 y 7. a) Na_2CO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$; b) 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$, KI ; c) SOCl_2 ; d) Piridina, NH_2CH_3



Esquema 4.3. Ruta sintética de los compuestos 6, 5 y 8. a) NaOH/Na₂CO₃, (CH₃)₂SO₄; b) NH₂CH₃; c) NaOH; d) H₂, Pd/C 5 %; e) (CF₃CO)₂O, PPA f) Na₂CO₃, (CH₃)₂SO₄; g) 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida, (CH₃CH₂)₃N, KI.



Esquema 4.4. Ruta sintética de los compuestos 9 y 10. a) MeOH, H₂SO₄; b) HCOONH₄, Pd/C 10 %; c) (CF₃CO)₂O; d) PPA o P₄O₁₀.

derivado 4-nitro-3-metilamino. Adicionalmente se obtuvo la mezcla de productos de transesterificación y amino-de-alcoxilación. La mezcla de productos se hidrolizó en medio básico para obtener el ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (19). La reducción del grupo nitro de 19 dio lugar a 20, el cual fue ciclocondensado con

anhídrido trifluoroacético en PPA y glima para obtener el bencimidazol deseado (4).

La obtención de los compuestos **5** y **6** fue similar a la de los compuestos **2** y **3**. Para sintetizar el compuesto **8** (Esquema 4.3) se partió de 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (**17**) y se realizó la sustitución nucleofílica aromática del 3-metoxi con metilamina de forma similar a la realizada para obtener el compuesto **19**, pero se utilizó una concentración más alta de metilamina, con lo que se pudo obtener la *N*-metilcarboxamida (**21**) con buen rendimiento. Posteriormente por reducción del grupo nitro, mediante hidrogenación catalítica, y subsiguiente formación del bencimidazol con anhídrido trifluoroacético en PPA y glima dio lugar a *N*, 1-dimetil 2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxamida (**8**).

La formación de los compuestos **9** y **10** fue realizada siguiendo la misma ruta sintética (Esquema 4.4). Los ácidos 4-hidroxi-3-nitrobenzoico (**22**) y 3-hidroxi-4-nitrobenzoico (**17**) fueron esterificados utilizando el método de Fischer, en metanol y ácido sulfúrico, con excelente rendimiento en ambos casos, para obtener a los compuestos **23** y **26**. La posterior reducción con formiato de amonio y *N*-trifluoroacetilación con anhídrido trifluoroacético dio por resultado a los compuestos **25** y **28**.

La deshidratación de 4-hidroxi-3-[(trifluoroacetil)amino]benzoato de metilo (**25**) calentando con pentóxido de fósforo en glima dio origen a 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (**9**). Para la síntesis de 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo (**10**), el 3-hidroxi-4-[(trifluorometil)amino]benzoato de metilo (**28**) se calentó en presencia de ácido polifosfórico (PPA) en un horno Kugelrohr. El compuesto **10** se destiló durante su formación a presión reducida y purificó por cromatografía en columna.

El procedimiento detallado de cada reacción se presenta en el Apéndice 1.

4.2. Parte biológica

4.2.1. Determinación de la permeabilidad aparente (Papp) en la línea celular Caco-2

Para medir la permeabilidad aparente se utilizó la línea celular Caco-2 cepa ASI-4. La estructura de los compuestos cuya Papp fue evaluada se muestra en la Figura 4.1. La línea celular Caco-2 ASI-4 fue mantenida en cultivo en insertos Transwell®. El ensayo de transporte se realizó al día de cultivo 28. En este día la monocapa celular se incubó en medio de transporte y en el lado donador se colocó una solución 100 μM del compuesto a medir su Papp, la metodología detallada de este estudio se describe en el Apéndice 2. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos del lado receptor y la cantidad de compuesto que apareció se cuantificó por HPLC. La velocidad de aparición del compuesto en el lado receptor se usó para calcular la Papp, tal como se describe en el Apéndice 2.

Al final del experimento se comprobó la integridad de las monocapas celulares mediante el uso de la sal de litio del compuesto Lucifer Yellow CH (LY).

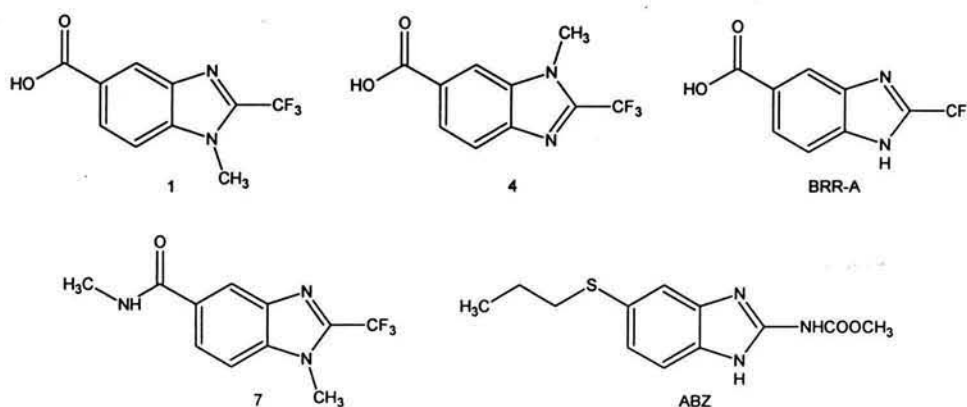


Figura 4.1. Estructura de los compuestos seleccionados para evaluar su permeabilidad aparente (Papp).

4.2.2. Evaluación *in vitro* de la actividad antiprotozoaria contra *Giardia intestinalis*

Los ensayos de susceptibilidad *in vitro* se realizaron de acuerdo a lo descrito por Cedillo-Rivera y cols., 1992. Se cultivaron 5×10^4 trofozoítos de *G. intestinalis* en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **1-10**, albendazol, metronidazol y nitazoxanida, por 48 horas a 37 °C. Se utilizó un control negativo, que consistió en incubar a los trofozoítos en medio libre de fármaco, pero que contenía la misma concentración de dimetilsulfóxido usada para evaluar la susceptibilidad a los compuestos. Después del tiempo de incubación, los trofozoítos fueron lavados y subcultivados por otras 48 horas en medio libre de fármaco o disolvente. Al término del tiempo de subcultivo, los trofozoítos viables se contaron y la CI_{50} de cada compuesto fue calculada por análisis Probit.

5. Resultados

Con el fin de contar con nuevas moléculas que posean actividad contra *G. intestinalis* se sintetizaron derivados *N*-metilados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxílico (**1** y **4**) (Figura 4.1.), así como sus ésteres metílicos (**2** y **5**), los ésteres de (dietilamino)-2-oxoetilo (**3** y **6**), derivados *N*-metilcarboxamida (**7** y **8**), y dos compuestos benzoxazólicos (**9** y **10**), los cuales son isómeros del anillo bencimidazólico.

Los compuestos **1** a **10** se obtuvieron siguiendo las rutas sintéticas que se muestran en los Esquemas 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4. Los compuestos propuestos se obtuvieron como sólidos con punto de fusión definido. La mayoría de las reacciones se obtuvieron con rendimientos satisfactorios o regulares (Tabla 5.1).

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **1** a **10** se presentan en la Tabla 5.2, las señales obtenidas corresponden a las señales esperadas para cada compuesto. Los espectros de IR, espectrometría de masas y RMN ^1H de los compuestos **1-10** se pueden apreciar en el Apéndice 3.

Los compuestos sintetizados fueron probados contra el protozoario *G. intestinalis*, utilizando el método de subcultivo (Cedillo-Rivera y col, 1992) para lo cual se agregó un inóculo de trofozoítos de *G. intestinalis* en medio de cultivo que contenía concentraciones diferentes del compuesto a evaluar.

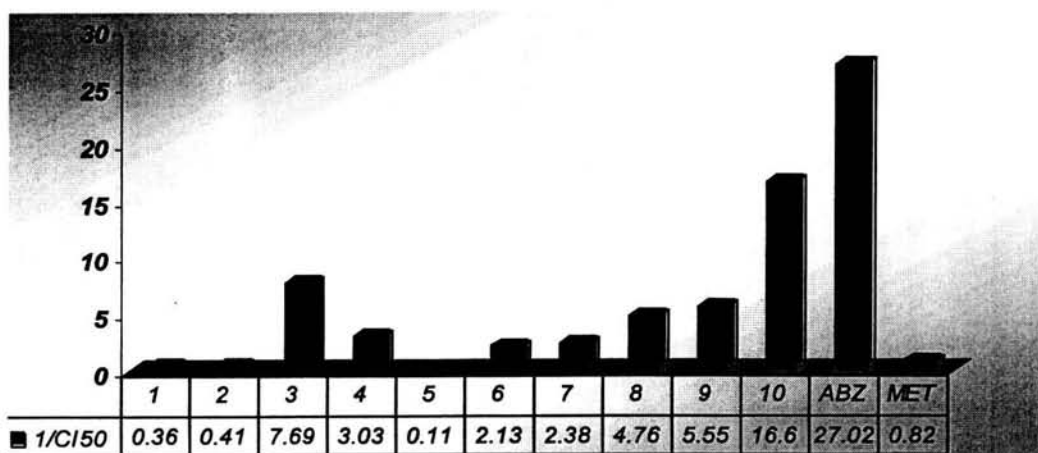


Figura 5.1. Comparación de la actividad contra *G. intestinalis* de los compuestos **1-10** con la actividad de albendazol y metronidazol. Se presenta el inverso de la CI_{50} (μM^{-1}). Debajo se presenta el valor exacto de $1/\text{CI}_{50}$, entre mayor sea el valor mayor es la actividad.

Después de 48 h se eliminó el medio de cultivo con compuesto y se incubó por 48 horas más en medio fresco. Se contaron los trofozoítos y se calculó la CI_{50} . Como control positivo se utilizaron trofozoítos incubados en presencia de albendazol, metronidazol o nitazoxanida y como control negativo se utilizaron trofozoítos incubados en presencia del disolvente utilizado en el estudio (DMSO) a la misma concentración utilizada para realizar los ensayos de susceptibilidad.

Tabla 5.1. Constantes físicas de los compuestos sintetizados

COMPUESTO	RENDIMIENTO %	PF (°C)	DISOLVENTE DE CRISTALIZACIÓN	R _f (SISTEMA)
1	60	252.4-254.3	Nitrometano	0.53 (I)
2	83	121.9-122.2	DMF-agua	0.40 (V)
3	76	97-97.9	ACN-agua	0.39 (I)
4	61	270.1-272.7	Isobutanol	0.53 (I)
5	84	107.1-107.5	DMF-agua	0.40 (V)
6	83	115.7-116.0	DMF-agua	0.62 (I)
7	75	177.1-178.1	MeOH-agua	0.35 (I)
8	69	218.0-218.8	AcOEt	0.35 (I)
9	38	51-52	**	0.69 (VI)
10	32	44-45	**	0.69 (VI)
12	95	259-262	EtOH-agua	0.40 (IV)
13	80	217.6-221.6	MeOH-agua	0.55 (I)
14 ^a	94	ND	ND	0.09 (II)
15	92	307-307.2	EtOH	0.52 (II)
16 ^a	75	ND	ND	ND
18	87	91.4-92.8	EtOH-agua	0.63 (VI)
19	77	269.9-271.0	EtOH-agua	0.50 (I)
20 ^a	97	ND	ND	ND
21	84	192.2-193.7	EtOH	0.33 (III)
23	93	74.3-75.1	MeOH-agua	0.57 (VI)
24 ^a	97	ND	ND	ND
25	72	219.7-220.3	EtOH-agua	0.33 (VI)
26	97	90.3-90.6	MeOH	0.61 (VI)
27 ^a	91	ND	ND	ND
28	87	207.7-208.3	EtOH-agua	0.49(VI)

I, CHCl₃-MeOH 90:10; II, CHCl₃:MeOH 99.5:0.5; III, CHCl₃-MeOH 99:1; IV, CHCl₃- MeOH 80:20; V, Hexano-Acetato de etilo 70:30; VI, CHCl₃-acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6; **, purificados por cromatografía en columna; a, estos compuestos se utilizaron inmediatamente en la siguiente reacción, por lo tanto no se determinaron sus constantes físicas.

Tabla 5.2. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos sintetizados

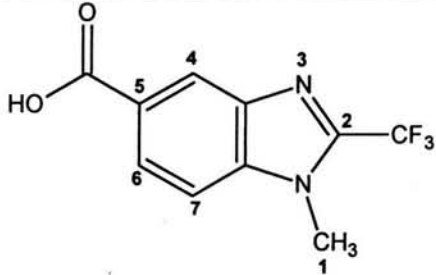
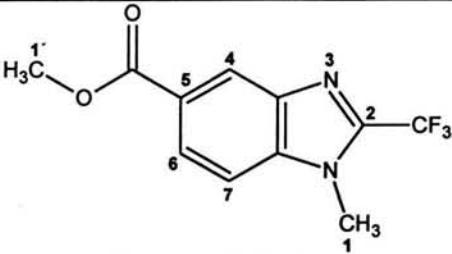
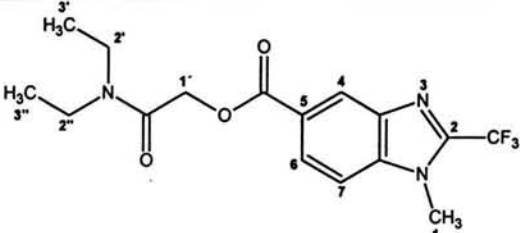
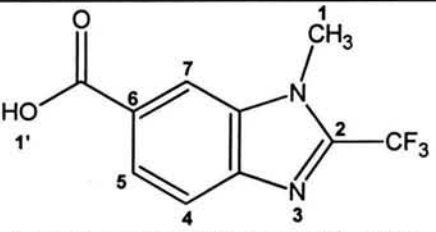
Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos.
 <p>ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-benzimidazolcarboxílico (1)</p>	<p>Espectro 1 a), IR en KBr (cm^{-1}): 2829 (R-OH), 2566 (C-H aromático), 1406 (C-N), 1685 (C=O), 1267 (C-O), 1141 (CF_3),</p> <p>Espectro 1 b), EM (IE) m/z: 244 M^+ (100%)</p> <p>Espectro 2, RMN ^1H (DMSO-d_6) δ 3.98 (s, 3H, N-CH_3 1), 7.82 (dd, 1H, $J=8.7$ Hz, $J=0.3$ Hz, H-Ar, 7), 8.021 (dd, 1H, $J=8.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H-Ar, 6), 8.342 (d, 1H, $J=0.6$ Hz, H-Ar, 4).</p> <p>Espectro 3, NOESY (DMSO-d_6): interacción entre los hidrógenos 1 (N-CH_3) y 7 (H-Ar).</p>
 <p>1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-benzimidazolcarboxilato de metilo (2)</p>	<p>Espectro 4 a), IR en KBr (cm^{-1}): 3018, 2962, 750 (C-H aromático), 1726 (C=O), 1306 (C-O), 1131 (CF_3).</p> <p>Espectro 4 b), EM (IE) m/z: 258 M^+ (65%), M^+-31 (100 %).</p> <p>Espectro 5, RMN ^1H (DMSO-d_6): δ 3.88 (s, 3H, O-CH_3, 1'), 3.99 (s, 3H, N-CH_3, 1), 7.88 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H-Ar, 7), 8.04 (dd, 1H, $J=8.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H-Ar, 6), 8.36 (d, 1H, $J=1.2$ Hz, H-Ar, 4).</p>
 <p>1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-benzimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (3)</p>	<p>Espectro 6 a), IR en KBr (cm^{-1}): 2967, 2934 (C-H alifático), 1726 (C=O éster), 1665 (C=O amida) 1471 (C-N), 1179 (C-O), 1130 (CF_3).</p> <p>Espectro 6 b), EM (IE) m/z: M^+-130 (100 %), M^+ no apreciable.</p> <p>Espectro 7, RMN ^1H (DMSO-d_6): δ 1.02 (t, 3H, $J=6.6$ Hz, CH_3-, 3'), 1.67 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH_3-, 3'), 3.31 (m, 4H, $J=2.7$ Hz, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2$, 2', 2''), 4.01 (s, 3H, N-CH_3, 1), 5.04 (s, 2H, COCH_2O, 1'), 7.92 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H-Ar, 7), 8.08 (dd, 1H, $J=8.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H-Ar, 6), 8.41 (d, 1H, $J=0.6$ Hz, H-Ar, 4).</p>
 <p>ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-benzimidazolcarboxílico (4)</p>	<p>Espectro 8 a), IR en KBr (cm^{-1}): 2963 (R-OH), 1679 (C=O), 1410 (C-N), 1260 (C-O), 1142 (CF_3)</p> <p>Espectro 8 b), EM (IE) m/z: 244 M^+ (100%).</p> <p>Espectro 9, RMN ^1H (DMSO-d_6) δ 4.00 (s, 3H, N-CH_3, 1), 7.82 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H-Ar, 4), 7.92 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=1.5$ Hz, H-Ar, 5), 8.33 (d, 1H, $J=0.6$ Hz, H-Ar, 7), 13.10 (s, 1H, COOH, 1').</p> <p>Espectro 10, NOE diferencial (DMSO-d_6): interacción entre 1 y 7.</p>

Tabla 5.2. (Continuación)

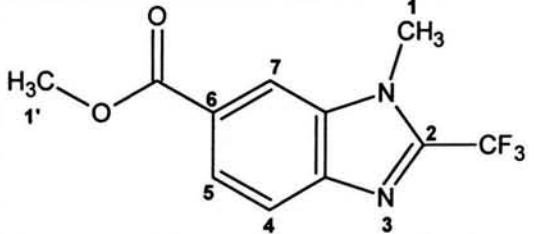
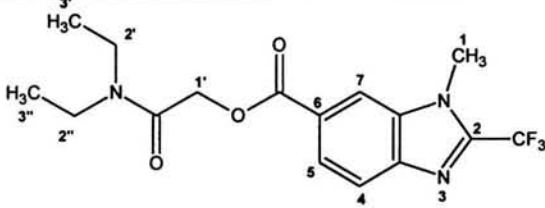
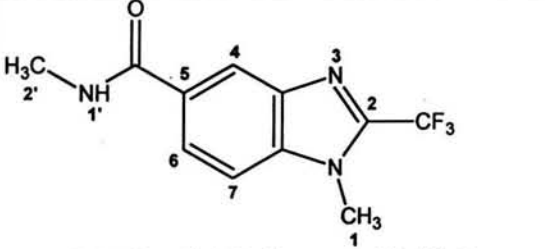
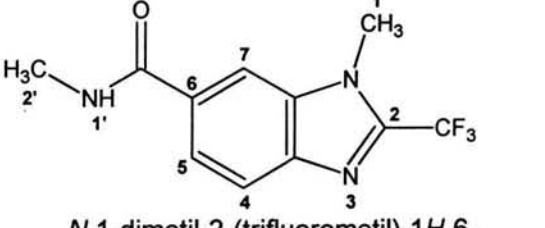
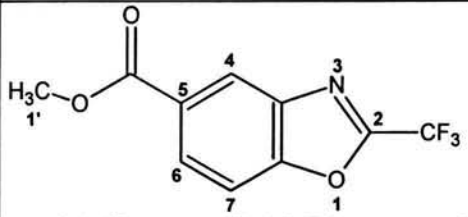
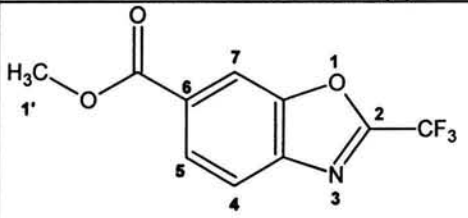
Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos.
 <p>1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazol-carboxilato de metilo (5)</p>	<p>Espectro 11 a), IR en KBr (cm⁻¹): 3036,2961, 748 (C-H aromático), 1710 (C=O), 1483 (C-N), 1268 (C-O), 1126 (CF₃).</p> <p>Espectro 11 b), EM (IE) m/z: 258 M⁺ (100%), M⁺-31 (100 %), M⁺-59 (86 %), M⁺-128 (48 %).</p> <p>Espectro 12, RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 3.90(s, 3H, O-CH₃, 1'), 4.02 (c, 3H, J=0.9 Hz, N-CH₃, 1), 7.88 (dd, 1H, J=8.7 Hz, J=0.6 Hz, H-Ar, 4), 7.94 (dd, 1H, J=8.7 Hz, J=1.5 Hz, H-Ar, 5), 8.38 (dd, 1H, J=1.5 Hz, J=0.6, H-Ar, 7).</p>
 <p>1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazol-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (6)</p>	<p>Espectro 13 a), IR en KBr (cm⁻¹): 2980, 2936, 742 (C-H alifático), 1722 (C=O éster), 1648 (C=O amida), 1482 (C-N), 1266 (C-O), 1122 (CF₃).</p> <p>Espectro 13 b), EM (IE) m/z: 357 M⁺ (despreciable), M⁺-130 (100 %).</p> <p>Espectro 14, RMN ¹H (DMSO-d₆): 1.025 (t, 3H, J=6.9 Hz, CH₃-, 3'), 1.171 (t, 3H, J=6.9 Hz, CH₃-, 3'), 3.28 (c, 2H, J=6.9 Hz, -CH₂-, 2''), 3.32 (c, 2H, J=6.9 Hz, -CH₂-, 2'), 4.03 (c, 3H, J=0.9 Hz, N-CH₃, 1), 5.06 (s, 2H, COCH₂O, 1'), 7.92 (dd, 1H, J=8.4 Hz, J=0.6 Hz, H-Ar, 4), 7.98 (dd, 1H, J=8.4 Hz, J= 1.5 Hz, H-Ar, 5), 8.42 (dd, 1H, J=1.5 Hz, J=0.6 Hz, H-Ar, 7).</p>
 <p>N,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxamida (7)</p>	<p>Espectro 15 a), IR en KBr (cm⁻¹): 3416, 3262 (N-H), 1617 (C=O), 1406 (C-N), 1271 (C-O), 1125 (CF₃), 596 (C-N).</p> <p>Espectro 15 b), EM (IE) m/z: 257 M⁺(45 %), M⁺-30 (100 %).</p> <p>Espectro 16, RMN ¹H (DMSO-d₆): 2.81 (d, 3H, J=4.5 Hz, CONCH₃, 2'), 3.97 (c, 3H, J=0.9 Hz, N-CH₃, 1), 7.82 (dd, 1H, J=8.4 Hz, J=0.3 Hz, H-Ar, 7), 7.95 (dd, 1H, J=8.7 Hz, J=1.8 Hz, H-Ar, 6), 8.29 (dd, 1H, J=1.5 Hz, J= 0.6 Hz, H-Ar, 4), 8.54 (c, 1H, J=3.9 Hz, CONH, 1').</p>
 <p>N,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazolcarboxamida (8)</p>	<p>Espectro 17 a), IR en KBr (cm⁻¹): 3295 (N-H), 2937 (C-H aromático), 1409 (C-N), 1269 (C-O), 1183 (CF₃).</p> <p>Espectro17 b), EM (IE) m/z: 257 M⁺(75 %), M⁺-30 (100 %).</p> <p>Espectro 18, RMN ¹H (DMSO-d₆): 2.83 (d, 3H, J=4.5 Hz, CONCH₃, 2'), 3.99 (c, 3H, J=0.6 Hz, N-CH₃, 1), 7.84 (d, 2H, J=0.9 Hz, H-Ar, 4,5), 8.26 (t, 1H, J=1.05 Hz, H-Ar, 7), 8.55 (c, 1H, J= 4.5 Hz, CONH, 1').</p>

Tabla 5.2. (Continuación)

Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos
 <p>2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazol-carboxilato de metilo (9)</p>	<p>Espectro 19 a), IR en KBr (cm^{-1}) 3393,1374 (Ar-NH-R), 3200 (C-H aromático), 2961 (CH_3), 1724 (C=O), 1445 (C-N), 1299 (C-O), 1102 (CF_3),</p> <p>Espectro 19 b), EM (IE) m/z: 245 M^+ (88 %), M^+-31 (100 %)</p> <p>Espectro 20, RMN ^1H (DMSO-d_6) δ 3.89 (s, 3H, O-CH_3, 1'), 8.06 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H-Ar, 7), 8.19 (dd, $J=8.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H-Ar, 6), 8.45 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H-Ar, 4).</p>
 <p>2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazol-carboxilato de metilo (10)</p>	<p>Espectro 21 a), IR en KBr (cm^{-1}): 3109 (C-H aromático), 2960 (CH_3), 1722 (C=O), 1438 (C-N), 1281 (C-O), 1197,1172 (CF_3).</p> <p>Espectro 21 b), EM (IE) m/z: 245 M^+ (78 %), M^+-31 (100 %).</p> <p>Espectro 22, RMN ^1H (DMSO-d_6): 3.91 (s, 3H, O-CH_3, 1'), 8.09 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=0.9$ Hz, H-Ar, 4), 8.12 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=1.5$ Hz, H-Ar, 5), 8.46 (dd, $J=1.2$ Hz, $J=0.6$ Hz, H-Ar, 7)</p>

IE, Impacto electrónico; m/z , relación masa carga; DMSO- d_6 , dimetilsulfóxido hexadeuterado; s, singulete; c, cuadruplete; d, doblete; dd, doble de dobles; m, multiplete; t, triplete; J, constante de acoplamiento; M^+ , ión molecular. Los números en cursiva representan el átomo de hidrógeno señalado en la estructura.

Tabla 5.3. Efecto antiprotozoario de los compuestos 1-10, albendazol, metronidazol y nitazoxanida contra *G. intestinalis*

Compuesto	Cl_{50} (μM)	Compuesto	Cl_{50} (μM)	Compuesto	Cl_{50} (μM)
1	2.77	6	0.47	albendazol	0.037
2	2.45	7	0.42	metronidazol	1.220
3	0.13	8	0.21	nitazoxanida	0.013
4	0.33	9	0.18		
5	8.82	10	0.06		

Los valores de Cl_{50} de cada compuesto se obtuvieron de 2 ensayos por duplicado.

Los compuestos 3, 4, 6-10 presentaron mayor actividad contra el protozoario que la presentada por el metronidazol, fármaco de primera elección para esta parasitosis (Figura 5.1, Tabla 5.3).

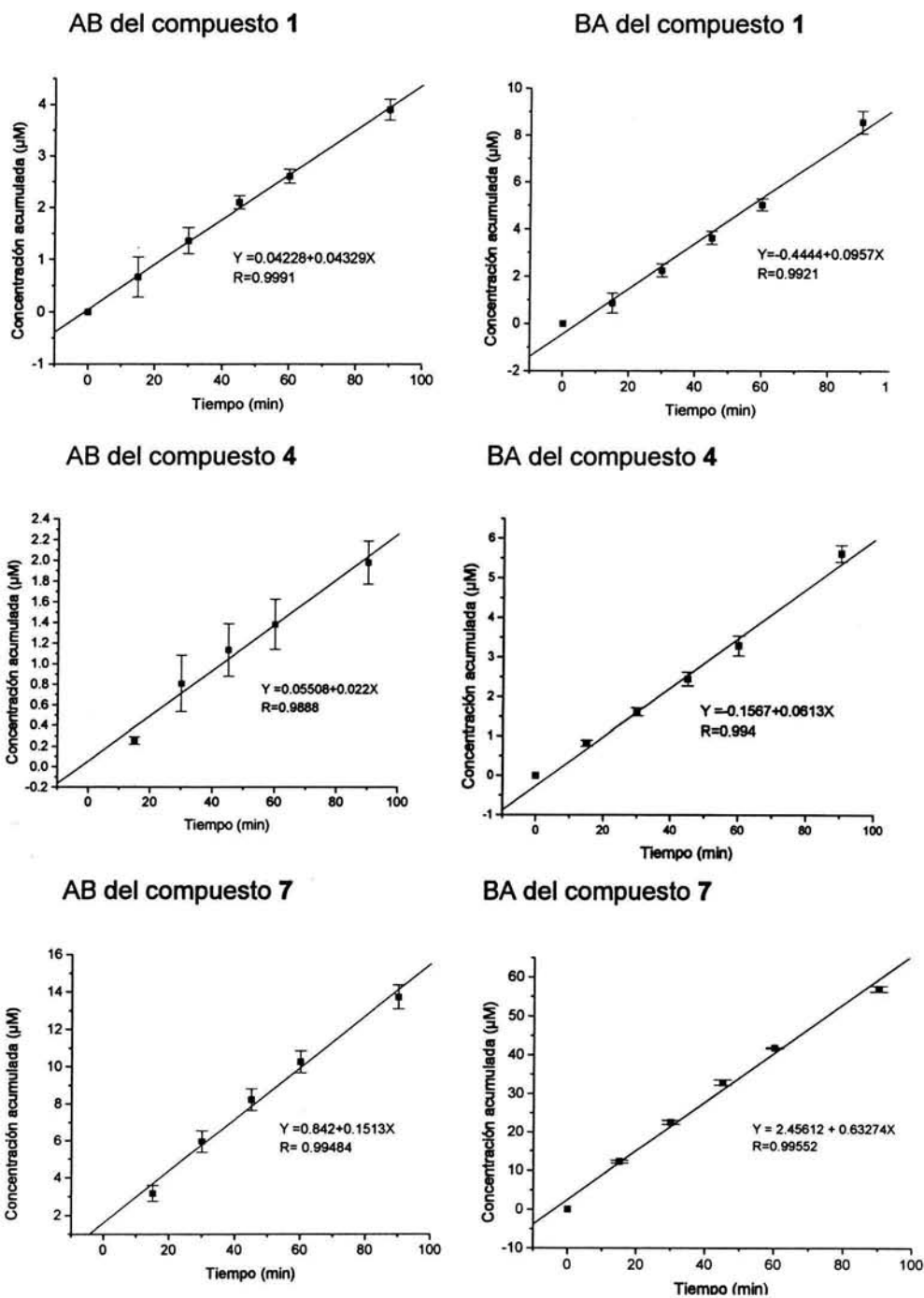


Figura 5.2. Perfiles de permeabilidad de los compuestos 1, 4, 7, BRR-A y ABZ. Se presentan los perfiles de los compuestos evaluados. Los datos para realizar las gráficas se presentan en las Tablas 5.4. y 5.5.

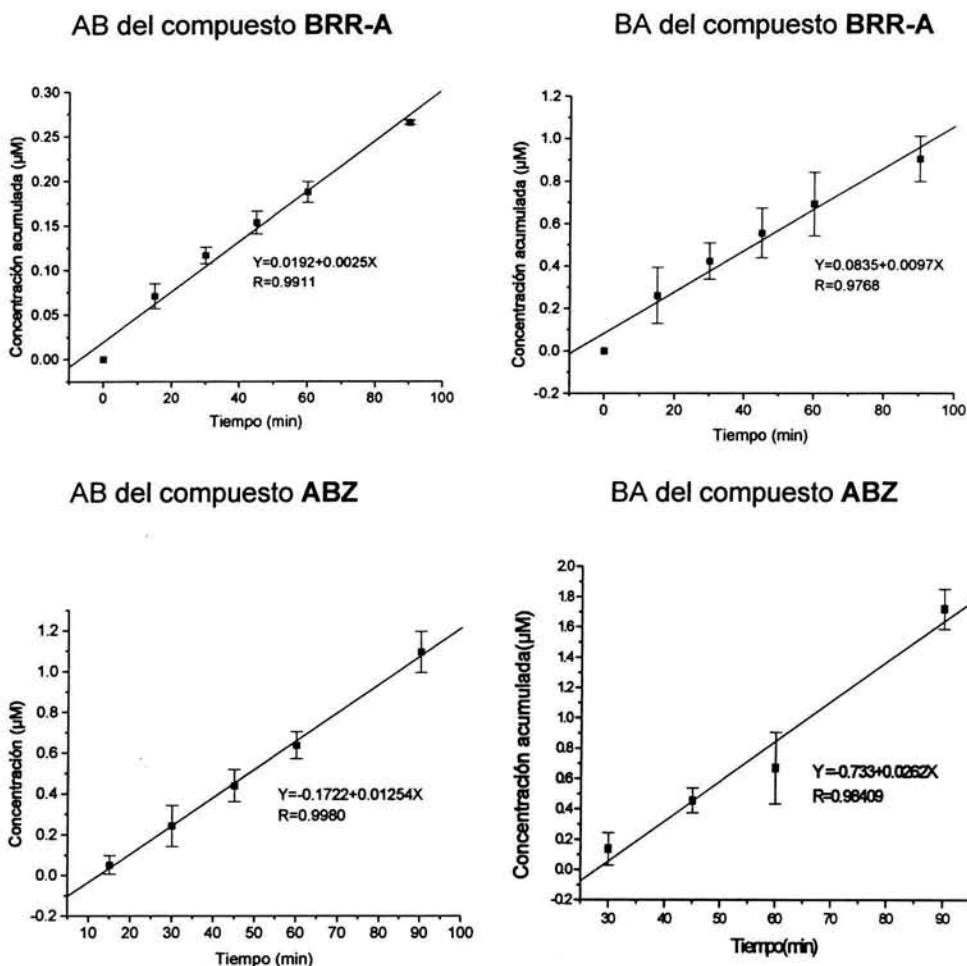


Figura 5.2. (Continuación).

Resulta interesante señalar que los compuestos más activos de la serie sintetizada fueron **3** y **10**, los cuales fueron 9.4 y 20.2 veces más activos que el metronidazol respectivamente.

Todos los compuestos fueron menos potentes que el albendazol (Tabla 5.3., Figura 5.1) y la nitazoxanida (Tabla 5.3).

Con respecto a la diferencia en actividad contra *G. intestinalis*, entre isómeros estructurales, se observa que los isómeros que guardan una relación estructural 1,5 entre el grupo *N*-metilo y el carboxilo son menos potentes que los isómeros que tienen una relación 1,6 entre los grupos mencionados, excepto para

los derivados **2, 3, 5 y 6** en los cuales se observó lo contrario. De los derivados benzoxazólicos el compuesto **10**, que guarda una relación 1,6 entre el oxígeno del anillo de benzoxazol y el grupo carboxilato de metilo, fue más potente que su isómero **9**, con relación 1,5 (Tabla 5.3).

Para determinar la permeabilidad aparente (Papp) se utilizó la línea celular Caco-2 ASI-4, la cual se cultivó en cámaras de cultivo Transwell® durante 28 días, tiempo suficiente para lograr que la línea celular se transforme y adquiera niveles adecuados de P-gp. Después de este tiempo se midió la TEER de las monocapas formadas. Los valores de TEER que se obtuvieron en el presente estudio oscilan entre 126 y 182 Ω cm². Los compuestos a los que se determinó su Papp se presentan en la Figura 4.1. Al realizar el estudio de permeabilidad basal-apical y apical-basal se obtuvieron alícuotas a los 15, 30, 45, 60 y 90 min. Al finalizar el estudio se comprobó que las monocapas no se hubieran alterado por efecto de los compuestos probados o por efecto de la manipulación utilizando el compuesto LY.

Los valores de permeabilidad obtenidos para el LY estuvieron dentro del rango de 0.8 y 7.9×10^{-7} cm/seg, lo cual indica que las monocapas celulares eran uniformes y se habían formado las uniones estrechas adecuadamente.

La concentración de las muestras se determinó por HPLC y se calculó la concentración acumulada en el lado receptor para cada compuesto (Tabla 5.4. y 5.5.). El ABZ presentó problemas en su cuantificación a los 15 minutos del estudio BA, debido a que su concentración estuvo por debajo del límite de detección (Tabla 5.5).

Con los valores de concentración acumulada se hicieron gráficas para observar la tendencia de los valores obtenidos, todos los puntos presentaron una tendencia lineal (Figura 5.2).

La pendiente de cada línea representa la velocidad con la que el compuesto pasa del compartimiento donador al receptor, con esta constante se calculó la Papp de cada compuesto (Tabla 5.6).

Los compuestos **1, 4 y ABZ** presentaron valores de Papp del orden de 10^{-6} cm/seg, el compuesto **BRR-A** presentó una Papp del orden de 10^{-7} cm/seg y el compuesto **7** tiene un Papp del orden de 10^{-5} cm/seg (Tabla 5.6).

Los valores de log (Papp) para los compuestos 1, 4 y ABZ son muy parecidos (entre -5.0 y -5.7), lo que indica que su permeabilidad es similar. El compuesto 7 presenta valores de log (Papp) de -4.46 para el estudio AB y -4.32 para el estudio BA, este valor indica una permeabilidad elevada. El compuesto BRR-A presenta valores bajos de log (Papp), -6.2 y -6.1 para el estudio AB y BA respectivamente

La relación entre la Papp AB y la Papp BA de todos los compuestos probados no fue mayor a 3 en ningún caso, valor que indica una contribución significativa en la permeabilidad por parte de transportadores (Morales-Hurtado, 2000) (Tabla 5.6).

Tabla 5.4. Cinética de aparición de los compuestos 1, 4, 7, BRR-A y ABZ en el lado receptor durante el ensayo apical-basolateral (AB)

Tiempo min.	Concentración Acumulada AB (µM)				
	1	4	7	BRR-A	ABZ
15	0.669±0.38	0.255±0.037	3.179±0.41	0.071±0.01	0.052±0.04
30	1.365±0.24	0.808±0.27	5.963±0.59	0.116±0.01	0.242±0.1
45	2.101±0.12	1.133±0.25	8.226±0.58	0.154±0.01	0.440±0.07
60	2.608±0.13	1.379±0.24	10.265±0.59	0.188±0.01	0.637±0.07
90	3.899±0.20	1.977±0.20	13.743±0.64	0.265±0.002	1.093±0.1

El estudio de permeabilidad se realizó como se describe en el Apéndice 2. Los resultados obtenidos son el promedio±D.E. de tres determinaciones independientes.

Tabla 5.5. Cinética de aparición de los compuestos 1, 4, 7, BRR-A y ABZ en el lado receptor durante el ensayo basolateral-apical (BA)

Tiempo min.	Concentración Acumulada BA (µM)				
	1	4	7	BRR-A	ABZ
15	0.869±0.41	0.821±0.07	12.225±0.36	0.261±0.13	ND
30	2.238±0.27	1.615±0.10	22.573±0.54	0.424±0.08	0.137±0.1
45	3.619±0.28	2.445±0.17	32.919±0.69	0.555±0.11	0.455±0.08
60	5.025±0.25	3.289±0.25	41.841±0.18	0.692±0.15	0.669±0.23
90	8.566±0.49	5.618±0.21	57.037±0.74	0.905±0.106	1.717±0.13

El estudio de permeabilidad se realizó como se describe en el Apéndice 2. Los resultados obtenidos son el promedio±D.E. de tres determinaciones independientes. ND, no determinado.

Tabla 5.6. Valores de permeabilidad aparente (Papp cm/seg) y log Papp de los compuestos 1, 4, 7, BRR-A y ABZ, su relación de Papp AB/BA y BA/AB y su logP

Compuesto	Papp/10 ⁶ cm/seg AB	log(Papp) AB	Papp/10 ⁶ cm/seg BA	log(Papp) BA	AB/BA	BA/AB	logP ^a
1	9.83±0.09	-5.0	7.25±0.30	-5.1	1.35	0.74	2.39
4	5.09±0.62	-5.2	4.65±0.25	-5.3	1.09	0.91	2.39
7	34.39±0.13	-4.4	47.93±0.03	-4.3	0.72	1.39	1.35
BRR-A	0.57±0.037	-6.2	0.74±0.08	-6.1	0.77	1.30	2.07
ABZ	3.14±0.14	-5.5	1.99±0.09	-5.7	1.58	0.63	3.01

El cálculo de la Papp para cada compuesto se realizó como se indica en el Apéndice 2. El valor presentado es el promedio±D.E. de tres experimentos independientes. a, Calculado con el programa ACD/Log P DB versión 4.56.

6. Análisis de resultados

6.1. Parte química

Se ha visto que los 2-(trifluorometil)bencimidazoles son activos contra varios protozoarios y los análogos *N*-metilados son más activos (Navarrete-Vázquez y cols., 2001). Por otro lado se sabe que el ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico (**BRR-A**) (Figura 4.1.) es activo contra *G. intestinalis*, por lo que fue necesario sintetizar ambos isómeros *N*-metilados de este compuesto para determinar si estos derivados eran más activos que el compuesto referido.

La metilación de **BRR-A** con yoduro de metilo en acetona y posterior hidrólisis en medio básico dio por resultado un sólido que presentaba una sola mancha en por cromatografía en capa fina en varios sistemas de elusión y no se pudo separar por cristalización. Al analizar el producto por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el cromatograma se presentaron dos picos con tiempo de retención de 7.61 y 8.46 min. Las señales principales fueron *m/z* 244 como ión molecular y con pico base del espectro de $M^+ - 17$ (*m/z* 227) lo que indicó que eran los productos monometilados **1** y **4** (Figura 6.1). Por lo anterior se decidió sintetizar los isómeros por separado.

El paso clave de la síntesis del compuesto **1** (Esquema 4.1) fue la formación del ácido 4-metilamino-3-nitrobenzoico (**15**). La monometilación de un grupo amino generalmente es una reacción difícil de llevar a cabo con agentes metilantes convencionales. La formación de la amida hace posible la monometilación del nitrógeno de **13** debido al carácter ácido del grupo amida. La presencia del grupo nitro y el grupo carbonilo favorecen la reacción de metilación.

Para evitar la hidrólisis de la amida y el éster fue necesario agregar paulatinamente la base y regular la temperatura de la mezcla de reacción.

Adicionalmente para obtener la monometilaminilina se utilizó NaOH y Na₂CO₃ en polvo, catalizador de transferencia de fases (sulfato monoácido de tetrabutilamonio) y sulfato de dimetilo en tolueno y el éster metílico del compuesto **13** (obtenido mediante tratamiento con sulfato de dimetilo y carbonato de potasio en dimetilformamida) (Figura 6.2) (Kalkote y cols., 1997).

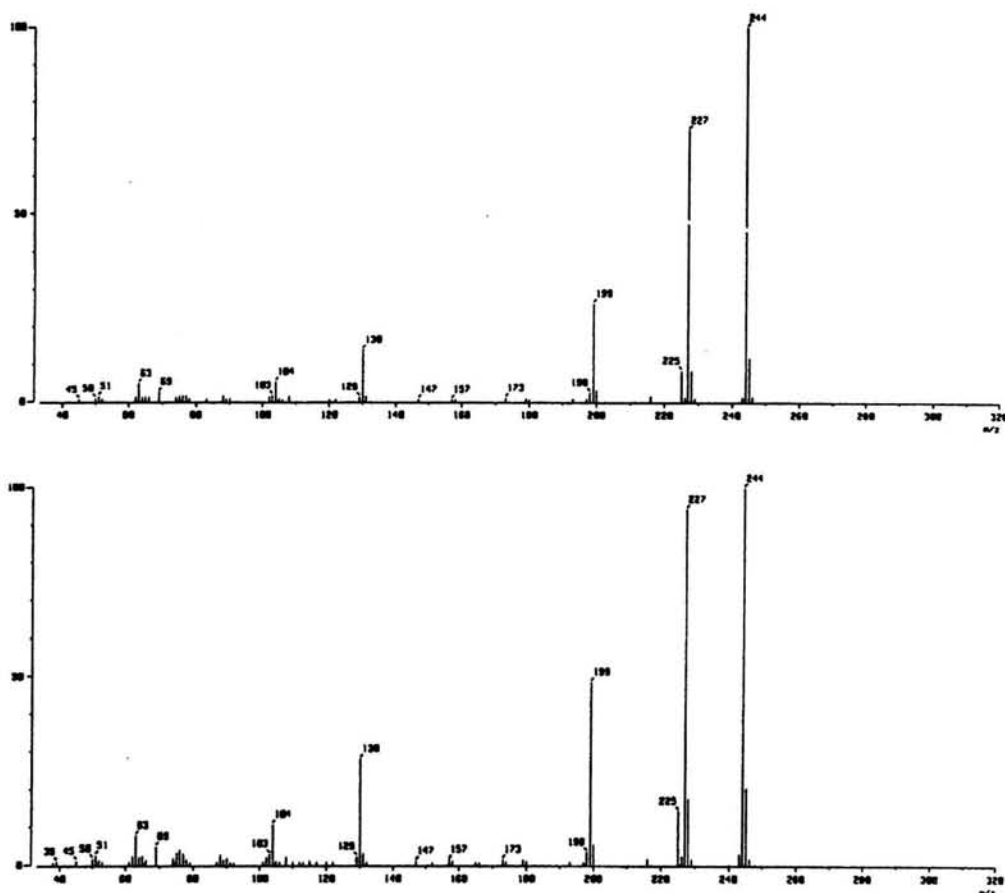


Figura 6.1. Productos obtenidos de la metilación directa de BRR-A con CH_3I . El compuesto del espectro superior presentó un tiempo de retención de 7.61 min y el del inferior de 8.46 min.

El compuesto principalmente obtenido fue el correspondiente a la saponificación del éster metílico.

Otra alternativa explorada fue hacer reaccionar la *o*-nitroanilina con formaldehído y benzotriazol para formar la *N*-(1,2,3-benzotriazol-1-ilmetil)-2-nitroanilina que posteriormente se reduciría con borohidruro de sodio en etanol para obtener la *N*-metil-2-nitroanilina correspondiente (Katritzky y cols., 1994). Para efectuar esta reacción, el compuesto **13** se hidrolizó en medio básico para formar el ácido 4-amino-3-nitrobenzoico, el cual al ponerse a reaccionar con benzotriazol y formaldehído no mostró avance en la reacción, aún después de 8 horas.

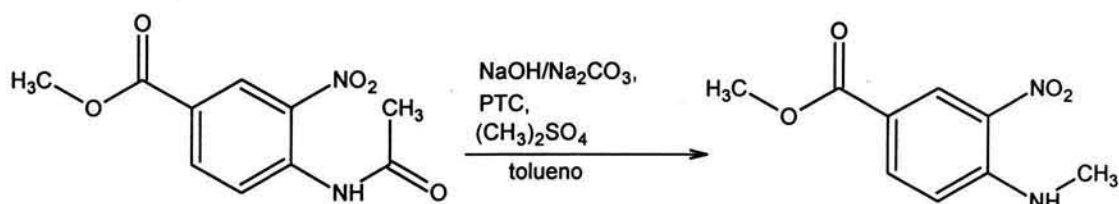


Figura 6.2. Síntesis de monometilanilinas en un solo paso (Kalkote U. R. y cols., 1997).

La hidrólisis del compuesto **14**, reducción del grupo nitro y ciclocondensación con ácido trifluoroacético dio por resultado el compuesto **1**.

La reducción del grupo nitro utilizando formiato de amonio y paladio sobre carbono es una alternativa a la hidrogenación catalítica, en el presente trabajo se obtuvieron excelentes resultados con este reactivo. Si la reacción se realiza adecuadamente, la reducción del grupo nitro requiere menos tiempo que la reducción con hidrógeno, aunque hay que eliminar el formiato de amonio residual lavando con agua. Además la reacción es ligeramente exotérmica y efervescente (libera bióxido de carbono y amoniaco). La cantidad de formiato de amonio utilizada y las condiciones se tomaron de la literatura (Ram y cols., 1984).

Para el compuesto **1** en IR se observa una banda correspondiente al trifluorometilo a 1141 cm^{-1} y al grupo carbonilo a 1677 cm^{-1} (Espectro 1a), en EM el ión molecular corresponde al peso molecular esperado (m/z 244) y una pérdida de $M^+ - 17$ confirma la presencia del ácido carboxílico (Espectro 1b). En RMN ^1H la señal del grupo *N*-metilo se observa a 3.97 ppm y el sistema aromático corresponde al esperado (Sistema ABX) (Espectro 2), en NOESY interaccionan los protones del *N*-metilo con el protón aromático del carbono 7 (Tabla 5.2, Espectro 3) confirmándose la estructura correcta del isómero. El rendimiento total de la síntesis fue de 30 %.

Los compuestos **2** y **3** son el éster metílico y el éster 2-(dietilamino)-2-oxoetílico del compuesto **1** respectivamente. Estos compuestos al hidrolizarse por medio de enzimas liberarán el compuesto **1** y metanol o *N,N*-dietilglicolamida. Los ésteres de glicolamida son rápidamente hidrolizados en plasma por esterasas, el éster de *N,N*-dietilglicolamida del ácido benzoico tiene un vida media de 0.08 min en plasma (Nielsen y cols., 1988). Por otro lado, la *N,N*-glicolamida liberada puede

generar ácido glicólico que es una sustancia endógena.

El compuesto **2** presenta en EM un ión molecular de m/z 258 y una señal de M^+-31 (m/z 227), la cual es el pico base del espectro, y corresponde a la pérdida de metoxilo (Espectro 4b, Tabla 5.2), en RMN 1H se observan dos señales correspondientes a metilos; la señal del éster se encuentra a 3.88 ppm y la del *N*-metilo a 3.99 ppm, el sistema observado en la zona de aromáticos es igual al del compuesto **1** (Espectro 5). Para el compuesto **3** en IR se observan dos señales para carbonilos a 1726 y 1665 cm^{-1} , los cuales corresponden a carbonilo de éster y amida respectivamente (Espectro 6a). En el espectro EM no se observa el ión molecular, debido a la inestabilidad de la molécula, el pico base del espectro es de m/z 277 que corresponde a la pérdida de 2-(dietilamino)-oxoetilo (Espectro 6b), el peso del compuesto se adquirió por FAB obteniéndose el esperado (m/z 358 para un M^++1) (Figura 6.3). El Espectro de RMN 1H presenta las señales correspondientes al 2-(dietilamino)-2-oxoetilo, al metilo en posición 1 y a los protones aromáticos del anillo de benceno (Espectro 7).

La síntesis del compuesto **4** se realizó como se describe en la sección de parte experimental (Esquema 4.3) La metilación del compuesto **17**, el cual se adquirió comercialmente, requirió de encontrar las condiciones propicias de reacción. La presencia de agua aceleró la reacción al mantener en fase homogénea las sales formadas.

La sustitución nucleofílica aromática del compuesto **18** con metilamina fue la reacción clave de esta ruta sintética. La búsqueda de las condiciones de reacción adecuadas requirió de varios intentos. Se encontró que el uso de clorhidrato de metilamina, con carbonato de potasio y glima o diglima como disolvente no es útil para llevar a cabo la reacción; debido a problemas de solubilidad del compuesto. La reacción con metilamina, bajo presión, 130 °C y etanol como disolvente dio por resultado la sustitución del metoxilo. Las reacciones alternas fueron formación parcial de la *N*-metilamida y productos de transesterificación, lo cual se comprobó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La hidrólisis con potasa al 10 % en etanol dio por resultado el compuesto **19** con buen rendimiento (Tabla 5.1).

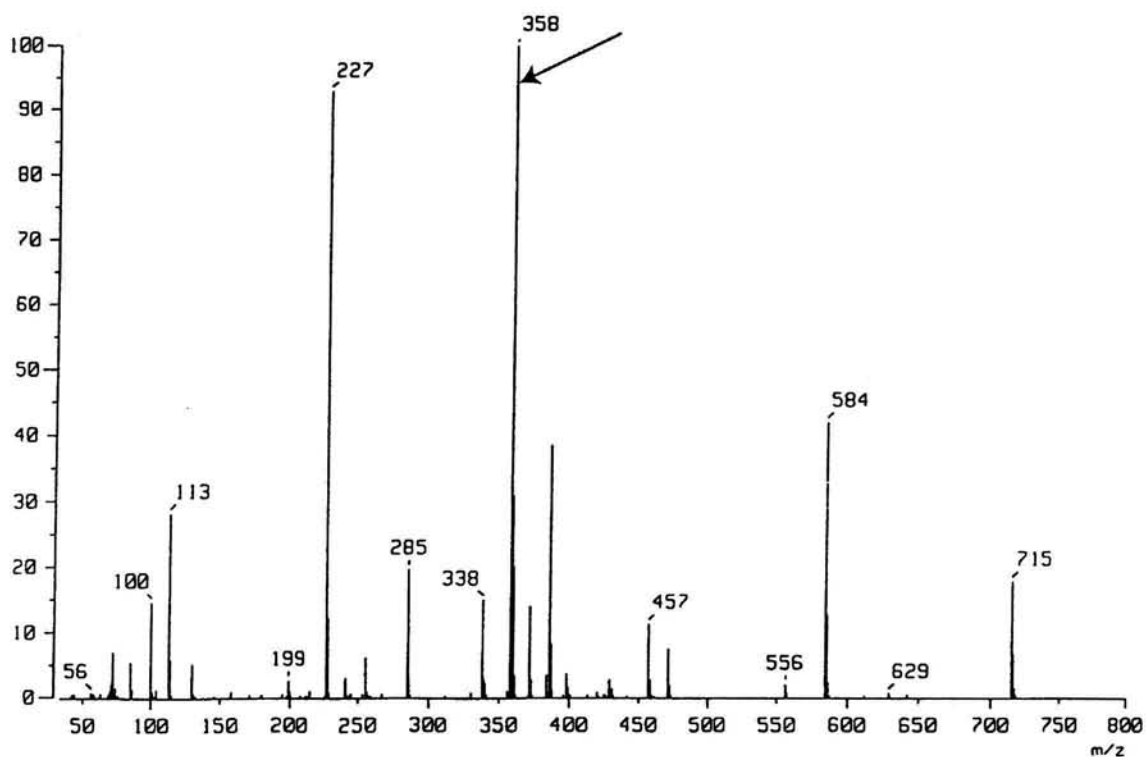


Figura 6.3. EM obtenido por FAB del compuesto **3**. El $M^{+}+1$ se indica con una flecha, matriz: alcohol nitrobenílico.

La sustitución del grupo metoxilo en el anillo aromático por metilamina se favorece por la presencia del grupo nitro y a la electronegatividad del oxígeno lo cual hace al anillo aromático deficiente en electrones. La catálisis básica entre la metilamina que se encuentra en exceso y el ión amonio formado favorece la eliminación del metoxilo por ser una base más débil (pK_a de 15.2 para el MeOH y de 38 para el NH_3) (Figura 6.4).

La reducción de **19** mediante hidrogenación catalítica (Pd/C al 5%) dio por resultado la *o*-fenilendiamina **20**, la cual se condensó con anhídrido trifluoroacético en glima y PPA para formar **4**. Al realizar la síntesis del compuesto anterior mediante el uso de ácido trifluoroacético y ácido clorhídrico diluido se obtuvo un rendimiento muy bajo, debido en parte a que el compuesto **20** se carbonizó parcialmente en las condiciones de reacción utilizadas y se observaron varias manchas por cromatografía en capa fina, por lo que se tuvo que realizar la ciclación bajo condiciones más suaves (Esquema 4.3). El anhídrido trifluoroacético

forma fácilmente la trifluoroacetamida con el compuesto **20**. La formación del bencimidazol se favorece debido a que el PPA reacciona con el agua formada. El rendimiento global de la síntesis de este compuesto es de 40 %.

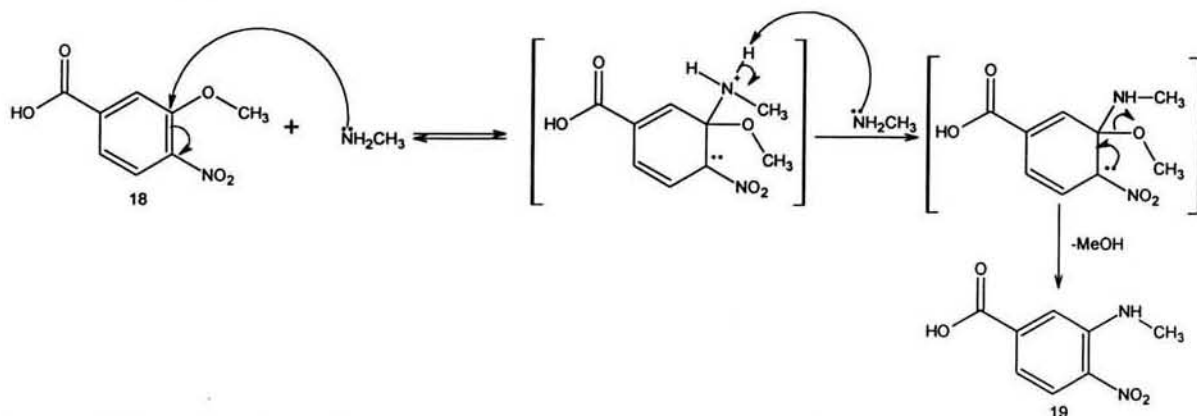


Figura 6.4. Catálisis básica en la síntesis del compuesto 19

El espectro de IR muestra bandas para carbonilo (1679 cm^{-1}), hidroxilo de ácido (2963 cm^{-1}), señales de C-H aromáticos (2542 cm^{-1}) y una señal correspondiente al trifluorometilo (1142 cm^{-1}) (Espectro 8a). En EM se observa un ión molecular de m/z 244, el cual es el peso esperado, y una pérdida de $M^+ - 17$, con lo cual se confirma la presencia del ácido (Espectro 8b). En RMN ^1H aparece la señal del *N*-metilo a 4.0 ppm, los protones aromáticos presentan el sistema característico entre 8.3 y 7.8 ppm y el protón ácido a 13.1 ppm (Espectro 9). Al irradiar el *N*-metilo aumenta la señal del hidrógeno en el carbono 7, confirmando su cercanía con este sustituyente (Tabla 5.2, Espectro 10).

La síntesis de los compuestos **5** y **6** se realizó de la misma manera que la de los compuestos **2** y **3**, obteniéndose buenos rendimientos (Tabla 5.1). Para el compuesto **5** (Espectro 11a) en IR se observa la pérdida de la señal a 2963 cm^{-1} presente en el espectro del compuesto **4**, indicando que el hidroxilo del ácido carboxílico está esterificado. En EM el ión molecular es de m/z 258 y se observa la pérdida de $M^+ - 31$ (Espectro 11b). En RMN ^1H se observa la señal para el metoxilo a 3.9 ppm, en este espectro se observa el acoplamiento a 5 enlaces del *N*-metilo con el trifluorometilo, el valor para $^5J_{\text{HF}}$ es de 0.9 Hz (Espectro 12).

El compuesto **6** presenta en IR dos bandas para carbonilo a 1722 y 1648 cm^{-1} que corresponden a carbonilo de éster y amida respectivamente; a 1122 cm^{-1}

se presenta la señal del trifluorometilo (Espectro 13a). En EM el ión molecular es insignificante, pero es el peso esperado (m/z 357) (Espectro 13b). En RMN ^1H se observan las señales del 2-(dietilamino)-2-oxoetoxilo a 1.02, 1.17, 3.28, 3.32 y 5.06 ppm; las señales de los hidrógenos aromáticos son las usuales (Espectro 14).

Para sintetizar el compuesto **7** se formó el cloruro de acilo del compuesto **1** con cloruro de tionilo. El cloruro de ácido se disolvió en piridina, los cuales forman el acilato de piridinio que es más reactivo que el cloruro de acilo. El acilato de piridinio reaccionó posteriormente con metilamina para formar el compuesto **7**.

Las bandas de IR para este compuesto a 3416 y 3262 cm^{-1} indican la presencia de un grupo amino y la banda a 1617 cm^{-1} corresponde al carbonilo de amida (Espectro 15a). En EM el ión molecular es de m/z 257 y se observa la pérdida del metilamino ($M^+ - 30$) (Espectro 15b). El espectro de RMN ^1H la señal del metilo de la amida aparece a 2.81 ppm y la señal del amino a 8.54 ppm (Espectro 16).

Al sintetizar el compuesto **19** se observó la formación parcial de la *N*-metilcarboxamida (Esquema 4.3). Al realizar la reacción de sustitución a una concentración más alta que la utilizada en la síntesis del compuesto **19** (0.9 M contra 3.5 M), se obtuvo principalmente el compuesto **21**. La reducción por hidrogenación catalítica de **21** y ciclación con anhídrido trifluoroacético en glima y como agente deshidratante PPA dio por resultado el compuesto **8**. El rendimiento total de la síntesis de **8** fue de 51 %. La elucidación estructural es similar a la del compuesto **7** (Espectros 17a, 17b y 18).

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación han hecho el cambio isostérico del anillo de bencimidazol por el anillo de benzoxazol. En este trabajo se sintetizaron dos benzoxazoles (**9**, **10**) análogos a los compuestos **2** y **5**.

La síntesis de **9** y **10** se realizó de la misma manera (Esquema 4.4). La materia prima **17** ó **22** fue esterificada utilizando el método de Fischer. Para **17** se utilizó metanol, ácido sulfúrico y 2,2-dimetoxipropano, este último para eliminar el agua de la reacción y desplazar el equilibrio hacia la derecha. La reacción procedió con buen rendimiento pero se obtuvieron impurezas oscuras que se eliminaron con carbón activado. Para **22** se utilizó más metanol y ácido sulfúrico,

sin emplear 2,2-dimetoxipropano, obteniéndose el éster con buen rendimiento, más limpio y en un tiempo menor.

La reducción del grupo nitro de **23** y **26** se realizó utilizando formiato de amonio y Pd/C al 10 % y la trifluoroacetilación con anhídrido trifluoroacético. La estructura de los compuestos **25** y **28** se establece mediante IR donde se observa una señal ancha correspondiente a hidroxilo a $3207\text{-}3240\text{ cm}^{-1}$.

La formación del anillo de oxazol para el compuesto **9** se realizó calentando a reflujo en glima y como agente deshidratante se utilizó pentóxido de fósforo. Al finalizar la reacción no se detectó materia prima. Se obtuvo el compuesto deseado con contaminantes de polaridad similar. La purificación por columna dio el producto puro, con un bajo rendimiento (38 %, Tabla 5.1). El compuesto se obtuvo como un sólido blanco con bajo punto de fusión, debido a que hay pocas interacciones entre las moléculas.

En IR aparecen señales de carbonilo a 1724 cm^{-1} y de trifluorometilo a 1102 cm^{-1} (Espectro 19a). El espectro de EM posee un M^+ de m/z 245, el cual es el esperado, y pérdidas de $M^+ - 31$ y $M^+ - 59$, correspondientes a la pérdida de metoxilo y metoxicarbonil respectivamente (Espectro 19b). En RMN ^1H muestra el sistema aromático ABX característico de toda la serie y la señal del O-metilo a 3.86 ppm (Espectro 20).

El compuesto **10** se cicló mediante calentamiento del compuesto **28** en presencia de PPA. Debido al bajo punto de fusión del compuesto fue posible utilizar un horno Kugelrohr. La reacción se llevó a cabo a presión reducida, de esta manera al formarse el compuesto se evaporó y fue arrastrado. El vapor del compuesto al pasar por los bulbos del horno, los cuales estaban refrigerados, sublimaron obteniéndose el benzoxazol, el cual presentó impurezas y un poco de materia prima.

Al tratar de sintetizar el compuesto **10** calentando con pentóxido de fósforo a reflujo en glima se observó que la formación del compuesto fue escasa.

En IR se observan bandas típicas del compuesto (carbonilo y trifluorometilo a 1722 y 1172 cm^{-1}) (Espectro 21a). En EM se aprecia un M^+ de m/z 245 y pérdidas de $M^+ - 31$ (Espectro 21b). En RMN ^1H se observan las señales esperadas

(Espectro 22).

6.2. Actividad giardicida

Los compuestos **3**, **4**, **6-10** son giardicidas (Figura 5.1, Tabla 5.3).

Al comparar la actividad de **1** (Tabla 5.3) con **BRR-A** (Tabla 1.2) se observa que el derivado *N*-metilado sólo es ligeramente más potente (1.1 veces) mientras que el derivado **4** (Tabla 5.3), que guarda una relación 1,6 entre el metilo y el ácido, es 9.1 veces más potente que **BRR-A** y **4** es 8.4 veces más activo que **1**. De lo anterior se deduce que los derivados *N*-metilados son más potentes que el compuesto **BRR-A** y que los compuestos con relación entre el *N*-metilo y el grupo del anillo de benceno 1,6 son más potentes que los 1,5 para estos compuestos.

Los ésteres metílicos **2** y **5** no fueron mejores que **BRR-A**. De hecho, el compuesto **8** fue el compuesto menos eficaz de la serie. En este par de compuestos, el que posee la relación 1,5 es más efectivo que el 1,6. Por otro lado, los derivados *N*-metilados fueron menos potentes que el compuesto 1*H*-bencimidazólico (Compuesto **X**, Tabla 1.2).

Los ésteres de 2-dietilamino-2-oxoetilo (**3** y **6**) muestran un comportamiento interesante frente a este parásito. El derivado **3** es 3.6 veces más potente que el derivado **6**. El compuesto con relación 1,5 es más eficaz y ambos son más potentes que su derivado 1*H*-bencimidazólico (Compuesto **XI**, Tabla 1.2).

La *N*-metilamida **8** es 2 veces más potente que el derivado **7** y el compuesto **10** es 3 veces más potente que el derivado **9**.

Con los resultados obtenidos se apoya el concepto de que los bencimidazoles *N*-metilados son más potentes contra *G. intestinalis* que los análogos 1*H*-bencimidazólicos y que los compuestos con relación 1,6 entre el grupo *N*-metilo y el sustituyente del anillo de benceno son más activos que los compuestos con relación 1,5; inclusive para los derivados benzoxazólicos (Tabla 5.3, Figura 5.1).

Una excepción a lo anterior fueron los compuestos **2**, **3**, **5** y **6** donde se observó lo contrario en cuanto a la isomería y la actividad. Para los compuestos **3** y **6**, la diferencia entre estos compuestos con los demás bencimidazoles es el

tamaño del sustituyente del anillo de benceno y la presencia de dos grupos carbonilos. No se puede afirmar con los compuestos sintetizados en este trabajo cual de las diferencias estructurales mencionadas es la más importante.

Para los compuestos **2** y **5** el compuesto con relación 1,5 es más activo. Posiblemente la presencia de un grupo éster es un factor importante para que los isómeros 1,5 sean más potentes. Es necesario realizar más estudios para definir la importancia de los sustituyentes del anillo de benceno y la actividad entre isómeros *N*-metilados.

La síntesis de compuestos benzoxazólicos, donde se realiza el reemplazo isostérico del anillo bencimidazólico, ha dado por resultado compuestos con poca potencia contra *G. intestinalis*. Sólo algunos benzoxazoles poseen actividad contra *G. intestinalis*; por ejemplo, el 2-metilbenzoxazol posee un CI_{50} de 0.82 μ M y el 2-etoxibenzoazol una CI_{50} de 0.68 μ M. El 2-(trifluorometil)benzoxazol posee una CI_{50} de 3.68 μ M.

Los compuestos **9** y **10** son 6.77 y 20.33 más potentes que el metronidazol respectivamente, siendo el compuesto **10** el benzoxazol más potente de todos los sintetizados hasta el momento, lo que abre una nueva posibilidad en la síntesis de nuevos compuestos contra *G. intestinalis*.

Los derivados **9** y **10** son los primeros benzoxazoles sintetizados en nuestro grupo de trabajo que presentan un grupo carbonilo en posición 5 ó 6, lo cual indica que este grupo puede ser importante en este tipo de compuestos para la actividad giardicida.

La influencia de la isomería en los derivados benzoxazólicos puede indicar que el mecanismo de acción de estos compuestos es similar al de los derivados bencimidazólicos.

Todos los compuestos sintetizados son menos activos que el albendazol (Figura 5.1). Sin embargo, los compuestos sintetizados son más solubles en agua que el albendazol. Aunque la determinación experimental de la solubilidad no se realizó, fue posible elaborar soluciones 100 μ M de estos compuestos en solución de Hank mientras que con el albendazol no se logró.

La solubilidad en agua hace posible obtener concentraciones más altas de

estos compuestos en el lumen intestinal y ejercer un mayor efecto contra el parásito.

6.3. Permeabilidad

El interés de este trabajo es obtener compuestos con afinidad por la P-gp. De esta manera el bencimidazol permanece en el intestino delgado por más tiempo actuando contra *G. intestinalis* y de esta manera disminuir la posología de los compuestos, lo cual tiene como consecuencia que el paciente siga el tratamiento adecuadamente y que éste tenga un costo menor.

Se ha establecido que un compuesto que es sustrato de la P-gp posee por lo menos dos átomos aceptores de puentes de hidrógeno separados por una distancia intramolecular específica (Seelig, 1998).

Por otro lado, se observó que el sulfóxido de albendazol está sujeto a un proceso de reflujo activo a través del intestino de rata, mientras que el albendazol no (Redondo y col, 1999). La presencia del sulfóxido fue suficiente para que el metabolito del albendazol posea reflujo, por esta razón los compuestos sintetizados poseen un grupo carbonilo en posición 5 ó 6.

Los compuestos cuya Papp se evaluó son estructuralmente similares (Figura 4.1). La distancia intermolecular entre el grupo carbonilo y los nitrógenos del anillo de imidazol se estimó con el programa ACD/3D versión 4.52. Los compuestos **1**, **4**, **7** y **BRR-A** muestran distancias intermoleculares que corresponden a un patrón de reconocimiento de la P-gp tipo 2 (Figura 1.6), con valores entre 5.27 y 5.28 Å entre el grupo carbonilo y el nitrógeno en posición 1 (para **1**, **7** y **BRR-A**) ó 3 (para **4**) del imidazol.

La Papp de los compuestos se determinó utilizando la línea celular Caco-2 utilizando como medio de transporte solución de Hank a pH 6.0. Con lo anterior se asegura que el ácido carboxílico se encuentre principalmente protonado. Por otro lado, este valor de pH refleja mejor las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal.

Durante el experimento se mantuvieron condiciones "sink", de esta manera

se evita que el compuesto del lado receptor regrese al lado donador. Las condiciones "sink" se obtienen cambiando el medio del lado receptor antes de que pase el 10 % del fármaco del lado donador (Figura 5.2).

Los valores de TEER obtenidos están en el rango de 126 a 182 $\Omega \text{ cm}^2$ (promedio 146 $\Omega \text{ cm}^2$), los cuales son valores bajos de TEER; sin embargo, están dentro de lo reportado (Tukker, 2000). Una prueba definitiva de la integridad de las monocapas fue el valor obtenido con el marcador LY que se encuentra en el rango de 0.8 a $7.9 \times 10^{-7} \text{ cm seg}^{-1}$, lo cual indica que las monocapas son uniformes. Por lo tanto, en este estudio el uso de marcadores hidrofílicos fue más útil para determinar la integridad de las monocapas que los valores de TEER.

Los valores de Papp obtenidos para el compuesto BRR-A predicen que este compuesto se absorberá pobremente *in vivo*, los compuestos **1**, **4** y **ABZ** se absorberán moderadamente y el compuesto **7** se absorberá adecuadamente (Tabla 5.6).

Comparando los valores de Papp de los compuestos **1**, **4**, **7** y **BRR-A** se observa que la metilación en la posición 1 aumenta la permeabilidad y la sustitución del grupo ácido por un grupo amida genera compuestos que se absorben bien. El compuesto **BRR-A** es un compuesto pequeño y polar por lo que cabe la posibilidad de que se absorba principalmente por vía paracelular. Al aumentar el volumen de la molécula aumenta su permeabilidad. Para los ácidos (**1**, **4** y **BRR-A**) al aumentar el logP aumenta la permeabilidad, Sin embargo, para el compuesto **7**, el compuesto que tiene una Papp mayor, el logP es menor que en todas las moléculas probadas (Tabla 5.6), lo cual indica que el grupo ácido no es favorable en la permeabilidad.

Considerando estos resultados, es posible que los compuestos **2** y **5** se absorban mejor que **1**, **4** e inclusive **7**, debido a que el grupo amida posee momento dipolo que aumenta la polaridad de este tipo de compuestos, fenómeno que no se presenta en los ésteres.

El valor de Papp tanto AB como BA del compuesto **ABZ** fue diferente a otra determinación utilizando la misma cepa de la línea celular Caco-2. (Morales-Hurtado R., 2000). En el trabajo anterior se obtuvieron valores de Papp del orden

de 10^{-5} y en este estudio el valor fue del orden de 10^{-6} . La única diferencia en las condiciones del experimento fue el pH, lo que indica que la Papp de **ABZ** es dependiente de pH y probablemente también su absorción *in vivo*.

La elección de los compuestos a medir la Papp fue anterior a conocer la actividad giardicida, por lo que hubiera sido más interesante conocer la Papp del compuesto **10**.

Todos los compuestos fueron absorbidos por procesos pasivos pues la relación BA/AB en ningún caso fue mayor a 3 (Tabla 5.6). Estos compuestos por ser ácidos monocarboxílicos pueden ser sustratos para el transportador de ácidos monocarboxílicos (MCT1), el cual transporta ácidos pequeños protonados como el ácido acético, salicílico y benzoico. Sin embargo los compuestos se absorben del lado apical al basal pasivamente.

Por otro lado, las células Caco-2 permiten observar la influencia de los sistemas de reflujo, principalmente la P-gp. La relación BA/AB en ningún caso fue mayor a 3 (Tabla 5.6), por lo que no son sustratos de P-gp u otro sistema de reflujo localizado en la parte apical de la célula (Morales-Hurtado, 2000). Como se mencionó estos poseen patrones estructurales que indican la posibilidad de estos compuestos de ser sustratos de la P-gp. La presencia de solo dos átomos aceptores de hidrógeno con una distancia adecuada no es suficiente para que los compuestos se unan a la P-gp y si lo hacen la unión es débil y no se realiza el transporte.

Los compuestos sintetizados en este trabajo poseen actividad giardicida, sin embargo no fueron sustratos de la P-gp. Hasta el momento los compuestos bencimidazólicos que han sido sustrato de la P-gp tienen en posición 2 un grupo 2-metoxicarbonilamino (Nare y cols., 1994) indicando la necesidad de este grupo en la afinidad por el transportador. Sin embargo, el grupo 2-metoxicarbonilamino hace que los compuestos sean menos solubles en agua.

7. Conclusiones

- Se obtuvieron los compuestos **1-10** con rendimientos aceptables.
- Los compuestos fueron activos contra *G. intestinalis*, la mayoría más que el metronidazol, siendo el compuesto **10** el más activo de la serie.
- Los compuestos con relación 1,6 entre el grupo *N*-metilo y el grupo carbonilo son más activos que sus isómeros con relación 1,5, excepto para los compuestos **2, 3, 5 y 6**.
- Los compuestos **1, 4, 7, BRR-A y ABZ** se absorben por difusión pasiva.
- Los compuestos **1, 4, 7, BRR-A y ABZ** no son sustratos de sistemas de reflujo.
- Según el valor de Papp se puede decir que: el compuesto **BRR-A** se absorbe pobremente, los compuestos **1 y 4** se absorben poco o moderadamente y el compuesto **7** se absorbe bien.
- Para los compuestos **1, 4, 7 y BRR-A**, la *N*-metilación en la posición 1 aumenta la permeabilidad y la sustitución del grupo ácido por un grupo amida genera compuestos que se absorben adecuadamente.

Con lo anterior se puede descartar la hipótesis planteada.

Apéndice 1. Parte química

Las reducciones por hidrogenación catalítica se llevaron a cabo en un hidrogenador Parr modelo 3916 EG. Las reacciones de sustitución aromática se realizaron en un reactor Parr de 300 mL serie 4561 con controlador Parr serie 4842. Para realizar la síntesis del compuesto **10** se utilizó un horno de vidrio Kugelrohr Büchi modelo B-580. El punto de fusión se determinó en capilares en un aparato Büchi B-540. Los disolventes se evaporaron en un rotavapor marca Büchi modelo R-114 acoplado a una bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F y a un refrigerante de inmersión VWR Scientific modelo 1107. La cromatografía de capa fina analítica fue llevada a cabo en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor GF-254 (Merck) y la cromatografía en columna se realizó con gel de sílice 60 (Merck) con tamaño de partícula de 0.063-0.2000 mm y malla ASTM 70-230.

A.1.1. Obtención de los compuestos 1, 2, 3 y 7

A.1.1.1. Síntesis de ácido 4-acetamidobenzoico (12). En un matraz bola de 500 mL con una boca, adaptado con embudo de adición y trampa de humedad, se disolvieron 15 g (0.109 moles) de ácido *p*-aminobenzoico (**11**) en 150 mL de acetona. Se colocó un baño de hielo y adicionó lentamente 17.87 g (16.5 mL, 0.12 moles, 1.6 eqs.) de anhídrido acético. Después de algunos minutos de finalizada la adición se observó la precipitación de un sólido color blanco. La mezcla de reacción se agitó por una hora más y el sólido obtenido se separó por filtración al vacío, la acetona se evaporó obteniéndose de esta manera más sólido. Los sólidos se reunieron y mezclaron con 15 mL de benceno, se filtró la mezcla al vacío, se lavó el sólido con benceno frío y secó al aire. Se obtuvieron 18.61 g de un polvo blanco (95%). Punto de fusión. 259-262 °C, R_f 0.4 (CHCl_3 , MeOH 80:20). Recristalizar el producto de etanol-agua no mejora el punto de fusión.

A.1.1.2. Síntesis de ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (13). En un vaso de precipitados, acondicionado con termómetro, agitación magnética, baño de hielo-agua y embudo de adición, se vertieron 20 mL de H_2SO_4 y se disolvieron lentamente 5 g (0.022 moles) de ácido 4-acetamidobenzoico (**12**). Por otro lado se

preparó una mezcla de 7.75 g (5.54 mL, 0.123mmoles, 4.4 eqs.) de HNO₃ y 10.153 g (5.6 mL, 0.1036 moles) de H₂SO₄ previamente enfriados en baño de hielo-sal. La mezcla sulfonítrica se adicionó lentamente a la solución del ácido cuidando que la temperatura no sobrepasara los 10 °C. Al finalizar la adición, la mezcla se agitó durante 1 hora entre 5 y 7 °C y vertió sobre 80 g de hielo picado. Se observó la solidificación del producto al agitar, el producto obtenido se separó por filtración al vacío y lavó tres veces con 100 mL de agua fría.

El sólido se secó al vacío obteniéndose 5.03 g (80.2%) de un polvo amarillo, se recristalizó una pequeña porción de metanol-agua obteniéndose cristales finos de color amarillo. Punto de fusión 217.6-221.6 °C, R_f 0.55 (CHCl₃-MeOH 90:10).

A.1.1.3. Síntesis de ácido 4-(metilamino)-3-nitrobenzoico (15). En un matraz tapler de 125 mL con tres bocas, adaptado con termómetro, agitación magnética y embudo de adición, se colocaron 5 g (0.022 moles) de ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (13) y suspendieron en 8 mL de acetona. Se adicionaron 1.355 g (0.0242 moles, 1.1 eqs.) de KOH al 25 % y 2.77 g (2.1 mL, 0.022 moles, 1 eq) de sulfato de dimetilo. Se agitó vigorosamente por 1 hora a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se calentó a 32 °C y se adicionaron 7.4 g (6 mL, 0.063 moles, 3 eqs.) de sulfato de dimetilo y la mezcla se agitó 5 minutos más. Aparte se preparó una disolución de 3.53 g (0.063 moles, 3 eqs.) de KOH en 3.5 mL de agua. La solución de potasa se adicionó lentamente a la suspensión a razón de una gota cada 5-7 min cuidando que la temperatura de la reacción no superara los 34 °C. Al finalizar la adición de la potasa se continuó agitando la solución por media hora más.

Al concluir la reacción la mezcla fue de color naranja y se vertió sobre 40 mL de agua-hielo. Se observó un compuesto líquido en el fondo, el cual se colocó en un embudo de separación y lavó con agua hasta que se tornó amarillo claro. Las aguas de lavado se extrajeron con CH₂Cl₂. Se evaporó el cloruro de metileno, se reunieron las fracciones y secaron con Na₂SO₄ anhidro obteniéndose 5.0 g (94.4 %) de un líquido amarillo claro, R_f 0.09 (CHCl₃:MeOH 99.5:0.5), el cual se sometió a hidrólisis básica sin más purificación.

La hidrólisis se realizó de la siguiente manera: En un vaso de precipitados de 200 mL, adaptado con baño de agua, termómetro y agitación magnética, se colocaron 10 g (0.039 moles) de 3-nitro-4-(acetil(metil)amino) benzoato de metilo (**7**) y se suspendieron en 30 mL de metanol. Se agregaron 5.55 g (0.139 moles, 3.5 eqs.) de NaOH al 50% y se agitó la mezcla durante 15 horas a 30 °C. La mezcla se acidificó hasta pH 6 y el sólido formado se separó por filtración. El producto se recristalizó de etanol obteniéndose 7.58 g (97.8 %, rendimiento total 92 %) de cristales amarillos. Punto de fusión 307-307.2 °C, R_f 0.52 (CHCl₃-MeOH 99.5:0.5).

A.1.1.4. Síntesis de ácido 3-amino-4-(metilamino)benzoico (16). En un matraz bola de 200 mL con 2 bocas, adaptado con trampa de nitrógeno, septo y agitación magnética, se suspendieron 6 g (0.030 moles) de ácido 4-(metilamino)-3-nitrobenzoico (**15**) en 30 mL de metanol. Se agregaron 0.6 g de Pd/C al 10% y se saturó la atmósfera de nitrógeno. Se disolvieron 5 g (0.153 moles, 5 eqs.) de formiato de amonio en 40 mL de metanol caliente. La disolución de formiato de amonio se inyectó lentamente por el septo, la reacción es efervescente y exotérmica por lo que se purgó el matraz cuando fue necesario. Al finalizar la adición, la reacción se agitó por 15 minutos más. Se filtró el metanol sobre celita.

La celita se lavó con metanol y el metanol se concentró en el rotavapor. Se obtuvo un sólido color rojizo, el cual se suspendió en 10 mL de agua y separó por filtración. El producto se secó al aire. Se obtuvieron 3.81 g (75 %) de un sólido rojizo el cual sin más purificación se utilizó en la siguiente reacción.

A.1.1.5. Síntesis de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazol-carboxílico (1). En un matraz de 200 mL con una boca, con condensador en posición de reflujo, trampa de nitrógeno y agitación magnética, se colocaron 3.4 g (0.02 moles) de ácido 3-amino-4-(metilamino)benzoico (**16**), 3.5 g (2.3 mL, 0.031 moles, 1.5 eqs.) de ácido trifluoroacético, 15 mL de ácido clorhídrico concentrado y 8 mL de agua. Se creó una atmósfera de nitrógeno y calentó a reflujo por 24 horas.

La mezcla de reacción se enfrió y el sólido formado se separó por filtración al vacío. El filtrado se neutralizó y extrajo con acetato de etilo. El sólido que se

obtuvo de la reacción se disolvió en acetato de etilo. Todas las fracciones de acetato de etilo se reunieron y pasaron a través de una capa de alumina.

Se evaporó el acetato de etilo para obtener un sólido café el cual se decoloró con carbón activado. Se obtuvo un sólido color crema que se repulpó en benceno para obtener un sólido blanco que se recrystalizó de nitrometano. Se obtuvieron 2.99 (60%) g de un polvo blanco con punto de fusión de 252.4-254.3 °C, R_f 0.53 (CHCl₃-MeOH 90:10).

A.1.1.6. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxilato de metilo (2). En un matraz de 25mL con boca, acondicionado con agitación magnética, se disolvieron 0.5 g (0.002 moles) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxílico (1) en 4 mL de dimetilformamida. Se agregó una suspensión de 0.36 g (0.0044 moles, 2.2 eqs.) de NaHCO₃ en 1 mL de agua y cuando cesó el desprendimiento de CO₂ se agregaron 0.283 g (0.21 mL, 0.283 g, 1.1 eqs.) de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agitó por una hora. Transcurrido este tiempo, el contenido del matraz se vertió sobre 30 mL de agua fría.

El sólido formado se separó por filtración al vacío y secó al aire. El producto se recrystalizó de dimetilformamida-agua obteniéndose 0.438 g (82.9 %) de cristales de color blanco. Punto de fusión 121.9-122.2 °C, R_f 0.4 (Hexano-Acetato de etilo 70:30).

A.1.1.7. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (3). En un matraz de 50 mL con una boca, adaptado con agitación magnética y trampa de humedad, se disolvieron 1.5 g (0.0061 moles) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxílico (1) en 10 mL de dimetilformamida R.A. y 1.37 g (0.0135 moles, 2.2 eqs.) de trietilamina. Se agregaron 0.1 g (0.00061 moles, 0.1 eqs.) de yoduro de potasio y 0.99 g (910 µL, 0.0067 moles, 1.1 eqs.) de 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida.

El matraz se protegió de la luz y la mezcla de reacción se agitó por 24 horas. Al finalizar la reacción, se preparó una solución diluida de NaHCO₃ en agua y la mezcla de reacción se vertió sobre ésta con agitación vigorosa. Se observa la formación de un sólido que se separó por filtración al vacío. El producto se

recristalizó de acetonitrilo-agua obteniéndose 1.661 g (76%) de hojuelas blancas. Punto de fusión 97-97.9 °C, R_f 0.39 (CHCl_3 -MeOH 90:10).

A.1.1.8. Síntesis de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazol-carboxamida (7). En un matraz de 100 mL con una boca, adaptado con agitación magnética, trampa de humedad, condensador en posición de reflujo, baño de agua y trampa de absorción de gases, se agregaron 1.5 g (0.0061 moles) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxílico (**1**) y 5 mL de cloruro de tionilo. La mezcla se calentó a reflujo hasta que cesó la liberación de gases. El excedente de cloruro de tionilo se destiló y se adicionaron 20 mL de benceno, los cuales se destilaron casi a sequedad.

Se adicionaron 13 mL de piridina fría y se agitó hasta la disolución del cloruro de ácido. Se enfrió la disolución en un baño de agua hielo y se agregaron 0.913 g (0.0135 moles. 2.2 eqs.) de clorhidrato de metilamina y 2 mL de trietilamina. La mezcla se agitó por una hora.

Después de este tiempo, la reacción procedió en su totalidad. La mezcla de reacción se vertió sobre 50 mL de HCl 3 N y agitó vigorosamente, el sólido formado se separó por filtración, lavó con agua carbonatada y por último con agua hasta pH neutro.

Se obtuvieron 1.3 g (82 %) de un polvo blanco, el cual se recristalizó de metanol-agua para obtener 1.196 g (75.4 %) de cristales color blanco. Punto de fusión 177.1-178.1 °C, R_f 0.35 (CHCl_3 -MeOH 90:10).

A.1.2. Obtención de los compuestos 4, 5, 6 y 8

A.1.2.1. Síntesis de 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (18). En un matraz de 250 mL con dos bocas, adaptado con embudo de adición, condensador en posición de reflujo, agitación magnética y canastilla de calentamiento, se colocaron 5 g (0.027 moles) del ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico (**17**) disueltos en 50 mL de acetona. Se agregó una solución de 2.38 g (0.059 moles, 2.2 eqs.) de NaOH en 25 mL de agua con agitación vigorosa, se observó la formación de una sal de color rojo. Por medio del embudo de adición se agregó lentamente 10.22 g

(7.6 mL, 0.081 moles, 3 eqs.) de sulfato de dimetilo, con agitación vigorosa. Después de finalizar la adición, se agitó por media hora más a temperatura ambiente. Para completar la metilación se agregaron 5 g (0.047 moles, 1.7 eqs.) de Na_2CO_3 y se calentó a reflujo por dos horas o hasta que la reacción se tornó de color amarillo pálido y el pH aún fuera básico. La mezcla de reacción se vertió sobre 100 g de hielo picado, se agitó hasta que el líquido del fondo solidificó y se verificó que el pH del agua fuera básico. El sólido obtenido se separó por filtración y lavó con agua hasta pH neutro.

Se obtuvieron 5.175 g (89.7%) de un sólido amarillo paja el cual se recrystalizó de etanol-agua para obtener 5.04 g de cristales amarillo paja (87.5%). Punto de fusión 91.4-92.8 °C, R_f 0.63 (CHCl_3 -acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6).

A.1.2.2. Síntesis de ácido 3-(metilamino)-4-nitrobenzoico (19). En un reactor Parr de 300 mL se colocaron 14 g (0.066 mmoles) de 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (18) y se suspendieron en 200 mL de etanol. Se agregaron 74.2 mL de metilamina al 33% en etanol (0.265 moles, 4 eqs.). El reactor se cerró herméticamente y la presión interna se aumentó con nitrógeno a aproximadamente 160 lb/in².

Se calentó la reacción durante 5.5 horas a 130 °C. Al finalizar, la mezcla de reacción se colocó en un matraz con 1 boca de 500 mL y se evaporó el disolvente. Se agregaron 250 mL de una solución de KOH al 10 % en etanol y se calentó a reflujo durante 5 horas. Al concluir el reflujo se evaporó la mayor parte del disolvente y reemplazó con agua.

La disolución que contenía al compuesto se acidificó hasta pH 6 con ácido sulfúrico al 20 % y el precipitado formado se separó por filtración. El sólido se lavó con agua. El material resinoso que contenía el producto se eliminó calentando ligeramente con carbón activado en etanol.

El carbón activado se separó filtrando sobre celita. El etanol que contenía el compuesto se evaporó al vacío. El producto se recrystalizó de etanol-agua. Se obtuvieron 10.07 g (77.5 %) de un sólido naranja con punto de fusión de 269.9-271.0 °C (con descomposición), R_f 0.5 (CHCl_3 -MeOH 90:10).

A.1.2.3. Síntesis de ácido 4-amino-3-(metilamino)benzoico (20). En un matraz de hidrogenación de 300 mL se colocaron 5.6 g (0.028 moles) de ácido 3-(metilamino)-4-nitrobenzoico (19) y 0.5 g de Pd/C al 5 %. Los sólidos se suspendieron en 100 mL de metanol absoluto y se burbujeó nitrógeno para eliminar el aire presente en el matraz.

Se adaptó el matraz a un aparato de hidrogenación Parr y se saturó la atmósfera del matraz con hidrógeno. Se consumieron 108.5 lb/in² de hidrógeno en 30 min. La mezcla de reacción se filtró al vacío sobre celita lavando esta última con 4 porciones de 10 mL de metanol. Se concentró el disolvente y se obtuvieron 4.5 g (97 %) de un sólido color rojizo, presentó una sola mancha en cromatografía en capa fina, sin más purificación se utilizó en la siguiente reacción.

A.1.2.4. Síntesis del ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazol-carboxílico (4). En un matraz de 200 mL con una boca, adaptado con agitación magnética, baño de agua, trampa de nitrógeno y condensador en posición de reflujo, se colocaron 4.19 g (0.0252 moles) de ácido 4-amino-3-(metilamino)benzoico (20), 20 mL de glima, 3 g de PPA y 7.95 g (5.4 mL, 0.0379 moles, 1.5 eqs.) de anhídrido trifluoroacético.

La mezcla se calentó a 80 °C. Después de 12 horas, la reacción procedió en su totalidad. Se adicionaron 40 mL de agua y el pH de la reacción se aumentó a 5-6 con una solución saturada de Na₂CO₃. El sólido formado se separó por filtración, las aguas madres se extrajeron con acetato de etilo el cual se evaporó para obtener otra fracción de sólido. Los sólidos obtenidos, de color púrpura, se reunieron y disolvieron en metanol, posteriormente se decoloraron con carbón activado.

Después de decolorar y evaporar el disolvente se obtuvo un sólido color rosáceo que se disolvió en acetato de etilo. El compuesto disuelto en acetato de etilo se pasó por una columna de alumina, al evaporar el disolvente se obtuvieron 5.3 g de un sólido color café claro, que presentaba varias impurezas. El sólido se recrystalizó de isobutanol para obtener 3.72 g (61 %) de un polvo color blanco amarillento que presento una mancha en cromatografía en capa fina. Punto de fusión 270.1-272.7 °C, R_f 0.53 (CHCl₃-MeOH 90:10).

A.1.2.5. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazolcarboxilato de metilo (5). Se procedió igual que en la síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxilato de metilo (2) (Sección A.1.1.6.), pero utilizando como materia prima el ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazolcarboxílico (4). El sólido obtenido se recrystalizó de dimetilformamida-agua para obtener 0.445 g (84.2 %) de un sólido blanco amarillento. Punto de fusión 107.1-107.5 °C, R_f 0.4 (Hexano-Acetato de etilo 70:30).

A.1.2.6. Síntesis de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (6). En un matraz de 25 mL con una boca, adaptado con agitación magnética y trampa de humedad, se disolvieron 1.5 g (0.0061 moles) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazolcarboxílico (4) en 8 mL de dimetilformamida y 0.684 g (0.95 mL, 0.01353 moles, 2.2 eqs.) de trietilamina.

Se agregaron 0.99 g (910 μ L, 0.0068 moles, 1.1 eqs.) de 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida y 0.1 g (0.00061 moles, 0.1 eqs.) de yoduro de potasio. La mezcla de reacción se agitó por 4 horas a temperatura ambiente, después de éste tiempo no se detectó materia prima.

La mezcla de reacción se vertió sobre 50 mL de hielo picado y se formó un sólido rosáceo. El producto obtenido se recrystalizó de dimetilformamida-agua. Se obtuvieron 1.82 g (83 %) de un polvo blanco. Punto de fusión 115.7-116.0 °C, R_f 0.62 (CHCl₃-MeOH 90:10).

A.1.2.7. Síntesis de *N*-metil-3-(metilamino)-4-nitrobenzamida (21). En un reactor Parr de 300 mL se colocaron 5 g (0.023 moles) de 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (18), 26.15 mL de metilamina al 33 % en etanol (0.095 moles, 4 eqs.) y 4 mL de etanol. El reactor se cerró herméticamente y la presión interna se aumentó a 160 lb/in² con nitrógeno.

La mezcla se calentó a 130 °C por 6.5 horas. Después de este tiempo no se detectó materia prima. Se dejó enfriar el reactor durante la noche y se observó la formación de cristales color naranja.

Los cristales se rasparon y separaron por filtración, el sólido se lavó con agua y secó al vacío. Se obtuvieron 4.2 g (84 %) de cristales color naranja que presentan una sola mancha por cromatografía en capa fina. Punto de fusión

192.2-193.7 °C, R_f 0.33 (CHCl_3 -MeOH 99:1).

A.1.2.8. Síntesis de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxamida (8). En un matraz de hidrogenación de 300 mL se colocaron 2.5 g (0.012 moles) de *N*-metil-3-(metilamino)-4-nitrobenzoico (**21**) y 0.2 g de Pd/C al 5 %. Los sólidos se suspendieron en 50 mL de metanol absoluto y se burbujeó nitrógeno para eliminar el aire presente en el matraz.

Se adaptó el matraz a un aparato de hidrogenación Parr y se saturó la atmósfera del matraz con hidrógeno. Se consumieron 31 lb/in² de hidrógeno en 25 min. La mezcla de reacción se filtró al vacío sobre celita lavando esta última con 5 porciones de 5 mL de metanol. Se concentró el disolvente y se obtuvieron 2.1317 g (99.5 %) de un sólido color rojizo, presentó una sola mancha en cromatografía en capa fina, obteniéndose la *N*-metil-4-amino-3-(metilamino)benzamida .

En un matraz bola de 100 mL con una boca, adaptado con condensador en posición de reflujo, agitación magnética, canastilla de calentamiento y trampa de nitrógeno, se disolvieron 2.13 g (0.0119 moles) de *N*-metil-4-amino-3-(metilamino)benzamida en 5 mL de glima, se añadieron 2 g de PPA y 3.69 g (2.4 mL, 0.0176 moles, 1.5 eqs.) de anhídrido trifluoroacético y calentó a 80 °C durante dos horas.

Al finalizar la reacción, se adicionaron 50 mL de agua y se aumentó el pH de la mezcla a 5-6 con una solución saturada de Na_2CO_3 . El sólido obtenido, de color violeta, se filtró al vacío y disolvió en metanol. El sólido se decoloró con carbón activado, se concentró el disolvente y se obtuvo un sólido color café. Éste último se disolvió en acetato de etilo y se hizo pasar por una cama de alumina. El acetato de etilo se lavó con agua carbonatada y secó con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el disolvente y se obtuvo un sólido amarillento.

El sólido se recristalizó de acetato de etilo obteniéndose 2.08 g (69.17 %) de agujas de color blanco. Punto de fusión 218.0-218.8 °C, R_f 0.35 (CHCl_3 -MeOH 90:10).

A.1.3. Obtención de 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9)

A.1.3.1. Síntesis de 4-hidroxi-3-nitrobenzoato de metilo (23). En un matraz de 100 mL con una boca, adaptado con refrigerante en posición de reflujo, canastilla de calentamiento y trampa de humedad, se colocaron 5 g (0.027 moles) de ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoico (22), 25 mL de metanol R. A., 0.5 mL de H₂SO₄ y 5.62 g (6.6 mL, 0.054 moles, 2 eqs.) de 2,2-dimetoxipropano. La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 5 horas.

La mezcla de reacción se vertió sobre agua fría y el polvo formado, de color verde oscuro, se separó por filtración al vacío. El sólido se disolvió en etanol y decoloró con carbón activado. Se evaporó el disolvente y el sólido se recristalizó de metanol-agua obteniéndose 4.95 g (93 %) de cristales color verde. Punto de fusión 74.3-75.1 °C, R_f 0.57 (CHCl₃-acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6).

A.1.3.2. Síntesis de 3-amino-4-hidroxibenzoato de metilo (24). En un matraz tapler de 50 mL con tres bocas adaptado con septo, tapón de rosca y trampa de nitrógeno, se colocó 1 g (5.07 mmoles) de 4-hidroxi-3-nitrobenzoato de metilo (23) y 0.1 g de Pd/C al 10 %, se agregaron 15 mL de metanol para formar una suspensión homogénea. El aire se purgó creándose una atmósfera de nitrógeno. Se disolvieron 1.6 g (25 mmoles, 5 eqs.) de formiato de amonio en 10 mL de metanol caliente y la disolución se agregó lentamente a la reacción evitando que la presión dentro del matraz aumentara demasiado, lo cual se logró purgando con el tapón de rosca.

Al finalizar la adición, la mezcla se agitó por 10 minutos y el catalizador se separó filtrando sobre celita. El disolvente se evaporó y el sólido obtenido se disolvió en 30 mL de acetato de etilo, se lavó con 3 mL de agua y secó con sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó y se obtuvieron 0.83 g (97 %) de un polvo color café, el cual sin más purificación se sometió a la siguiente reacción.

A.1.3.3. Síntesis de 4-hidroxi-3-[(trifluoroacetil)amino] benzoato de metilo (25). En un matraz de 25 mL con una boca, adaptado con condensador en

posición de reflujo, agitación magnética y trampa de humedad, se suspendieron 0.83 g (4.97 mmoles) de 4-hidroxi-3-aminobenzoato de metilo (**24**) en cloruro de metileno y se agregaron 1.14 g (0.8 mL, 5.46 mmoles, 1.1 eqs.) de anhídrido trifluoroacético. Se agitó la mezcla vigorosamente por 30 minutos y después se calentó a reflujo por 2 horas.

Se evaporaron todas las sustancias volátiles con el rotavapor y se disolvió el sólido obtenido en 30 mL de acetato de etilo. El acetato de etilo se filtró a través de alumina obteniéndose 0.94 g (72 %) del producto deseado con suficiente pureza para realizar la siguiente reacción.

Se recrystalizó una pequeña parte de etanol-agua y se obtuvieron cristales blancos con punto de fusión de 219.7-220.3 °C. R_f 0.33 (CHCl₃-acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6).

A.1.3.4. Síntesis de ácido 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9). En un matraz bola de 15 mL con una boca, adaptado con condensador en posición de reflujo y agitación magnética, se colocaron 0.8 g (3.04 mmoles) de 4-hidroxi-3-[(trifluoroacetil) amino]benzoato de metilo (**25**), 3.5 mL de diglima y 2 g de pentóxido de fósforo.

La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 4 h, después de este tiempo no se detectó la materia prima. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y concentró a sequedad. El sólido obtenido se extrajo con hexano y se purificó la mezcla de productos por cromatografía en columna (hexano-acetato de etilo 99:1). Se obtuvieron 0.28 g de un sólido blanco (37.73 %). punto de fusión 51-52 °C, R_f 0.69 (CHCl₃-acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6).

A.1.4. Obtención del ácido 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxílico (10)

A.1.4.1. Síntesis de 3-hidroxi-4-nitrobenzoato de metilo (26). En un matraz bola de 250 mL con una boca, adaptado con condensador en posición de reflujo, canastilla de calentamiento y trampa de humedad, se colocaron 5 g (0.027 moles) del ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico(**17**) y 50 mL de metanol absoluto. Se adicionaron lentamente 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y la mezcla se

calentó durante 3.5 h. Se apagó el calentamiento y el producto se dejó recrystalizar en el seno de la reacción. Los cristales obtenidos se filtraron y lavaron con agua obteniéndose 5.2 g (96.65 %) de un polvo amarillo claro. Punto de fusión 90.3-90.6 °C, R_f 0.61 (CHCl₃-acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6).

A.1.4.2. Síntesis de 4-amino-3-hidroxibenzoato de metilo (27). En un matraz tapler de 100 mL con 3 bocas, acondicionado con atmósfera de nitrógeno, agitación magnética y septo, se agregaron 2 g (0.01 moles) de 3-hidroxi-4-nitrobenzoato de metilo (26) y 0.2 g de Pd/C al 5 % suspendidos en 10 mL de metanol. Por otro lado, se disolvieron 3.2 g (0.05 moles, 5 eqs.) de formiato de amonio en 25 mL de metanol caliente.

La disolución de formiato de amonio se inyectó lentamente a la suspensión contenida en el matraz tapler, la cual previamente se enfrió en baño de hielo-agua. Al finalizar la adición se dejó agitando por 10 min más. La mezcla de reacción se filtró sobre celita y esta última se lavó con 3 porciones de 5 mL de metanol. Se evaporó el disolvente y el sólido formado se disolvió en acetato de etilo. La disolución hecha con el acetato de etilo se lavó con agua, secó con sulfato de sodio y concentró al vacío. Se obtuvieron 1.54 g (91.1%) de un sólido café que presentó una mancha por cromatografía en capa fina Sin más purificación se utilizó en la siguiente reacción.

A.1.4.3. Síntesis de 3-hidroxi-4-[(trifluoroacetil)amino]benzoato de metilo (28). En un matraz bola de 50 mL con una boca, adaptado con agitación magnética, columna Vigreux y trampa de humedad, se suspendieron 1.54 g (0.00921 moles) de 4-amino-3-hidroxibenzoato de metilo (27) en 10 mL de cloruro de metileno. Se enfrió la suspensión en baño de hielo y se agregaron lentamente 2.32 g (1.56 mL, 0.011 moles, 1.2 eqs.) de anhídrido trifluoroacético.

La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Después de finalizada la agitación, se evaporaron todas las sustancias volátiles y el sólido obtenido se disolvió en acetato de etilo y decoloró con carbón activado.

El carbón activado se separó por filtración y el acetato de etilo se evaporó para obtener un sólido color café. El producto se recrystalizó de etanol-agua para obtener 2.1 g (86.6 %) de hojuelas color café-claro. Punto de fusión 207.7-208.3

°C, R_f 0.49 (CHCl₃-acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6).

A.1.4.4. Síntesis de ácido 2-(trifluorometil)-1,3,6-benzoxazolcarboxilato de metilo (10). En un horno Kugelrohr, en línea con una bomba de vacío y trampas enfriadas con baño de hielo-sal, se colocaron 2 g (0.0076 moles) de 3-hidroxi-4-[(trifluoroacetil)amino]benzoato de metilo (**28**) y 8 g de PPA. Se calentó la mezcla de reacción lentamente a 120 °C y se destiló el producto a 4 mmHg, al observar la disolución del sólido en el PPA se calentó hasta 150 °C. La reacción se llevó a cabo por 1.5 horas. Al concluir la reacción, se formó un sólido blanco en las paredes de las trampas del horno Kugelrohr, el cual se colectó con acetona. El producto presentó varias manchas por cromatografía en capa fina. El producto se purificó por columna (fase móvil hexano) para obtener 0.62 g (32 %) de un sólido blanco. Punto de fusión 44-45 °C, R_f 0.69 (CHCl₃-acetona-éter de petróleo-ácido acético 10:6:15:0.6).

Apéndice 2. Parte biológica

A.2.1 Materiales. La línea celular Caco-2 ASI-4 fue donada por los laboratorios Absorption Systems (Exton, PA). El medio de Eagle modificación de Dulbecco (DMEM) fue obtenido de Gibco (Grand Island, NY). Los compuestos y soluciones glucosa, L-glutamina (200mM), mezcla de antibiótico-antimicótico (Solución 100 X: 10,000 U mL⁻¹ de penicilina, 10 mg mL⁻¹ de sulfato de estreptomicina y 25 µg mL⁻¹ de amfotericina B en solución salina al 0.85 %), HEPES, piruvato de sodio (100 mM, 11.0 mg mL⁻¹), y albendazol (**ABZ**) fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO). La solución de aminoácidos no esenciales (NEAA), solución de tripsina (0.25 % w/v) en EDTA 1 mM y solución salina de Hank (HBSS) (10X) sin rojo de fenol y sin bicarbonato de sodio fueron adquiridos de In vitro (Naucalpan de Juárez, Estado de México), la sal de litio del compuesto Lucifer Yellow CH (LY) fue obtenida de Molecular Probes (Eugene, OR). La colágena de cola de rata tipo I liofilizada fue marca Boehringer Mannheim (Alemania). Las cámaras de cultivo celular Transwell®, poro de 0.3 µM y 1.1 cm² de área para el inserto, utilizadas fueron de marca Costar (Cambridge, CA), la TEER fue monitoreada utilizando un voltímetro y electrodo EVOM (World Precision Instrument, Sarasota, FL).

Para medir la fluorescencia del compuesto LY se utilizó un lector de fluorescencia marca Fluostar modelo 403-0098 con filtro de emisión de 538 nm y filtro de excitación de 485 nm en placas de 96 pozos FluoroNunc con superficie MaxiSorp de marca Nunc (Dinamarca).

Para la cuantificación de los compuestos utilizados en el estudio de transporte se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con bomba binaria Waters serie 1525, detector de arreglo de diodos Waters 996, software Millennium³² PDA y columna SymmetryShield C₁₈, tamaño de partícula de 5µM y dimensiones de 4.6X150 mm marca Waters W22601V 027 con precolumna SymmetryShield marca Waters.

A.2.2. Ensayos de transporte apical-basolateral (AB) y basolateral-apical (BA).

Se prepararon soluciones stock de los compuestos cuya permeabilidad fue evaluada a una concentración de 10 mM en etanol. Para lo cual se pesaron 24.4 mg del compuesto **1**, 24.7 mg del compuesto **2**, 23.1 mg del compuesto **BRR-A** y 25.7 mg del compuesto **7** aforando a 10 mL con etanol. La solución 10 mM de **ABZ** se realizó pesando 26.5 mg de ABZ y aforando a 10 mL con DMSO. Las soluciones hechas para el estudio de permeabilidad se hicieron con HBSS diluyendo a una concentración de 100 μ M, la concentración final de disolvente fue de 1%.

Para recubrir los insertos con colágena se realizó el siguiente procedimiento: Se disolvieron 10 mg de colágena de cola de rata tipo I liofilizada en 2.7 mL de ácido acético al 2% estéril y se agregó etanol al 70 % estéril para completar 11 mL. Se recubrió cada inserto con 100 μ L de la disolución anterior, se secaron en zona aséptica y rotularon. Después de recubrir los insertos se recomienda utilizarlos durante las dos semanas siguientes.

La línea celular Caco-2 ASI-4 (pase 59) se descongeló y creció utilizando medio DMEM suplementado al 20 % con SFB en botellas de cultivo de 75 cm² en atmósfera húmeda y 5% por ciento de CO₂. Cuando las células alcanzaron una velocidad de crecimiento adecuado se cultivaron en medio DMEM suplementado al 10 % con SFB. El medio DMEM fue suplementado además con 1 % de solución de antibiótico-antimicótico, L-glutamina 2 mM , piruvato de sodio 1 mM, HEPES 25 mM y 1 % de NEAA. Las células se disgregaron cuando alcanzaron una confluencia del 80 % con tripsina-verseno, para lo cual se enjuagaron las células con PBS-EDTA (NaCl 0.14 M, KH₂PO₄ 1.76 mM, Na₂HPO₄ 10.14 mM, KCl 2.7 mM y EDTA disódico 1.1 mM) e incubaron por 8-10 min en presencia de tripsina-verseno, las células se disgregaron mediante pipeteo e inocularon en insertos con filtros de policarbonato Transwell[®], los cuales fueron recubiertos previamente con colágena, a una densidad de 6.0X10⁴ células cm⁻², el día en que se realizó la inoculación en los insertos Transwell[®] se consideró el día cero del experimento.

El medio de cultivo (0.5 mL en el inserto y 1.5 en el pozo) se reemplazó cada 48 horas, los primeros 8 días, y después diariamente hasta el día 28, el estudio de transporte se realizó hasta este día.

Para realizar el estudio de transporte las monocapas celulares se enjuagaron e incubaron con solución de transporte (HBSS; suplementada con 25 mM, glucosa y HEPES 10 mM, ajustada a pH 6) por 30 min a 37 °C. Después de incubar, se midió la TEER, para comprobar que la formación de la monocapa sea regular.

Para el estudio de transporte AB (el lado apical se llamara donador y el lado basolateral receptor), se colocaron 1.5 mL de HBSS en 5 pozos de una placa de cultivo de 12 pozos, que corresponden a la parte receptora. Se colocó un inserto Transwell® en el primer pozo y se aspiró la HBSS del lado donador sustituyéndose por 0.5 mL de solución del compuesto a evaluar, a una concentración 100 µM en HBSS, y se incubó a 37 °C con agitación constante de 70 rpm. El inserto se cambió a otro pozo a los 15, 30, 45, 60 y 90 min. Al finalizar el estudio se tomaron alícuotas del lado receptor y el donador para ser cuantificadas.

Para el estudio de transporte BA (basolateral-donador, apical-receptor) se colocaron 1.5 mL de una solución del compuesto a probar, a una concentración 100 µM, en el lado donador. Se colocó un inserto Transwell® con 0.5 mL de HBSS, y se incubó a 37 °C con agitación constante de 70 rpm. Se tomaron alícuotas de 200 µL del lado receptor a los 15, 30, 45, 60 y 90 min., los cuales fueron reemplazados con 200 µL de HBSS fresco. Al finalizar el estudio de transporte se colectó una alícuota del lado donador.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Al finalizar el estudio se verificó que las monocapas de células Caco-2 ASI-4 estuvieran integras mediante el uso del marcador LY. Los insertos Transwell® se colocaron en placas de 12 pozos y se vertieron 1.5 mL de HBSS en el lado basolateral. En el lado apical se aspiró cualquier remanente de HBSS del estudio de transporte y se reemplazó con 0.5 mL de una solución de LY 1 mM. Se incubó a 37 °C por media hora con agitación constante. Al terminar la incubación, se tomaron 200 µL de solución del lado basolateral Se realizó una curva del

compuesto LY en el rango de concentraciones de 25 a 1.625 μM y se leyó la fluorescencia de la curva y las muestras, valores de P_{app} alrededor a 8×10^{-7} indican integridad de la monocapa.

La determinación de la concentración de cada una de las alícuotas de los diferentes compuestos se realizó por HPLC. Las condiciones fueron las siguientes: para los compuesto **1**, **4**, **BRRR** y **ABZ** se utilizó como fase móvil acetonitrilo:agua con 0.5 % de ácido acético (46:54) con flujo de 1 mL min^{-1} y para el compuesto **7** se utilizó como fase móvil acetonitrilo:agua con 0.5 % de ácido acético (35:65) con flujo de 1 mL min^{-1} e inyector de $50 \mu\text{L}$, se realizó una curva estándar de cada compuesto abarcando concentraciones de 100 a $0.1 \mu\text{M}$, la cual sirvió para cuantificar los compuestos evaluados. Los compuestos fueron detectados a 270 nm.

Al obtener la concentración de cada tiempo, tanto de estudio AB como del BA, se calculó la concentración acumulada (en el caso del estudio BA corregida por dilución) y realizó el gráfico de la concentración acumulada de compuesto que apareció en el lado receptor con respecto al tiempo, de esta manera se pudo calcular la pendiente de la parte lineal del gráfico y utilizar la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \frac{V_r}{60(A C_o)} \left(\frac{dC}{dt} \right)$$

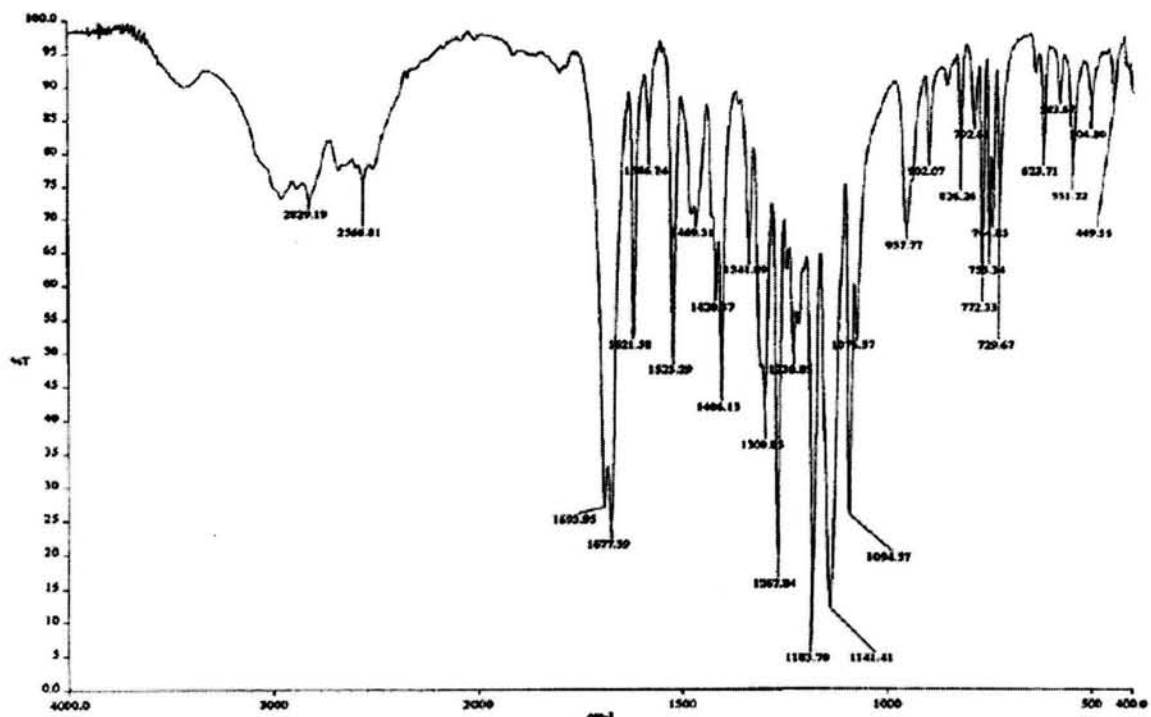
donde V_r es el volumen del compartimiento receptor (cm^3), A es el área de la monocapa (cm^2), C_o es la concentración inicial del lado donador (μM), 60 es un factor de conversión de minutos a segundos (seg min^{-1}) y dC/dt es la velocidad de aparición del compuesto en el lado receptor ($\mu\text{M min}^{-1}$).

Apéndice 3. Espectroscopia y espectrometría

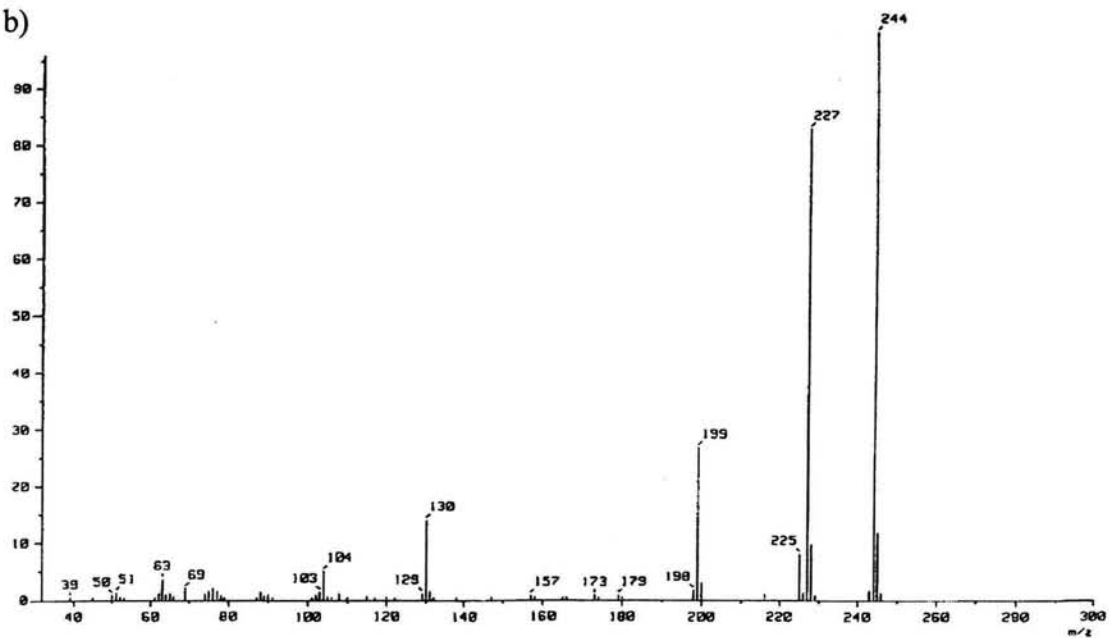
En este apéndice se muestran los espectros de los productos finales sintetizados (1-10)

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en un aparato Varian modelo VRX-300 MHz en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), el cual se utilizó como disolvente y estándar interno. La espectrometría de masas se realizó en un equipo Jeol modelo JMS-SX102A. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier marca Perkin Elmer modelo 1605, en pastillas de bromuro de potasio.

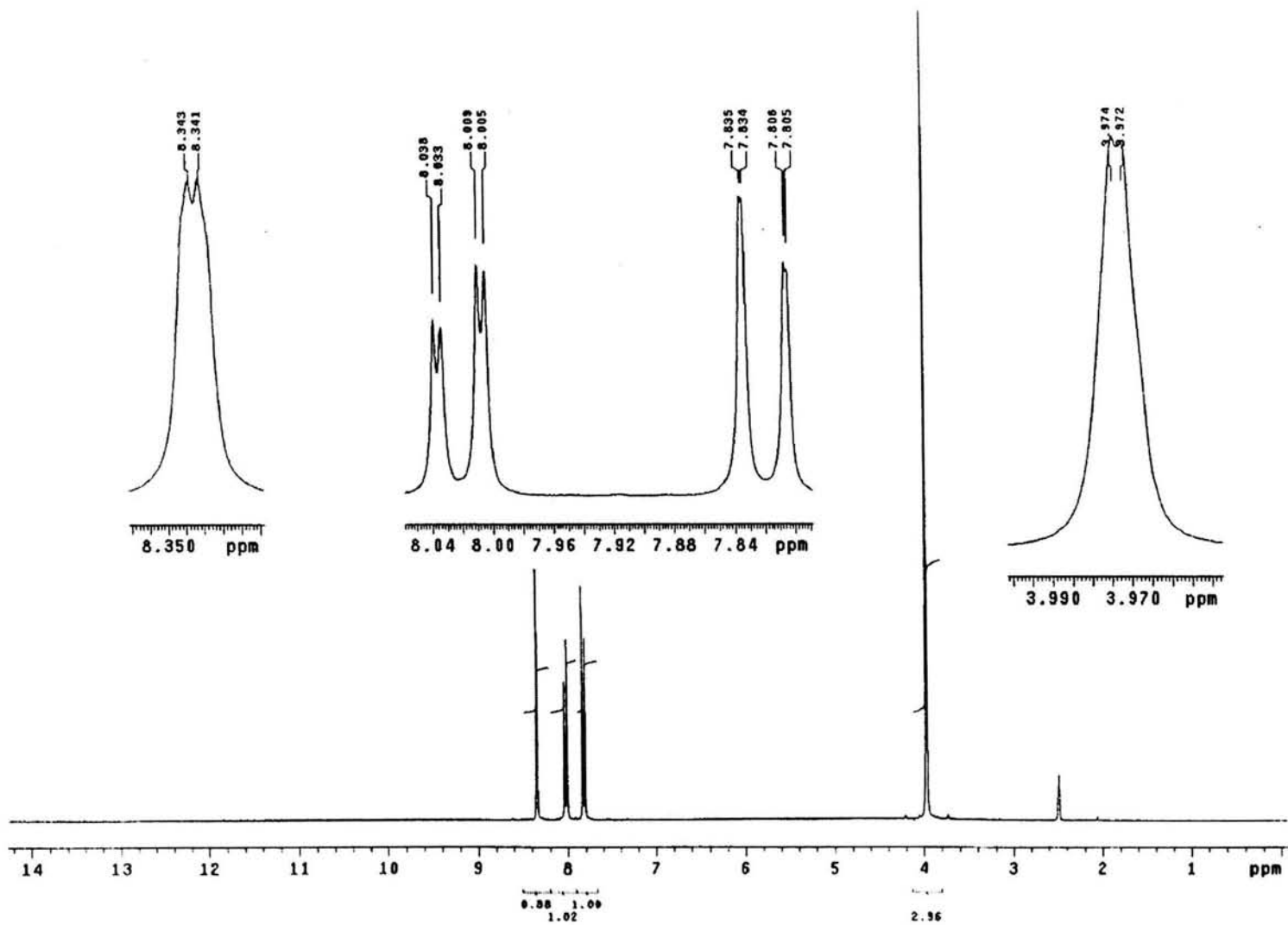
a)



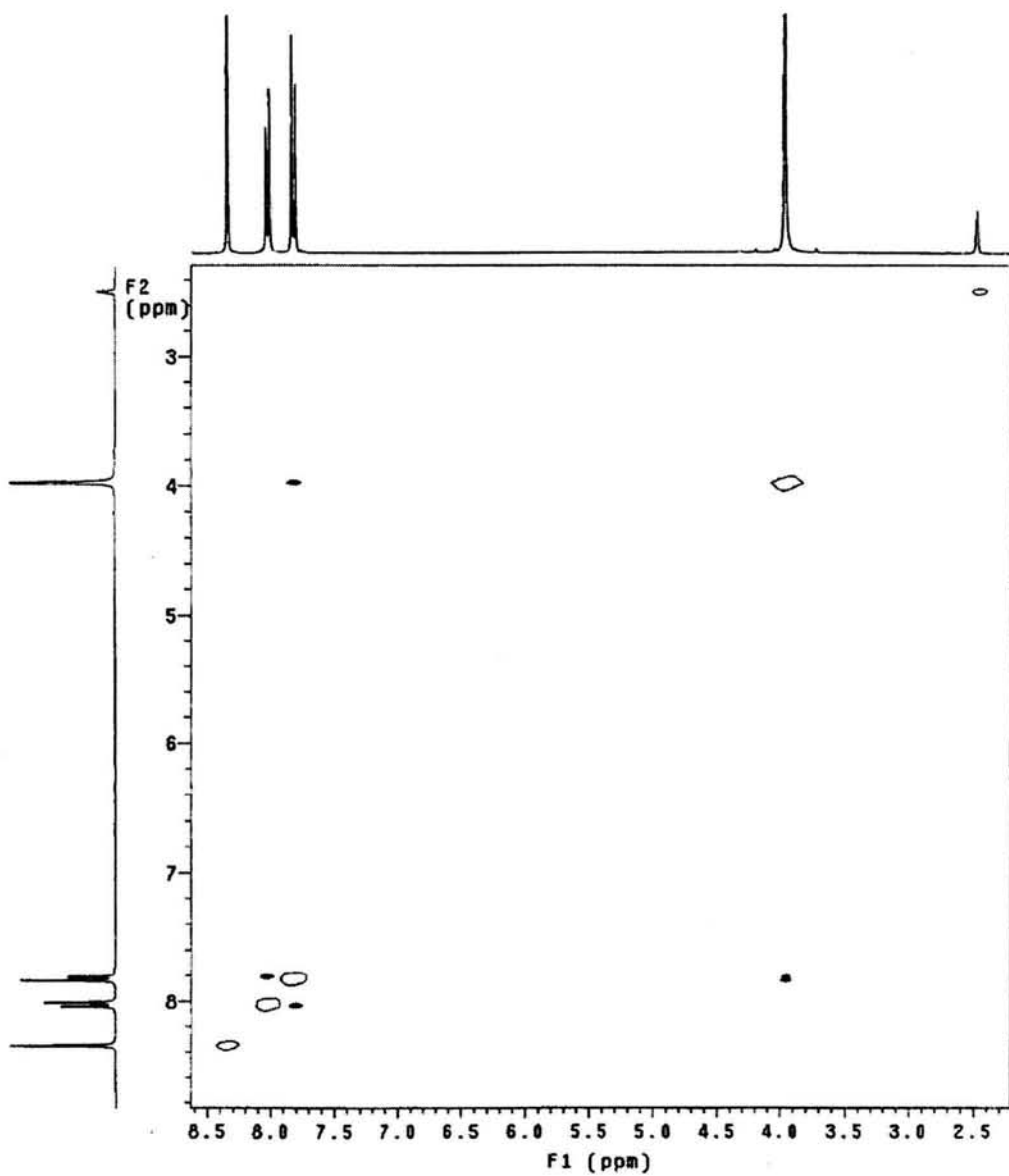
b)



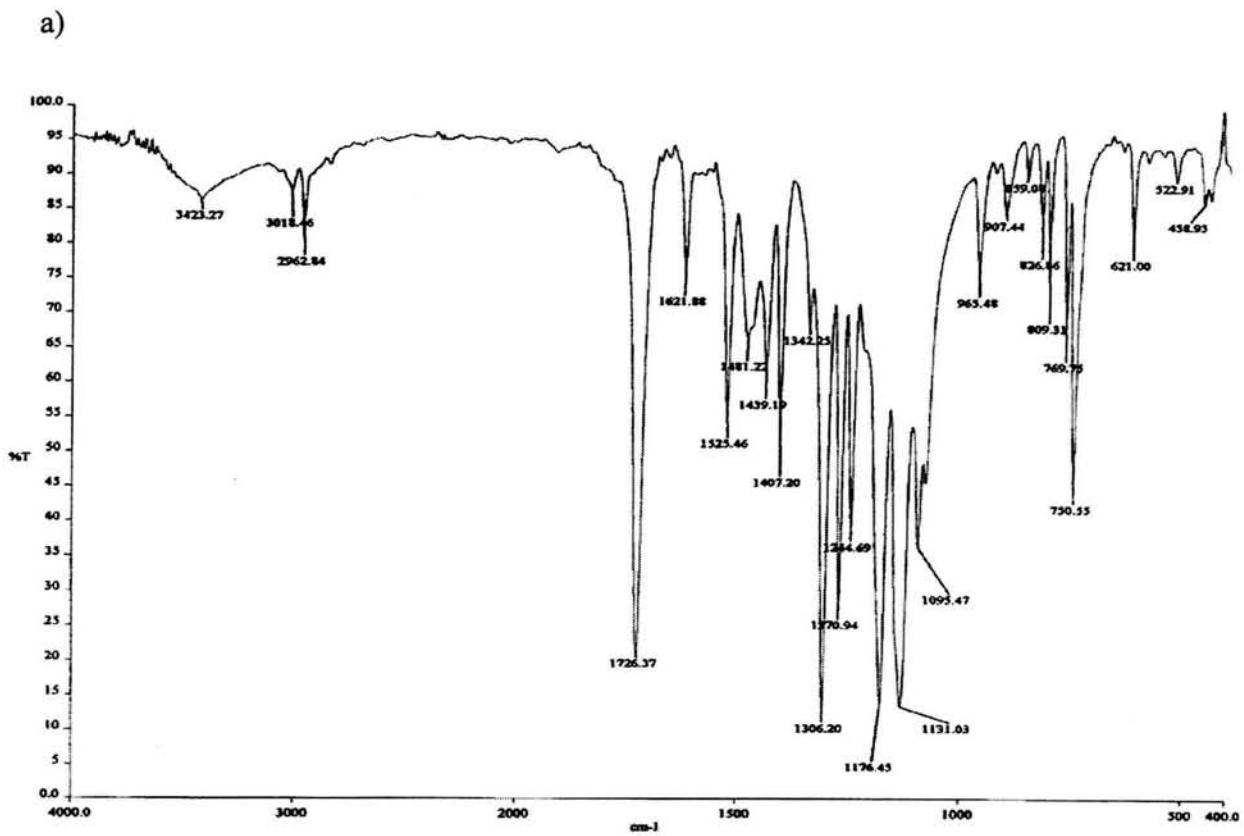
Espectro No 1. a)IR (KBr) b) EM (IE) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazol-carboxílico (1)



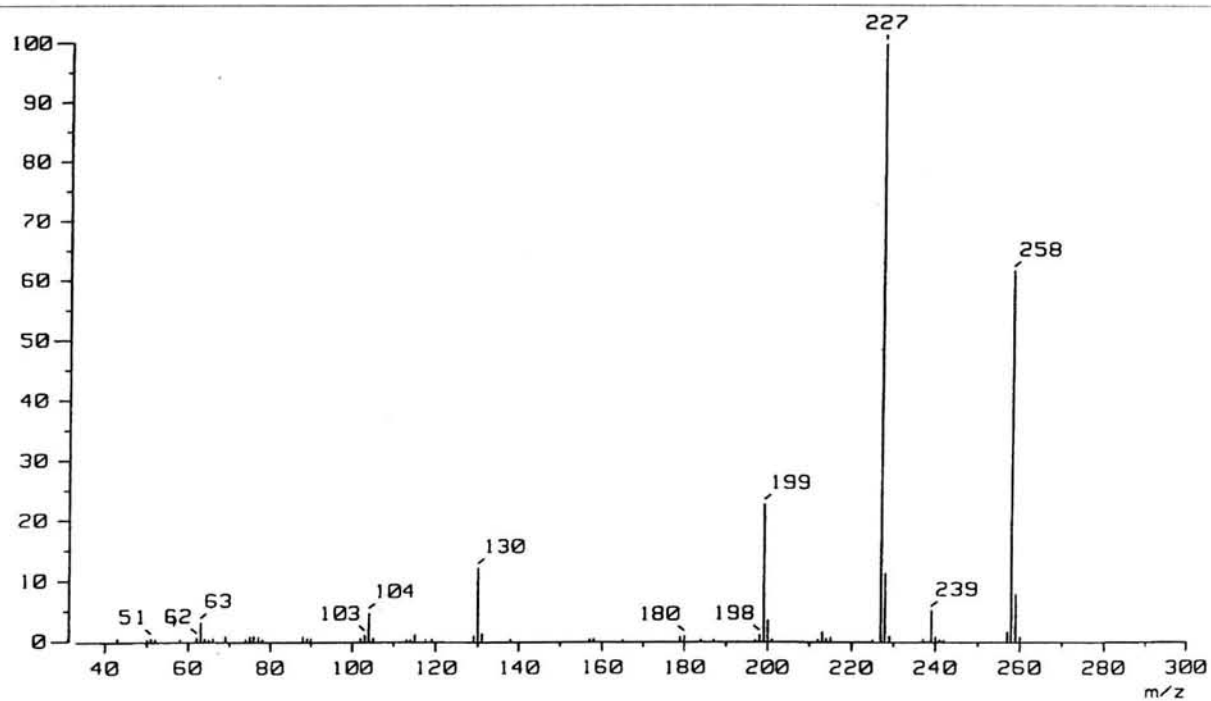
Espectro 2. RMN ^1H (DMSO-d_6) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-benzimidazolcarboxílico (1)



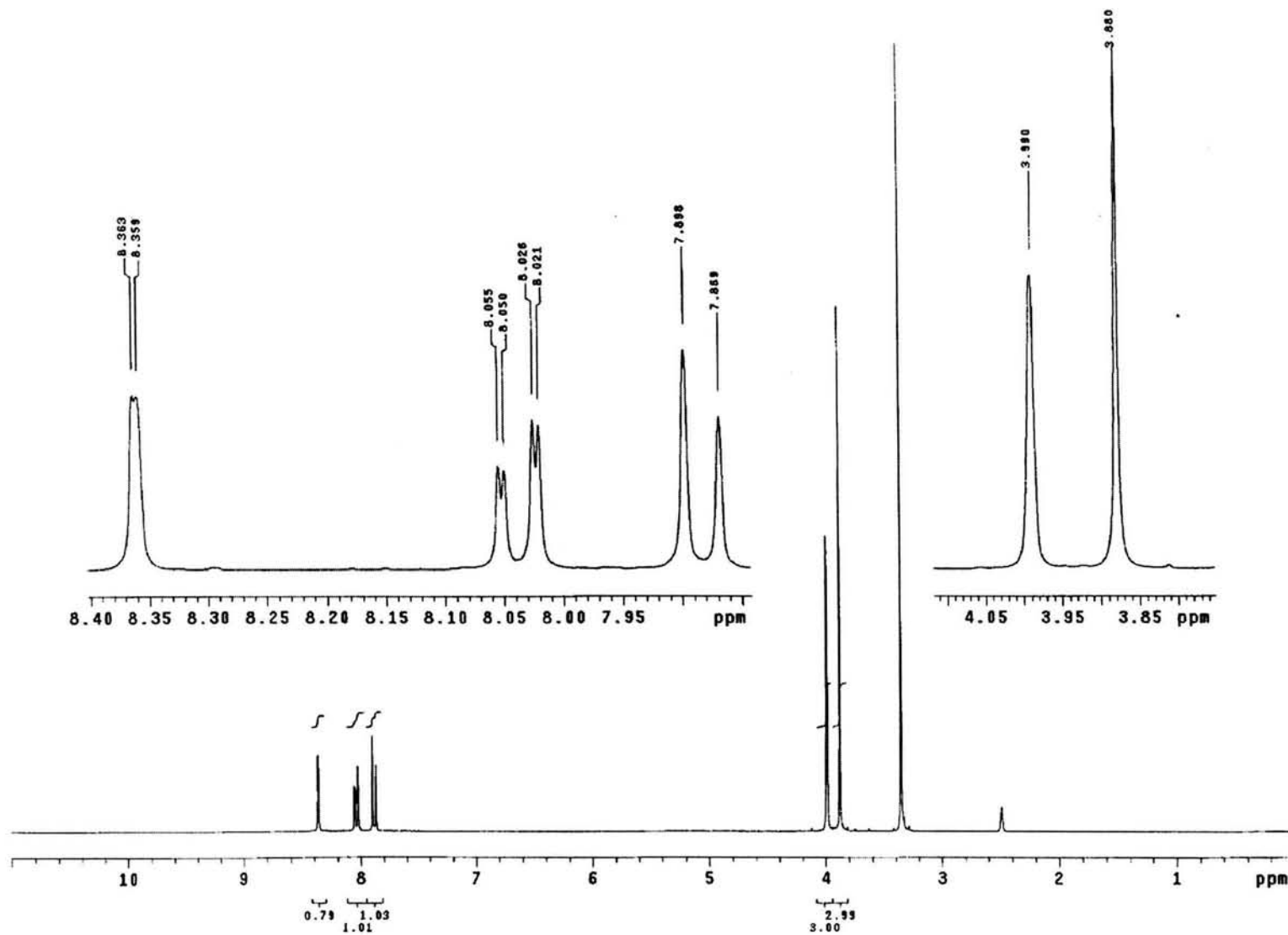
Espectro 3. NOESY (DMSO-d₆) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazol-carboxílico (1)



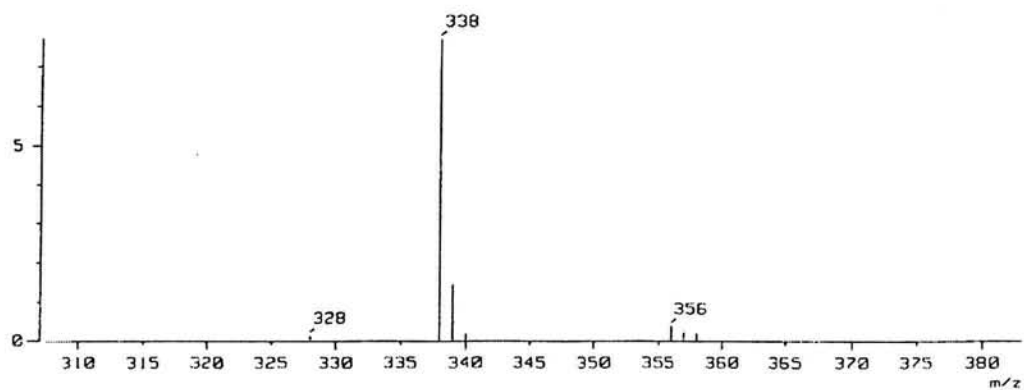
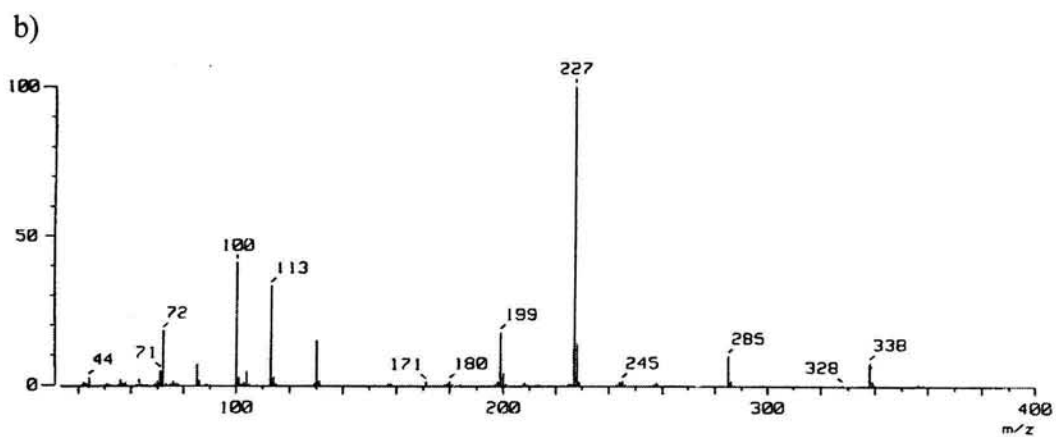
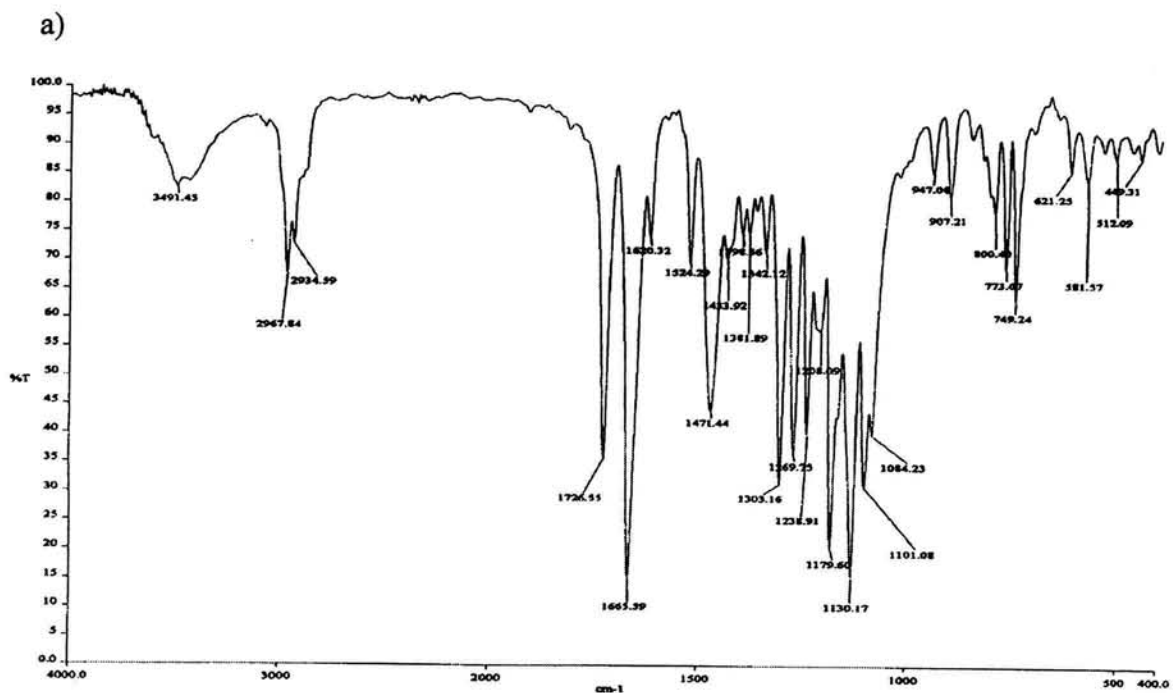
b)



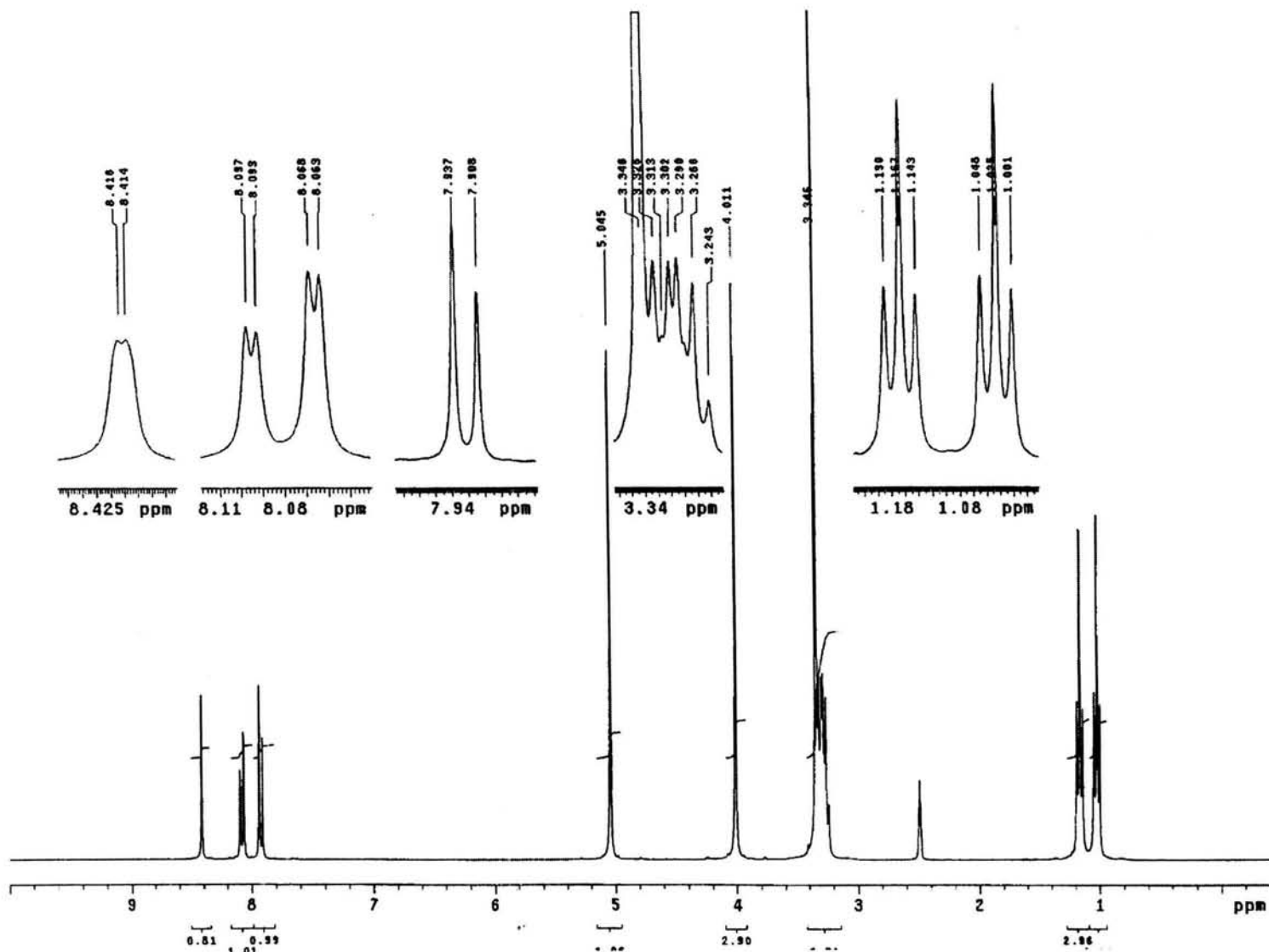
Espetro 4. a) IR (KBr) b) EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxilato de metilo (2)



Espectro 5. RMN ^1H (DMSO-d_6) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxilato de metilo (2)

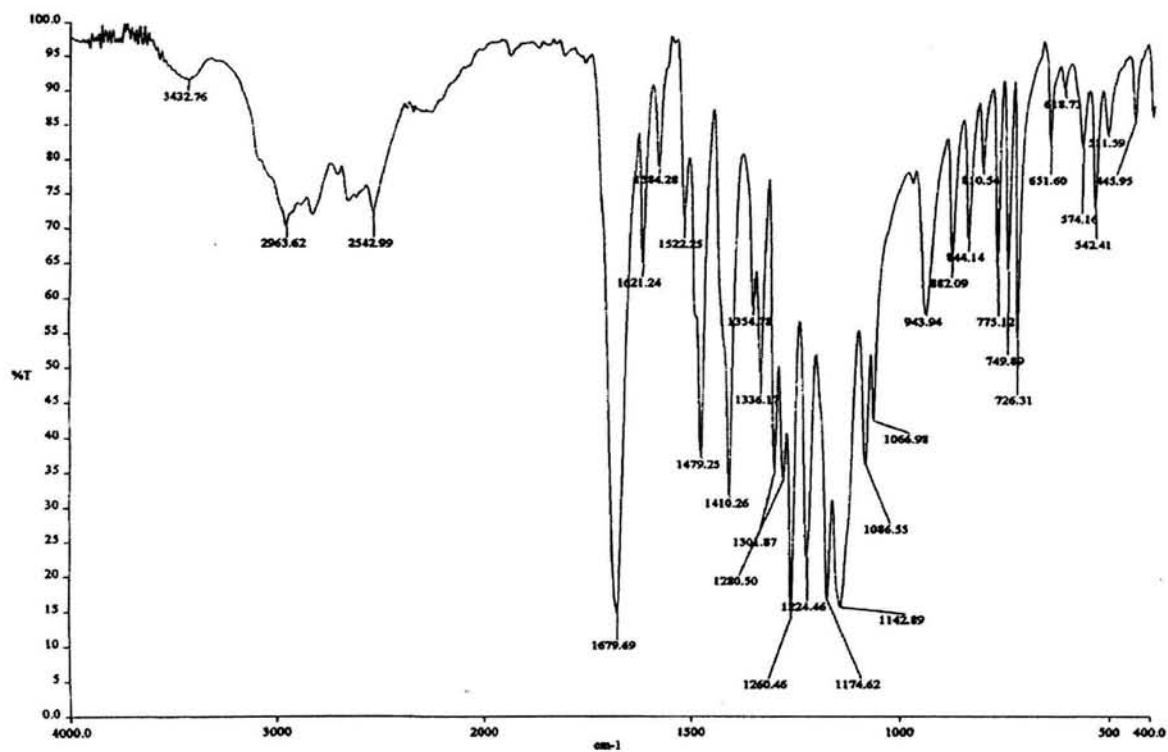


Espectro 6 a) IR (KBr) b) EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (3)

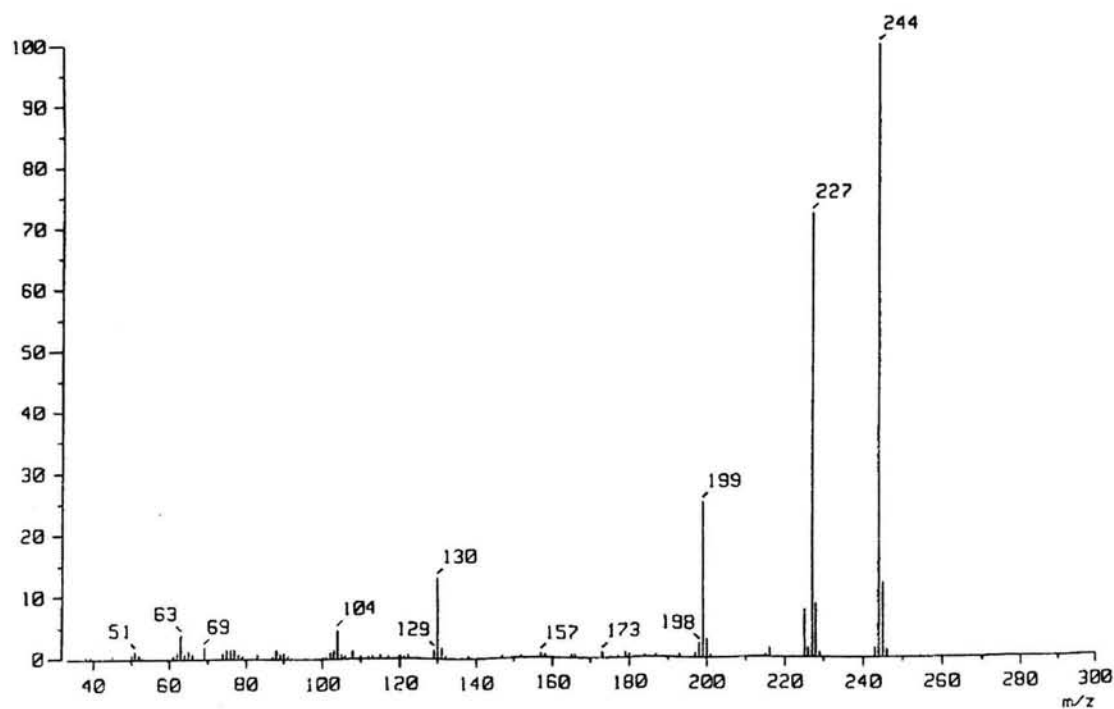


Espectro 7. RMN ^1H (DMSO- d_6) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-5-metilbencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (3)

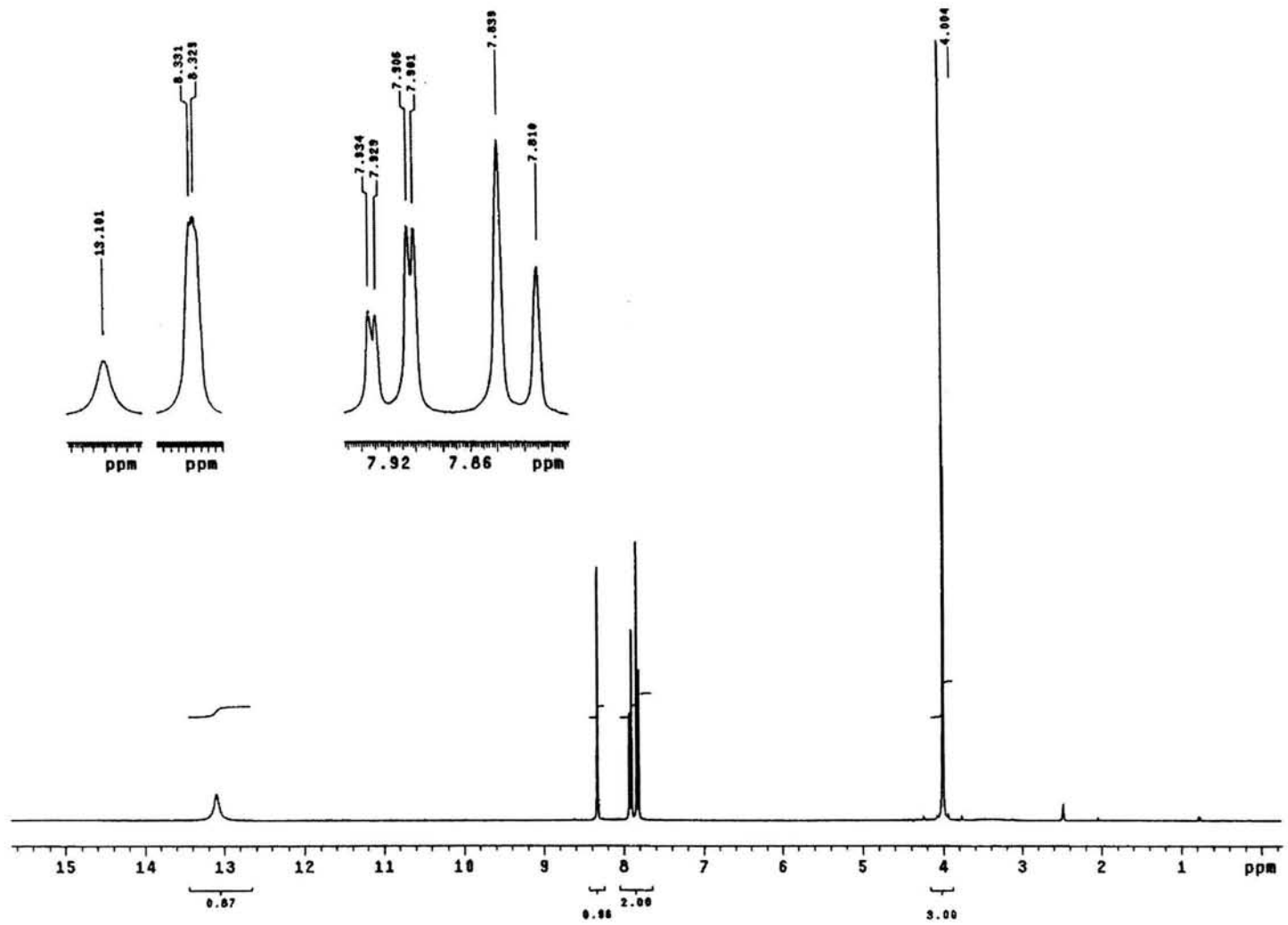
a)



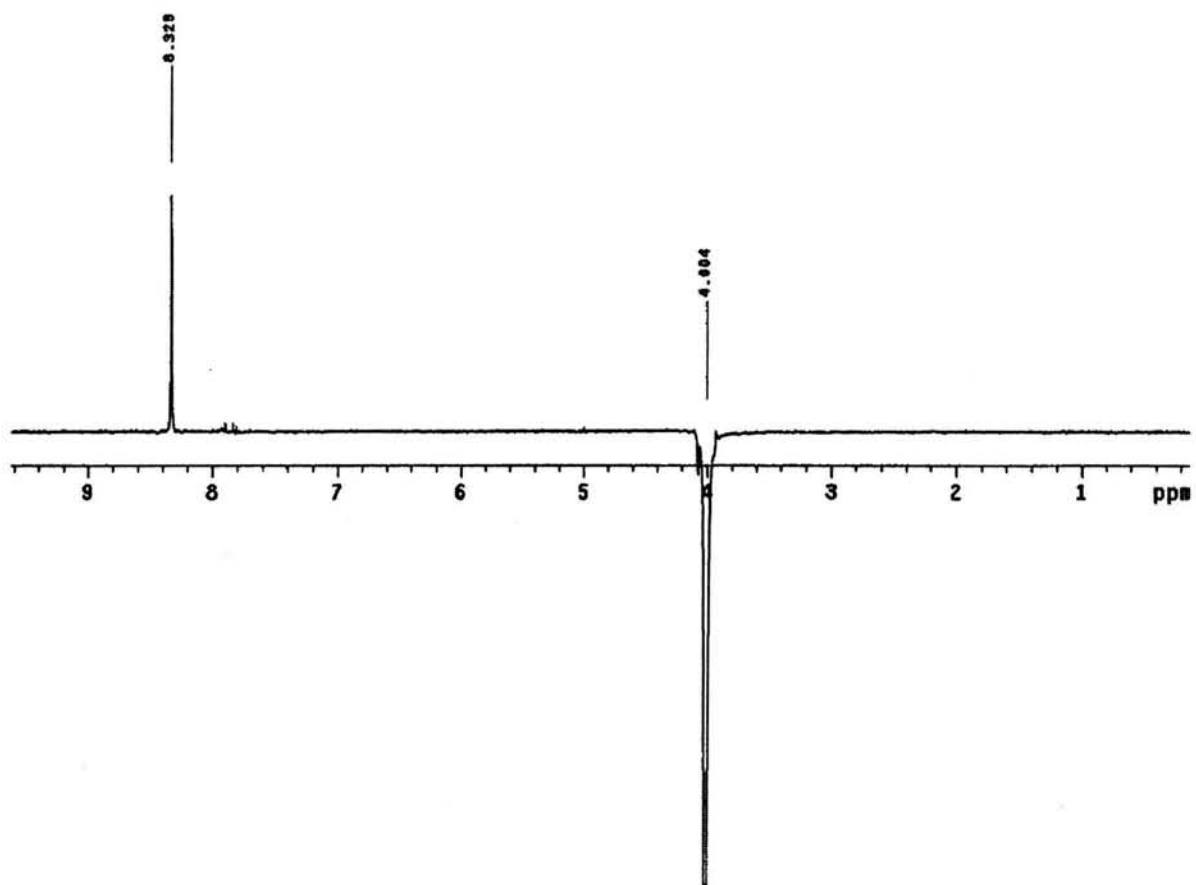
b)



Espectro 8. a) IR (KBr) b) EM (IE) de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazol-carboxílico (4)

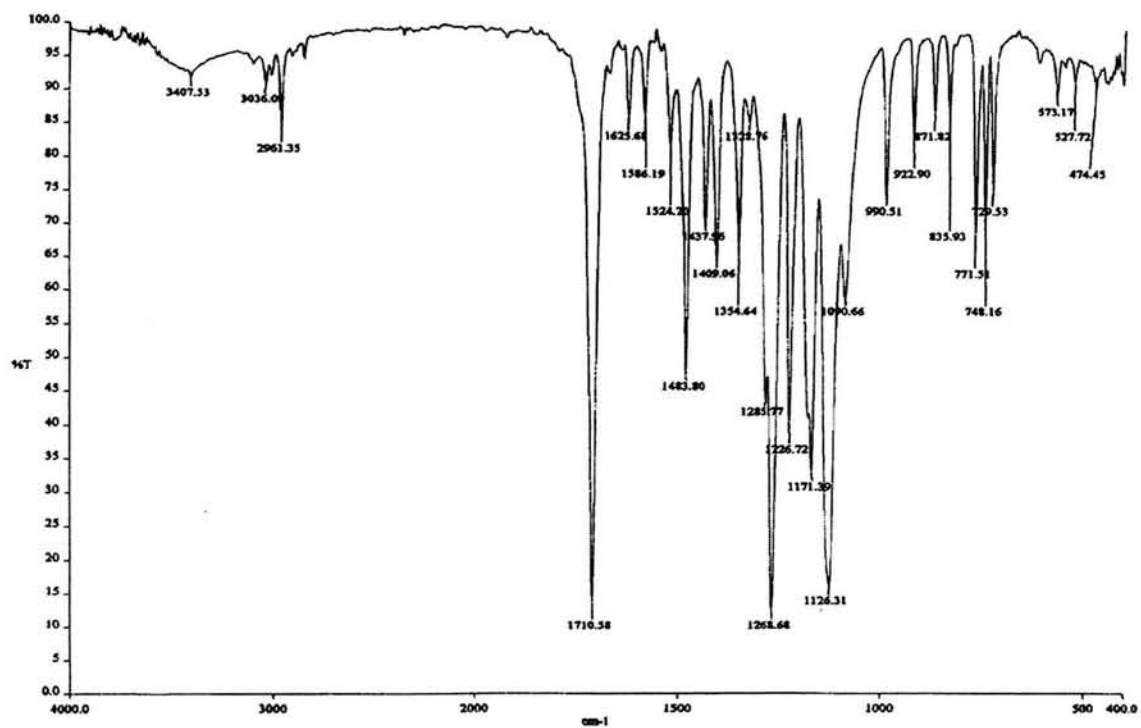


Espectro 9. RMN ^1H de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-metilbencimidazolcarboxílico (4)

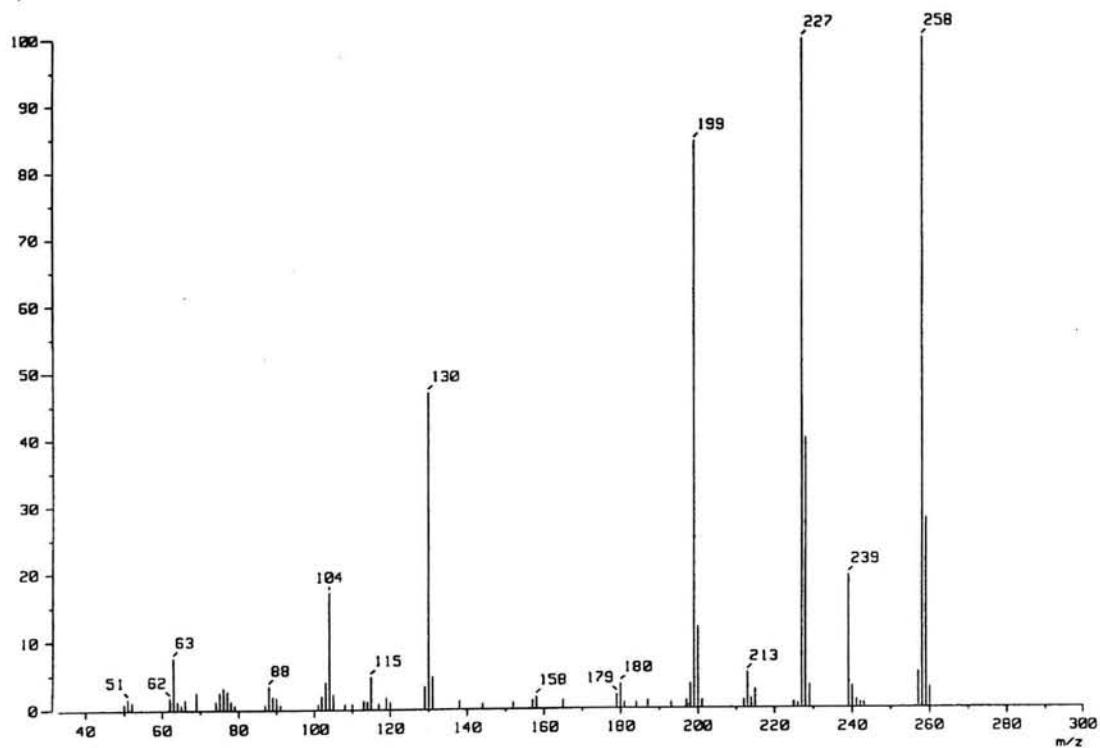


Espectro 10. NOE diferencial de ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-metilbencimidazol-carboxílico (4)

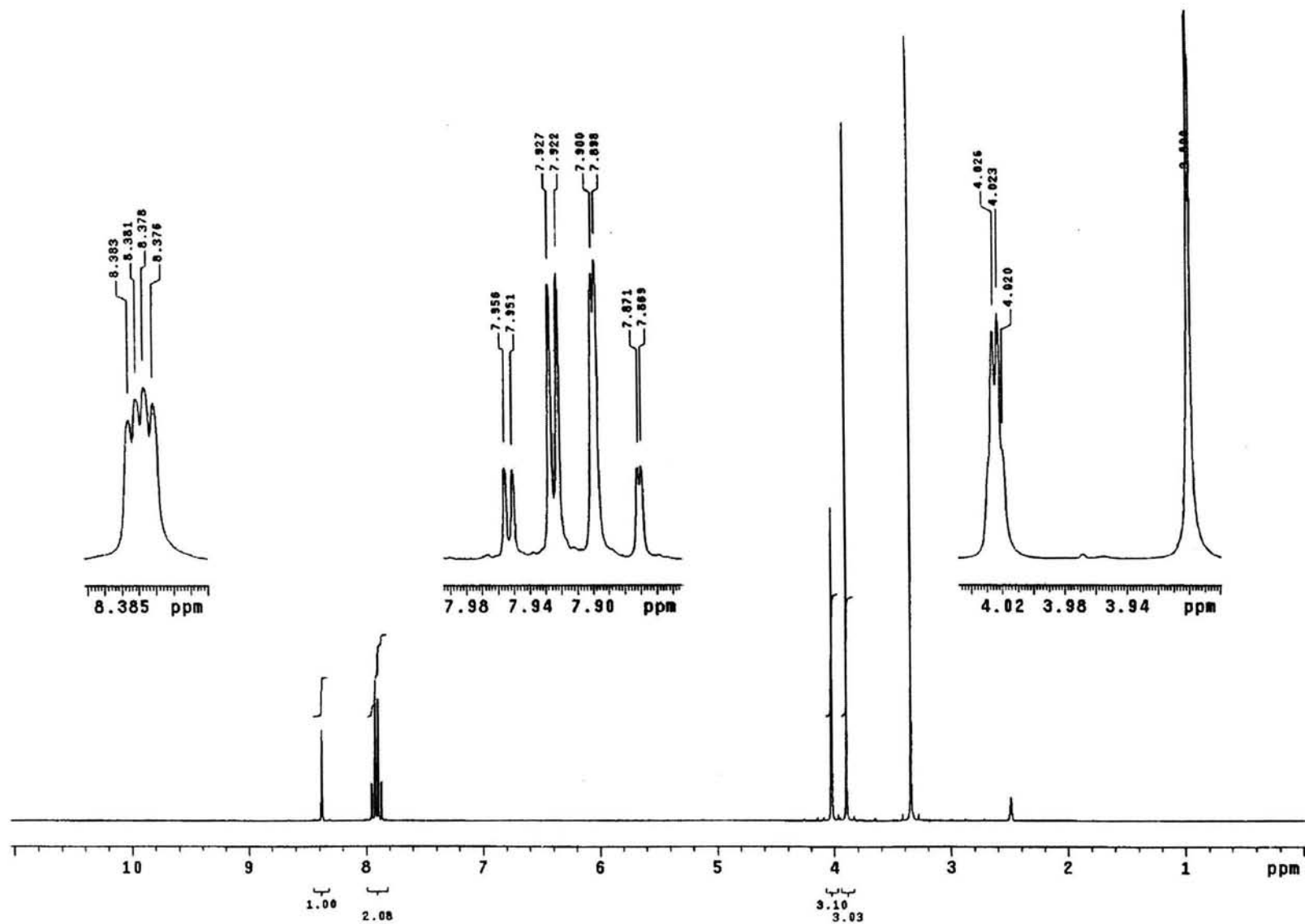
a)



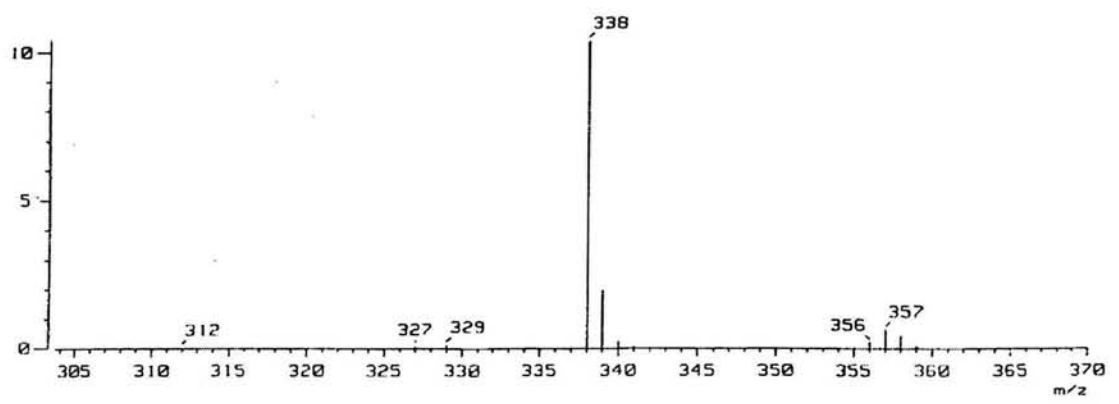
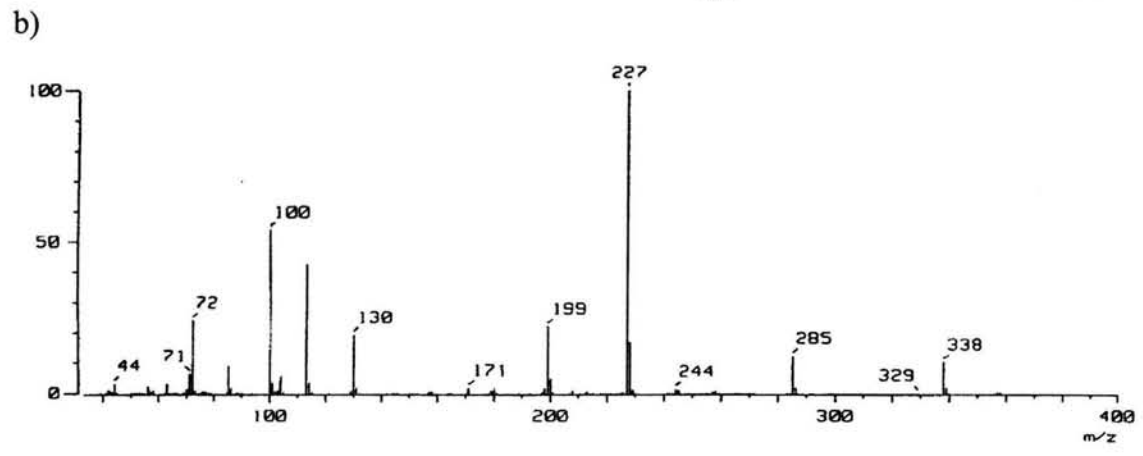
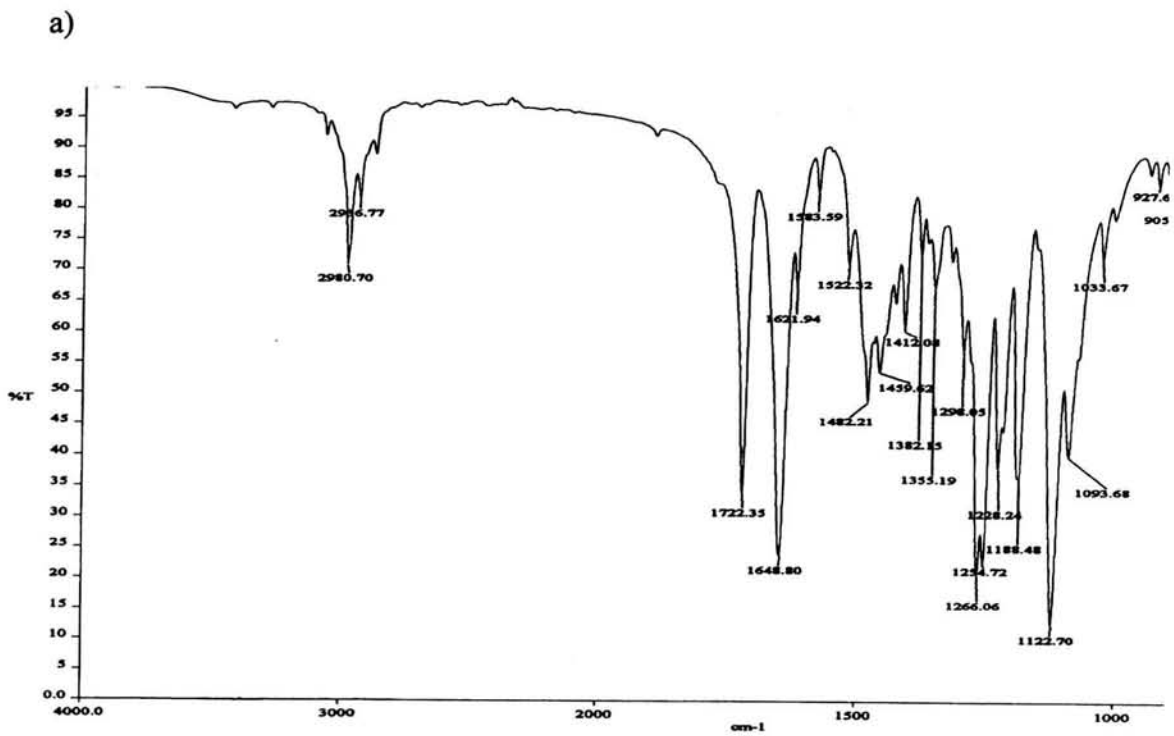
b)



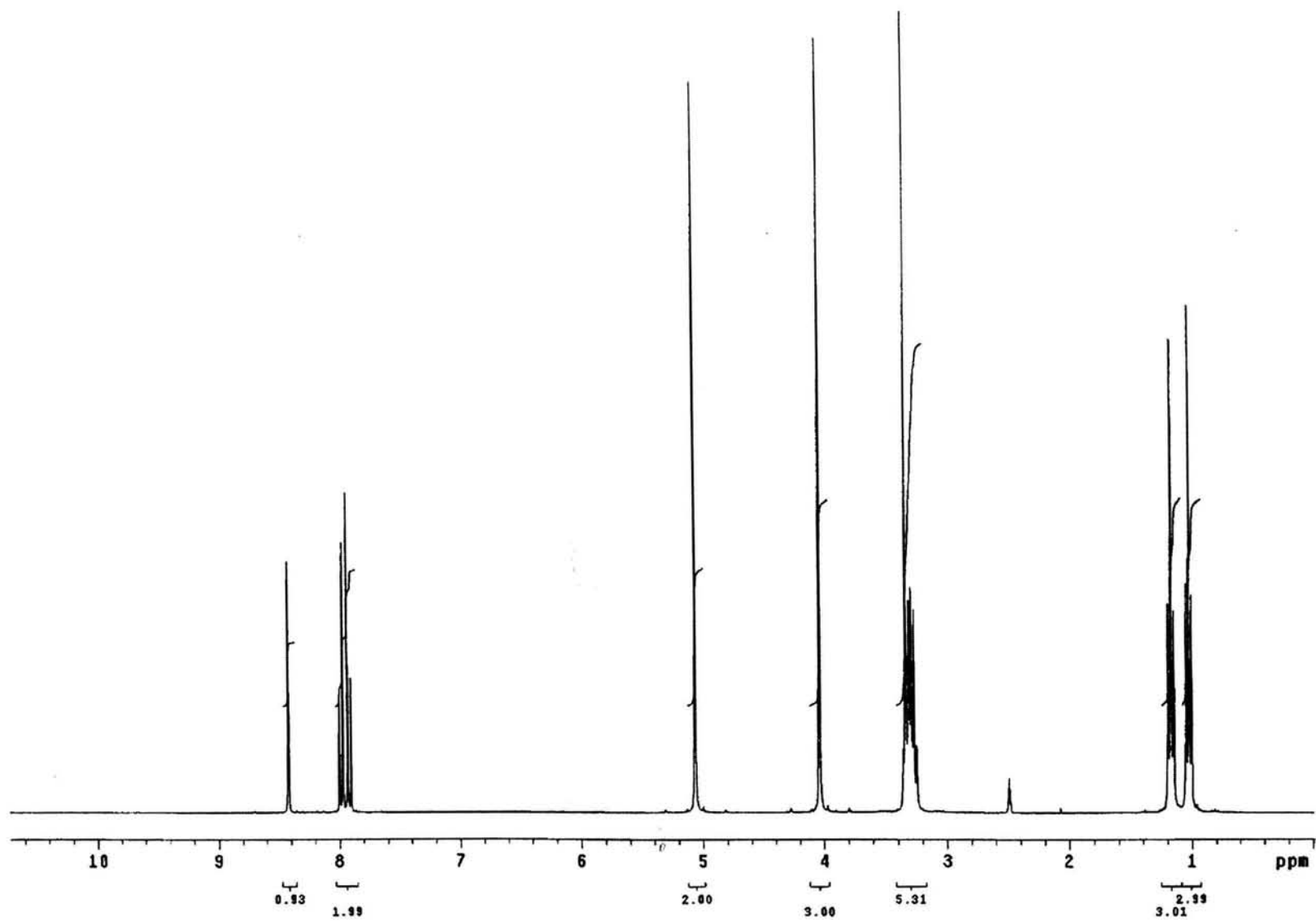
Espectro 11. a) IR (KBr) b) EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazolcarboxilato de metilo (5).



Espectro 12. RMN^1H (DMSO-d_6) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-metilbencimidazolcarboxilato de metilo (**5**).

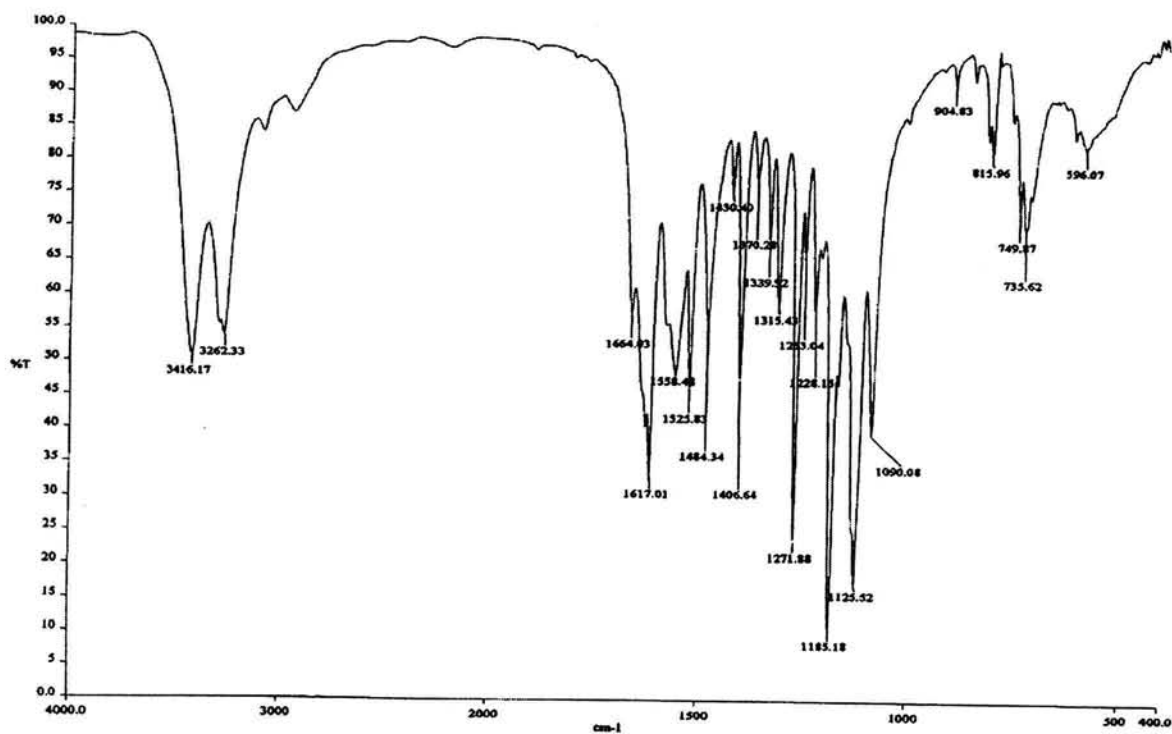


Espectro 13. a) IR (KBr) b) EM (IE) de 1-metil-2-(trifluorometil)-1H-6-bencimidazol-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (6).

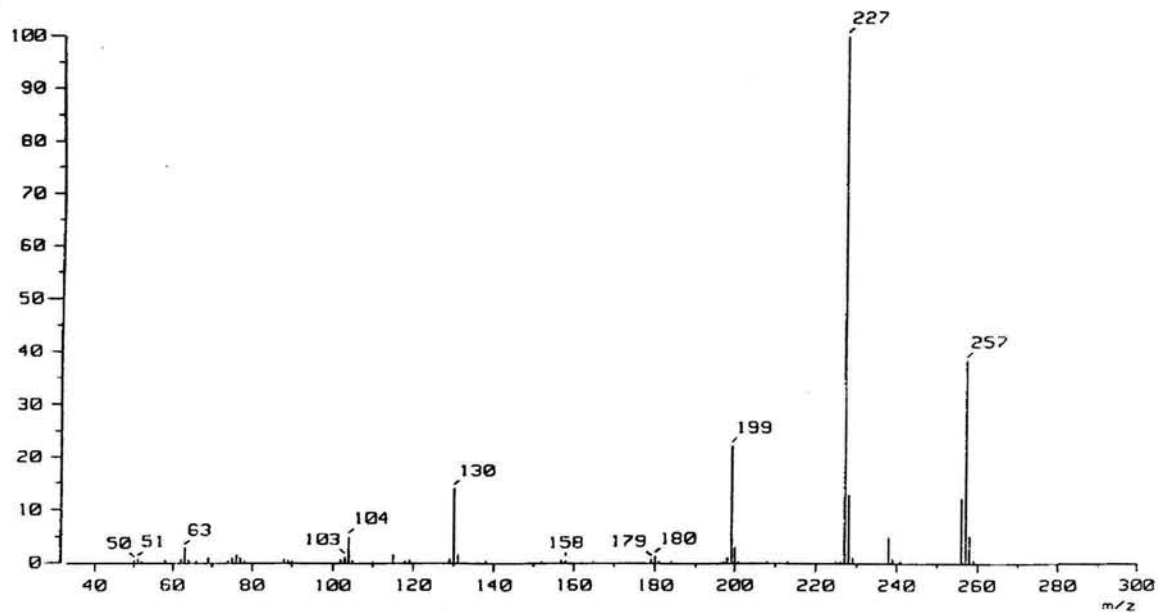


Espectro 14. RMN ¹H de 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo (6).

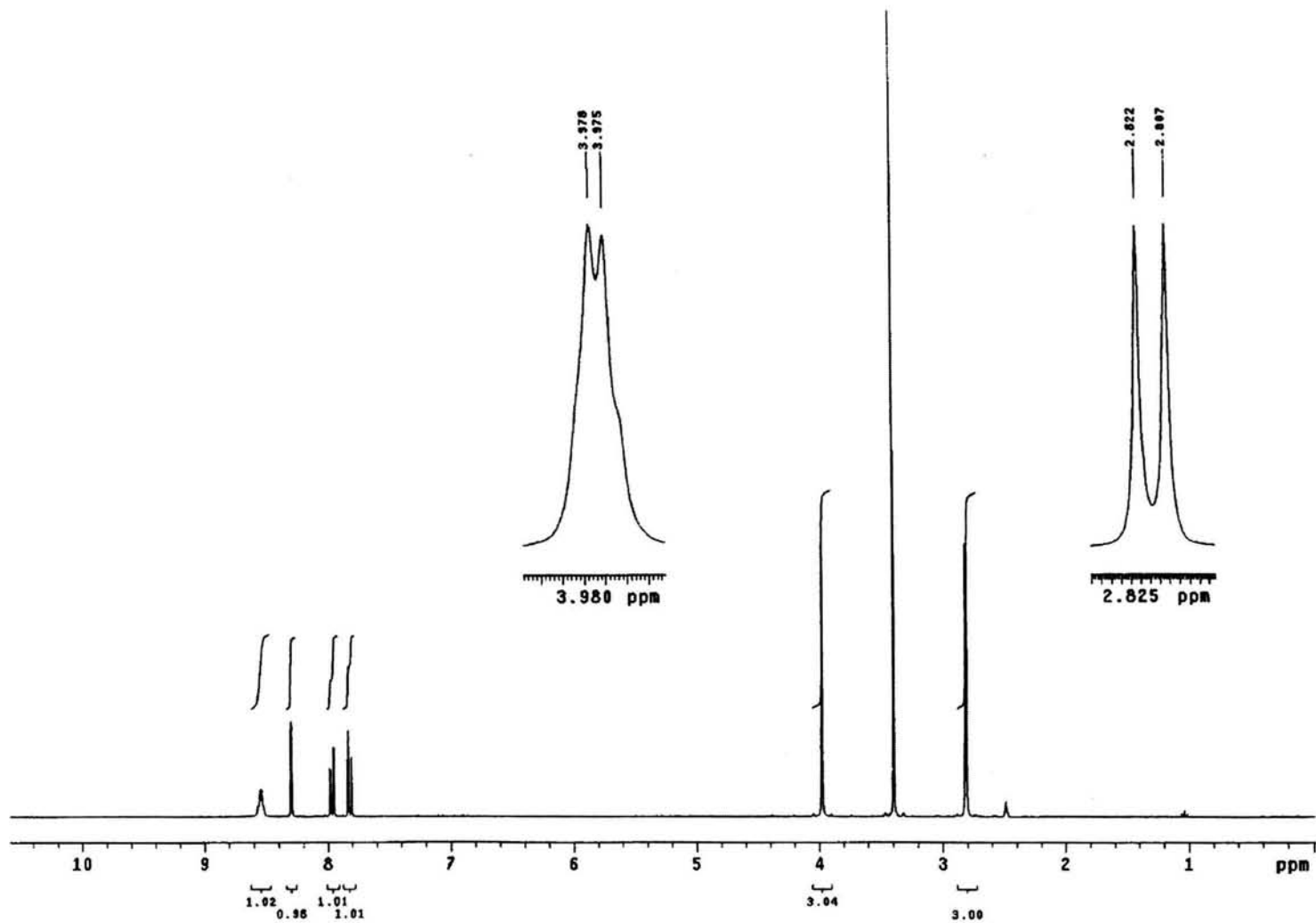
a)



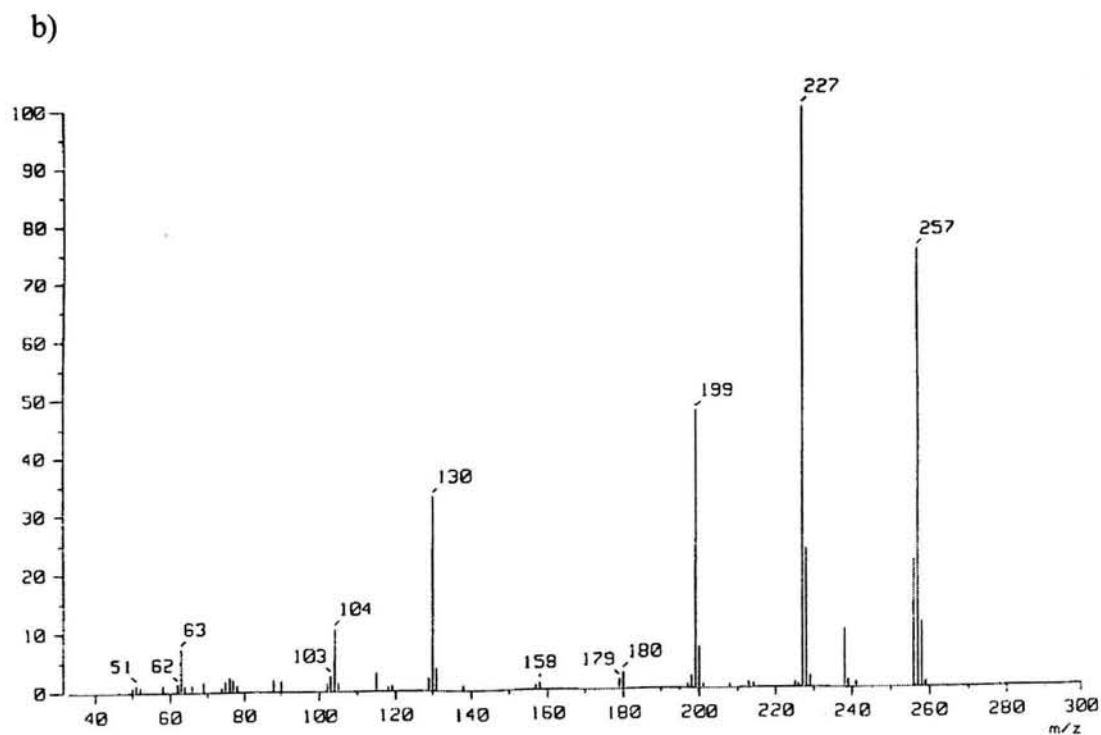
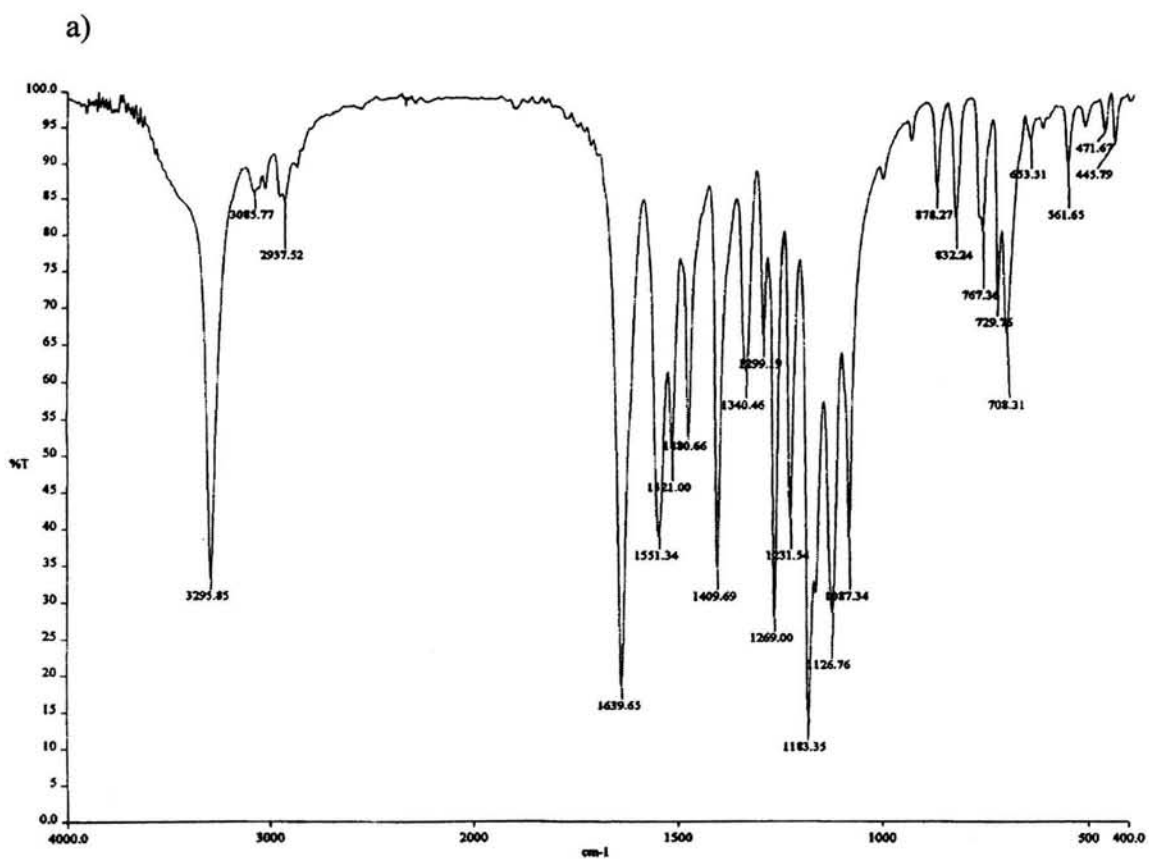
b)



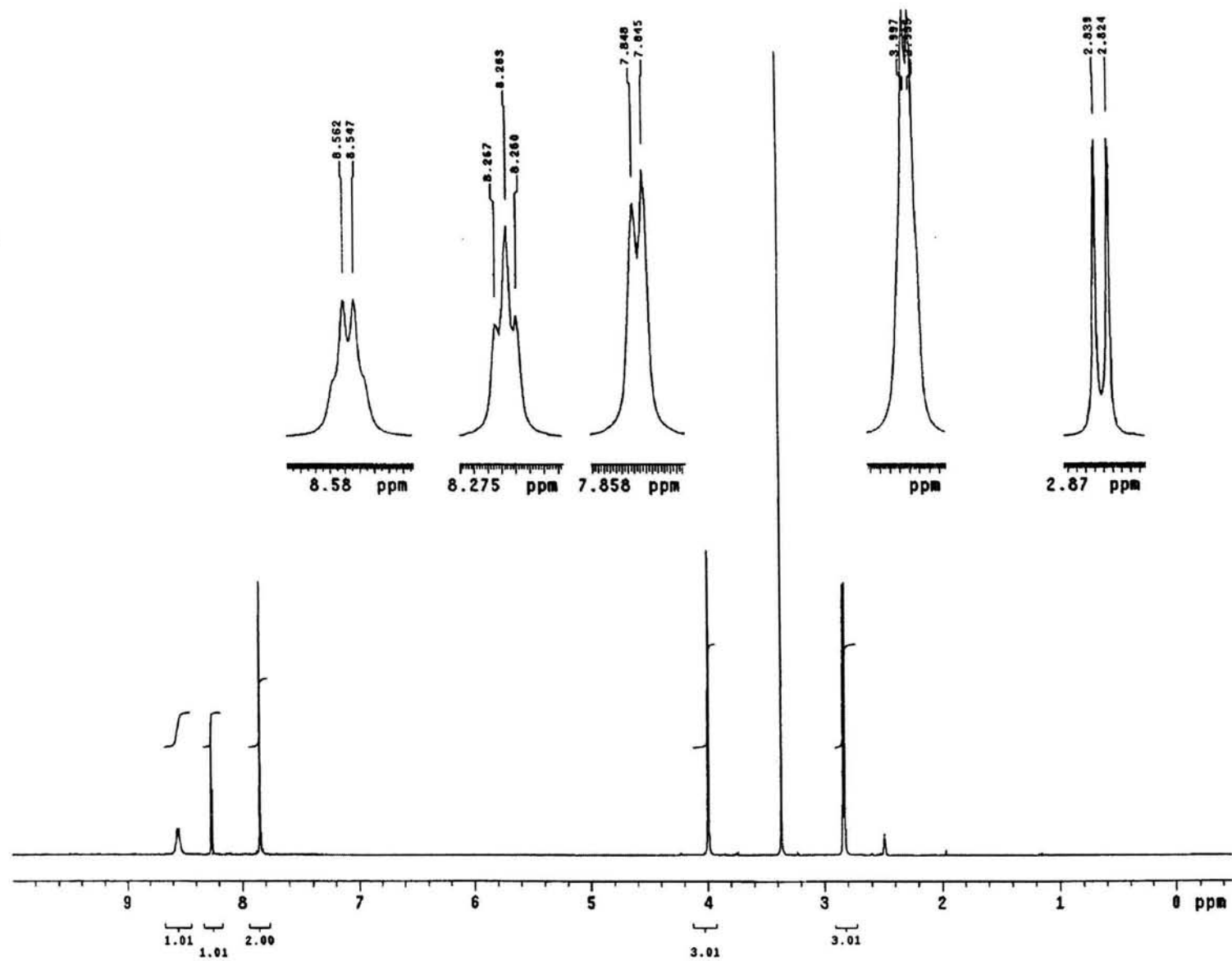
Espectro 15. a) IR (KBr) b) EM(IE) de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazol-carboxamida (7).



Espectro 16. RMN ^1H de *N*,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1*H*-5-bencimidazolcarboxamida (7).

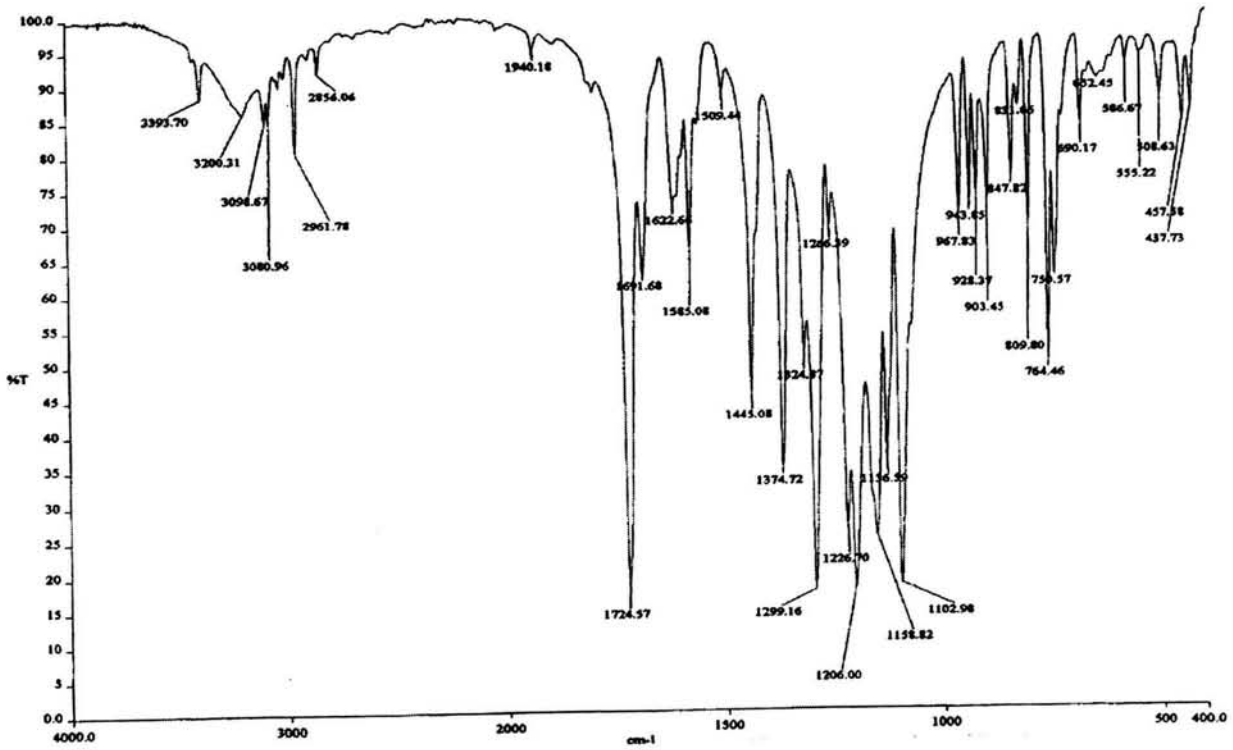


Espectro 17. a) IR (KBr) b) EM (IE) de *N*,1-dimetil 2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazol-carboxamida (8).

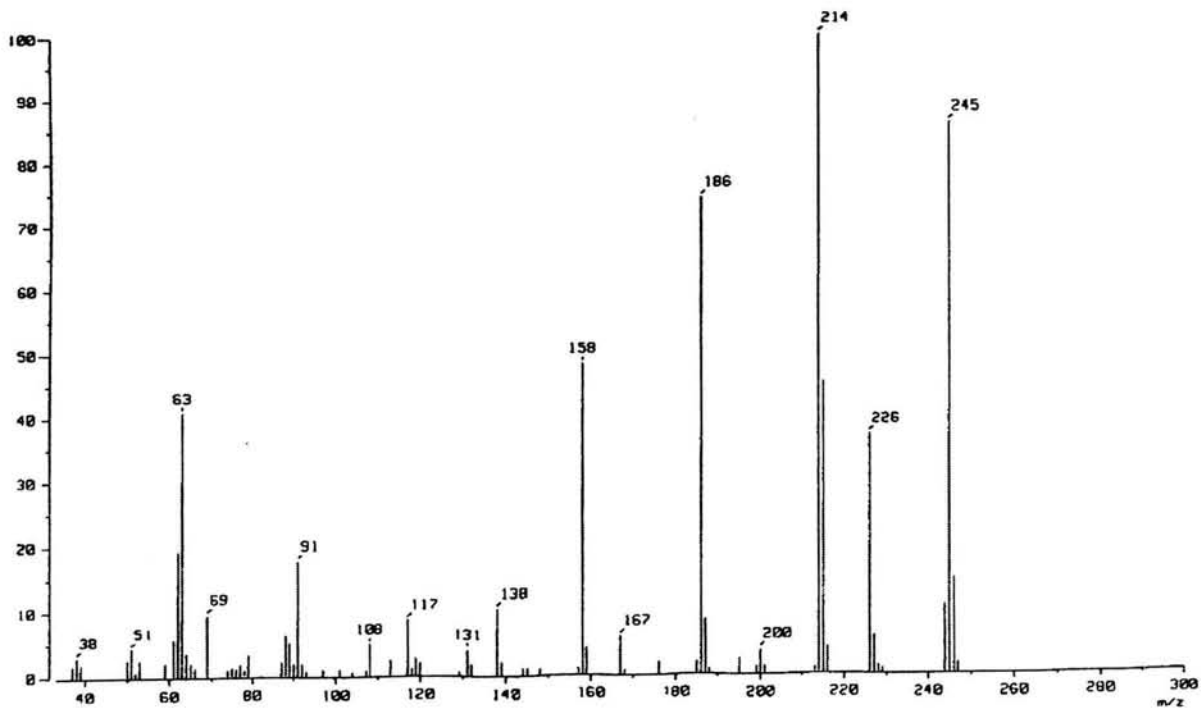


Espectro 18. RMN ^1H de *N*,1-dimetil 2-(trifluorometil)-1*H*-6-bencimidazolcarboxamida (8).

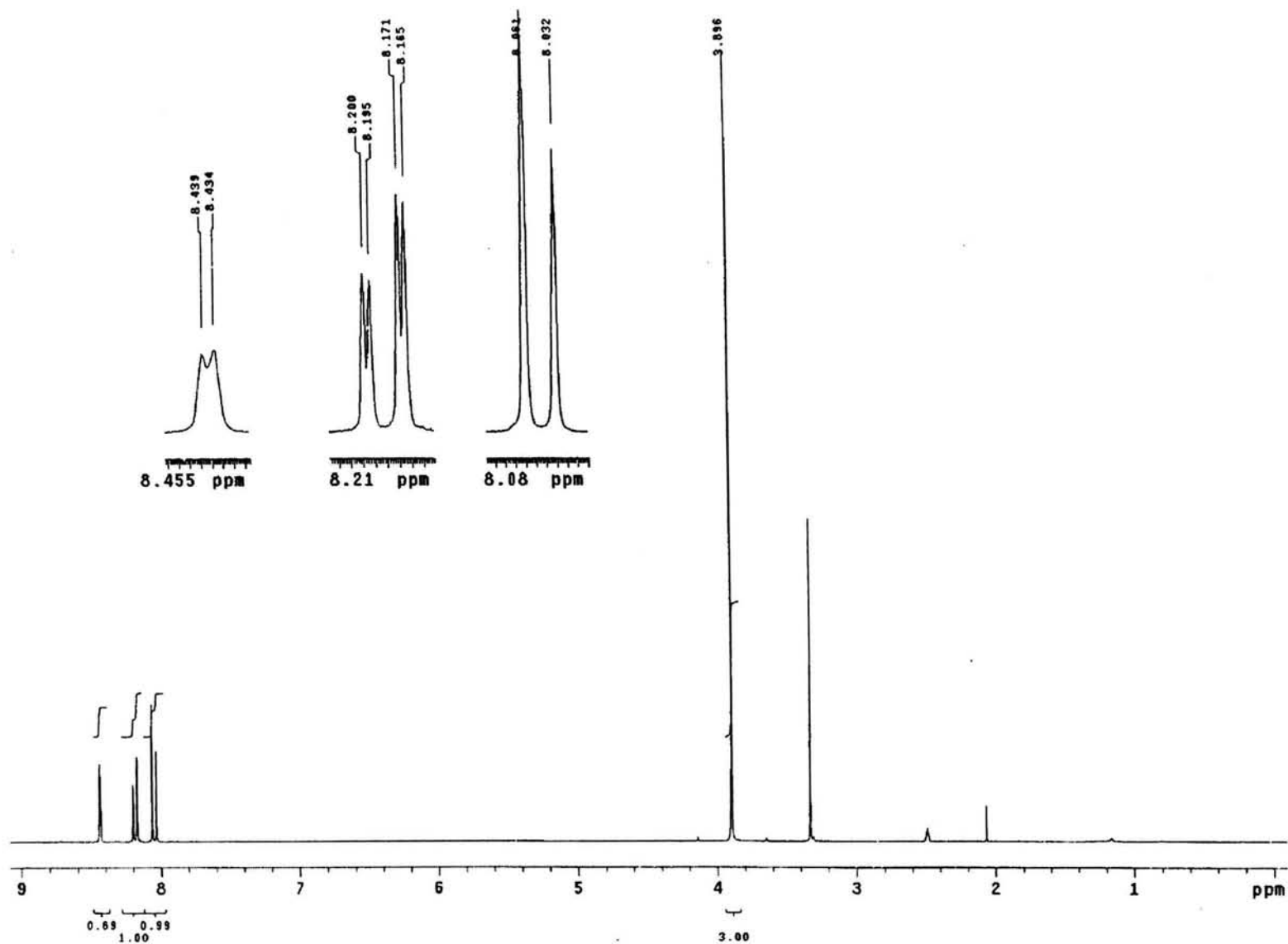
a)



b)

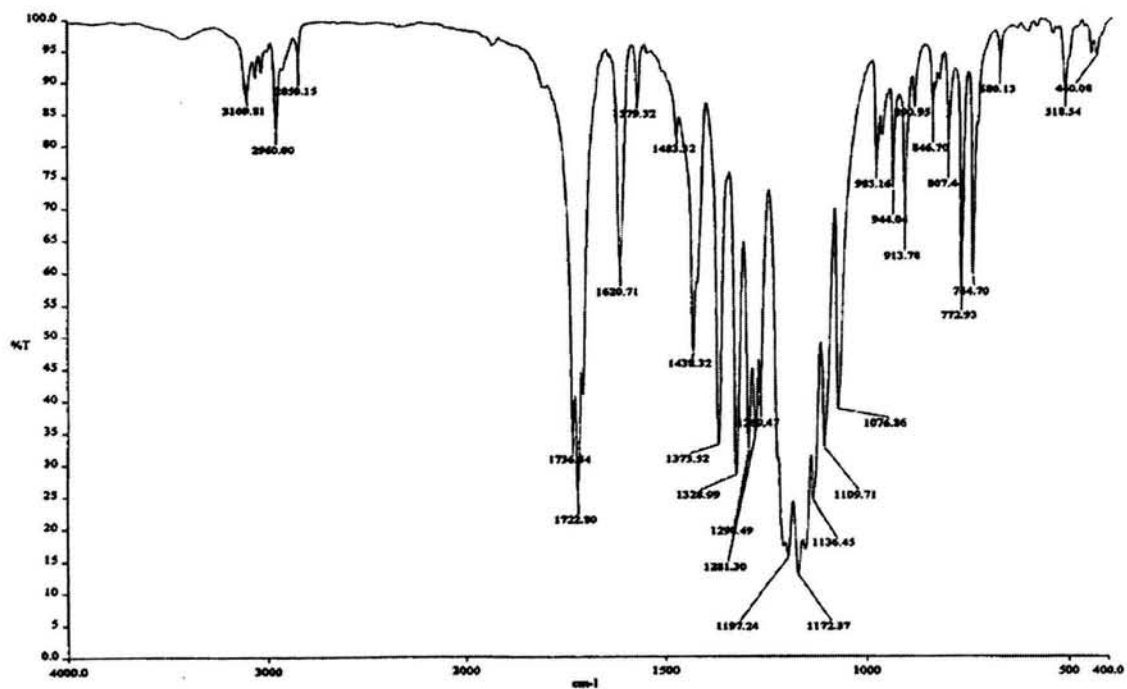


Espectro 19. a) IR (KBr) b) EM (IE) de 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9).

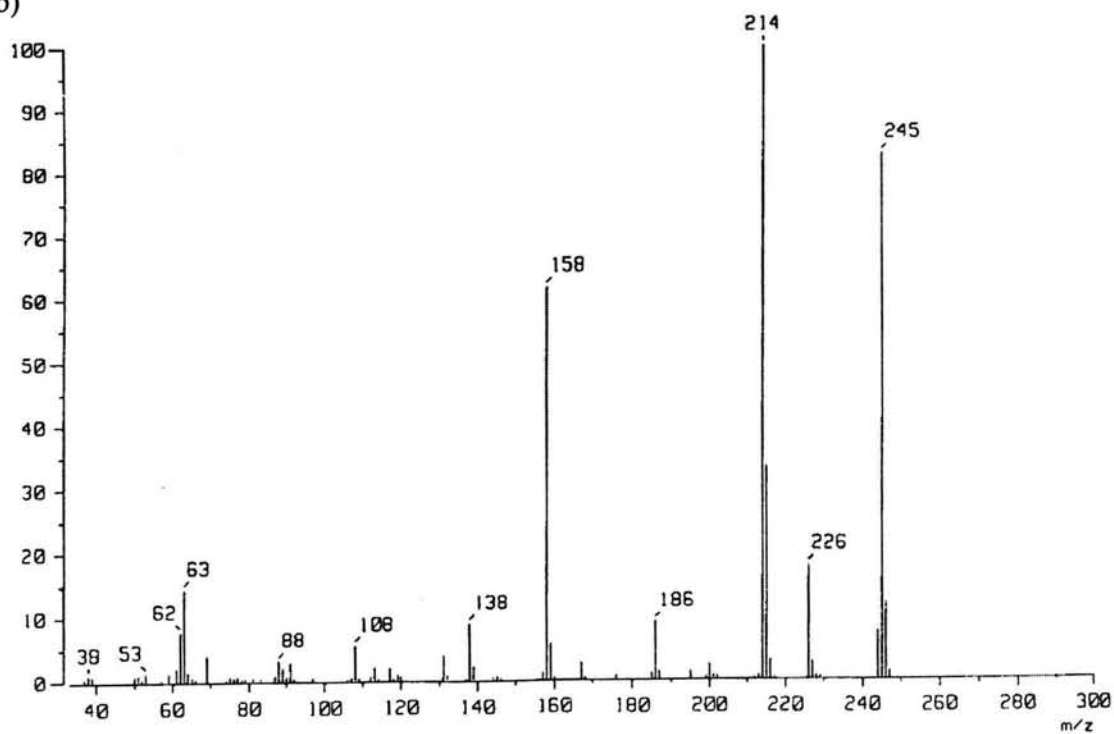


Espectro 20. . RMN ^1H de 2-(trifluorometil)-1,3-5-benzoxazolcarboxilato de metilo (9).

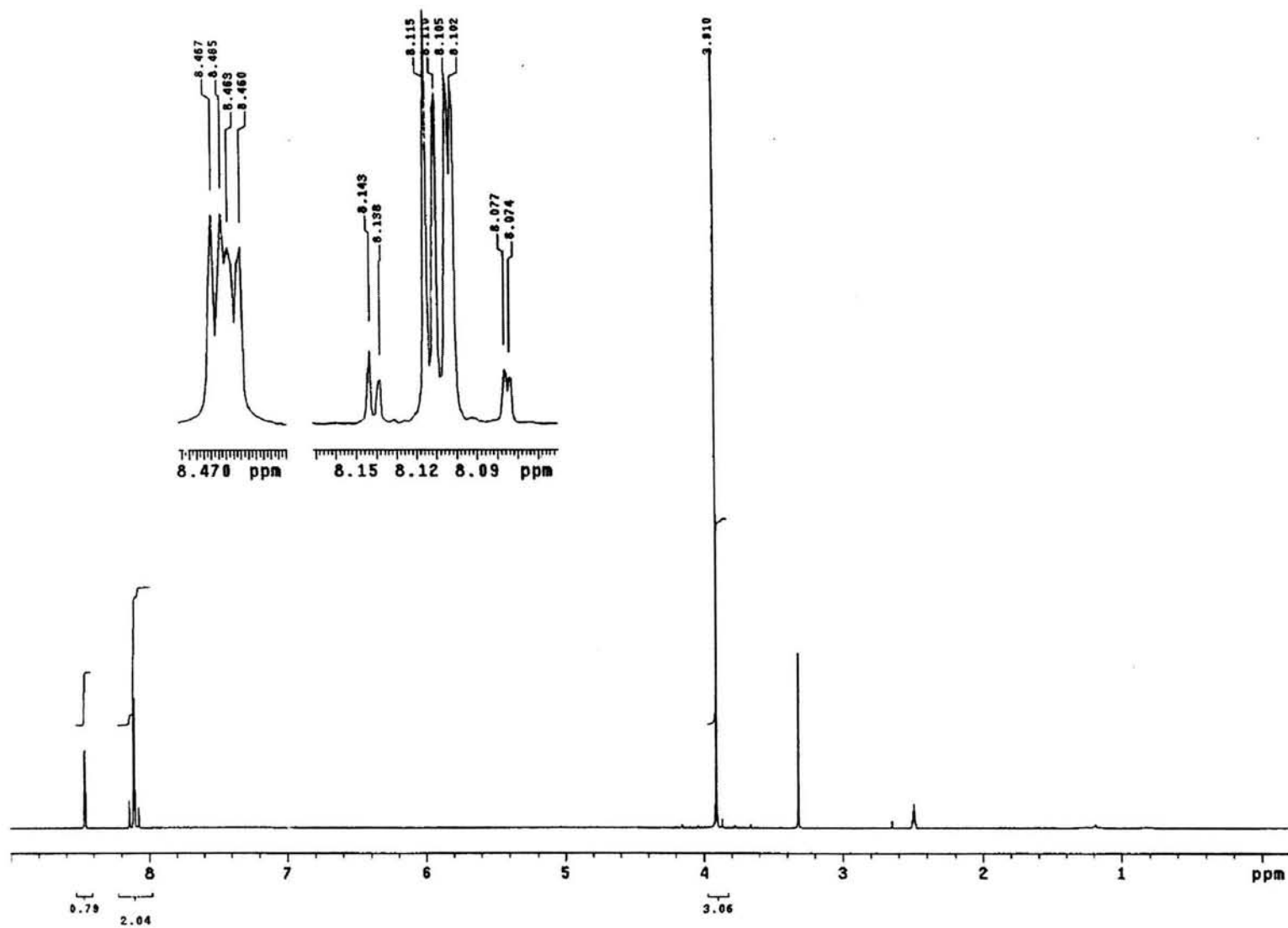
a)



b)



Espectro 21. a) IR (KBr) b) EM (IE) de 2-(trifluorometil)-1,3,6-benzoxazol-carboxilato de metilo (10).



Espectro 22. RMN ^1H de 2-(trifluorometil)-1,3-6-benzoxazolcarboxilato de metilo (10).

Bibliografía

- Adam R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3): 447–475
- Adamson G. W., Bawden D. y Saggars D. T. 1984. Quantitative Structure-Activity Relationship Studies of Acute Toxicity (LD₅₀) in a Large Series of Herbicidal Benzimidazoles. *Pestic. Sci.* 15:31-39.
- Adson A., Burton P. S., Raub T. J., Barsuhn C. L., Audus K. L. y Ho N. F. H. 1995. Passive Diffusion of Weak Organic Electrolytes Across Caco-2 Cell Monolayers: Uncoupling the Contributions of Hydrodynamic, Transcellular and Paracellular Barriers. *J. Pharm. Sci.* 84(10): 1197-1204.
- Adson A., Raub T. J., Burton P. S., Barsuhn C. L., Hilgers A. R., Audus K. L. y Ho N. F. H. 1994. Quantitative Approaches to Delineate Paracellular Diffusion in Cultured Epithelial Cell Monolayers. *J. Pharm. Sci.* 3(11):1529-1536.
- Anderle P., Niederer E., Rubas W., Hildendorf C., Spahn-Langguth H., Wunderli-Allenspach H., Merkle H. P. y Langguth P. 1998. P-Glycoprotein (P-gp) Mediated Efflux in Caco-2 Cell Monolayers: the Influence of Culturing Conditions and Drug Exposure on P-gp Expression Levels. *J. Pharm. Sci.* 87:757-762.
- Andrzejewska M., Yépez-Mulia L., Cedillo-Rivera R., Tapia A., Vilpo L., Vilpo J. y Kazimierczuk Z. 2002. Synthesis, Antiprotozoal and Anticancer Activity of Substituted 2-Trifluoromethyl- and 2-Pentafluoroethylbenzimidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 37:973-978.
- Artursson P. 1990. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: a Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs Over Intestinal Absorptive Cells. *J. Pharm. Sci.* 79(6):476-482.
- Artursson P. y Magnusson C. 1990. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. II: Effect of Extracellular Calcium Concentration on the Paracellular Transport of Drugs of Different Lipophilicities Across Monolayers of Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *J. Pharm. Sci.* 79(7):595-600.
- Balimane P. V., Chong S. y Morrison R. A. 2000. Current Methodologies Used for Evaluation of Intestinal Permeability and Absorption. *J. Pharmacol. Toxicol.*

Methods 44:301-312.

- Benet L. Z. y Cummins C. L. 2001. The Drug Efflux-Metabolism Alliance: Biochemical Aspects. *Adv. Drug Del. Rev.* 50(Supl.):S3-S11.
- Benet L. Z. y Wu C., Hebert M. F. y Wachter V. J. 1996. Intestinal Drug Metabolism and Antitransport Processes: A Potential Paradigm Shift in Oral Drug Delivery. *J. Control. Release.* 39:139-143.
- Berman J., Halm K., Adkison K., Shaffer J. 1997. Simultaneous Pharmacokinetic Screening of a Mixture of Compounds in the Dog Using API LC/MS/MS Analysis for Increased Throughput. *J. Med. Chem.* 40:827-829.
- Bishop B. C., Jones A. S. y Tatlow J. C. 1964 a. The Synthesis of Some Perfluoroalkylbenzimidazoles. *J. Chem Soc.* 86:3076-3080.
- Bishop B.C., Chelton E. T. J. y Jones A. S. 1964 b. The Antibacterial Activity of Some Fluorinecontaining Benzimidazoles. *Biochem. Pharmacol.* 13:751-754.
- Bohets H., Annaert P., Mannens G., van Beijsterveldt L., Anciaux K., Verboven P., Meuldermans W. y Lavrijsen K. 2001. Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development. *Curr. Top. Med. Chem.* 1(5):367:383.
- Bolger M. B., Gilman T. M., Fraczkiwicz R., Steere B. y Woltosz W. S. 2002. Predicting Drug Absorption by Computational Methods. pp 353-377 en Lehr C. M. (ed.) *Cell Culture Models of Biological Barriers. In vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery.* Taylor and Francis, Londres.
- Boreham P. F. L. 1994. The Current Status of Chemotherapy for Giardiasis. p 317-328 en R C A Thompson, J. A. Reynoldson y A. J. Lymbery (ed.), *Giardia: from Molecules to Disease.* CAB International, Cambridge.
- Braun A., Hämmerle S., Suda K., Rothen-Rutishauser B., Günthert M., Krämer S. D. y Wunderli-Allenspach H. 2000. Cell Cultures as Tools in Biopharmacy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11(Supl. 2): S51-S60.
- Buret A. 1994. Pathogenesis- How Does *Giardia* Cause Disease? p 293-315. En Thompson R. C. A., Reynoldson J. A. y Lymbery A. J., ed. *Giardia: from Molecules to Disease.* CAB International, Cambridge.
- Burton D. E., Lambie A. J., Ludgate J. C. L., Newbold G. T., Percival A. y Siggers D. T. 1965. 2-Trifluoromethylbenzimidazoles: a New Class of Herbicidal

Compounds. *Nature* 208:1166-1169.

- Cedillo-Rivera R., Chávez B., Gonzales-Robles A., Tapia A. y Yépez-Mulia L., 2002. *In vitro* Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *J. Eukariot. Microbiol.* 49(3):201-208.
- Chavez B., Cedillo-Rivera R., y Martinez-Palomo A. 1992. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of the *In Vitro* Effect of Benzimidazoles. *J. Protozool.* 39:510-515.
- Dagci H., Ustun S., Taner M. S., Rezos G., Karacasu F. y Budak S. 2002. Protozoon Infections and Intestinal Permeability. *Acta Trop.* 81:1-5.
- De Souza D. W., De Souza M. S. y Neves J. 1973 Therapeutic Action of Mebendazole (R17, 635) in Multiple Parasitized Patients. Preliminary Results. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 15:30-33.
- Deeley R. G. y Cole S. P. C. 1997. Function, Evolution and Structure of Multidrug Resistance Protein (MRP). *Sem. Cancer Res.* 8:193-204.
- Ecker G., Huber M., Schmid D. y Chiba P. 1999. The Importance of a Nitrogen Atom in Modulators of Multidrug Resistance. *Mol. Pharmacol.* 56:791-796.
- Evans D. B. y Jamison D. T. 1994. Economics and the Argument for Parasitic Disease Control. *Science* 264:1866-1867.
- Farthing M. J. G. 1994. Giardiasis as a Disease. pp 15-37. En R C A Thompson, J. A. Reynoldson y A. J. Lymbery (ed.), *Giardia: from Molecules to Disease*. CAB International, Cambridge.
- Farthing, M. J. G., Mata L., Urrutia J. J. y Kronmal R. A. 1986. Natural History of *Giardia* Infection of Infants and Children in Rural Guatemala and its Impact on Physical Growth. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 393-403.
- Gardner T. B. y Hill D. R. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(1): 114-128.
- Guengerich F. P. 1999. Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:1-17.
- Gull K., Dawson P. J., Davis C. y Byard E. H. 1987. Microtubules as Target Organelles for Benzimidazole Anthelmintic Chemotherapy. *Biochem. Soc.*

Trans. 15:59-60.

- Hidalgo I. J. 2001. Assessing the Absorption of New Pharmaceuticals. *Curr. Top. Med. Chem.* 1(5):385-401.
- Higgins C. F. y Linton K. J. 2001. The xyz of ABC Transporters. *Science* 293:1782-1784.
- Horton R. J. 1990. Benzimidazoles in a Wormy World. *Parasitol. Today* 6(4):106.
- Hosoya K. I., Kim K. J. y Lee V. H. 1996. Age-Dependent Expression of P-Glycoprotein gp170 in Caco-2 Cell Monolayers. *Pharm. Res.* 885-890.
- Inaba M. y Maruyama E. 1988. Reversal of Resistance to Vincristine in P388 Leukemia by Various Polycyclic Clinical Drugs with a Special Emphasis on Quinacrine. *Cancer Res.* 50:2064-2067.
- Irvine J. D., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J. W., Selick H. E. y Grove, J. R. 1999. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: a Tool for Membrane Permeability Screening. *J. Pharm. Sci.* 88:28-33.
- Jarroll E L. 1994. Biochemical Mechanism of Antigiardial Drug Action. p 329-337 En R C A Thompson, J A Reynoldson y A J Lymbery (ed.), *Giardia: from Molecules to Disease*. CAB International, Cambridge.
- Johnstone R. W., Ruefli A. A. y Smyth M. J. 2000. Multiple Physiological Functions for Multidrug Transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem. Sci.* 25:1-6.
- Jones O. T. y Watson W. A. 1965. Activity of 2-Trifluoromethylbenzimidazoles as Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Nature* 208:1169-1170.
- Kalkote U. R., Choudhary A. R., Natu A. A., Lahoti R. J. y Ayyangar N. R. 1991. Facile Synthesis of Substituted N-Monoalkylaromatic Amines Under PTC Conditions *Synthes. Comm.* 21 (18-19), 1889-1900.
- Karlsson J., Kuo S., Ziemniak J. y Artursson P. 1993. Transport of Celiprolol Across Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells: Mediation of Secretion by Multiple Transporters Including P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* 110:1009-1016.
- Katoh M., Nakajima M., Yamazaki H. y Yokoi T. 2001. Inhibitory Effects of CYP3A4 Substrates and Their Metabolites on P-glycoprotein-Mediated Transport. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12:505-513.

- Katritzky A. R. y Rachwal S. 1994. New Routes to selectively Methylated Benzimidazoles. *J. Heterocyclic Chem.* 31: 775-779.
- Lacey E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitol. Today* 6(4): 112-115.
- Lacey E. y Gill J. H. 1994. Biochemistry of Benzimidazole Resistance. *Acta Trop.* 56:245-262.
- Leitch G. J., Scanlon M., Shaw A. y Visvevara G. S. 2001. Role of P Glycoprotein in the Course and Treatment of *Encephalitozoon* Microsporidiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(1):73-78.
- Lipinski C. A.; Lombardo F.; Dominy B. W.; Feeney P. J. 1997. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 23:3-25.
- Lipka E., Spahn-Langguth H., Mutschler E. y Amidon G. L. 1998. *In Vivo* Non-Linear Intestinal Permeability of Celiprolol and Propranolol in Conscious Dogs: Evidence for Intestinal Secretion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6:75-81.
- Lloyd D. y Harris J. C. 2002. *Giardia*: Highly Evolved Parasite or Early Branching Eukaryote? *Trends Microbiol.* 10(3): 122-127.
- Lörenberg R. y Amidon G L. 2000. Modern Bioavailability, Bioequivalence and Biopharmaceutics Classification System. New Scientific Approaches to International Regulatory Standards. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50:3-12.
- Madera J. L. y Trier J. S. 1987. Functional Morphology of the Mucosa of the Small Intestine. pp 1209-1250 En Johnson L. R. (ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2a ed. Raven Press, New York
- Markowska M., Oberle R., Juzwin S., Hsu C., Gryzkiewicz M. y Streeter A. J. 2001. Optimizing Caco-2 Cell Monolayers to Increase Throughput in Drug Intestinal Absorption Analysis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 46:51-55.
- Merino G., Alvarez A. I., Prieto J. G. y Kim R. B. 2002. The Anthelmintic Agent Albendazole does not Interact with P-glycoprotein. *Drug Metab. Dispos* 30(4):365-369.
- Meyer E. A. 1994. *Giardia* as an Organism. p 3-13. En R. C. A. Thompson, J. A. Reynoldson y A. J. Lymbery (ed.), *Giardia: from Molecules to Disease*. CAB International, Cambridge.

- Mineno T. y Avery M. A. 2003. Giardiasis: Recent Progress in Chemotherapy and Drug Development. *Curr. Pharm. Des.* 9: 841-855.
- Morales-Hurtado R. 2000. Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente utilizando a la línea celular caco-2 como modelo in vitro de derivados del 1-metilbencimidazol. Tesis de Maestría UNAM
- Nare B., Liu Z., Prichard R. K. y Georges E. 1994. Benzimidazoles, Potent Anti-Mitotic Drugs: Substrates for the P-glycoprotein Transporter in Multidrug-Resistant Cells. *Biochem. Pharmacol.* 48(12):2215-2222.
- Navarrete-Vázquez G., Cedillo R., Hernández-Campos A., Yépez-Mulia L., Hernández-Luis F., Valdez J., Morales R., Cortés R., Hernández M. y Castillo R. 2001. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 187-190
- Nielsen N. M. y Bundgaard H. 1988. Glycolamide Esters as Biolabile Prodrugs of Carboxylic Acid Agents: Synthesis, Stability, Bioconversion, and Physicochemical Properties. *J. Pharm. Sci.* 77(4):285-298.
- Pearce H. L., Safa A. R., Bach N. J., Winter M. A., Cirtain M. C. y Beck W. T. 1989. Essential Features of the P-glycoprotein Pharmacophore as Defined by a Series of Reserpine Analogs that Modulate Multidrug Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5128-5132.
- Penzotti J. E., Lamb M. L., Evensen E. y Grootenhuis P. D. J. 2002. A Computational Ensemble Pharmacophore Model for Identifying Substrates of P-Glycoprotein. *J. Med. Chem.* 45(9):1737-1740
- Petri W. A. 2003. Therapy of Intestinal Protozoa. *Trends Parasitol.* 19(11):523-526.
- Piña-Gallardo B. E. 2003. Preparación de tres profármacos del 5-carboxi-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM.
- Pisano C., Battistoni A., Antoccia A., Degrassi F. y Tanzarella C. 2000, Changes in Microtubule Organization After Exposure to a Benzimidazole Derivate in Chinese Hamster Cells. *Mutagenesis* 15(6):507-515.
- Ram S. y Ehrenkauf R. E. 1984. A General Procedure for Mild and Rapid Reduction of Aliphatic and Aromatic Nitro Compounds Using Ammonium

Formate as a Catalytic Hydrogen Transfer Agent. *Tetrahedron Letters* 25(32):3415-3418.

- Redondo P. A., Álvarez A. I., Garcia J. L., Larrodé O. M., Merino G. y Prieto J. G. 1999. Presystemic Metabolism of Albendazole: Experimental Evidence of an Efflux Process of Albendazole Sulfoxide to Intestinal Lumen. *Drug. Metab. Dispos.* 27(6):736-740
- Reynoldson J. A., Thompson R. C. A. y Meloni B. P. 1991. The Mode of Action of Benzimidazoles Against *Giardia* and Their Chemotherapeutic Potential Against *Giardia* and Other Parasitic Protozoa. p 587-593 en G. Coombs y M. North (ed.), *Biochemical Protozoology*. Taylor and Francis, Londres.
- Roe, F. J. C. 1985. Safety of Nitroimidazoles. *Scand. J. Infect. Dis.* 46: 72-81.
- Saggers D. T. y Clark M. L. 1967. Trifluoromethyl-benzimidazoles- a New Family of Acaricides. *Nature* 215:275-276.
- Scala S., Akhmed N., Rao U. S., Paull K., Lan L., Dickstein B., Lee J., Elgemeie G. H., Stein W. D. y Bates S. E. 1997. P-Glycoprotein Substrates and Antagonists Cluster into Two Distinct Groups. *Mol. Pharmacol.* 51:1024-1033.
- Seelig A. 1998. A General Pattern for Substrate Recognition by P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 251:252-261.
- Sharma S. 1994. Design of New Drugs for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles. *Adv. Drug Res.* 25: 103-172.
- Shiau Y., Fernandez P., Jackson M. J. y McMonagle S. 1985. Mechanisms Maintaining a Low pH Microclimate in the Intestine. *Am. J. Physiol.* 248(*Gastrointest. Liver Physiol.* 11): G608-G-617.
- Smith W. T. Steinle F. C. 1953. Some Substituted Benzimidazoles. *J. Amer. Chem. Soc.* 75:1292-1294.
- Soriano-Agaton F. N. 2002. Síntesis del 5-carboxi-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, un bioprecursor y un análogo de tipo carboxamida. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM.
- Thompson T. N. 2001. Optimization of Metabolic Stability as a Goal of Modern Drug Design. *Med. Res. Rev.* 21(5):412-449.
- Toso R. J., Jordan M. A., Farrell K. W., Matsumoto B. y Wilson L. 1993. Kinetic

- Stabilization of Microtubule Dynamic Instability in Vitro by Vinblastine. *Biochem.* 32:1285-1293.
- Townsend L. B. y Wise D. S. The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitol. Today* 6(4):107-112.
- Tukker J. J. *In Vitro* Methods for the Assessment of Permeability. p 51-72 en J. B Dressman y H. Lennernäs (ed.) *Oral Drug Absorption Prediction and Assessment*. Drug and the Pharmaceutical Sciences Vol. 106. Marcel Dekker Inc. 2000 New York.
- Upcroft P y Upcroft J A. 2001. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(1):150-164.
- van de Waterbeemd H. Intestinal Permeability: Prediction from Theory. pp. 31-49 en J. B Dressman. y Lennernäs (ed.) *Oral Drug Absorption Prediction and Assessment*. Drug and the Pharmaceutical Sciences Vol. 106. Marcel Dekker Inc. 2000 New York.
- Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H., Smith B. R., Ward K. W. y Kopple K. D. 2002. Molecular Properties that Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* 45:2615-2623.
- Wacher V. J., Salphati L. y Benet L. Z. 2001. Active Secretion and Enterocytic Drug Metabolism Barriers to Drug Absorption. *Adv. Drug Del. Rev.* 46:89-102.
- Walchshofer N., Delabre-Defayolle I. Paris J. y Petavy A. F. 1990. In Vivo Morphological Damage Induced by a New Benzimidazole Prodrug in *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. *J. Pharm. Sci.* 79(7):606-608.
- Walter E. y Kissel T. 1995. Heterogeneity in the Human Intestinal Cell Line Caco-2 Leads to Differences in Transepithelial Transport. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3:215-230.
- Wang E. Lew K., Barecki M., Casciano C. N., Clement R. P. y Johnson W. W. 2001. Quantitative Distinctions of Active Site Molecular Recognition by P-Glycoprotein and Cytochrome P450 3A4. *Chem. Res. Toxicol.* 14:1596-1603.
- Withington L. 2002. High-Throughput Epithelial Cell Culture Systems for Screening Drug Intestinal Permeability. pp 94-111 en C. M. Lehr (ed.) *Cell Culture Models of Biological Barriers. In vitro Test Systems for Drug Absorption and*

Delivery. Taylor and Francis, Londres

- Wolinowska R., Zajdel-Dabrowska J., Starosciak B. J. y Kazimierczuk Z. 2002. Antimicrobial Activity of Substituted 2-Trifluoromethyl- and 2-pentafluoroethylbenzimidazoles. *Acta Microbiol. Pol.* 51(3):265-273.
- Yamashita A, Tokuda H *et al.* Optimized Conditions for Prediction of Intestinal Drug Permeability Using Caco-2 Cells. 2000 *Eur. J. Pharm. Sci.* 10:195-204
- Zamora J. M., Pearce H. L. y Beck W. T. 1988. Physical-Chemical Properties Shared by Compounds that Modulate Multidrug Resistance in Human Leukemic Cells. *Mol. Pharmacol.* 33:454-462.
- Zhong H. L., Cao W. J., Rossignol J. F., Feng M. L., Hu R. Y., Gan S. B. y Tan W. 1986. Albendazole in Nematode, Cestode, Trematode and Protozoan (*Giardia*) Infections. *Chin. Med. J. (Engl. Ed.)* 99:912-915.