



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y actividad fasciolicida de fosfonoximetil bencimidazoles

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Miguel Angel Flores Ramos

TUTOR: Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Facultad de Química

México, D. F. Febrero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Síntesis y actividad fasciolicida de fosfonooximetil bencimidazoles

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Miguel Angel Flores Ramos



TUTOR: Dr. Rafael Castillo Bocanegra AÑO: 2016
Facultad de Química

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a Miguel y Rafaela, mis padres, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundido siempre; además del valor mostrado para salir adelante y por su amor. A mis hermanos Mario y Toño, que más que hermanos son mis mejores amigos. A mis hermanas Malena, Lupita y Jazmín.

A mi amor, Magali, te agradezco la enorme ayuda y el apoyo para concluir con éxito este proyecto de tesis. Aunque hemos pasado momentos difíciles, siempre has estado conmigo brindándome tu comprensión, cariño y amor.

De manera muy especial agradezco al Dr. Rafael Castillo, su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador. Adicionalmente, agradezco a la Dra. Alicia Hernández, por sus invaluable consejos y enseñanzas, que ayudaron a llevar cabo el trabajo aquí presentado.

Agradezco al Dr. Froylán Ibarra Velarde y a la Dra. Yolanda Vera Montenegro de la FMVZ, UNAM, por la determinación de las pruebas fasciolícidas. Igualmente, agradezco a la Dra. Helgi Jung Cook y a la M. en C. Ma. de Lourdes Beatriz Mayet Cruz de la Facultad de Química, UNAM, por la determinación de las pruebas analíticas. Su participación ha sido crucial para desarrollar este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio 122, Pedro Trejo, Miguel Velázquez, Rodrigo Aguayo, Elí Fernández, Paulina Flores, Rodrigo Arroyo, Rodrigo Pérez, Jeferson Mateus, Eduardo Sanabria, Lucy Cano, Gustavo Martínez, Sandy Salgado, Luis Zavala, George Victoria y Marie Sarabia, gracias por su amistad y por los excelentes momentos que compartimos juntos.

A la UNAM, institución donde realicé mi formación profesional. Al Posgrado en Ciencias Químicas, por el apoyo brindado.

A los miembros de mi comité tutor Dr. Roberto Martínez y Dr. Héctor Jaime Salgado Zamora quienes enriquecieron este proyecto a lo largo de su evolución. A los miembros del jurado Dr. Francisco Yuste López (presidente), Dr. Héctor Jaime Salgado Zamora (Vocal), Dr. Osvaldo Froylán Ibarra Velarde (Vocal), Dra. Helgi Jung Cook (Vocal) y Dr. José Alfredo Vázquez Martínez (Secretario) por sus valiosas observaciones y aportaciones para enriquecer este trabajo de tesis.

Al personal de la USAI de la Facultad de Química, UNAM, en especial a M. en C. Rosa Isela del Villar, Dra. Minerva Monroy, Q. Georgina Duarte, Q. Marisela Gutiérrez y Margarita Guzmán Villanueva, por la determinación de los espectros de los compuestos sintetizados en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico proporcionado durante mis estudios de doctorado con el número de becario 223411. A la DGAPA-PAPIIT por el apoyo en el proyecto IT201113.

Jurado Asignado

Presidente	Dr. Francisco Yuste López
Vocal	Dr. Héctor Jaime Salgado Zamora
Vocal	Dr. Osvaldo Froylán Ibarra Velarde
Vocal	Dra. Helgi Jung Cook
Secretario	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

La mayor parte del presente trabajo se realizó en la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, laboratorio L-122 del conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra. Adicionalmente, los estudios analíticos se realizaron en este mismo departamento, laboratorio L-112, bajo la dirección de la Dra. Helgi Jung Cook. Las evaluaciones fasciolicidas se llevaron a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM) y en la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), bajo la dirección del Dr. Osvaldo Froylán Ibarra Velarde y el Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón, respectivamente.

Los resultados obtenidos en éste trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- **Flores-Ramos, M.**, Castillo, R., et al., 2014. 5-Chloro-2-methyl-sulfanyl-6-(naphthalen-1-yl-oxy)-1*H*-benzimidazole methanol monosolvate. *Acta crystallographica. Section E, Structure reports online*, 70(Pt 1), p.077.
- **Flores-Ramos, M.**, Ibarra-Velarde, F., et al., 2014. A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(24), pp.5814–5817.

Además, el registro de una patente:

- **Miguel Angel Flores Ramos**, Rafael Castillo Bocanegra, María Alicia Hernández Campos, Osvaldo Froylán Ibarra Velarde, Remedios Yolanda Vera Montenegro. Nuevos compuestos hidrosolubles derivados del bencimidazol, útiles para el tratamiento de la fasciolosis. Número de solicitud *MX/a/2014/014417*.

Los resultados de esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos:

- 13th International Congress of parasitology “A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis”. Castillo Rafael^{1*}, **Flores-Ramos Miguel**¹, Ibarra-VelardeFroylán², Hernández-Campos Alicia¹, Vera-Montenegro Yolanda² ¹Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, México. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF. 04510, México. Realizados en la Ciudad de México del 10-15 de agosto 2014.
- 49° Congreso Mexicano de Química y 33° Congreso Nacional de Educación Química Mérida, Yucatán, 2014. Castillo Rafael, **Flores-Ramos Miguel**, Ibarra-Velarde Froylán, Hernández-Campos Alicia, Vera-Montenegro Yolanda. ”Síntesis y actividad fasciolicida de fosfonooximetil bencimidazoles”. Realizado del 17 al 21 de septiembre 2014.
- 250th ACS National Meeting, Boston, MA, August 16-20, 2015 Fall Meeting. American Chemical Society Division of Medicinal Chemistry. Highly water-soluble benzimidazole derivatives useful for the treatment of fasciolosis. Rafael Castillo-Bocanegra¹, **Miguel A. Flores-Ramos**¹, Froylán O. Ibarra², Alicia Hernández Campos¹, Yolanda Vera-Montenegro², Helgi Jung-Cook¹, Germinal J. Cantó-Alarcón³. (1) Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México; (2) Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México; (3) Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, México.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac	Acetilo	DMAP	4-Dimetilaminopiridina
AcOEt	Acetato de Etilo	DMF	Dimetilformamida
NOESY	Efecto Nuclear Overhauser	DMSO	Dimetilsulfóxido
NOE	Efecto Nuclear Overhauser	DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
TMS	Tetrametilsilano	Exp	Experimental
Anal. Calcd.	Análisis Calculado	EM	Espectrometría de Masas
F. hepatica	Fasciola hepatica	EMAR	Espectrometría de Masas de Alta de Resolución
p_{ka}	Logaritmo negativo de la constante de disociación	EM/ES	Espectrometría de Masas Electro Spray
UV	Ultra violeta	EM/IE	Espectrometría de Masas Impacto Electrónico
ccf	Cromatografía en Placa Fina	R_f	Factor de retención
pH	Logaritmo negativo de concentración de protones	Lb/in²	Libras sobre pulgada cuadrada
DE	Desviación estándar	eq	Equivalentes
EE	Error estándar	g	Gramos
d	Señal doble	h	Horas
dd	Señal doble de dobles	Hz	Hertz
t	Señal triple	IR	Infrarrojo
IES	Ionización electrospray	J	Constante de Acoplamiento
DCM	Diclorometano	M	Molar
H₂SO₄	Ácido sulfúrico	M⁺	Ion Molecular
HNO₃	Ácido nítrico	mmol	milimoles
		s	Señal simple

m	Señal Múltiple	μM	Micromoles
mL	Mililitros	δ	Desplazamiento Químico
MeOH	Metanol	UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
HCl	Ácido clorhídrico	UV	Luz Ultravioleta
MeCN	Acetonitrilo	NaOH	Hidróxido de sodio
m/z	Relación masa/carga	Ph	fenilo
Ni-Raney	Níquel Raney	RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
OMS	Organización Mundial de la Salud	S_NAr	Sustitución Nucleofílica Aromática
pf	Punto de Fusión		
PM	Peso Molecular		
ppm	Partes Por Millón		
RMN COSY	Resonancia Nuclear Homonuclear		Magnética Correlación
RMN ¹³C	Resonancia Nuclear de Carbono 13		Magnética
RMN ¹H	Resonancia Nuclear de Hidrógeno		Magnética
RMN HMBC	Resonancia Nuclear Heteronuclear Enlaces		Magnética Correlación a varios
RMN HSQC	Resonancia Nuclear Heteronuclear Simple		Magnética Correlación
W	Potencia (Watts)		
μ	10 ⁻⁶		

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES GENERALES	4
2.1 GENERALIDADES SOBRE LA FASCIOSIS	4
2.2 CICLO DE VIDA DE <i>Fasciola hepatica</i>	6
2.3 MEDIDAS DE CONTROL.....	7
2.3.1 Control del huésped intermediario	8
2.3.2 Control del huésped libre de <i>F. hepatica</i>	8
2.3.3 Control de <i>F. hepatica</i> en el huésped definitivo.....	9
2.4 TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO.....	9
2.5 BENCIMIDAZOLES.....	10
2.5.1 Bencimidazoles como antiparasitarios	13
2.5.2 Triclabendazol	14
2.5.3 Compuesto alfa como agente fasciolicida.....	15
2.5.4 Solubilidad de los compuestos bencimidazólicos.....	17
2.6 ESTRATEGIAS UTILIZADAS EN QUÍMICA FARMACÉUTICA PARA AUMENTAR LA SOLUBILIDAD	19
2.7 LOS PROFÁRMACOS EN LA QUÍMICA FARMACÉUTICA	19
2.7.1 Definición de profármaco	20
2.7.2 Clasificación de los profármacos	22
2.7.3 Grupos funcionales susceptibles para el diseño de profármacos	25
2.7.4 Ésteres de fosfato como acarreador en los profármacos.....	27
2.7.5 Profármaco de los carbamatos bencimidazólicos	28
CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
4.1 HIPÓTESIS	31
4.2 OBJETIVO GENERAL.....	31
4.3 OBJETIVOS PARTICULARES	31
CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	33
5.1 PARTE QUÍMICA	33
5.1.1 Estudio sobre la síntesis del compuesto alfa (13) y triclabendazol (14).....	33
5.1.2 Estudio sobre la síntesis de los intermediarios 7 y 8	34
5.1.2.1 Reacción de S_NAr usando un equipo de microondas.....	34
5.1.2.2 Reacción de S_NAr utilizando vacío de 150-200 mmHg	35
5.1.3 Estudio sobre la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34	35
5.1.3.1 Primera estrategia para la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34	35
5.1.3.1.1 Síntesis de los acetiloximetilbencimidazoles 20 y 21	36
5.1.3.1.2 Reacciones adicionales utilizando el intermediario 17	37
5.1.3.1.2.1 Estudio sobre 36	37
5.1.3.1.2.2 Estudio sobre 39	37
5.1.4.1 Segunda estrategia para la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34	37
5.1.4.1.1 Síntesis de clorosulfato de clorometilo (27).....	38
5.1.4.1.2 Síntesis de fosfato de di-terc-butiltetrametilamonio (35).....	39

5.2	DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD, ESTABILIDAD ACUOSA E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	39
5.2.1	Determinación de solubilidad acuosa.....	39
5.2.1.1	Preparación de la muestra	39
5.2.1.2	Preparación de la curva de calibración	40
5.2.2	Determinación de estabilidad acuosa.....	40
5.2.2.1	Preparación de la muestra	40
5.2.2.2	Preparación de la curva de calibración	40
5.2.3	Determinación de hidrólisis enzimática.....	41
5.2.3.1	Preparación de la muestra	41
5.2.3.2	Preparación de la curva de calibración	41
5.3	PARTE BIOLÓGICA.....	41
5.3.1	Evaluación in vitro de la actividad fasciolicida de MFR-33	41
5.3.2	Evaluación in vivo de la actividad fasciolicida de los profármacos MFR-33 y MFR-34	42
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		44
6.1	CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO.....	44
6.2	SÍNTESIS DEL COMPUESTO ALFA (13) Y TRICLABENDAZOL (14).....	46
6.2.1	Sustitución Nucleofílica Aromática (S_NAr).....	48
6.2.1.1	Reacción de S_NAr usando un equipo de microondas Synthos 3000 Anton Paar.....	49
6.2.1.2	Reacción de S_NAr usando vacío de 150-200 mmHg.....	50
6.2.2	Difracción de rayos X.....	51
6.3	ESTUDIO SOBRE LA SÍNTESIS DE LOS PROFÁRMACOS MFR-33 Y MFR-34	52
6.3.1	Primera estrategia para síntesis de los profármacos	52
6.3.1.1	Síntesis de los hidroximetilbencimidazoles 17 y 18	52
6.3.1.2	Síntesis de los acetiloximetilbencimidazoles 20 y 21	54
6.3.1.3	Estudio sobre la síntesis de MFR-33	55
6.3.1.3.1	Reacciones adicionales utilizando el intermediario 17	56
6.3.2	Segunda estrategia para síntesis de MFR-33 y MFR-34	59
6.3.2.1	Síntesis de fosfato monohidrógeno de di-terc-butilo (24).....	59
6.3.2.2	Síntesis de clorosulfato de clorometilo (27).....	61
6.3.2.3	Síntesis de fosfato de di-terc-butilclorometilo (28).....	62
6.3.2.3.1	Procedimiento A	63
6.3.2.3.2	Procedimiento B	63
6.3.2.4	Síntesis de los intermediarios 29 y 30	65
6.3.2.5	Síntesis de los intermediarios 31 y 32	70
6.3.2.6	Síntesis de MFR-33 y MFR-34	72
6.4	PREDICCIÓN DE PK_a TEÓRICO	74
6.5	SOLUBILIDAD ACUOSA DE LOS PROFÁRMACOS MFR-33 Y MFR-34	77
6.6	ESTABILIDAD DE LOS PROFÁRMACOS MFR-33 Y MFR-34	79
6.7	HIDRÓLISIS EN SOLUCIÓN CON FOSFATASA ALCALINA DE LOS PROFÁRMACOS MFR-33 Y MFR-34	79
6.8	EVALUACIÓN IN VITRO DEL PROFÁRMACO MFR-33	81
6.9	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FASCIOLICIDA IN VIVO DE MFR-33 Y MFR-34	81
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....		85
CAPÍTULO 8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....		88
8.1	PARTE QUÍMICA.....	88
8.1.1	Instrumentación y materiales.....	88
8.1.2	Sistemas cromatográficos	89
8.1.3	Procedimientos sintéticos	90
8.1.3.1	Síntesis de los intermediarios	90
8.1.3.1.1	N-(3,4-diclorofenil)acetamida (2).....	90

8.1.3.1.2	<i>N</i> -(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3).....	90
8.1.3.1.3	4,5-dicloro-2-nitroanilina (4)	91
8.1.3.1.4	Procedimiento general de S_NAr (7 y 8)	91
8.1.3.1.4	Procedimiento general para hidrólisis de acetamidas 15 y 16 en medio básico.....	93
8.1.3.1.5	Procedimiento general para hidrogenación catalítica	93
8.1.3.1.6	Procedimiento general de ciclocondensación.....	94
8.1.3.1.7	Procedimiento general de <i>S</i> -alquilación con yoduro de metilo	94
8.1.3.2	Síntesis de los productos finales.....	95
8.1.3.2.1	Procedimiento general para la síntesis de hidroximetilbencimidazoles	95
8.1.3.2.2	Procedimiento general para la síntesis de acetiloximetilbencimidazoles	96
8.1.3.2.3	Síntesis de intermediarios con fósforo	97
8.1.3.2.4	Procedimiento general para la obtención de los profármacos MFR-33 y MFR-34	99
8.2	PREDICCIÓN DE PK_a TEÓRICO PARA MFR-34	103
8.3	PARTE ANALÍTICA.....	104
8.3.1	Solubilidad acuosa.....	104
8.3.1.1	Datos para elaboración de curva estándar de los compuestos 13 y 14	104
8.3.1.2	Datos para elaboración de curva estándar para MFR-33 y MFR-34	104
8.3.1.3	Preparación de las muestras	105
8.3.1.3.1	Preparación de la muestra 13 y 14	105
8.3.1.3.2	Preparación de las muestras MFR-33 y MFR-34	106
8.3.2	Estabilidad acuosa.....	106
8.3.3	Hidrólisis enzimática	106
8.4	PARTE BIOLÓGICA.....	108
8.4.1	Evaluación <i>in vitro</i>	108
8.4.2	Evaluación <i>in vivo</i>	109
	REFERENCIAS	110
	APÉNDICE 1. ESPECTROS	114
	APÉNDICE 2. PUBLICACIONES	220
	APÉNDICE 3. PATENTE	226

ÍNDICE DE FIGURAS

Antecedentes Generales

<i>Figura 2.1. Fasciola hepatica adulta.</i>	6
<i>Figura 2.2. Ciclo de vida de Fasciola hepatica.</i>	7
<i>Figura 2.3. Bencimidazoles con diferentes propiedades biológicas.</i>	12
<i>Figura 2.4. Compuestos bencimidazólicos antihelmínticos.</i>	13
<i>Figura 2.5. Compuestos bencimidazólicos utilizados para el tratamiento de la fasciolosis.</i>	14
<i>Figura 2.6. Reemplazo bioisotérico no clásico en el triclabendazol.</i>	16
<i>Figura 2.7. Comparación entre análogos y profármacos.</i>	20
<i>Figura 2.8. Primeros profármacos encontrados por serendipia.</i>	21
<i>Figura 2.9. Interrelación existente entre los objetivos que se persiguen en el desarrollo de profármacos.</i>	22
<i>Figura 2.10. Ilustración simplificada del concepto de profármaco.</i>	23
<i>Figura 2.11. Ejemplos de profármacos (compuestos bioprecursores y derivados biorreversibles).</i>	24
<i>Figura 2.12. Grupos funcionales para derivatizar una amina.</i>	26
<i>Figura 2.13. Fosfonooximetil derivados del 1H-bencimidazol-2-carbamato de metilo.</i>	29

Hipótesis y Objetivos

<i>Figura 4.1. Profármacos propuestos del compuesto alfa (MFR-33) y triclabendazol (MFR-34).</i>	31
--	----

Resultados y Discusión

<i>Figura 6.1. Estructura de la fosfenitoína.</i>	46
<i>Figura 6.2. RMN NOESY para identificar los diferentes hidrógenos en el compuesto alfa (13).</i>	48
<i>Figura 6.3. Celda unitaria del compuesto alfa (13) y estructura molecular con una molécula de metanol.</i>	52
<i>Figura 6.4. RMN ¹H de mezcla de regioisómeros 17a, 17b, 17a' y 17b'.</i>	54
<i>Figura 6.5. Espectro de Masas del sólido obtenido en la reacción.</i>	58
<i>Figura 6.6. RMN ¹H de 6-cloro-1-(4-toluensulfonyl)-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-H-bencimidazol.</i>	59
<i>Figura 6.7. RMN ¹H del compuesto 29.</i>	67
<i>Figura 6.8. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm) experimento NOE-1D para 29a.</i>	68
<i>Figura 6.9. RMN ¹H para el compuesto 30 como mezcla de regioisómeros (50:50).</i>	69
<i>Figura 6.10. RMN ¹H para el compuesto 31b.</i>	70
<i>Figura 6.11. RMN ¹H de la mezcla de regioisómeros para 31.</i>	71
<i>Figura 6.12. RMN ¹H de la mezcla de regioisómeros para MFR-33.</i>	72
<i>Figura 6.13. RMN ¹H de la mezcla de regioisómeros para MFR-34.</i>	73
<i>Figura 6.14. pK_a's teóricos de MFR-33 obtenidos de MarvinSketch.</i>	75
<i>Figura 6.15. pK_a's teóricos de MFR-33 obtenidos de ACDLab/pK_a.</i>	76
<i>Figura 6.16. Compuestos a los cuales se les determinó solubilidad acuosa.</i>	77
<i>Figura 6.17. Estructuras de los profármacos de fosfato de etopósido, LY307853 y fosfato de taxol.</i>	82

Procedimiento Experimental

<i>Figura 8.2.1. pK_a's teóricos de MFR-34 obtenidos de ACDLab/pK_a.</i>	103
--	-----

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Antecedentes Generales

<i>Esquema 2.1. Primeras síntesis de bencimidazoles.</i>	11
<i>Esquema 2.2. pKa de un derivado del bencimidazol.</i>	11
<i>Esquema 2.3. Tautómeros y regioisómeros de bencimidazoles 5(6) sustituidos.</i>	11

Metodología Experimental

<i>Esquema 5.1. Ruta sintética para obtener el compuesto alfa (13) y triclabendazol (14). Reactivos y condiciones: (a) Ac₂O, 40-50 °C; (b) H₂SO₄, HNO₃, 0-5 °C; (c) NaOH, MeOH, H₂O; (d) K₂CO₃, DMF, 115 °C; (e) H₂, Ni-Raney, MeOH; (f) CS₂, KOH, EtOH, 70 °C; (g) CH₃I, KOH, Acetona, 0-10 °C.</i>	34
<i>Esquema 5.2. Reacción modelo para incrementar el rendimiento de la reacción de S_NAr.</i>	35
<i>Esquema 5.3. Ruta sintética de la primera estrategia para obtener MFR-33 y MFR-34. Reactivos y condiciones: (a) CH₂O, CH₂Cl₂, temperatura ambiente; (b) 1 eq de (CH₃CH₂)₃N, CH₂Cl₂, temperatura ambiente; (c) Cl₃CCN, DMF, temperatura ambiente; (d) MeONa, MeOH.</i>	36
<i>Esquema 5.4. Demostración de la obtención de los derivados hidroximetil bencimidazoles.</i>	36
<i>Esquema 5.5. Sustitución nucleofílica.</i>	37
<i>Esquema 5.6. Sustitución nucleofílica.</i>	37
<i>Esquema 5.7. Procedimiento general para la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34. Reactivos y condiciones: (a) KMnO₄, NaHCO₃, H₂O, 0-5 °C; (b) HCl, 0-5 °C; (c) reflujo 70 °C; (d) NaHCO₃, n-Bu₄NHSO₄, CH₂Cl₂-H₂O, 0 °C-temperatura ambiente; (e) NaH, DMF, temperatura ambiente; (f) HCl 4 M en dioxano, temperatura ambiente; (g) NaOH/H₂O, temperatura ambiente.</i>	38
<i>Esquema 5.8. Reacción para generar 27.</i>	39
<i>Esquema 5.9. Síntesis de intermediario alterno 35.</i>	39

Resultados y Discusión

<i>Esquema 6.1. Derivados biorreversibles de 1H-bencimidazol-2-carbamato de metilo tomados como modelo.</i>	44
<i>Esquema 6.2. Ilustración de la estrategia de profármaco utilizada.</i>	45
<i>Esquema 6.3. Sustitución nucleofílica aromática reportada.</i>	49
<i>Esquema 6.4. Obtención de mezcla de regioisómeros.</i>	53
<i>Esquema 6.5. Obtención de mezcla de regioisómeros con exceso de formaldehído.</i>	53
<i>Esquema 6.6. Mecanismo de reacción propuesto en la primera estrategia para la obtención de 31.</i>	56
<i>Esquema 6.7. Formación de puentes de hidrógeno en los derivados 17-18.</i>	56
<i>Esquema 6.8. Sustitución nucleofílica.</i>	57
<i>Esquema 6.9. Sustitución nucleofílica.</i>	58
<i>Esquema 6.10. Ruta de síntesis de 24.</i>	60
<i>Esquema 6.11. Ruta prevista para la síntesis de II.</i>	60
<i>Esquema 6.12. Reacción para generar 27 y su principal impureza (I).</i>	61
<i>Esquema 6.13. Primera ruta propuesta.</i>	62
<i>Esquema 6.14. Síntesis de 28 reportado por Mäntylä.</i>	63
<i>Esquema 6.15. Síntesis propuesta para obtener 28.</i>	63
<i>Esquema 6.16. Síntesis propuesta para obtener 35.</i>	64
<i>Esquema 6.17. Ruta propuesta de descomposición de 28.</i>	65
<i>Esquema 6.18. Mezcla de regioisómeros obtenidos.</i>	66
<i>Esquema 6.19. Interacciones NOE para identificar el regioisómero.</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

Antecedentes Generales

Tabla 2.1. Niveles del infección en humanos alrededor del mundo4
Tabla 2.2. Prevalencia de fasciolosis animal en México.....5
Tabla 2.3. Eficacia de algunos fármacos contra *F. hepatica* en ovinos.....9
Tabla 2.4. Espectro de eficacia de los fármacos en las dosis recomendadas contra *F. hepatica* en el ganado ovino.....10
Tabla 2.5. Solubilidad del compuesto alfa en diferentes disolventes a 25 °C18
Tabla 2.6. Diferencias entre compuestos bioprecursores y derivados biorreversibles24

Resultados y Discusión

Tabla 6.1. Resultados de la síntesis del compuesto alfa y triclabendazol47
Tabla 6.2. Resultados de la síntesis del compuesto alfa en microondas50
Tabla 6.3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **17a-b, 18a-b, 20a-b** y **21a-b**55
Tabla 6.4. Condiciones utilizadas para obtener **36**.....57
Tabla 6.5. Absorbancias promedio de la curva de calibración de **13, 14, MFR-33** y **MFR-34**78
Tabla 6.6. Absorbancia promedio de las muestras problemas de **13, 14, MFR-33** y **MFR-34**78
Tabla 6.7. Solubilidad y estabilidad acuosa de **13, 14, MFR-33** y **MFR-34**78
Tabla 6.8. Velocidad de hidrólisis de **MFR-33** y **MFR-34** en solución de fosfatasa alcalina a 37 °C.....80
Tabla 6.9. Porcentaje de mortalidad in vitro de *F. hepatica* después del tratamiento con **MFR-33**.....81
Tabla 6.10. Eficacia de **MFR-33** expresada como porcentaje de reducción de *F. hepatica* y huevos en ovinos infectados artificialmente.....83
Tabla 6.11. Eficacia de **MFR-34** expresada como porcentaje de reducción de *F. hepatica* y huevos en ovinos infectados artificialmente.....84

Procedimiento Experimental

Tabla 8.1. Sistemas cromatográficos utilizados en este trabajo.....89

RESUMEN

En este trabajo se presenta la síntesis, determinación de solubilidad y estabilidad acuosa, hidrólisis con fosfatasa alcalina, y las evaluaciones de actividad fasciolicida *in vitro* e *in vivo* de dos profármacos derivados del compuesto alfa (**MFR-33**) y triclabendazol (**MFR-34**). Cada derivado se obtuvo como sal de fosfato en mezclas de regioisómeros. Los profármacos fueron diseñados como sales hidrosolubles usando un grupo ionizable fosfonooximetilo agregado en el átomo de nitrógeno del anillo de imidazol, con el objetivo de disminuir las interacciones intermoleculares, aumentar la solubilidad acuosa e incrementar la biodisponibilidad, de tal manera que se favoreciera la administración parenteral. La solubilidad acuosa se incrementó sustancialmente de 0.00026 y 0.00024 mg/mL a 20.67 y 21.12 mg/mL para **MFR-33** y **MFR-34**, respectivamente, esto es, se aumentó 79,500 y 88,000 veces en comparación a sus compuestos precursores. Las sales **MFR-33** y **MFR-34** mostraron estabilidad acuosa (>95% después de 26 horas) a pH 1 y 7.4, lo que es ideal para la formulación parenteral desde un punto de vista fisiológico, además fueron hidrolizadas enzimáticamente por fosfatasa alcalina para liberar a sus compuestos precursores. Se evaluó la actividad fasciolicida *in vitro* del profármaco **MFR-33** contra metacercarias recién desenquistadas, a concentraciones de 10 y 50 mg/L. A 50 mg/L y 24 h, el profármaco demostró una eficacia fasciolicida de 100%, a una concentración de 10 mg/L esta eficacia fue de 95.83% a las 24 y 48 h, obteniendo 100% de eficacia hasta 72 horas post-tratamiento. El profármaco **MFR-33** se evaluó *in vivo* en ovinos contra fasciolas adultas de 10 semanas de edad por vía oral, intramuscular y subcutánea. Los mejores resultados se obtuvieron en la dosificación por vía intramuscular, observando una eficacia del 87.8% a una concentración de 4 mg/kg, demostrando una reducción de casi cuatro veces la dosis administrada por vía oral del compuesto precursor, el cual normalmente se administra a 15 mg/kg en forma de suspensión obteniendo una eficacia similar. Debido a los resultados obtenidos *in vivo* del profármaco **MFR-33**, se decidió evaluar a **MFR-34** solo por vía intramuscular a concentraciones de 4, 6 y 8 mg/kg, obteniendo una eficacia fasciolicida de 96.5%, 98.4% y 99.2%, respectivamente. En el mismo experimento, se evaluó al triclabendazol por vía oral como referencia positiva, a una concentración de 12 mg/kg obteniendo una eficacia de 99.8%. Además, se observó que **MFR-34** reduce la emisión de huevos al 100% en todas las concentraciones. Es evidente la actividad fasciolicida de **MFR-33** y **MFR-34**, los cuales disminuyeron la dosis administrada con respecto a sus compuestos precursores, obteniendo resultados similares. Adicionalmente, se logró administrar a **MFR-33** y **MFR-34** por vía intramuscular facilitando la administración para uso veterinario.

ABSTRACT

In this work we present the synthesis, water solubility, water stability, alkaline phosphatase hydrolysis, and *in vitro* and *in vivo* evaluations of two new prodrugs of compound alpha (**MFR-33**), and triclabendazole **MFR-34**. Each derivative was obtained as a mixture of phosphate regioisomers sodium salts. These pro-drugs were designed by addition of a phosphonoxyethyl group at position 1 of the benzimidazole nucleus to eliminate intermolecular interactions, facilitate the aqueous solubility and increase the bioavailability for parenteral administration. The aqueous solubility was increased from 0.00026 and 0.00024 mg/mL to 20.67 and 21.12 mg/mL for **MFR-33** and **MFR-34**, respectively. Thus, the solubility of each drug was increased 79,500 and 88,000 times, respectively. These salts **MFR-33** y **MFR-34** were stable in aqueous solution (>95% after 24 h) at pH 1 and 7, fact that is ideal for formulations from the physiological point of view, besides, they were easily hydrolyzed with the alkaline phosphatase enzyme to regenerate the precursor drugs. Compound **MFR-33** was evaluated *in vitro* against recently excysted *Fasciola hepatica* metacercariae, resulting in 100% fasciolicidal effectiveness at a concentration of 50 mg/L and 72 hours post-exposure; at 10 mg/L, the efficacy was 95.83% at 24 and 48 h; however, the efficacy increased to 100% at 72 h. The *in vivo* evaluation of **MFR-33** in sheep was carried out via oral, intramuscular and subcutaneous administration at doses of 12, 4 and 4 mg/Kg, respectively, in sheep artificially infected with *F. hepatica* metacercariae. At a dose of 4 mg/Kg via intramuscular administration, 87.8% and 44.9% fluke and egg reductions were observed, respectively, thus achieving a reduction of about four times the administered oral dose of the precursor, which is normally administered at a dose of 15 mg/Kg as a suspension to get similar efficacy. Considering the efficacy of prodrug **MFR-33**, compound **MFR-34** was evaluated via intramuscular at 4, 6 and 8 mg/kg. It was obtained a fasciolicidal efficacy of 96.5, 98.4 and 99.2%, respectively. An oral suspension containing triclabendazole, 12 mg/Kg, was also evaluated as positive control. An efficacy of 99.8% was obtained. In addition, it was observed that **MFR-34** reduced 100% egg emission at all concentrations. The fasciolicidal activity of **MFR-33** and **MFR-34** is evident; the administered dose was decreased with respect to that of the precursors obtaining similar results. Additionally, the prodrugs could be administered as solutions via intramuscular injection, thus facilitating the manipulation for veterinary use.

Capítulo 1. Introducción

Uno de los problemas más serios de salud que se presentan actualmente en el mundo, pero con mayor relevancia en los países en vías de desarrollo y pobres, son las enfermedades parasitarias, las cuales se estima que afectan acerca de la mitad de la población mundial. Desafortunadamente, las condiciones de pobreza económica de muchos países, tienen como consecuencia que los programas de salud sean deficientes, así como la educación; lo que trae consigo malas prácticas de higiene y convivencia entre humanos y animales. Por tal motivo, se vuelve una necesidad la investigación para encontrar nuevas moléculas con actividad antiparasitaria. Dentro de las helmintosis que afectan tanto a humanos como animales en países con climas templados o tropicales está la fasciolosis. Esta es una enfermedad parasitaria extraintestinal, provocada por el trematodo *Fasciola hepatica*, la cual puede ser adquirida por el ganado, animales silvestres y el humano, en países con climas templados o tropicales. El triclabendazol es el fármaco de elección para el tratamiento de esta enfermedad; sin embargo, se han reportado cepas resistentes. Por esta razón, se han realizado esfuerzos en los últimos años para identificar nuevas moléculas; como el compuesto alfa, fasciolicida experimental bioisómero del triclabendazol. La problemática de este tipo de compuestos bencimidazólicos es la pobre solubilidad acuosa, motivo por el cual son administrados por vía oral en forma de suspensiones, pastas, polvos y bolos intraruminales, limitando otras rutas de administración. Por lo anterior, se justifica y hace necesario el desarrollo de proyectos para generar nuevos fármacos más efectivos, con mejores propiedades para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas.

El desarrollo de profármacos es utilizado como una estrategia para mejorar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas o farmacocinéticas de compuestos farmacológicamente activos. Los profármacos ofrecen posibilidades para superar varias barreras para la formulación y administración de fármacos tales como la mala solubilidad acuosa, inestabilidad química, absorción oral insuficiente, rápido metabolismo presistémico, penetración insuficiente en el cerebro, toxicidad e irritación local, etc.

En este trabajo se diseñaron dos profármacos usando un grupo fosfonooximetilo para incrementar la solubilidad acuosa y biodisponibilidad del compuesto alfa y triclabendazol, favoreciendo una administración parenteral que facilite y mejore el control de dosificación a los animales; además de reducir la dosis administrada.

Capítulo 2. Antecedentes Generales

2.1 Generalidades sobre la Fasciolosis

Dentro de las helmintiosis que afectan tanto a humanos como animales está la fasciolosis, esta enfermedad es causada por dos especies de trematodos *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, también conocidas como duelas del hígado. La fasciolosis ocasiona grandes pérdidas en la ganadería y en la economía de los países productores de animales domésticos y sus productos, como leche, carne, lana, cuero, etc. Asimismo, afecta principalmente al ganado bovino, ovino y caprino, pero puede presentarse en animales silvestres, y en el ser humano; por lo que la infección se considera como una zoonosis, la cual es un serio problema a nivel mundial.^{1,2}

La situación epidemiológica de la fasciolosis humana ha cambiado en los últimos años, desde 1980 ha aumentado considerablemente el número de personas infectadas por *F. hepatica*, y en diversas zonas geográficas se han descrito verdaderas endemias humanas, con cifras de prevalencia e intensidad entre baja y alta. La fasciolosis también es una enfermedad humana reemergente con estimaciones de entre 2.4 y 17 millones de personas infectadas y 180 millones en riesgo de contraer esta infección parasitaria en todo el mundo.^{2,3} Las zonas de prevalencia de fasciolosis en el ser humano no coinciden necesariamente con las zonas en donde la enfermedad constituye un problema veterinario de primera magnitud. Esta parasitosis ya no puede considerarse simplemente como una enfermedad zoonótica secundaria, sino como una enfermedad parasitaria humana importante.⁴ La fasciolosis es una enfermedad global, y los casos humanos se han registrado en más de 51 países en todo el mundo.⁵ Existen zonas reconocidas de alta transmisión, entre ellas se encuentran las tierras altas de América del Sur, el valle del Nilo, la cuenca del mar Caspio que se extiende entre Europa y Asia, así como en Asia Oriental, el sudeste asiático, el Reino Unido y Australia, algunos países se muestran en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Niveles de infección en humanos alrededor del mundo⁴

Nivel de infección	País	Porcentaje de población infectada
Bajo	Francia	0.00034
	Chile	0.7
	Egipto (Delta del Rio Nilo)	7.3
Intermedio	Perú (Cajamarca)	10.7
	Puerto Rico (Corozal)	8.7
	Irán	Variable
	Oeste de Europa	Variable
Alto	Perú (Puno)	15.6
	Perú (Valle Mantaro)	34.2
	Bolivia	53-100

Por otro lado, recientemente, aumentó la fasciolosis en el ganado,^{6,7} la cual seguirá aumentando en el futuro, continuando con la tendencia observada en los últimos años, esta tendencia se ha atribuido al cambio climático,⁸ que afecta a la distribución del caracol *Galba truncatula* que es un huésped intermediario requerido.^{2,8-11} Actualmente, ningún país puede considerarse libre del riesgo de la fasciolosis. En México se han realizado diversos estudios en diferentes estados de la república, los cuales se muestran en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Prevalencia de fasciolosis animal en México¹²

Prevalencia	73-100%	31-70%	2.0-21.5%	<2.0%	s/datos
Estados	Hidalgo	Guanajuato	Sonora	Baja California	Distrito Federal
	Tabasco		Chiapas		Campeche
	Edo. México	Tlaxcala	Chihuahua	Yucatán	Guerrero
	Michoacán	Morelos	Coahuila	Quintana Roo	Colima
	Veracruz	Puebla	Tamaulipas	San Luis Potosí	Nayarit
		Jalisco	Zacatecas		Sinaloa
					Nuevo León
					Querétaro

Datos conservadores obtenidos en México muestran que de 36 millones de bovinos, 18 millones están expuestos a la infección por *F. hepatica*, en virtud de que el ganado se encuentra localizado en zonas reconocidas como “fasciolosas”.¹² Sin embargo, estudios epidemiológicos realizados en 2005, muestran que alrededor de 5 millones están realmente infectados,¹³ reconociendo que cada animal parasitado pierde en su vida productiva 30 kg de carne y a su vez multiplicamos estas pérdidas por \$30 pesos, que en esa época costaba cada kilo, se obtiene una pérdida global aproximada de \$4,500 millones de pesos anualmente.

Por lo tanto, la relevancia de esta parasitosis radica en las grandes pérdidas económicas que se produce en la ganadería, debido al proceso inflamatorio, generalmente crónico del hígado y conductos biliares, así como también trastornos digestivos y de nutrición. Lo anterior se traduce en pérdidas directas debido a la muerte de animales jóvenes por infecciones masivas de *Fasciola hepatica*, e indirectas por decomisos de hígados en el rastro, abortos, baja tasa de crecimiento y reproducción, así como baja producción de carne, leche, predisposición a otras enfermedades y gastos por tratamiento.¹⁴

2.2 Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica (**Figura 2.1**) tiene un ciclo de vida complejo que incluye dos hospederos: un molusco gasterópodo (caracoles) y su huésped definitivo, un mamífero (humanos, ovejas, etc.).

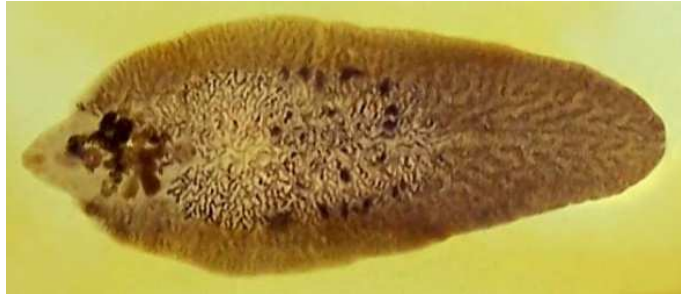


Figura 2.1. *Fasciola hepatica* adulta.

Los huevos que se alojan en la vesícula biliar del huésped definitivo pasan al duodeno y se excretan al medio ambiente por medio de la heces, ahí son capaces de permanecer viables por largos períodos. Es necesario un medio hídrico, como charcos, para continuar su desarrollo. En condiciones de temperatura adecuada, se forman los miracidios al final del desarrollo embrionario dentro del huevo. Los miracidios eclosionan a los nueve días, los cuales se ven favorecidos con la lluvia o cuando las heces son depositadas en agua; para su posterior desarrollo es necesario un huésped intermediario debido a que no pueden vivir más de 24 horas a la intemperie. Al penetrar al caracol del género *Lymnaea*, el miracidio pierde su cubierta de cilios, una vez dentro del caracol se transforma en esporoquiste, el cual crece en el sistema digestivo del caracol y da origen a un número muy grande de redias, las cuales producen una generación de redias hijas que llegarán por último a la fase de cercarías. De un solo miracidio se pueden producir hasta 600 cercarías. La cercarías nada hasta cualquier superficie firme, por lo general es una planta (como pasto, alfalfa, berros, etc.) y se adhiere a ella. Inmediatamente forma un quiste y se transforma en metacercaria (**Figura 2.2**).

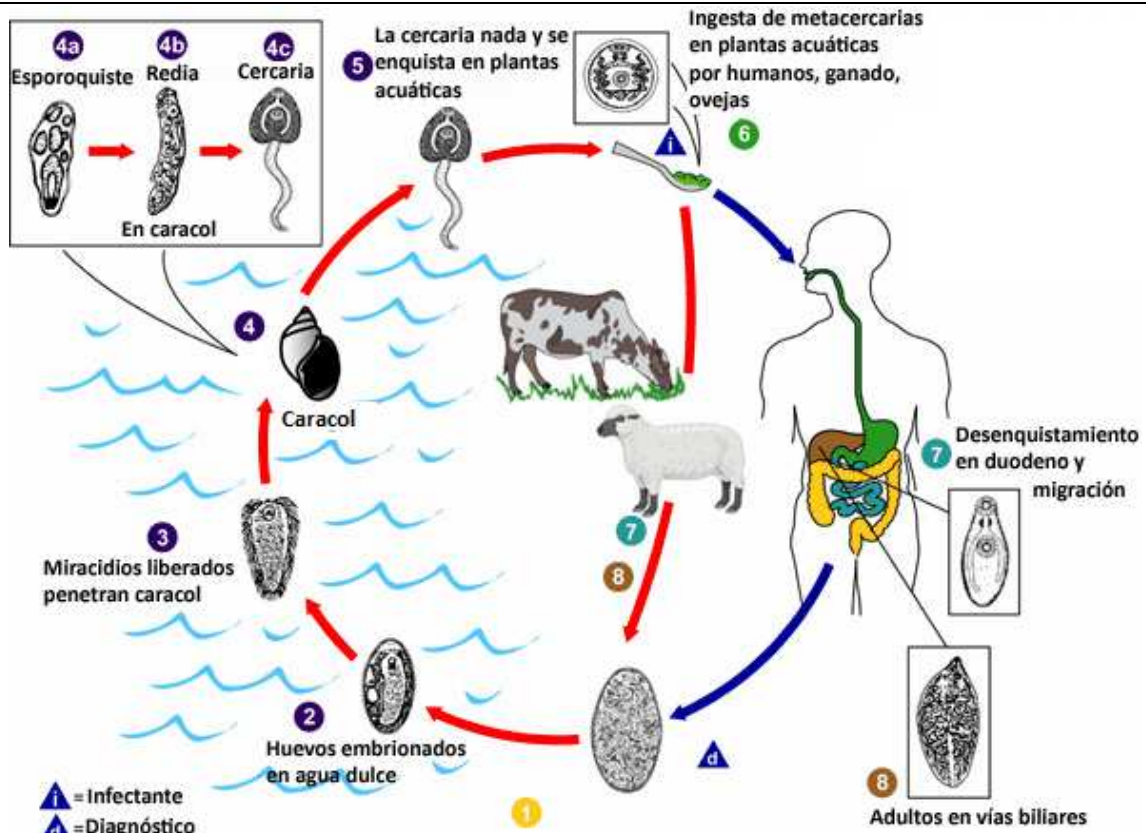


Figura 2.2. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*.

La infección del huésped definitivo ocurre por medio de la ingestión de plantas o agua contaminada con metacercarias. En el intestino se disuelve la membrana quística externa y queda libre el trematodo, el cual se nutre de sangre y es capaz de penetrar la pared del intestino, alcanzando la cavidad peritoneal en 28 horas; luego penetra el tejido hepático y se aloja ahí por semanas hasta llegar al conducto biliar convirtiéndose en adulto, causando hemorragia y fibrosis. Existen evidencias que el trematodo puede llegar a alojarse en el útero, pulmón, tejido subcutáneo y páncreas. Después de ocho semanas, se encuentran los huevos en la bilis y posteriormente en las heces, completando así su ciclo de vida.^{13,15}

2.3 Medidas de Control

La gran capacidad de *F. hepatica* para infectar a numerosos huéspedes definitivos hace prácticamente imposible erradicarla; por esta circunstancia son ineludibles las medidas para tratar de controlar esta enfermedad. Teniendo claro el ciclo biológico de *F. hepatica* y los aspectos epidemiológicos se puede planificar un control preventivo de la enfermedad. Las medidas básicas para el control de *F. hepatica*, se focalizan en tres puntos:

- Control del huésped intermediario
- Control del huésped libre del parásito
- Control del parásito en el huésped definitivo

2.3.1 Control del huésped intermediario

El control químico de los caracoles vectores con molusquicidas (p.ej. sulfato de cobre, pentaclorofenato de sodio, niclosamida, *N*-trietilmorfolina, etc.) puede ser apropiado para mantener limpios de caracoles los lugares donde se congrega el ganado (bebederos, comederos, lugares de reposo, etc.). Sin embargo es prácticamente inútil tratar de erradicar los caracoles de una propiedad usando molusquicidas: porque los caracoles se reproducen fácilmente, un sólo caracol puede producir hasta 100,000 caracoles en un año, re infectan los pastos rápidamente y es improbable que el tratamiento alcance a todos los caracoles. Cabe destacar que el uso de molusquicidas conlleva riesgos tales como acumulación de residuos tóxicos en agua y suelo, además del efecto negativo en la fauna circundante.

2.3.2 Control del huésped libre de *F. hepatica*

El control de la fasciolosis en un área endémica debe estar orientado a prever o limitar el contacto entre el parásito y su huésped definitivo, tratando en principio, de evitar las pasturas húmedas para el ganado, limitar los hábitats de caracoles drenando áreas pantanosas, canalizando corrientes de agua, limpiando canales de riego, construyendo represas y evitando el derrame permanente de los bebederos. Tomando estas medidas se impide la continuidad del ciclo de vida del parásito, pero también se reduce el área de pastoreo de los animales, siendo casi imposible mantener estas condiciones. Igualmente, se encuentran en fase experimental, algunas plantas, bacterias, algas, moscas, otros caracoles y parásitos que puedan reducir el crecimiento y reproducción de los caracoles, por depredación, infección o competición, pero hasta ahora no se han podido adaptar para ser utilizados.

La fasciolosis en los humanos se evita mediante la abstención del consumo de plantas acuáticas como: berros silvestres, alfalfa, apio silvestre, etc., prescindir el empleo de excremento de ovinos, bovinos o de aguas residuales como abono especialmente en zonas endémicas.

2.3.3 Control de *F. hepatica* en el huésped definitivo

El tratamiento quimioterapéutico es la práctica más común empleada para controlar esta enfermedad. El objetivo del tratamiento, es eliminar el agente causal de la enfermedad e interrumpir la excreción de huevos en las heces, para así prevenir la infección de huéspedes intermediarios y la contaminación de plantas y agua. Además, se tiene que tomar en cuenta, que no todos los fasciolicidas disponibles en el mercado son eficaces sobre las diferentes edades de *F. hepatica* para su uso en los programas de control. Por esta razón, se utilizan mezclas de uno o más de estos compuestos con un nematicida de amplio espectro de modo que el producto pueda usarse contra los nematodos gastrointestinales y contra *F. hepatica*.

2.4 Tratamiento quimioterapéutico

Actualmente, varios compuestos químicos están disponibles para el tratamiento de la fasciolosis animal, los principales compuestos utilizados para tratar la fasciolosis se presentan en la **Tabla 2.3**, así como también, su espectro de actividad contra trematodos de diferentes edades se resumen en la **Tabla 2.4**.¹⁶ Después de la dosificación, solo las infecciones presentes en ese momento son curadas; sin embargo, los animales en pasturas contaminadas son susceptibles a la reinfección.

Tabla 2.3. Eficacia de algunos fármacos contra *F. hepatica* en ovinos.¹⁶

Grupo Químico	Fármaco	Ruta de administración	Dosis utilizada (mg/kg)	Dosis máxima tolerada (mg/kg)	Índice de seguridad	Edad mínima del parásito (semanas), eficacia > 90%
Fenoles halogenados	Bitionol	Oral	75	75	1	>12
	Hexaclorofeno	Oral	15	40	2.6	12
	Niclofolano	Oral	4	12	3.0	12
	Nitroxinil	Subcutánea	10	40	4.0	8
Salicilamidas	Brotianida	Oral	5.6	27	4.8	12
	Closantel	Oral	7.5-10	40	4.0	6-8
	Oxiclozanida	Oral	15	60	4.0	12
	Rafoxanida	Oral	7.5	45	6.0	6
Bencimidazoles	Albendazol	Oral	4.75	30	8	>12
	Triclabendazol	Oral	10	200	20-40	1
Sulfonamidas	Clorsulon*	Oral	7	100	5	8
Fenoxialcanos	Diamfenitida	Oral	80-120	400	3.3-5.0	1 día-6 semanas

*Datos para ganado vacuno.

Una vez que el parásito está dentro del huésped intermediario, *F. hepatica* comienza a desarrollarse; considerando como fasciolas juveniles de 1-7 semanas, mientras que de 8-14 semanas son fasciolas adultas, con esta premisa se observa en la **Tabla 2.4** que no todos los fármacos son eficaces en todas las etapas y/o edades de *F. hepatica*.

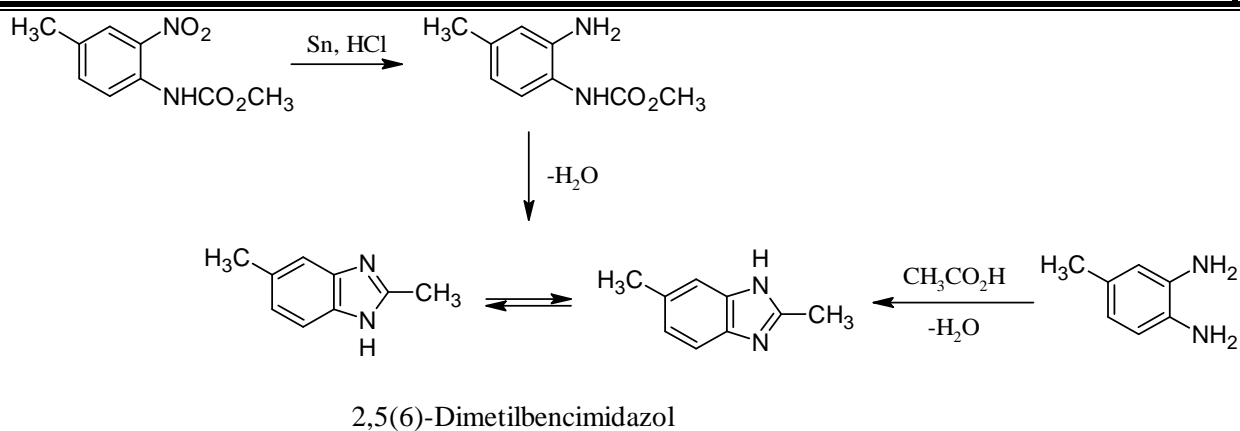
Tabla 2.4. Espectro de eficacia de los fármacos en las dosis recomendadas contra *F. hepatica* en el ganado ovino¹⁶

Fármaco	Edad de fasciolas en semanas													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bitionol, Hexaclorofeno, Oxiclozanida, Niclofolan, Albendazol, Clorsulon+ Ivermectina (inyección)	90-99%							50-70%		80-99%				
Clorsulon (oral)	90-99%													
Nitroxinil, Closantel	90-99%							50-90%		91-99%				
Rafoxanida	90-99%							50-90%		91-99%				
Triclabendazol	90-99%		91-100%					99-100%						
Diamfenetida	91-100%						50-80%							

De los compuestos bencimidazólicos solo el albendazol y triclabendazol son utilizados para el tratamiento de la fasciolosis. El albendazol, ha sido uno de los derivados bencimidazólicos más exitosos en virtud de tener amplio espectro y alta eficacia contra nematodos gastrointestinales; sin embargo, sobre *F. hepatica* sólo actúa en las semanas 10-11, teniendo una eficacia del 50-70%; mientras que en las semanas 12-14 tiene una eficacia del 80-99%. El triclabendazol es el único fasciolicida que actúa en las etapas juveniles y adultas, ubicadas en los conductos biliares y en el parénquima hepático, respectivamente.¹⁷⁻¹⁹

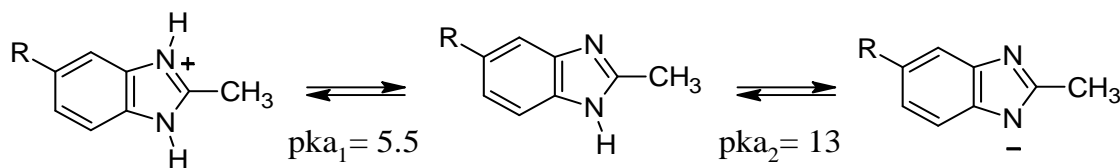
2.5 Bencimidazoles

El bencimidazol es uno de los heterociclos nitrogenados más antiguos que se conocen. Hoebrecker en 1872 preparó el 2,5 ó 2,6-dimetilbencimidazol a partir de la 2-nitro-4-metilacetanilida por reducción química con Sn y HCl. Después, Landernbur y Wundt obtuvieron el mismo compuesto a partir de 3,4-diamino tolueno y ácido acético a reflujo,²⁰⁻²² (**Esquema 2.1**).



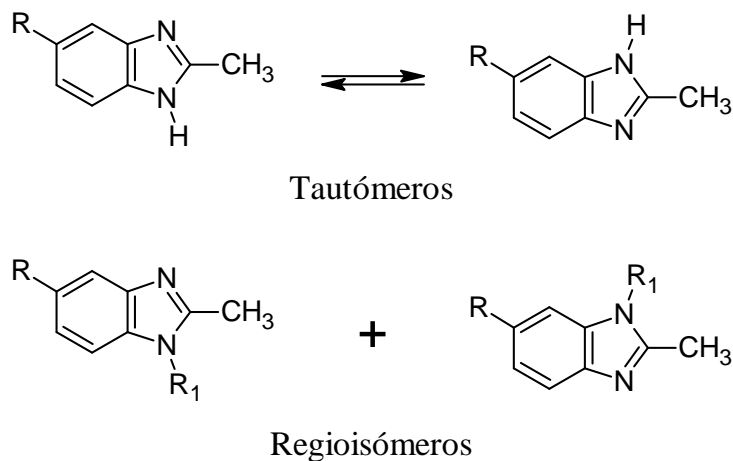
Esquema 2.1. Primeras síntesis de bencimidazoles.

El 1*H*-bencimidazol y sus 1*H*-derivados presentan propiedades ácido-base, con dos p*K*_a's,²³ lo que les permiten formar sales (**Esquema 2.2**).



Esquema 2.2. p*K*_a de un derivado del bencimidazol.

Este tipo de compuestos tienen también la propiedad intrínseca de mostrar tautomería protónica entre las posiciones 1, 3; por lo que existen como mezclas de tautómeros, cuando el núcleo del 1*H*-bencimidazol está no simétricamente sustituido. Cuando el núcleo del 1*H*-bencimidazol está sustituido en la posición 1 y es no simétrico, entonces forma regioisómeros (**Esquema 2.3**).



Esquema 2.3. Tautómeros y regioisómeros de bencimidazoles 5(6) sustituidos.

El descubrimiento de derivados del bencimidazol como fármacos de amplio espectro y como moléculas bioactivas con propiedades antiparasitarias, antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antihelmínticas, entre otras, sitúan al núcleo de bencimidazol como una estructura privilegiada.²⁴⁻²⁷ Todas las posiciones del anillo pueden ser sustituidas con diversos grupos o entidades químicas, pero la mayoría de los compuestos con propiedades biológicas están sustituidos en las posiciones 1, 2, 5 ó 6, como se observa en la **Figura 2.3**.

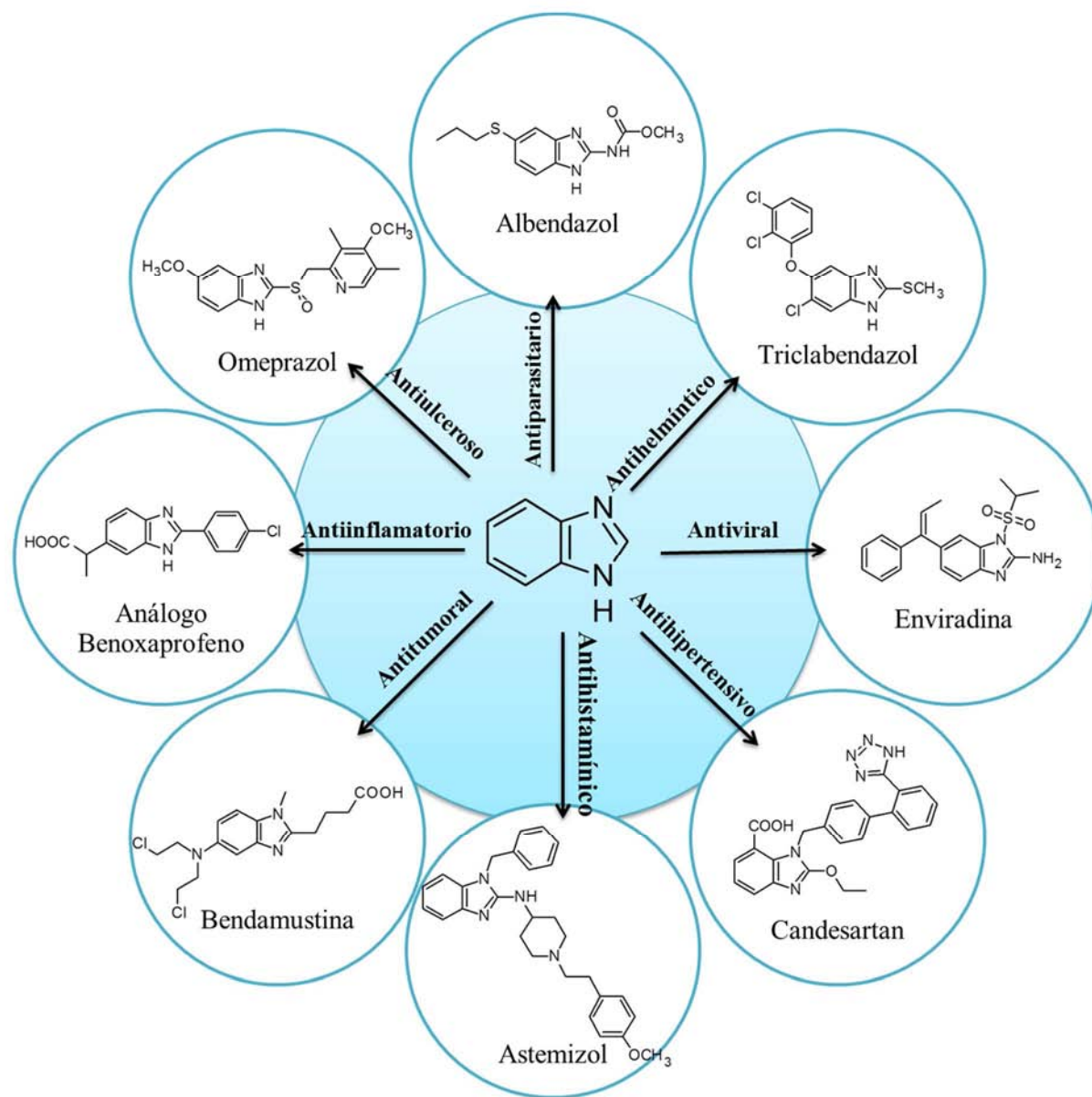


Figura 2.3. Bencimidazoles con diferentes propiedades biológicas.²⁷

2.5.1 Bencimidazoles como antiparasitarios

Los compuestos bencimidazólicos (albendazol, mebendazol, triclabendazol, etc.) y metabolitos como el sulfóxido de albendazol, que se aprecian en la **Figura 2.4**, se desarrollaron en la década de los 70's para uso veterinario, comprobándose después su eficacia y seguridad para su uso en medicina humana. Se ha propuesto que estas moléculas se fijan a los microtúbulos del parásito,²⁸ provocando cambios degenerativos en las células tegumentarias e intestinales no solo de helmintos,²⁹ sino también de protozoarios,³⁰ bloqueando el ensamblaje de las tubulinas que, una vez polimerizadas, van a formar las proteínas microtubulares de los helmintos, responsables del normal funcionamiento celular.²⁸

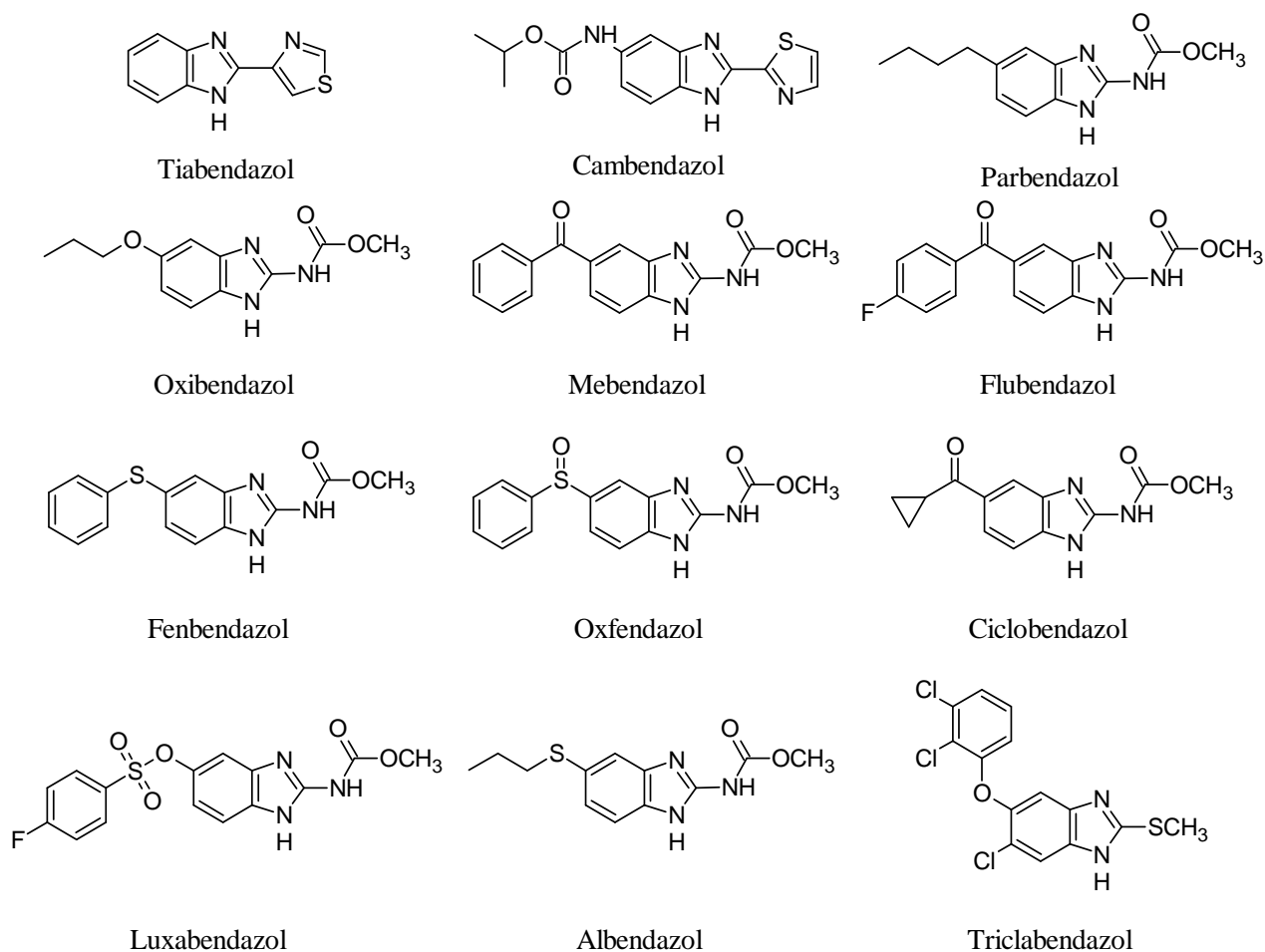


Figura 2.4. Compuestos bencimidazólicos antihelmínticos.

Algunos de estos bencimidazoles tienen actividad contra varios cestodos y nematodos, e incluso contra algunos trematodos, pero poca o nula actividad contra *F. hepatica*. El albendazol

se ha recomendado para su uso en la fasciolosis, a pesar de su actividad, se restringe a organismos adultos y requiere de dosis muy altas. El luxabendazol es otro bencimidazol contra organismos adultos e incluso de seis semanas de edad, pero no es muy usado. El fármaco de elección es el triclabendazol; se ha encontrado que este derivado del bencimidazol tiene una gran eficacia contra organismos jóvenes y adultos de *F. hepatica*; también es efectivo contra *F. gigantica*, y *Fascioloides magna*.

2.5.2 Triclabendazol

El triclabendazol se comenzó a comercializar por Ciba-Geigy como Fasinex[®] para uso en los animales aplicando una dosis única de 10-12 mg/kg desde principios de los 80's. Asimismo, el uso de triclabendazol en humanos fue aprobado en 1989 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para combatir la gran epidemia de fasciolosis presente en Irán³¹ en ese año; desde entonces se administra una dosis única de 10 mg/kg y es comercializado actualmente como Egaten[®] por Novartis Pharma Inc.

El triclabendazol tiene un estrecho espectro de actividad antihelmíntica pero alta eficacia contra *F. hepatica*,³² *F. gigantica* y *Fascioloides magna*,³³ careciendo de actividad contra otros nematodos y cestodos.³⁴ Estructuralmente el triclabendazol difiere del albendazol y otros bencimidazol 2-carbamatos de metilo, ya que tiene un grupo metiltio en la posición 2 del núcleo bencimidazólico que aunado a cloro en 6(5) y diclorofenoxy en 5(6) le confieren mayor liposolubilidad mejorando sus propiedades biofarmacéuticas (**Figura 2.5**).

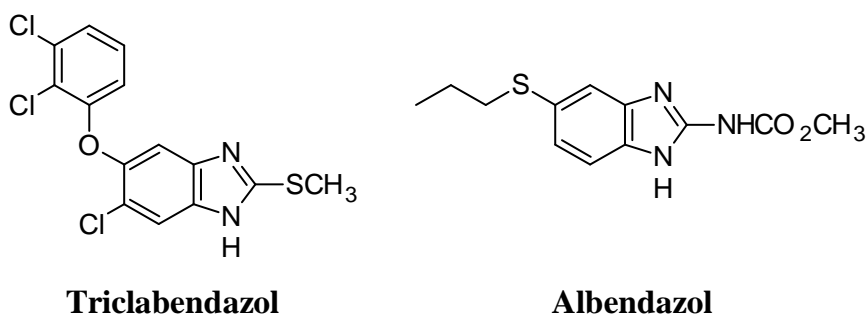


Figura 2.5. Compuestos bencimidazólicos utilizados para el tratamiento de la fasciolosis.

A pesar de las buenas características de actividad del triclabendazol, se han generado cepas resistentes debido al sobreuso y/o dosificación inadecuada. La resistencia se registró por primera vez en el ganado de Victoria, Australia en 1995³⁵ y ahora se reportan en diferentes

países,³⁶⁻⁴⁰ con un caso de resistencia en un humano en Holanda.⁴¹ El triclabendazol tiene el inconveniente de ser altamente no polar y muy poco soluble en fluidos biológicos, revelando su pobre solubilidad acuosa y por consiguiente pobre biodisponibilidad; por lo anterior, se ha observado que solo 5% de la dosis administrada se absorbe. No obstante, el triclabendazol sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones por *F. hepatica* en el ganado desde hace más de 30 años.

Debido a que el triclabendazol es un bencimidazol, se cree que su diana farmacológica es la β -tubulina del parásito, de acuerdo a algunos estudios de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos de antitubulina y estudios de inhibición de polimerización han demostrado que tanto el triclabendazol como sus dos principales metabolitos inhiben la unión de la colchicina, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos. En un homogeneizado de *Fasciola* el orden de efectividad de los compuestos es: sulfóxido de triclabendazol>colchicina>sulfona de triclabendazol>>triclabendazo.⁴² Se cree que el triclabendazol se une a la β -tubulina por un sitio cercano, pero diferente al que se unen los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, de ahí que éstos no sean tan efectivos contra *F. hepatica* y que el triclabendazol no sea activo frente a otros nematodos.^{16,43}

2.5.3 Compuesto alfa como agente fasciolicida

Considerando la necesidad de contar con nuevas estructuras fasciolicidas, debido a los reportes de cepas resistentes al triclabendazol, se han realizado estudios por nuestro grupo de investigación, en conjunto con el departamento de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, obteniendo como resultado el diseño, síntesis y evaluación fasciolicida de la molécula llamada compuesto alfa, cuyo nombre químico es 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol.⁴⁴

El compuesto alfa estructuralmente es un bencimidazol sustituido, su diseño obedece el concepto de reemplazo bioisotérico del tipo no-clásico, la sustitución del entorno electrónico de los dos átomos de cloro en el triclabendazol por un anillo de benceno produjo un compuesto con semejantes propiedades fisicoquímicas y biológicas (**Figura 2.6**).

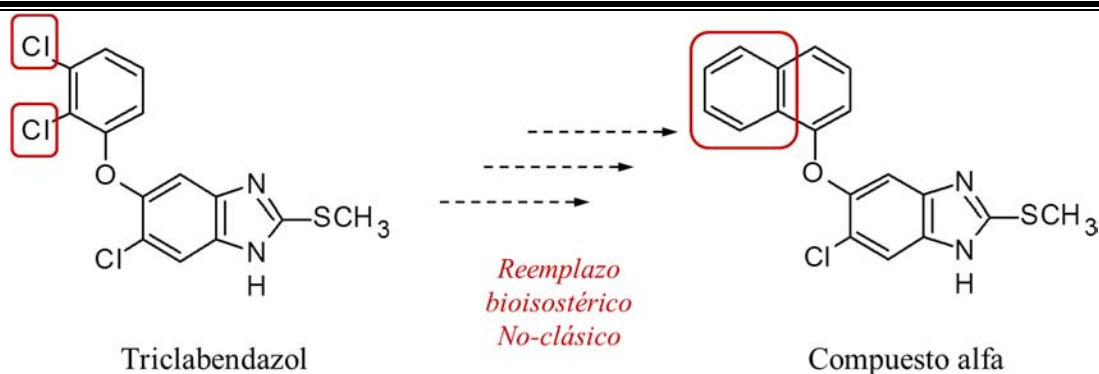


Figura 2.6. Reemplazo bioisostérico no clásico en el triclabendazol.

El compuesto alfa se ha evaluado realizándole diferentes estudios. La actividad fasciolicida obtenida de los ensayos *in vitro* sobre metacercarias de *F. hepatica* mostraron que el compuesto alfa es activo a concentraciones de 10 mg/mL.⁴⁵ En las pruebas *in vivo* en ovinos, los resultados comprueban que el compuesto tiene una eficacia del 86.90% a una dosis de 15 mg/kg en forma de suspensión acuosa en DMSO al 5% en agua contra parásitos con tres días y hasta 10 semanas de edad,⁴⁶ y presenta una eficacia del 100% a la misma dosis en una suspensión formulada por vía oral.⁴⁷ Además, estudios de microscopia electrónica han demostrado daño importante en la estructura de *F. hepatica*,⁴⁸⁻⁵¹ y recientemente, daño en la estructura de *F. hepatica* resistente al triclabendazol.^{52,53} Los procesos de espermatogénesis⁵⁴ y ovogénesis⁵⁵ se observan severamente dañados por el compuesto alfa. Estos resultados indican que posiblemente el compuesto tenga un efecto de acción dual, a nivel de tubulina y otro, posiblemente actina. También se determinó la dosis efectiva en ganado bovino infectado de forma experimental y natural. De este experimento se concluyó que la dosis efectiva del compuesto alfa en bovinos con infección inducida o natural es de 12 mg/kg de peso.⁵⁶ Se determinó en bovinos que la dosis máxima tolerada para el compuesto alfa es de 180 mg/kg de peso y su índice de seguridad es de 15 veces la dosis efectiva. El índice de seguridad del triclabendazol es de 20; sin embargo, produce fotosensibilidad e inflamación de la piel y las ubres, lo que no se observó con el compuesto alfa. Con respecto a los resultados anteriores se postula que el tratamiento con el compuesto alfa es seguro en bovinos.⁵⁷ Por otro lado, también se evaluó el efecto del compuesto alfa en vacas de 2, 3, 6 y 9 meses de gestación, tratadas con una dosis única de 12 mg/kg de peso. No se observaron abortos en los 24 animales del experimento, ni daño aparente en los becerros recién nacidos, ni en las madres durante el mes que duró el experimento. Con esto se demuestra que el compuesto alfa no es teratogénico.⁵⁸

Los resultados obtenidos son prometedores, ya que la mayoría de los fasciolicidas usados hasta el momento como la Rafoxanida, Nitroxinil, Closantel y Clorsulon solo actúan contra parásitos de 6 semanas de edad en adelante, o en la fase inmadura como la Diamfenitida, siendo el compuesto alfa una alternativa para el tratamiento de la fasciolosis.

Dentro de los esfuerzos por mejorar la dosis y la formulación se ha propuesto que el compuesto alfa sea formulado en solución inyectable de fácil administración para uso veterinario, pero debido a su baja solubilidad acuosa esto no se ha logrado.

2.5.4 Solubilidad de los compuestos bencimidazólicos

Generalmente, los bencimidazoles antihelmínticos son escasamente solubles en agua. Se administran por vía oral en forma de suspensión, pasta o polvo, o a través de inyección intraruminal. La pobre solubilidad acuosa resulta muy benéfica cuando los parásitos se encuentran en el tracto gastrointestinal, puesto que es ahí donde se requiere una alta concentración del fármaco, pero cuando los parásitos son sistémicos o se encuentran alojados en algún órgano, como en el caso de *F. hepatica*, se requiere que el compuesto activo se absorba.⁵⁹ El hecho de que los bencimidazoles sean escasamente solubles en agua limita otras vías de administración como las parenterales; por esta razón, la escasa solubilidad acuosa de los bencimidazoles sigue siendo un importante obstáculo.

Los carbamatos de bencimidazol antihelmínticos, como fenbendazol, tienen baja hidrosolubilidad que está incluso por debajo de 0.05 µg/mL.⁵⁹ Sin embargo, también los metiltio bencimidazoles como el triclabendazol y el compuesto alfa, se han reportado con pobre solubilidad acuosa, 0.2 µg/mL (buffer fosfatos, pH 6.8, 37 °C)⁶⁰ y 0.02 µg/mL (buffer fosfatos, pH 7.4, 25 °C, **Tabla 2.5**)⁶¹, respectivamente.

Tabla 2.5. Solubilidad del compuesto alfa en diferentes disolventes a 25 °C⁶¹

Disolvente	Solubilidad $\mu\text{g/mL}$
Solución de buffer de fosfatos pH 7.4	>0.02
Solución de buffer de fosfatos pH 6.0	0.47
Solución de buffer de fosfatos pH 2.2	3.8
Solución de buffer de fosfatos pH 1.3	6.2
NaOH 0.1 M	0.32
HCl 0.1 M	10
Acetonitrilo	9
Acetona	38
Propilenglicol	41
Hexano	62
Metanol	100
DMSO	210

DMSO, dimetilsulfóxido.

Para tratar de solucionar la problemática de la pobre solubilidad acuosa de los bencimidazoles antihelmínticos, se han obtenido logros efímeros por vías de administración no convencionales; como por ejemplo, la efectiva dosificación de bencimidazoles por medio de una formulación transdérmica en cintas con polietilenglicol/polivinilpirrolidona.⁶² La desventaja de esta presentación es que se necesita un contacto íntimo de las cintas con la piel del animal, limitándose mucho su aplicación. En la historia de los bencimidazoles se han preparado algunas formulaciones inyectables para uso en veterinaria, algunos de los primeros bencimidazoles que se lograron formular en vehículos aceptados para su uso y llegándose a comercializar fueron el Oxfendazol (Endovet®, Novartis) y Sulfóxido de Albendazol (Ricozol, Bayer). Sin embargo, estas formulaciones tienden a causar necrosis en el sitio de aplicación por su pH tan ácido.

Es importante mencionar que actualmente existe en el mercado un producto denominado Fasiject[®]Plus de Agrovvetmarket S.A., el cual es una solución inyectable estéril, que contiene 36% de triclabendazol micronizado, cuyo tamaño de partículas permite una inyección indolora y le confiere una absorción más rápida. Esta solución inyectable logra controlar a *F. hepatica* que afecta la salud y la productividad de los bovinos, ovinos, camélidos y caprinos. Además, contiene 0.6% de ivermectina, lo que complementa su efectividad contra diversos parásitos, como nematodos y ectoparásitos como ácaros causantes de sarna, piojos chupadores de sangre y larvas de mosca. Su formulación por cada 100 mL contiene triclabendazol micronizado (36 g), ivermectina (0.6 g) y excipientes c.s.p (100 mL). En bovinos se administra mediante inyección intramuscular. En ovinos, caprinos y camélidos se administra vía intramuscular o subcutánea. Fasiject[®]Plus se administra a razón de 12 mg de triclabendazol/kg y 200 μg de ivermectina/kg, lo

que en la práctica equivale a 1 mL/30 kg de peso del animal. Se realizaron estudios de excreción del triclabendazol en ratas, perros, ovinos, caprinos y conejos demostrando que la mayor parte se elimina en heces con una mínima excreción urinaria. Sin embargo, para el compuesto alfa no hay formulaciones que se administren por vía parenteral.

2.6 Estrategias utilizadas en Química Farmacéutica para aumentar la solubilidad

En la Química Farmacéutica, la solubilidad es un tema de gran interés ya que se ha observado en forma general que existen problemas al respecto con casi 40% de los nuevos fármacos y, por lo tanto, cualquier esfuerzo que ayude a mejorar o incluso predecir esta propiedad, es valioso, especialmente al momento de trabajar con formas farmacéuticas líquidas, independientemente de que la vía de administración sea oral, parenteral, oftálmica o tópica.⁶³ Entre los diferentes métodos usados para incrementar la solubilidad acuosa de los fármacos están, el uso de cosolventes, tensoactivos, modificación del pH, formación de profármacos y complejación.⁶⁴ Sin embargo se ha observado que al utilizar el enfoque de los profármacos, la solubilidad acuosa se puede incrementar en varios órdenes de magnitud.

2.7 Los profármacos en la Química Farmacéutica

El descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo, complejo y costoso que requiere entre 12 y 24 años desde que se inicia el proyecto, hasta que se logra poner el fármaco en el mercado.⁶⁵ Además, muchos de estos proyectos fracasan completamente a la hora de producir un fármaco comercializable. Las causas principales por las que un fármaco no llega al mercado es el presentar características no deseables en sus propiedades farmacéuticas, farmacodinámicas y farmacocinéticas.^{66,67} Con el fin de superar las propiedades no deseadas que presentan algunas moléculas y que limitan su desarrollo, se pueden llevar a cabo variaciones en la formulación del fármaco, la síntesis de análogos del compuesto o el desarrollo de profármacos.

La diferencia entre el desarrollo de un análogo del fármaco y la preparación de profármacos fue ilustrada por Ferres⁶⁸ en 1983 tal como se describe en la **Figura 2.7**. En algunas ocasiones la molécula presenta elementos estructurales tan restringidos que no se pueden preparar análogos, mediante modificaciones habitualmente empleadas en Química Farmacéutica, sin comprometer su afinidad por el receptor o diana. Es en estos casos es donde el diseño de

profármacos cobra una gran importancia, ya que permite modificar propiedades del fármaco candidato.

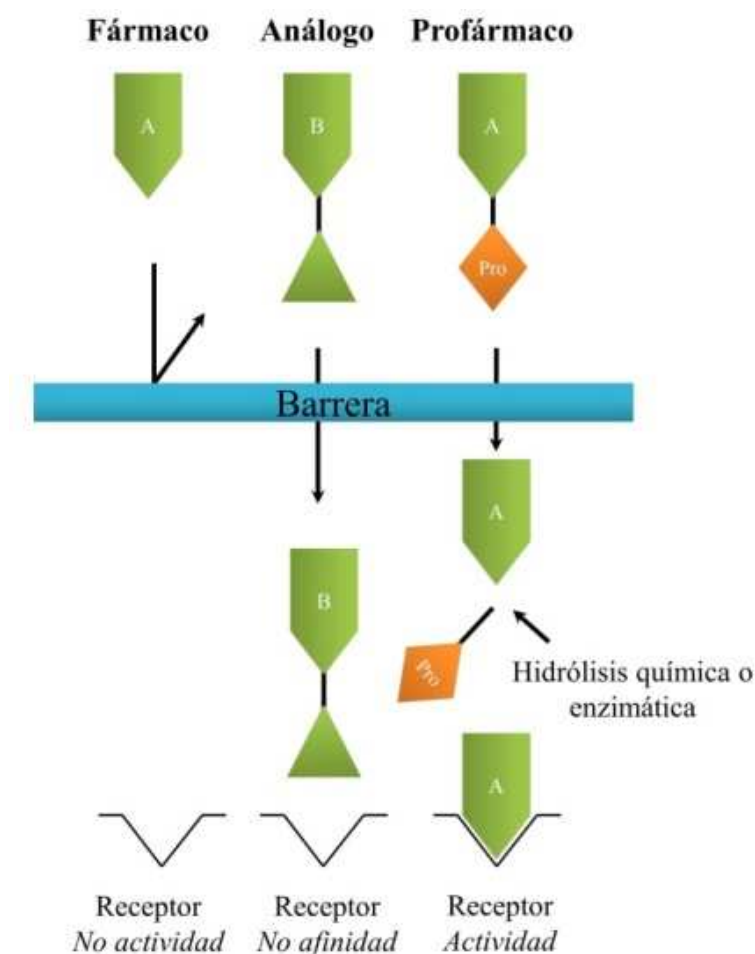


Figura 2.7. Comparación entre análogos y profármacos.

2.7.1 Definición de profármaco

La historia se remite a 1958, cuando Adrien Albert introduce por primera vez el término profármaco, para describir a los compuestos que se tienen que someter a una o más biotransformaciones para obtener el efecto farmacológico, es decir, agentes terapéuticamente inactivos o poco activos pero que se biotransforman en uno o más metabolitos activos.⁶⁹

Los primeros profármacos surgieron por “serendipia”, es decir, de manera fortuita en el siglo XIX. Por ejemplo, la acetanilida, utilizada en 1886 como analgésico, debe su actividad biológica a su transformación metabólica en paracetamol; o el prontosil, sintetizado

originalmente como un colorante, éste compuesto resultó ser un antibacteriano de amplio espectro que se metabolizaba en el organismo en sulfanilamida (**Figura 2.8**).⁷⁰

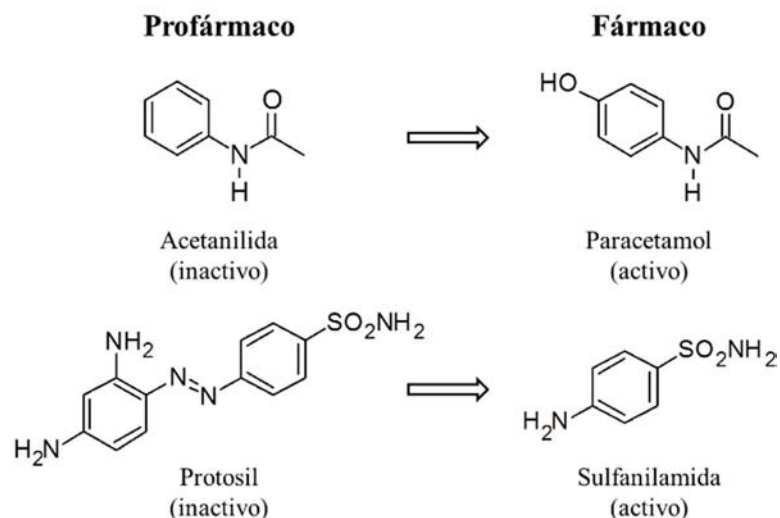


Figura 2.8. Primeros profármacos encontrados por serendipia.

El diseño de profármacos, obedece a un intento de superar barreras que impiden el desarrollo de una molécula como un fármaco líder. Estas barreras pueden ser de tres tipos:^{71,72}

- Farmacéuticas: Problemas de formulación derivados de una baja solubilidad, insuficiente estabilidad química, propiedades organolépticas desagradables (tales como mal sabor u olor) o producir irritación o dolor.
- Farmacocinéticas: Deficiente biodisponibilidad oral (bajos niveles de fármaco en sangre tras la ingestión oral). Otros objetivos también son aumentar la duración de acción del fármaco y conseguir el transporte selectivo a un órgano o tejido determinado.
- Farmacodinámicas: Toxicidad que afecta a algún órgano y su función (toxicidad sistémica).

Además, las propiedades no deseadas están interrelacionadas; es decir, al modificar una se pueden variar otras, lo que le confiere una mayor complejidad al proceso de diseño de un profármaco. Así, por ejemplo, el aumento de la solubilidad acuosa de una molécula puede facilitar su absorción oral, mientras que mejorar la estabilidad química de un agente activo puede permitir su transporte selectivo a un órgano o tejido (**Figura 2.9**).^{71,72}



Figura 2.9. Interrelación existente entre los objetivos que se persiguen en el desarrollo de profármacos.⁷²

2.7.2 Clasificación de los profármacos

Actualmente se puede clasificar a los profármacos de acuerdo a dos criterios, químico y enzimático.^{73,74}

Desde el punto de vista químico, los profármacos se dividen de la siguiente manera:

Profármacos unidos a un acarreador o derivados biorreversibles: Como su nombre lo indica, es una molécula que contiene un compuesto activo unido a un acarreador que se somete a una transformación enzimática y/o química *in vivo* para liberar el fármaco precursor activo, que ejerce el efecto farmacológico deseado.

Dentro de esta clasificación tenemos:

- Profármacos bipartitas: Compuestos producto de la unión entre un fármaco y un acarreador.
- Profármacos tripartitas: Compuestos producto de la unión entre un fármaco, un acarreador y una entidad que mantenga a ambos unidos (acoplador o "linker").⁷⁴
- Profármacos dobles: Compuestos producto de la unión entre un fármaco, un acarreador y dos acopladores que los mantienen unidos. Generalmente usados para la liberación selectiva o para protección de sitios de biotransformación.

- Profármacos mutuos o cofármacos: Compuestos producto de la unión de dos fármacos, generalmente de acción sinérgica entre sí.⁷⁵

Dentro de esta clase se pueden considerar a los fármacos que se les une un acarreador (como un anticuerpo o una entidad química cuya biotransformación sea sitio específica) que es capaz de transportarlos desde el sitio de aplicación, de una manera selectiva a las células blanco, conocidos como *fármacos dirigidos*,^{71,74} de igual manera a los fármacos unidos a polímeros (como el polietilenglicol) para lograr una liberación retardada del mismo, conocidos como *profármacos macromoleculares*.⁷⁶

Compuestos bioprecusores: Son compuestos que no contienen un acarreador, sino que resultan de una modificación molecular que al sufrir una reacción química y/o enzimática *in vivo* (por ejemplo, oxidación o reducción) generan a un nuevo compuesto que es el principio activo. Para el diseño de los compuestos bioprecusores, se toman en cuenta las reacciones metabólicas de Fase 1: reacciones que involucran la transformación de entidades específicas en una molécula sustrato, y la creación de nuevos grupos funcionales.⁷³

En términos simplificados, los profármacos son formas enmascaradas de fármacos activos que están diseñados para ser activados después de una reacción química o enzimática una vez administrados; tanto los derivados biorreversibles como los compuestos bioprecusores se ilustran en la **Figura 2.10**.

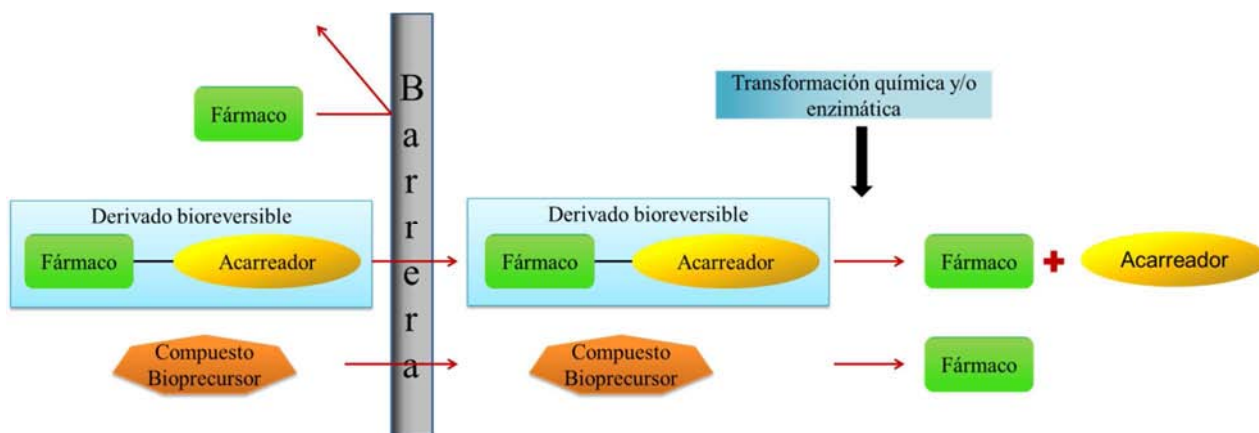


Figura 2.10. Ilustración simplificada del concepto de profármaco.⁷⁷

Para observar la diferencia entre los compuestos bioprecusores y los derivados biorreversibles se presenta un ejemplo en la **Figura 2.11**. El Netobimin (compuesto bioprecursor) se transforma mediante reacciones químicas y/o enzimáticas en albendazol fármaco que tiene la

actividad biológica. Por otro lado, tenemos al metoxicarbonilfenbendazol (derivado bio reversible) que mediante hidrólisis química y/o enzimática genera el fenbendazol.

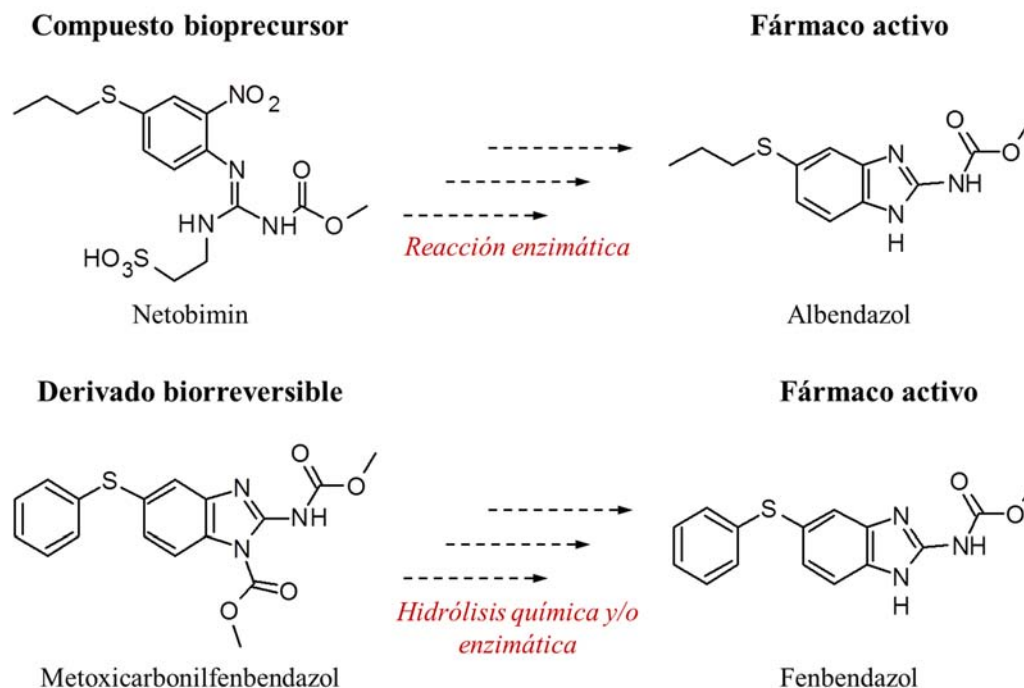


Figura 2.11. Ejemplos de profármacos (compuestos bioprecusores y derivados biorreversibles).

En la **Tabla 2.6** se resumen las características de los profármacos anteriormente mencionados.

Tabla 2.6. Diferencias entre compuestos bioprecusores y derivados biorreversibles

Características	Profármacos	
	Derivados biorreversibles	Compuestos bioprecusores
Constitución	Principio activo + Acarreador	Sin acarreador
Lipofilicidad	Fuertemente modificada	Ligeramente modificada
Bioactivación	hidrolítica	Oxidativa o reductiva
Catálisis	Química y/o enzimática	Enzimática

Desde el punto de vista del mecanismo de activación, los profármacos se dividen en:⁷⁴

Enzimáticos: se activan por acción de enzimas; presentan variabilidad biológica y dificultades de optimización.

No-enzimáticos: No requieren activación enzimática; tienen menos dificultades de optimización pero presentan mayores dificultades por ser más inestables.

2.7.3 Grupos funcionales susceptibles para el diseño de profármacos

El diseño de un profármaco debe ser considerado en las primeras etapas del desarrollo preclínico, teniendo en cuenta que los profármacos pueden alterar la distribución en los tejidos, la eficacia y la toxicidad de los fármacos precursores. Varios factores importantes deben ser cuidadosamente examinados en el diseño de la estructura de un profármaco, entre ellos:^{71,72}

- Identificación de las barreras a vencer con el diseño de los profármacos: baja solubilidad acuosa, pobre absorción, baja permeabilidad, etc.
- Grupos funcionales presentes en el fármaco precursor sean susceptibles a derivatización.
- El modificador debe ser seguro y rápidamente eliminable del cuerpo. La elección del acarreador se debe considerar con respecto al estado de la enfermedad, la dosis y la duración del tratamiento.

La unión entre el grupo modificador y el fármaco es de tipo covalente.

- El profármaco debe carecer de actividad biológica y su síntesis no puede ser más costosa que la del mismo fármaco.
- La separación del fármaco de su modificador debe llevarse a cabo rápidamente para asegurar niveles adecuados del fármaco en el sitio de acción y así evitar metabolismo del propio profármaco.⁷³

En la mayoría de los casos, los profármacos son derivados químicos simples que requieren de uno a dos pasos de transformaciones químicas o enzimáticas para obtener el fármaco activo.⁷⁴ Para derivatizar una amina se modifica con grupos funcionales como carbamatos, amidas, fosfatos, oximas, iminas y bases N-Mannich, estos grupos se ilustran en la **Figura 2.12**.⁷³ La selección del grupo acarreador dependerá de la característica indeseada que tenga nuestro fármaco líder.

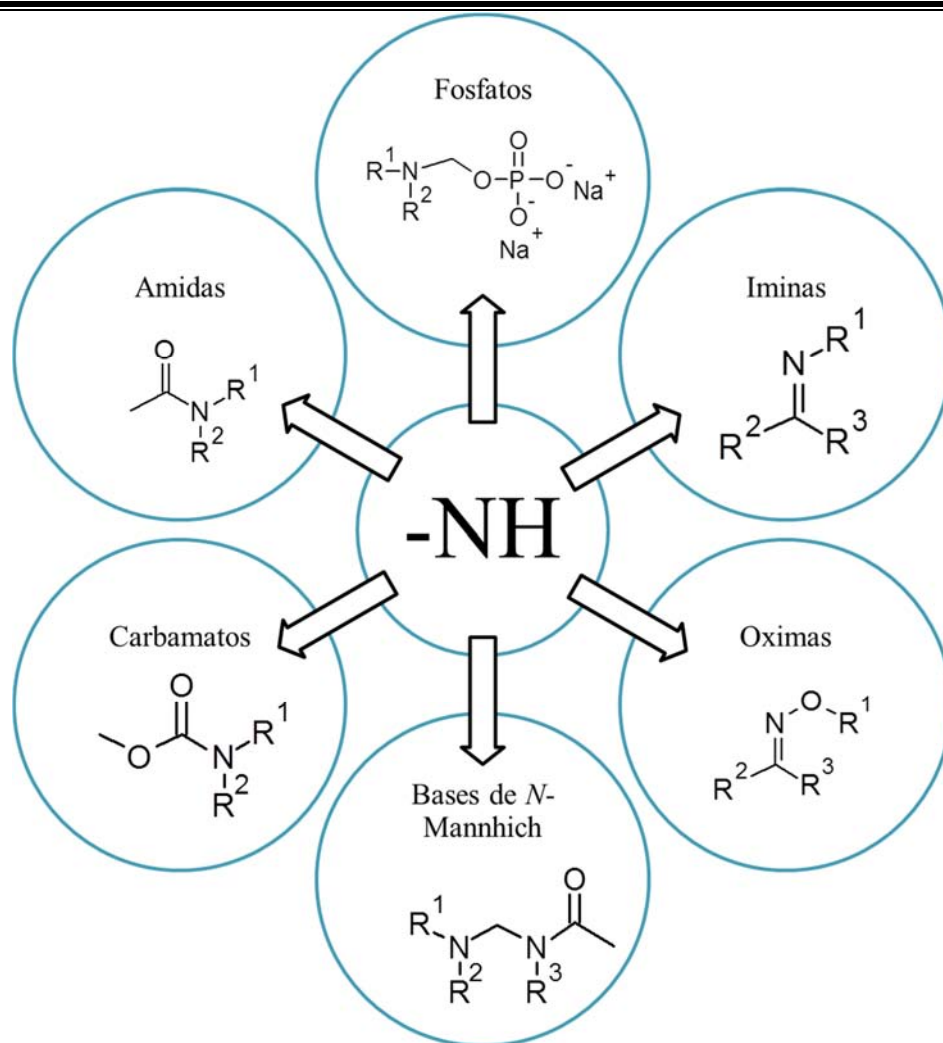


Figura 2.12. Grupos funcionales para derivatizar una amina.⁷³

Los profármacos que son ésteres de fosfato son típicamente diseñados para los grupos funcionales hidroxilo y amina de fármacos poco solubles en agua con el objetivo de mejorar su solubilidad acuosa y permitir un entorno más favorable para la administración por vía oral o parenteral.⁷³

Los profármacos fosfato suelen mostrar una excelente estabilidad química y adecuada bioconversión al fármaco original por fosfatasa presentes en el borde del cepillo intestinal, en el hígado o en el torrente sanguíneo.^{70,78} Además, todos los profármacos, independientemente de la vía de administración, tendrán que cumplir en lo posible los siguientes requisitos típicos:⁷³

- El costo en el mercado del profármaco debe incrementarse muy poco a diferencia del compuesto precursor; además de la fácil síntesis del acarreador y del profármaco.

- La escisión lenta y prolongada puede ser deseable como una forma especial de un mecanismo de liberación controlada.
- El profármaco no debe añadir un efecto secundario adicional o toxicidad para el fármaco de origen que está siendo eliminado fácilmente del cuerpo y no poseer cualquier potencial tóxico inherente.

2.7.4 Ésteres de fosfato como acarreador en los profármacos

Los ésteres de fosfato juegan un papel dominante en la fisiología de las células y por lo tanto son esenciales para cualquier organismo. El más destacado es la participación de ésteres de fosfato como un elemento estructural y funcional en el ADN, ARN y sus bloques de construcción monoméricos, como una señal postraduccional en las proteínas, como un grupo cabeza en los fosfolípidos. Además, los hidratos de carbono a menudo son fosforilados, a veces con fosfatos individuales, como en los nucleótidos cíclicos, a veces en gran medida, como polifosfatos de inositol y fosfoinosítidos.⁷⁹ Los ésteres de fosfato generalmente tienen un pK_a bajo, a menudo entre 1 y 2, por lo tanto a pH fisiológico en el rango de 7.0-7.4, los compuestos se desprotonan de forma permanente, por lo que se encuentran cargados negativamente. La carga negativa en ésteres de fosfato es responsable de una gran variedad de sus propiedades.⁸⁰ En primer lugar, el nucleófilo o la carga negativa de los compuestos son repelidos debido a las interacciones de Coulomb, que resulta en una notable estabilidad frente a la hidrólisis no enzimática con vidas medias que son fácilmente en el orden de cientos de años.⁸¹ En segundo lugar, son en su mayoría impermeables a las membranas celulares, a menos que el transporte activo, endo/exocitosis, o la fusión viral esté involucrado. Una vez dentro de las células, los grupos acarreadores se eliminan por hidrólisis química o enzimática, generando fosfato o fosfonato cargados, haciendo que las moléculas sean de nuevo impermeables a las membranas celulares y biológicamente activas.

Por lo anterior, los profármacos que contienen en su estructura grupos fosfato ofrecen varias ventajas para la formulación y el desarrollo de compuestos con baja solubilidad acuosa, ya que el aumento en la solubilidad por el grupo fosfato dianiónico es, a menudo, de varios órdenes de magnitud,^{82,83} además de que son químicamente estables⁷⁸ y fácilmente hidrolizables por fosfatasa endógenas.^{78,84-86}

Se tiene preferencia por este tipo de profármacos sobre los ésteres de aminoácidos o amidas, porque éstos carecen de estabilidad acuosa y en ocasiones su bioconversión es incompleta.⁸⁷ Por lo tanto, el profármaco ideal será perfectamente estable hasta que alcance el sitio deseado de la activación, y luego será rápidamente y cuantitativamente convertido en el fármaco activo. Al igual que la estabilidad, la tasa de conversión es un atributo que se puede medir utilizando sistemas *in vitro*.

2.7.5 Profármaco de los carbamatos bencimidazólicos

Teniendo la perspectiva de los profármacos, se han dedicado esfuerzos para el desarrollo de derivados hidrosolubles de bencimidazoles, con el objetivo de obtener moléculas que tengan una mejor solubilidad acuosa que permita su administración en forma de solución a los animales infectados y que además posean una suficiente estabilidad acuosa durante su aplicación, así como también una rápida bioconversión al fármaco correspondiente en el sitio de acción, para combatir enfermedades del tracto gastrointestinal e infecciones sistémicas.

Como resultado de este enfoque se han obtenido diferentes compuestos como profármacos de fenilguanidina que se transforman metabólicamente en bencimidazoles antihelmínticos. Por ejemplo, Febantel,⁸⁸ profármaco que se convierte en fenbendazol y netobimina⁸⁹ que genera albendazol. Se han realizado también tentativas para proporcionar derivados más solubles de bencimidazoles, profármacos, que son metabolizados para dar el compuesto activo, como la unión al núcleo de bencimidazol de grupos *N*-acilo,^{90,91} *N*-alcoxicarbonilos^{92,93} o bases de Mannich^{94,95}.

En la década de los 90's, Stella y colaboradores desarrollaron una estrategia para el diseño de profármacos a través de la derivación de aminas terciarias con un grupo fosfonoximetil,^{96,97} que se extendió más tarde a la derivatización de grupos hidroxilo.⁹⁸ Para liberar al fármaco correspondiente, se tienen que completar dos pasos, el primero de ellos es a través de la catálisis por una fosfatasa, el paso desfosforilación hidrolítica, para obtener el intermediario hidroximetil que se descompone de forma espontánea en el fármaco correspondiente y formaldehído.

Esta estrategia ya se extendió a los carbamatos bencimidazólicos en el campo de los antiparasitarios. En 2008 se reportó la síntesis de profármacos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo, antihelmínticos veterinarios. Las moléculas mostraron buena eficacia

terapéutica, alta solubilidad acuosa y estabilidad, con alta labilidad en presencia de fosfatasa alcalinas. Se evaluó *in vivo* el profármaco del fenbendazol, realizado en cerdos, se demostró que la eficacia es comparable al fármaco precursor. Por otra parte, los estudios farmacocinéticos comparativos, revelaron un aumento en la concentración de los metabolitos activos cuando fue administrado el profármaco.^{99,100} Cabe destacar que estos compuesto fueron diseñados para ser administrados por vía agua de beber, pero también se pueden extrapolar a otras vías como la parenteral (**Figura 2.13**).

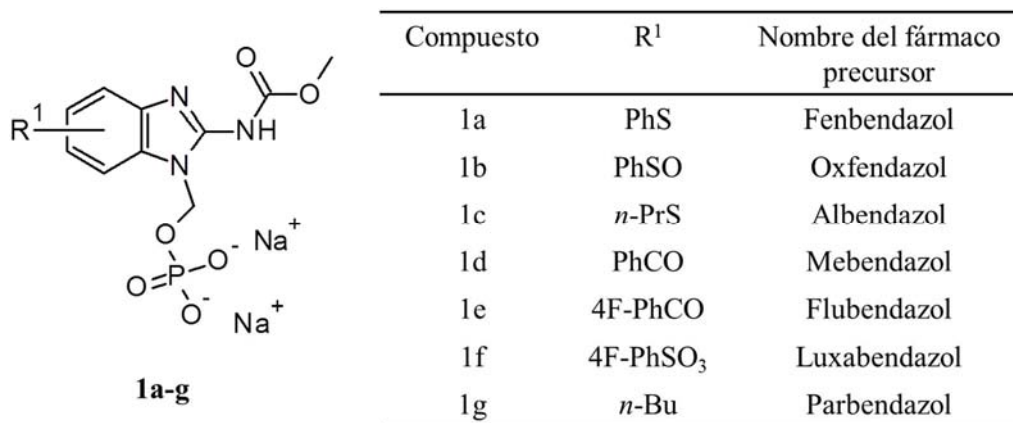


Figura 2.13. Fosfonooximetil derivados del 1H-benzimidazol-2-carbamato de metilo.

Por lo anterior, la estrategia de los profármacos actualmente se ha utilizado para resolver las problemáticas antes mencionadas, lo cual se aprecia con los siguientes datos:

- Hasta antes de 2002, 5-7% de todos los medicamentos aprobados en todo el mundo, podían ser considerados profármacos, y el 15% de los medicamentos aprobados entre 2001 y 2002 son profármacos. Aproximadamente 49% de esos profármacos eran activados por hidrólisis y 23% eran bioprecusores.¹⁰¹
- De 2000 a 2008 fueron aprobadas 236 moléculas, de las cuales 12.6% fueron identificados como profármacos y otro 5.2% pueden considerarse profármacos.¹⁰²
- Actualmente 10% de todos los medicamentos comercializados en todo el mundo, se clasifican como profármacos.

Aún con los datos anteriores, se sigue pensando que los profármacos son una medida desesperada a la que sólo debe recurrirse cuando un fármaco es rechazado; y que son sólo de interés académico, como una alternativa para mejorar la biodisponibilidad y problemas de toxicidad.⁷³

Capítulo 3. Planteamiento del problema

Durante décadas se han utilizado una gran variedad de fasciolicidas alrededor de todo el mundo, los cuales, a través de los años, debido al sobreuso y dosificación inadecuada, han generado problemas de resistencia por parte del parásito. Además, el costo del tratamiento para cada animal es cada vez más alto.

El último fasciolicida lanzado al mercado en 1978 fue el triclabendazol y a pesar de los problemas de resistencia, es el fármaco de elección para el tratamiento de la fasciolosis desde hace más de 30 años, debido a su alta eficacia en todos los estadios del parásito. Por lo anterior, se han desarrollado fármacos alternativos de igual o mayor eficacia que la del triclabendazol para el control de esta parasitosis, como el denominado “compuesto alfa” (5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol), el cual mostró actividad fasciolicida equiparable a la del triclabendazol. Uno de los problemas importantes de estos compuestos bencimidazólicos, es la baja solubilidad acuosa, la cual es atribuida a las fuerzas de atracción intermoleculares, lo que provoca la pobre absorción gastrointestinal generando que se utilicen a altas dosis. La pobre solubilidad acuosa ha llevado a que tanto el triclabendazol y el compuesto alfa, se suministren en formulaciones en forma de suspensiones, polvos y bolos intrarrumiales. Además, la administración por vía oral al ganado sigue siendo un problema, puesto que no es igual suministrar el medicamento a un borrego que a un toro de lidia. Por tal motivo, se necesitan desarrollar nuevas formas farmacéuticas que permitan una fácil y mejor forma de administración, como una solución inyectable.

El presente proyecto contribuye a la creación de dos profármacos derivados del compuesto alfa (**MFR-33**) y triclabendazol (**MFR-34**) altamente hidrosolubles, agregando un grupo ionizable fosfonooximetilo al nitrógeno del núcleo de imidazol. Con ello, se logrará la optimización de las propiedades biofarmacéuticas para el tratamiento de la fasciolosis que es una enfermedad sistémica, reduciendo la dosis administrada, además de dar paso a generar una formulación inyectable.

Capítulo 4. Hipótesis y Objetivos

4.1 Hipótesis

Si se logra modificar la estructura del compuesto alfa y triclabendazol mediante la introducción de un grupo ionizable como fosfonooximetilo en el átomo de nitrógeno del anillo del imidazol, se conseguirá disminuir las fuerzas de atracción intermoleculares, con el consecuente aumento en la solubilidad acuosa, biodisponibilidad y actividad fasciolicida.

4.2 Objetivo General

Mejorar la solubilidad acuosa del compuesto alfa y triclabendazol mediante la preparación de profármacos.

4.3 Objetivos Particulares

- Desarrollar una metodología para sintetizar los profármacos hidrosolubles fosfonooximetilo del compuesto alfa y del triclabendazol (**Figura 4.1**).

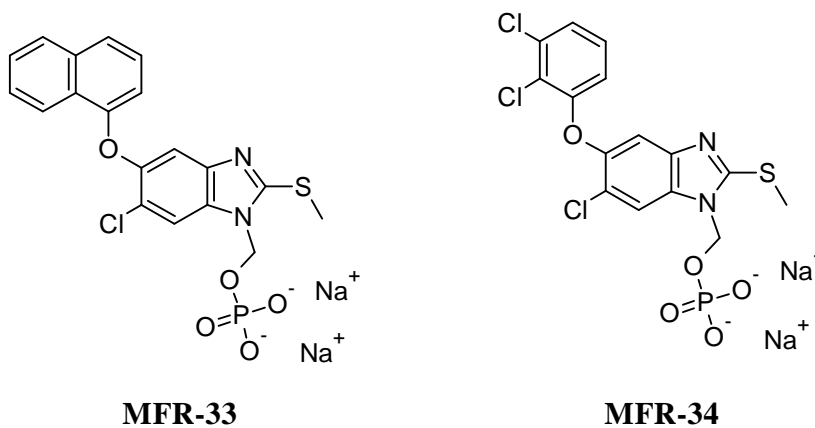


Figura 4.1. Profármacos propuestos del compuesto alfa (**MFR-33**) y triclabendazol (**MFR-34**).

- Determinar de los derivados fosfonooximetil benzimidazoles en colaboración de la Dra. Helgi Jung Cook de Facultad de Química, UNAM:
 - Solubilidad acuosa.
 - Estabilidad acuosa.
 - Hidrólisis enzimática con fosfatasa alcalina.

- Evaluar de los derivados fosfonooximetil bencimidazoles en colaboración del Dr. Froylán Ibarra Velarde de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM:
 - La actividad fasciolicida *in vitro* contra metacercarias de *F. hepatica*.
 - La actividad fasciolicida *in vivo* en ovinos infectados artificialmente con *F. hepatica*.

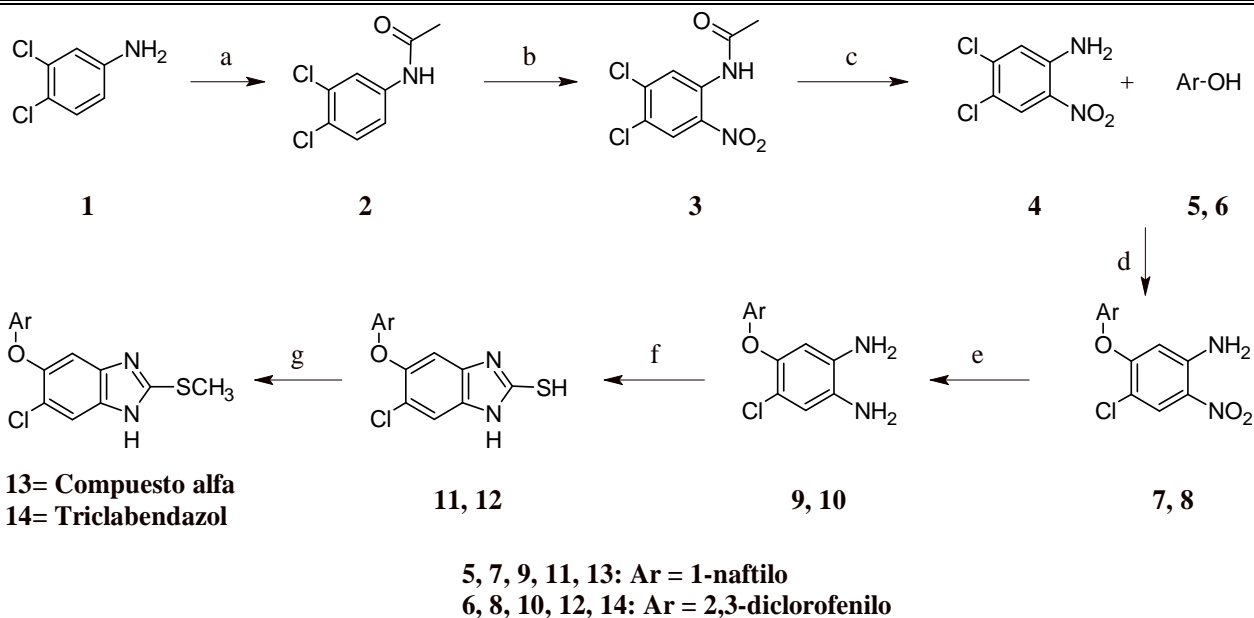
Capítulo 5. Metodología experimental

5.1 Parte química

En esta sección se describe la ruta sintética para obtener los profármacos **MFR-33** y **MFR-34**, la determinación de la solubilidad acuosa, estabilidad acuosa e hidrólisis enzimática, y por último, la evaluación *in vitro* del compuesto **MFR-33** e *in vivo* de los dos profármacos **MFR-33** y **MFR-34**.

5.1.1 Estudio sobre la síntesis del compuesto alfa (13) y triclabendazol (14)

La síntesis del compuesto alfa (**13**) y triclabendazol (**14**) se realizó de acuerdo a la secuencia de reacciones del **Esquema 5.1**.^{44,103,104} Se comenzó con la 3,4-dicloroanilina comercial (**1**). Primeramente, se realizó una acetilación con anhídrido acético para formar *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (**2**); posteriormente, se llevó a cabo una *S_EAr* usando HNO₃ y H₂SO₄ a una temperatura entre 0-5°C obteniendo a *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**3**). A **3** se le realizó una reacción de hidrólisis para obtener la correspondiente 3,4-dicloro-2-nitroanilina (**4**), a la cual se le efectuó una *S_NAr* con el correspondiente alcohol aromático (1-naftol (**5**) o 2,3-diclorofenol (**6**)) en DMF a 115 °C. El compuesto **7** u **8** obtenido se redujo mediante hidrogenación catalítica y la *o*-fenilendiamina (**9**, **10**) obtenida se sometió a una reacción de ciclocondensación con CS₂ en medio básico etanólico para dar el correspondiente 2-mercaptobencimidazol (**11**, **12**). Por último, la *S*-metilación de los compuestos **11** ó **12** se realizó utilizando CH₃I, KOH y acetona a 0-10 °C, llevando al correspondiente compuesto alfa (**13**) o triclabendazol (**14**).



Esquema 5.1. Ruta sintética para obtener el compuesto alfa (**13**) y trichlorobenzodiazol (**14**). Reactivos y condiciones: (a) Ac_2O , 40-50 °C; (b) H_2SO_4 , HNO_3 , 0-5 °C; (c) NaOH , MeOH , H_2O ; (d) K_2CO_3 , DMF , 115 °C; (e) H_2 , Ni-Raney, MeOH ; (f) CS_2 , KOH , EtOH , 70 °C; (g) CH_3I , KOH , Acetona, 0-10 °C.

Se obtuvieron buenos rendimientos en la mayoría de las reacciones; sin embargo, se observaron bajos rendimientos en la reacción de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ para obtener el compuesto **7** u **8**, por lo que el rendimiento global se redujó considerablemente, por esta razón se exploró dicha sustitución.

5.1.2 Estudio sobre la síntesis de los intermediarios **7** y **8**

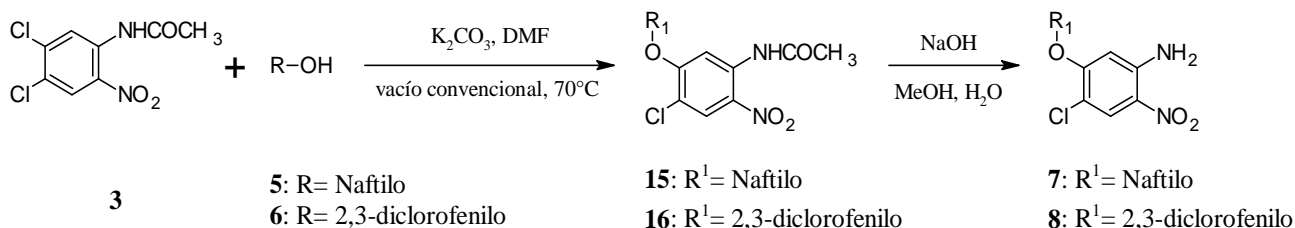
Para tratar de aumentar los rendimientos de la $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, esta reacción se estudió usando dos metodologías, una de ellas es llevar a cabo la sustitución utilizando un equipo de microondas y otra haciendo uso de vacío y el compuesto **3**.

5.1.2.1 Reacción de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ usando un equipo de microondas

En el primer método se utilizó una mezcla de 1-naftol (**5**), la base adecuada, una mezcla 80:20 del correspondiente disolvente y H_2O , agitando durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4**), y se colocó en el equipo de microondas (Synthos 3000 Anton Paar) con agitación a 175 °C y 13.3 bar durante 10 minutos.

5.1.2.2 Reacción de S_NAr utilizando vacío de 150-200 mmHg

El segundo método que se utilizó para incrementar el rendimiento de los productos de S_NAr (**7** y **8**) se basó en utilizar el intermediario **3**, el correspondiente alcohol aromático (**5** ó **6**), K_2CO_3 , vacío de 150-200 mmHg, 70 °C durante 6 horas, obteniendo los intermediarios **15** ó **16**. Finalmente, los intermediarios **15** ó **16** se sometieron a una hidrólisis básica para obtener los compuestos deseados **7** u **8** como se muestra en el **Esquema 5.2**.



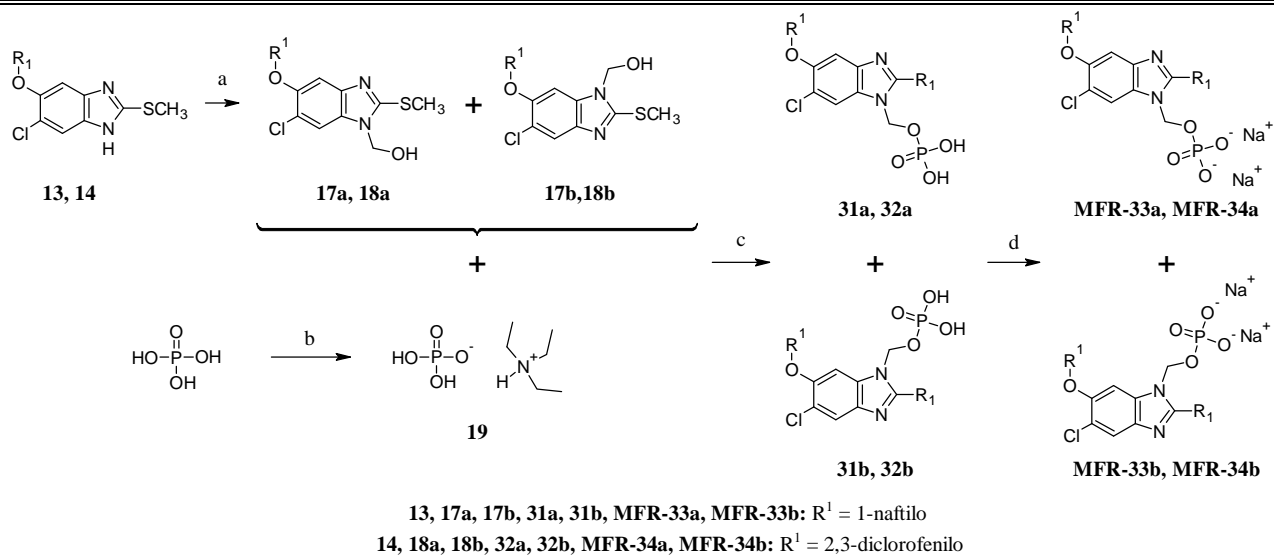
Esquema 5.2. Reacción modelo para incrementar el rendimiento de la reacción de S_NAr .

5.1.3 Estudio sobre la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34

Para la síntesis de los profármacos se propusieron dos estrategias.

5.1.3.1 Primera estrategia para la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34

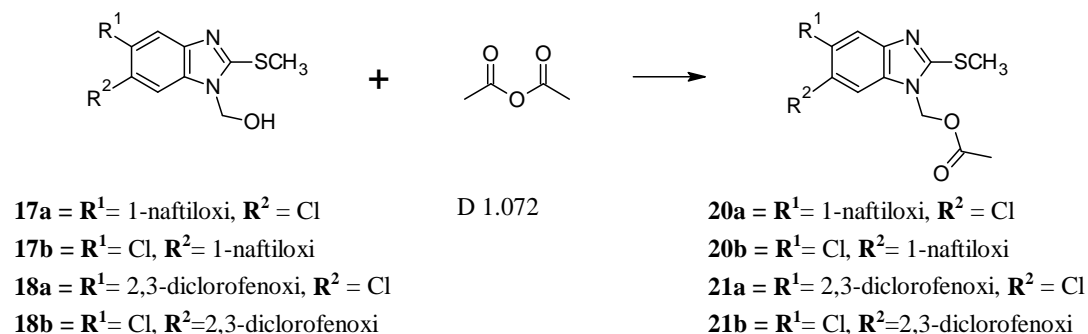
En la primera estrategia, los alcoholes **17a-b** y **18a-b** se prepararon por tratamiento de los bencimidazoles (compuesto alfa (**13**) o triclabendazol (**14**)), con *p*-formaldehído en medio básico utilizando DMF como disolvente; los compuestos se obtendrán como mezclas de regioisómeros que sin separarlos se someterán a la siguiente reacción.¹⁰⁵ El fosfato de trietilamonio (**19**) será generado a partir del ácido fosfórico y un equivalente de trietilamina.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ El grupo fosfato se introducirá empleando el fosfato de trietilamonio, el cual se hará reaccionar con los alcoholes **17a-b** y **18a-b**, recién preparados, en CH_2Cl_2 , y en presencia de tricloroacetitrilo para dar las sales del derivado fosfonooximetilo de trietilamonio correspondientes; éstas, por tratamiento con MeONa en MeOH se interconvertirán en las correspondientes sales disódicas. A todos los derivados finales y a sus intermediarios aislados se les determinarán sus constantes físicas y espectroscópicas, y en su caso, se compararán con los ya reportados (**Esquema 5.3**).



Esquema 5.3. Ruta sintética de la primera estrategia para obtener **MFR-33** y **MFR-34**. Reactivos y condiciones: (a) CH_2O , CH_2Cl_2 , temperatura ambiente; (b) 1 eq de $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$, CH_2Cl_2 , temperatura ambiente; (c) Cl_3CCN , DMF, temperatura ambiente; (d) MeONa, MeOH.

5.1.3.1.1 Síntesis de los acetiloximetilbencimidazoles **20** y **21**

Para demostrar la existencia de los hidroximetil derivados del compuesto alfa (**17**) y triclabendazol (**18**), se realizó una reacción de acetilación para la formación de los acetiloximetil derivados (**20** y **21**). Utilizando el correspondiente hidroximetil derivado, 4-dimetilaminopiridina, anhídrido acético, CH_2Cl_2 con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Obteniendo la mezcla de regioisómeros del compuesto **20a-b** y **21a-b** (Esquema 5.4).



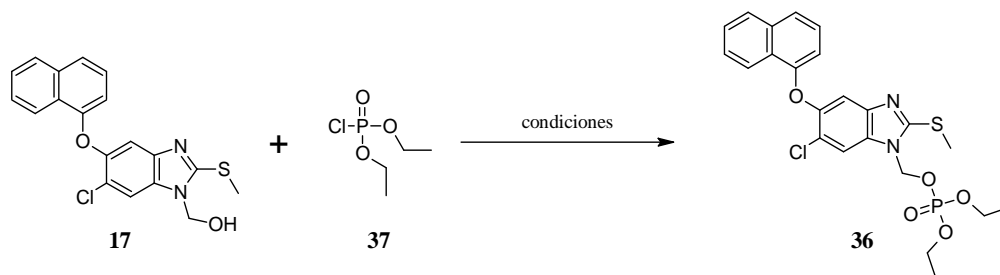
Esquema 5.4. Demostración de la obtención de los derivados hidroximetil bencimidazoles.

Debido a que las reacciones posteriores a **17** y **18** de esta estrategia no se lograron llevar a cabo, se decidió estudiar rutas alternas a estos intermediarios.

5.1.3.1.2 Reacciones adicionales utilizando el intermediario 17

5.1.3.1.2.1 Estudio sobre 36

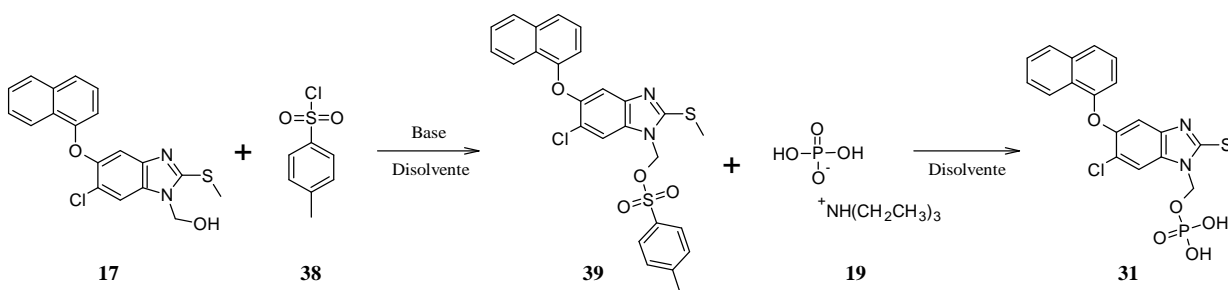
Con el mismo principio, se intentó sintetizar el intermediario **36**, con el cual se pretendía que el oxígeno del hidroximetilo de **17** llevaría un ataque nucleofílico al clorofosfato de dietilo (**37**). Esta reacción se realizó utilizando diferentes bases, disolventes y condiciones de temperatura (**Esquema 5.5**).



Esquema 5.5. Sustitución nucleofílica.

5.1.3.1.2.2 Estudio sobre 39

Con el propósito de sintetizar un intermediario que fuera atacado nucleofílicamente por un fosfato con una carga negativa, se intentó obtener a **39** utilizando cloruro de *p*-toluensulfonilo en medio básico con diferentes disolventes polares apróticos. Posteriormente, **39** se haría reaccionar con **19** para obtener **31**.

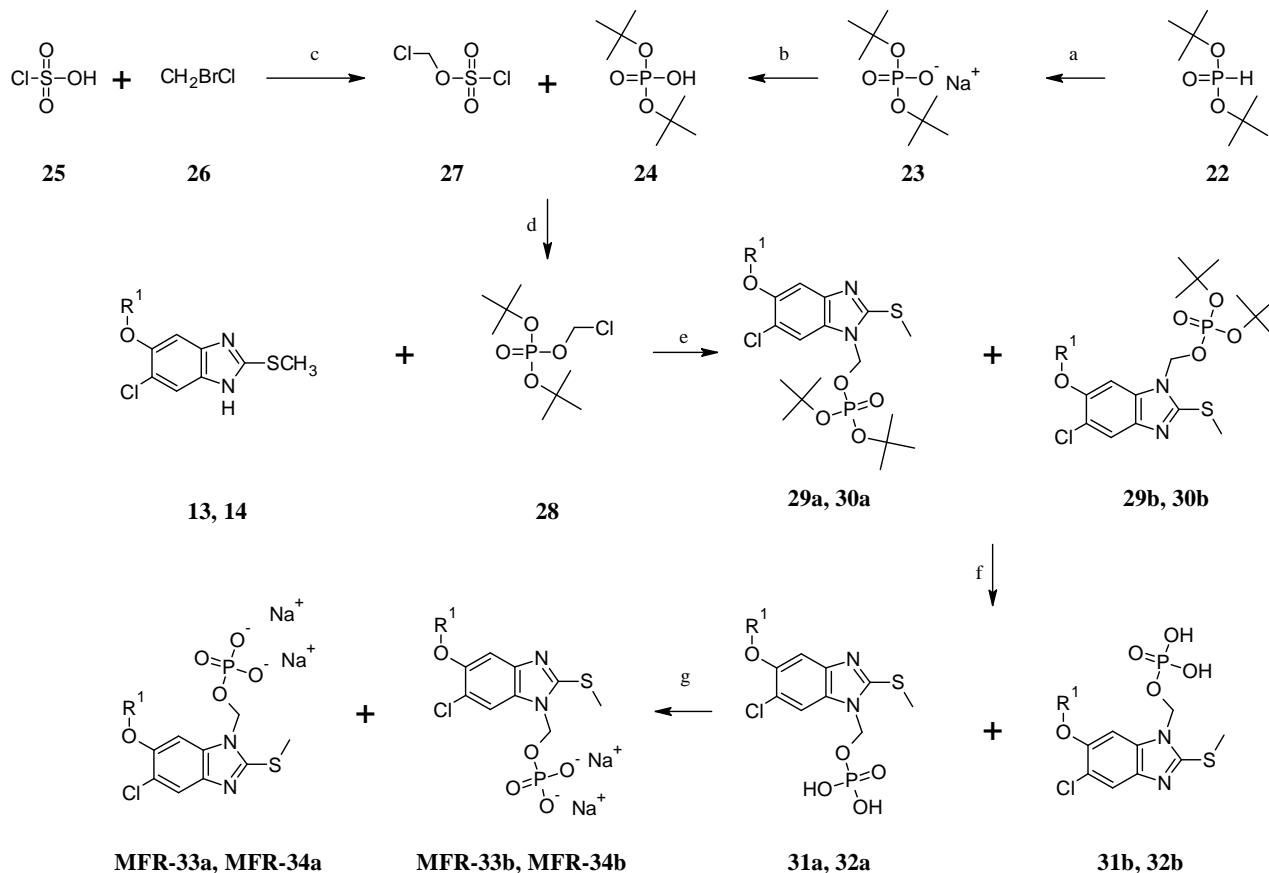


Esquema 5.6. Sustitución nucleofílica.

5.1.4.1 Segunda estrategia para la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34

La segunda estrategia que se siguió para la síntesis de los profármacos del compuesto alfa (**MFR-33**) y triclabendazol (**MFR-34**) se muestra en el **Esquema 5.7**. Para introducir el grupo fosfato se empleó el fosfato de *di-terc*-butilclorometilo (**28**), recién preparado a partir del clorosulfato de clorometilo (**27**) y fosfato monohidrógeno de *di-terc*-butilo (**24**), de acuerdo a lo

reportado, con algunas modificaciones.⁹⁹ El compuesto alfa (**13**) y tricloabendazol (**14**) se trataron en medio básico y en condiciones anhidras para dar el derivado triéster de fosfato (**29** ó **30**) que se obtuvo como mezclas de regioisómeros, resultado de la sustitución en ambos nitrógenos del anillo de bencimidazol. La desprotección del triéster se llevó a cabo utilizando HCl en dioxano, lo que condujo a la formación de los fosfatos dihidrógeno (**31** ó **32**) los cuales se convirtieron a las sales disódicas deseadas (**MFR-33** ó **MFR-34**) por tratamiento con NaOH en MeOH/H₂O.

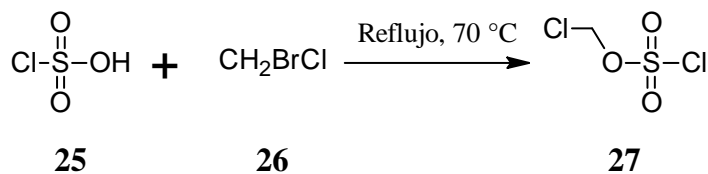


Esquema 5.7. Procedimiento general para la síntesis de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34**. Reactivos y condiciones: (a) KMnO₄, NaHCO₃, H₂O, 0-5 °C; (b) HCl, 0-5 °C; (c) reflujo 70 °C; (d) NaHCO₃, n-Bu₄NHSO₄, CH₂Cl₂-H₂O, 0 °C-temperatura ambiente; (e) NaH, DMF, temperatura ambiente; (f) HCl 4 M en dioxano, temperatura ambiente; (g) NaOH/H₂O, temperatura ambiente.

5.1.4.1.1 Síntesis de clorosulfato de clorometilo (27)

El clorosulfato de clorometilo (**27**) es un reactivo versátil que se utiliza para realizar clorometilaciones a diferentes compuestos orgánicos. Este reactivo es relativamente costoso

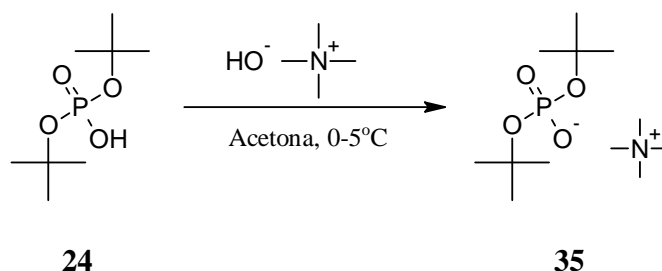
(Número de producto 656682-2g, 1,915.00 MXP, 97% de pureza de Sigma-Aldrich). Debido a que se contaba con las materias primas se realizó la reacción según lo reportado por Binderup y Hansen (**Esquema 5.8**).¹⁰⁹



Esquema 5.8. Reacción para generar **27**.

5.1.4.1.2 Síntesis de fosfato de di-*terc*-butiltetrametilamonio (**35**)

Por los bajos rendimientos que se obtuvieron en la síntesis de fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**28**) a partir de fosfato monohidrógeno de di-*terc*-butilo (**24**) y clorosulfato de clorometilo (**27**), se sintetizó el compuesto **35** que incrementó el rendimiento (**Esquema 5.9**).



Esquema 5.9. Síntesis de intermediario alterno **35**.

5.2 Determinación de solubilidad, estabilidad acuosa e hidrólisis enzimática

5.2.1 Determinación de solubilidad acuosa

5.2.1.1 Preparación de la muestra

La solubilidad acuosa del compuesto alfa (**13**), triclabendazol (**14**) y los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** se determinó por triplicado e individualmente, en agua desionizada siguiendo el procedimiento de Yalkowski.¹¹⁰ La muestra se preparó por la adición en exceso del compuesto a evaluar (**13** y **14**, 10 mg; **MFR-33** y **MFR-34**, 50 mg) en agua desionizada (**13** y **14**, 10 mL; **MFR-33** y **MFR-34**, 2 mL) contenido en un tubo con tapa. La muestra se agitó a temperatura ambiente por 48 horas para llegar al equilibrio entre las dos fases. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 4500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, tomando la alícuota del sobrenadante cristalino. Las muestras **13** y **14** se leyeron directamente, mientras que las muestras de **MFR-33** y **MFR-34** se diluyeron tomando una alícuota de 0.1 mL y aforando a 100 mL, de

ésta se tomó 1 mL y se aforó a 2 mL, para finalmente leer en el espectrofotómetro e interpolar en las curvas de calibración previamente elaboradas. Las curvas de calibración se presentan en el procedimiento experimental (página 99-101).

5.2.1.2 Preparación de la curva de calibración

Se realizó un barrido del compuesto alfa (**13**), triclabendazol (**14**) y de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** obteniendo los máximos y mínimos. Las longitudes de onda máximas que se utilizaron para evaluar la solubilidad de **13**, **14**, **MFR-33** y **MFR-34** fueron 305, 306, 305 y 304 nm, respectivamente. Por último, para determinar la concentración de la muestra problema se construyó la curva de calibración (0.2, 1.6, 3.2, 6.4 y 12.8 µg/mL, para **13** y **14**; 2, 4, 6, 10 y 20 µg/mL, para **MFR-33** y **MFR-34**) para posteriormente interpolar las muestras recién preparadas.

5.2.2 Determinación de estabilidad acuosa

5.2.2.1 Preparación de la muestra

La determinación de la estabilidad acuosa se realizó por triplicado, preparando una solución de 10 mg del correspondiente compuesto (**13**, **14**, **MFR-33** o **MFR-34**) en 10 mL de una solución amortiguadora 0.1 M y a pH de 1 (KCl/HCl) y 7.4 (K₂HPO₄/KH₂PO₄), obteniendo una concentración de 1 mg/mL de compuesto a analizar. En el caso de **13** y **14** la suspensión se filtró a través de un filtro WHATMAN 25 mm GD/X CA (filtro membrana de polipropileno). Posteriormente, 5 mL de la solución de **MFR-33** y **MFR-34** se diluyeron con 10 mL de solución amortiguadora (si es necesario se aplicó factor de dilución (1:2) en caso de que la lectura no cayera dentro de la curva de calibración). Las soluciones se guardaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 26 horas. La estabilidad de los compuestos **13**, **14**, **MFR-33** y **MFR-34** se determinó por UV-HPLC comparando las áreas bajo la curva correspondientes a los compuestos al tiempo cero (t₀) y después de 26 horas de incubación utilizando las mismas longitudes de onda que en la determinación de la solubilidad acuosa.

5.2.2.2 Preparación de la curva de calibración

Se prepararon curvas de calibración de los compuestos **13**, **14**, **MFR-33** y **MFR-34**, a diferentes concentraciones 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 µg/mL para **13** y **14**; 1, 2, 3, 4 y 5 µg/mL para **MFR-33** y **MFR-34**.

5.2.3 Determinación de hidrólisis enzimática

5.2.3.1 Preparación de la muestra

La velocidad de hidrólisis enzimática de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** se determinó por duplicado en una solución de fosfatasa alcalina a 37 °C a pH 7.4. La fosfatasa alcalina EC 3.1.3.1 (Tipo VII-S: de mucosa intestinal de bovino 3546 unidades/mg; 32372 unidades/mL) se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO, USA). Se disolvieron los profármacos **MFR-33** (0.2474 mg, 0.5 µmol) y **MFR-34** (0.2568 mg, 0.5 µmol) en 2 mL de una solución buffer Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 0.1 M. La solución se colocó en un baño maría a 37 °C y posteriormente se agregó a la solución 2 µL (64.7 unidades) de fosfatasa alcalina. Se retiraron 200 µL de muestra a predeterminados intervalos de tiempo (0.5, 0.75, 1, 3, 5 y 10 minutos) e inmediatamente se agregaron 200 µL de acetonitrilo frío para precipitar la proteína. Después de mezclar, las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante claro se analizó por HPLC para determinar la cantidad de profármaco restante. La vida media de pseudo primer orden ($t_{1/2}$) para la hidrólisis del profármaco se calculó de la pendiente de la proporción lineal de la gráfica logarítmica de profármaco remanente contra tiempo.^{111,112}

5.2.3.2 Preparación de la curva de calibración

Una vez conocida la longitud de onda máxima, se preparó una solución patrón de 1000 µg/mL de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34**, utilizando 10 mg del correspondiente profármaco y 10 mL de agua desionizada. Posteriormente, se realizaron las correspondientes diluciones para preparar la curva de calibración (15, 30, 50, 75, 100, y 150 µg/mL). Tanto la curva de calibración como las muestras se prepararon y leyeron el mismo día.

5.3 Parte biológica

5.3.1 Evaluación *in vitro* de la actividad fasciolicida de MFR-33

Para evaluar la actividad fasciolicida del compuesto **MFR-33** como mezcla de regioisómeros, se utilizaron fasciolas desenquistadas artificialmente (aproximadamente seis horas después del desenquistamiento). Posteriormente, las fasciolas recién desenquistadas se suspendieron en 90 mL de medio de cultivo (RPMI)-1640[®] más 90 mL de suero bovino y 1.5 mL de antibiótico (Penicilina y Streptomycin) a una densidad de 100 individuos/mL. Se utilizaron 5 mg del compuesto experimental colocados en una botella universal (capacidad de 30 mL), agregando 0.1 mL de metanol para disolver el compuesto. A partir de ahí se realizaron las

diluciones necesarias con agua destilada para preparar concentraciones de 50 y 10 mg/L. Se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos marca NUNC® y en cada pozo se depositaron 1.6 mL de medio de cultivo (RPMI/suero bovino), 0.2 mL de la concentración de compuesto a evaluar y 0.2 mL de RPMI conteniendo 10 fasciolas por pozo. Por cada placa se utilizaron pozos testigo conteniendo fasciolas sin compuesto, además de que se incluye un grupo testigo con un fármaco de referencia (Triclabendazol-Fasinex®-Novartis). Cada concentración se realizó por triplicado. Cada prueba permaneció en incubación a 37°C durante 4 días bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Las fasciolas bajo estudio se examinaron a las 24, 48 y 72 horas post-exposición al compuesto mediante un microscopio invertido a 40x. La actividad de los compuestos se determinó comparando la sobrevivencia de las fasciolas tratadas con relación a las fasciolas del grupo testigo. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. La eficacia se determinó utilizando la siguiente fórmula:¹¹³

$$\% \text{ de efectividad} = \frac{\text{No de fasciolas en el grupo testigo} - \text{No de Fasciolas en el grupo tratado}}{\text{No de Fasciolas en el grupo testigo}} \times 100$$

Cuando el extracto muestra una eficacia *in-vitro* mayor al 80% se considera que posee actividad fasciolicida.^{113,114}

5.3.2 Evaluación *in vivo* de la actividad fasciolicida de los profármacos MFR-33 y MFR-34

Se utilizaron 24 ovinos criollos, de sexo indistinto, entre 10 y 12 meses de edad, libres de infección por *F. hepatica*. Los animales se infectaron por vía oral con 200 metacercarias del parásito por ovino. Dichas metacercarias se obtuvieron de caracoles *Lymnaea bulimoides* infectados en el laboratorio con miracidios de origen bovino. El profármaco **MFR-33** se administró en una dosis única por diversas vías de administración: 12 mg/Kg/vía oral, 4 mg/Kg/vía intramuscular y 4 mg/Kg/vía subcutánea. De todos los ovinos se tomaron muestras de heces durante los días 0, 95 y 105 post-tratamiento; con la finalidad de diagnosticar positivo o negativo a huevos de *F. hepatica* utilizando la técnica de sedimentación. A los 15 días post-tratamiento, todos los ovinos se sacrificaron con la finalidad de extraer su hígado para colectar y contar el número de vermes presentes, determinando el porcentaje de reducción de trematodos en los grupos tratados en relación con el número de parásitos presentes en el grupo testigo. La eficacia se mide utilizando la siguiente fórmula:¹¹³

$$\% \text{ de efectividad} = \frac{\text{No de huevos o Fasciolas en el grupo testigo} - \text{No de huevos o Fasciolas en el grupo tratado}}{\text{No de huevos o Fasciolas en el grupo testigo}} \times 100$$

De manera similar, se evaluó el profármaco **MFR-34**; sin embargo, este compuesto se administró solo por vía intramuscular a concentraciones de 4, 6 y 8 mg/kg.

Capítulo 6. Resultados y Discusión

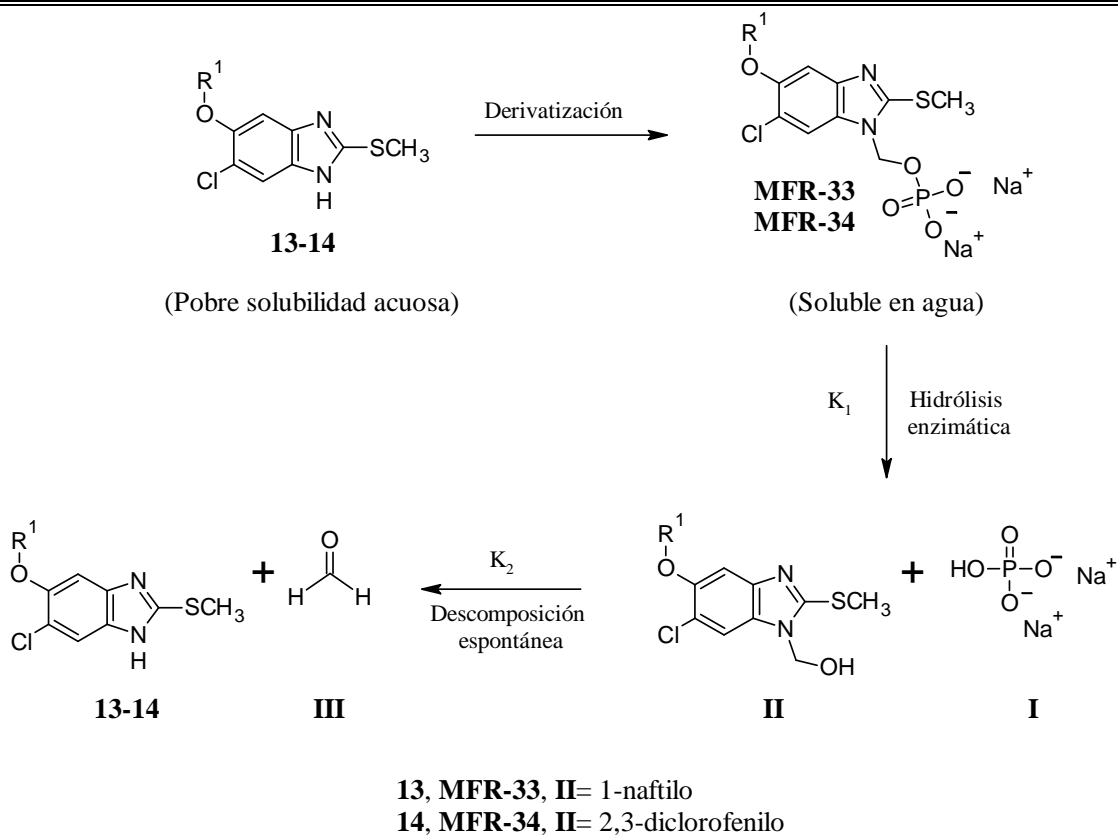
6.1 Consideraciones para el diseño

El diseño de **MFR-33** y **MFR-34** se basó en estudios realizados con compuestos 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo.⁹⁹ Este tipo de moléculas son derivados biorreversibles con un grupo ionizable fosfonooximetilo, las cuales mostraron buena eficacia terapéutica, alta solubilidad y estabilidad acuosa, además de mostrar labilidad en presencia de fosfatasa alcalina (**Esquema 6.1**).



Esquema 6.1. Derivados biorreversibles de 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo tomados como modelo.

Dada la relevancia de los estudios antes mencionados, se diseñaron los derivados biorreversibles **MFR-33** y **MFR-34**, cuya bioconversión al compuesto alfa o al triclabendazol, respectivamente, se llevaría a cabo en dos pasos. El primero, una desfosforilación empleando enzimas para generar el intermediario hidroximetilo (**II**) y el segundo, la descomposición química espontánea de **II** al fármaco precursor y formaldehído (**Esquema 6.2**).



Esquema 6.2. Ilustración de la estrategia de profármaco utilizada.

Además, la implementación de esta estrategia se basó en que tanto el compuesto alfa como el triclabendazol en estado sólido, al igual que muchos otros bencimidazoles, presentan diferentes interacciones intermoleculares como puentes de hidrógeno e interacciones π - π , que provocan una estructura con un acomodo difícil de romper por las moléculas de agua, siendo las interacciones soluto-soluto, las que predominan sobre las interacciones soluto-disolvente. Con el propósito de cambiar este empaquetamiento, se decidió alterar la estructura de este principio activo retirándole el hidrógeno de la posición 1 del núcleo bencimidazólico y en su lugar colocar una porción estructural que evite la formación de este enlace intermolecular y que contenga un grupo ionizable como los fosfatos. Con ello se espera incrementar la solubilidad acuosa y con ayuda del metabolismo se pueda hidrolizar el grupo fosfonooximetilo, generando al principio activo sin disminuir significativamente la liposolubilidad de los compuestos precusores.

Un aspecto importante en el diseño de los derivados biorreversibles tripartitas como **MFR-33** y **MFR-34** es la toxicidad. Como se ha indicado en los antecedentes, el triclabendazol, a las dosis administradas (10 mg/Kg), es generalmente bien tolerado; y el hecho de no utilizarlos

por tiempos prolongados abre un amplio margen para la selección de los modificadores. Estos compuestos como se observa **Esquema 6.2** liberan al acoplador en forma de formaldehído compuesto clasificado como moderadamente tóxico por el valor de su DL₅₀ en ratas (26666.6 μmol/kg, 800 mg/kg, vía oral; 2897.1 μmol/kg, 87 mg/kg, vía intravenosa).¹¹⁵ Sin embargo, al administrar estos derivados en relación equimolar al triclabendazol (10 mg/Kg, 27.8 μmol/Kg) la cantidad liberada de formaldehído (27.8 μmol/kg), no alcanza la DL₅₀. Por esta situación, la liberación de formaldehído ha sido previamente utilizada en el diseño de otros profármacos que no se administran por tiempos prolongados, tales como fosfenitoína (**Figura 6.1**). Un elemento adicional a tomar en cuenta, es que al incrementar la solubilidad acuosa del triclabendazol y compuesto alfa, probablemente la dosis administrada sería menor.

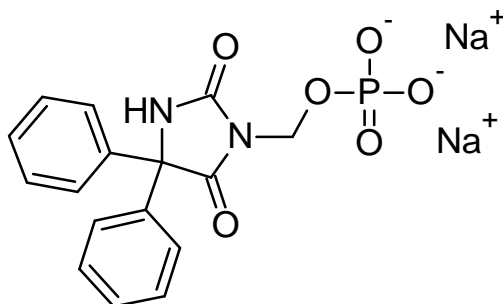
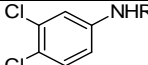
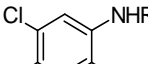
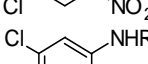
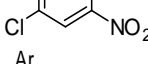
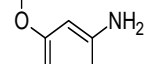
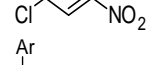
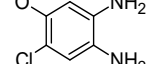
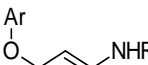
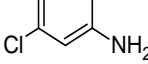
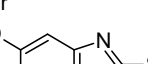
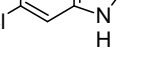
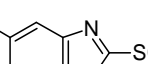
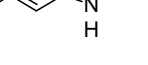


Figura 6.1. Estructura de la fosfenitoína.

6.2 Síntesis del compuesto alfa (13) y triclabendazol (14)

Para la síntesis del compuesto alfa y triclabendazol se comenzó de la 3,4-dicloroanilina comercial obteniendo resultados similares a los reportados (**Tabla 6.1**).^{44,103}

Tabla 6.1. Resultados de la síntesis del compuesto alfa y triclabendazol

Estructura	Sustituyentes	R _f	Sistema de elución ^b	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)
	R=COCH ₃ (2)	0.30	I	123.7-124.3	94
	R=COCH ₃ (3)	0.39	II	125.8-126.5	80
	R=H (4)	0.57	II	178.8-179.5	91
	Ar= 1-naftilo (7)	0.56	III	145.8-146.5	72
	Ar= 2,3-diclorofenilo (8)	0.60	III	149-150	68
	Ar= 1-naftilo (9)	ND ^a	-----	ND ^a	ND ^a
	Ar= 2,3-diclorofenilo (10)	ND ^a	-----	ND ^a	ND ^a
	Ar= 1-naftilo (15) R=COCH ₃	0.58	IV	176-177	90
	Ar= 2,3-diclorofenilo (16) R=COCH ₃	0.56	IV	160.5-161.2	87
	Ar= 1-naftilo (11)	0.4	III	273-275	85
	Ar= 2,3-diclorofenilo (12)	0.35	III	294-295	87
	Ar= 1-naftilo (13) Compuesto alfa	0.4	III	192-193	95
	Ar= 2,3-diclorofenilo (14) Triclabendazol	0.45	III	176-177	92

^aND no determinado, ^blos sistemas de elución se encuentran en la sección 9.1.2.

Los puntos de fusión y los espectros de IR, EM y RMN ¹H y ¹³C de todos los intermediarios para llegar a **13-14**, fueron consistentes con los reportados en la literatura,^{44,103,116} los cuales se pueden observar en la sección de procedimiento experimental y el apéndice 1 de espectros. También, se logró asignar los hidrógenos del compuesto alfa (**13**) mediante espectroscopia de RMN HSQC, HSMC y NOESY. En la **Figura 6.2** se muestra el espectro NOESY que demuestra la asignación de los diferentes hidrógenos.

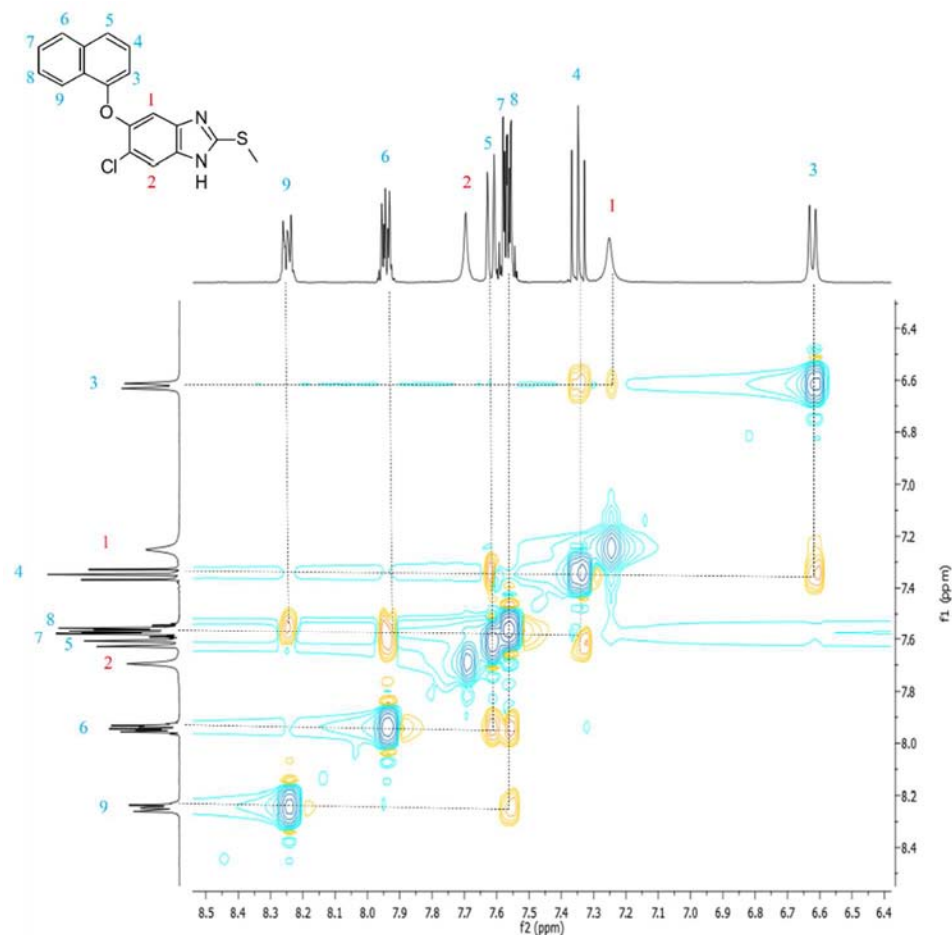


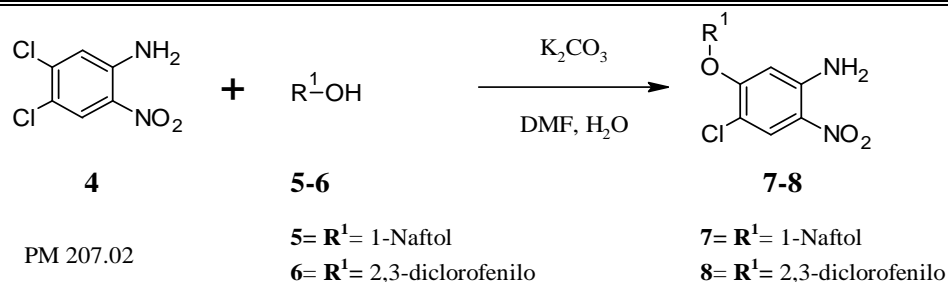
Figura 6.2. RMN NOESY para identificar los diferentes hidrógenos en el compuesto alfa (**13**).

Es importante mencionar, que en estudios anteriores se logró sintetizar el compuesto alfa a escala de 100-150 g con rendimiento global de 51% a partir de **4** en un proceso de 5 pasos.¹¹⁷

Por otra parte, se obtuvieron buenos rendimientos en la mayoría de las reacciones; sin embargo, se observó que en la reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática (S_NAr), a partir de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4**), el rendimiento global se reducía considerablemente. Por esta razón, se decidió explorar esta reacción.

6.2.1 Sustitución nucleofílica aromática (S_NAr)

Reportes anteriores describen esta reacción⁴⁴ a partir de 1 eq del compuesto **4**, 1.1 eq de **5** o **6**, 1.5 eq de K_2CO_3 en H_2O/DMF a $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 8 horas (**Esquema 6.3**). En la obtención del compuesto deseado (**7** u **8**), se logró observar un producto secundario.



Esquema 6.3. Sustitución nucleofílica aromática reportada.⁴⁴

El producto secundario se logró identificar, el cual correspondió a 4-cloro-5-(dimetilamino)-2-nitroanilina con un punto de fusión de 173-174 °C, la formación de dicho compuesto se confirmó con espectrometría de masas mostrando el pico correspondiente al ion m/z 215 (100%) concordante con la masa molecular calculada. El espectro de RMN ¹H mostró una señal simple a 2.87 ppm con integración para 6H correspondiente a los metilos de la amina, una señal amplia intercambiable con D₂O a 7.50 ppm que integró para 2H asignable a los protones de la amina; además, las señales correspondientes a los protones del benceno que son señales simples en 6.53 y 7.93 ppm que integran para 1H cada una. Esta reacción se estudió utilizando bases como NaOH y NaHCO₃ observando la formación en mayor cantidad del producto secundario cuando se utilizó NaOH. Este producto surge de la descomposición de DMF usada como disolvente en la reacción, al poner en contacto con una base, H₂O y altas temperaturas; se genera dimetilamina y ácido fórmico. Así, la dimetilamina funcionó como nucleófilo llevando a cabo la S_NAr sobre la materia prima (**4**). El tratamiento de purificación de esta reacción es complicado ya que se obtiene una resina, la cual se purifica en una columna cromatográfica, como se describe en el apartado de procedimiento experimental. Para tratar de solucionar esta problemática, la reacción se estudió usando dos metodologías, una de ellas fue llevar a cabo la reacción utilizando un equipo de microondas y otra haciendo uso de vacío de 150-200 mmHg, además de utilizar *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**3**) como materia prima.

6.2.1.1 Reacción de S_NAr usando un equipo de microondas Synthos 3000 Anton Paar

La reacción de S_NAr se estudió empleando como base Na₂CO₃ y NaOH, una mezcla 80:20 del correspondiente disolvente y agua, generando el alcóxido. Se utilizó 1.1 eq del alcohol (**5** ó **6**) agitando durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó 1 eq de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4**), y se colocó en un equipo de microondas con agitación a 175 °C y 13.3 bar durante 10 minutos.

Culminado el tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida obteniendo una resina, la cual se suspendió en una solución acuosa saturada de NaCl, generando un sólido cuya ccf mostró varias manchas, lo que dificultó el aislamiento y purificación del producto deseado. El sólido se aisló y purificó mediante una columna cromatográfica (utilizando un sistema 90/10 Hexano/Acetato de etilo), obteniendo rendimientos bajos que son reportados en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2. Resultados de la síntesis del compuesto alfa en microondas

Reactivos	Condiciones	Tiempo (min)	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)
a) 1.1 eq. de 1-naftol o 2,3-diclorofenol, 1.5 eq. de Na ₂ CO ₃ , DMF/H ₂ O y 1 eq de 3	175 °C, 13.3 bar	10	38	149-150
b) 1.1 eq. de 1-naftol o 2,3-diclorofenol, 1.5 eq. de Na ₂ CO ₃ , ACN/H ₂ O y 1 eq de 3	175 °C, 13.3 bar	10	30	149-150
c) 1.1 eq. de 1-naftol o 2,3-diclorofenol, 1 eq. de NaOH, DMF/H ₂ O y 1 eq de 3	175 °C, 13.3 bar	10	35	149-150
d) 1.1 eq. de 1-naftol o 2,3-diclorofenol, 1 eq. de NaOH, ACN/H ₂ O y 1 eq de 3	175 °C, 13.3 bar	10	30	149-150

Como se observa en la **Tabla 6.2** los rendimientos de las reacciones utilizando microondas son menores a los reportados; además, el método de purificación fue más complicado. Aún no se encuentra descartado el hacer la reacción utilizando como materia prima **3** en lugar de **4**, además de probar otras condiciones para poder optimizar esta reacción mediante la radiación con microondas ya que es una forma alterna para disminuir tiempos de reacción.

6.2.1.2 Reacción de S_NAr usando vacío de 150-200 mmHg

Recientemente, se publicó una patente que describe un nuevo proceso de síntesis del triclabendazol¹⁰³ en la que se sintetizó el intermediario de S_NAr utilizando 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (**3**) y 2,3-diclorofenol, con vacío obteniendo altos rendimientos. Esta reacción se extrapoló a la síntesis del compuesto alfa, utilizando 1 eq del compuesto **3**, 1.1 eq de α -naftol, 1.5 eq de Na₂CO₃, DMF y vacío de 150-200 mmHg a 70 °C durante 6 horas. Consecutivamente, se evaporó el disolvente a presión reducida y se adicionó agua, generando un sólido amarillo. Al sólido se le realizó una extracción sólido-líquido con MeOH obteniendo el compuesto de S_NAr deseado (**21**) con un rendimiento del 90%. La formación de dicho compuesto se confirmó en el espectro de IR, donde se observaron dos bandas a 3342 cm⁻¹ y a 1719 cm⁻¹ correspondientes al NH y CO de la acetamida, respectivamente. Además, la espectrometría de masas mostró el pico correspondiente al ion m/z 356 (100%) concordante con la masa molecular calculada. El espectro de RMN ¹H mostró una señal simple a 1.93 ppm con integración para 3H correspondiente al

metilo de la acetamida, una señal amplia intercambiable con D₂O a 10.21 ppm que integró para 1H asignable al protón de la amida. Además, las señales correspondientes a los protones naftalénicos integraron acorde al producto deseado **21**. Consecutivamente, el producto de S_NAr se hidrolizó utilizando NaOH en MeOH/H₂O a una temperatura entre 70-80 °C para obtener **6** con 90% de rendimiento. El aumento del rendimiento de la reacción se debe a que la materia prima **3** está más favorecida para sufrir el ataque nucleofílico del alcóxido en comparación con **4** que es utilizado comúnmente. Por otra parte, la descomposición de DMF no se generó debido a que la reacción se colocó a una temperatura menor de 120 °C a 70 °C y ausencia de agua. El vacío aplicado probablemente nos ayudó a mantener el reflujo, además de que las moléculas estuvieran en un constante movimiento con la energía necesaria para generar el choque y se llevará a cabo la sustitución nucleofílica. Los cuatro productos obtenidos (**7**, **8**, **15** y **16**) por ambos métodos, coincidieron en *R_f*, punto de fusión y constantes espectroscópicas. Sin embargo, es contundente el aumento en el rendimiento y la facilidad de purificación de los compuestos deseados (**7-8**) utilizando a **3** y vacío de 150-200 mmHg en comparación a los reportados.⁴⁴

Es importante mencionar que utilizando esta metodología se logró mejorar el rendimiento global de los compuestos deseados **13** y **14**, con un 91% y 90%, respectivamente.

6.2.2 Difracción de rayos X

Además de caracterizar todos los compuestos de la **Tabla 6.1** por técnicas espectroscópicas y espectrométricas, el compuesto alfa (**13**) se logró cristalizar de metanol. Los cristales generados cumplieron las características para realizar un estudio de difracción de rayos X, obteniendo la estructura tridimensional del compuesto alfa (**13**), el cual se encuentra con una molécula del disolvente en su celda unitaria. Como se ha comentado anteriormente, una de las características de los compuestos bencimidazólicos es la baja solubilidad acuosa.⁵⁹ En esta cristalografía, se puede observar diferentes interacciones intermoleculares como π - π y puentes de hidrógeno que mantienen unidas a estas moléculas y que son difíciles de romper por las moléculas de agua (**Figura 6.3**).¹¹⁸

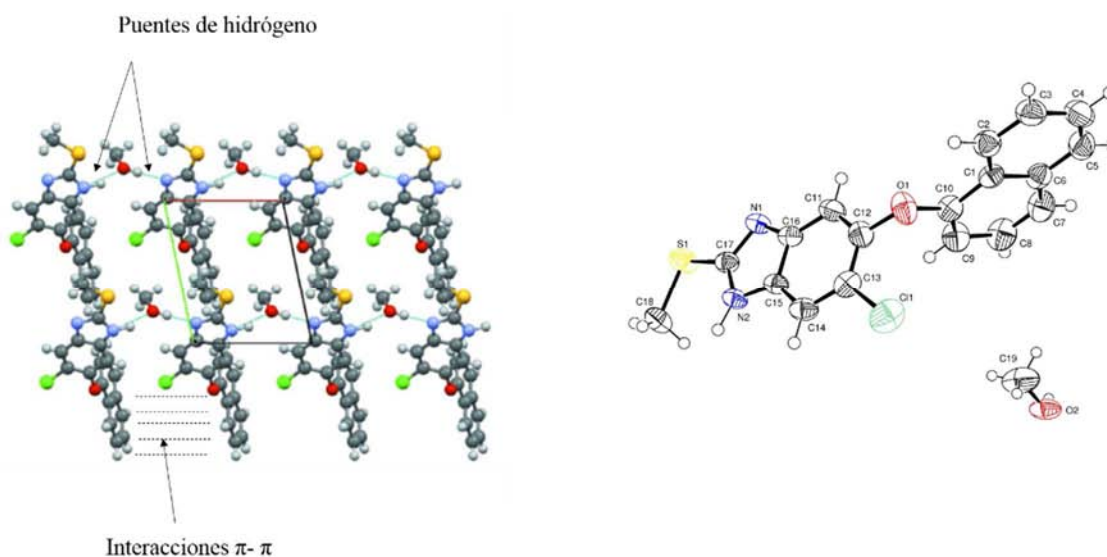


Figura 6.3. Celda unitaria del compuesto alfa (**13**) y estructura molecular con una molécula de metanol.

6.3 Estudio sobre la síntesis de los profármacos MFR-33 y MFR-34

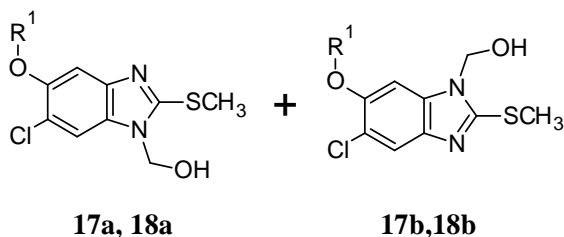
Como se ha mencionado anteriormente, los fosfatos son una herramienta importante para generar profármacos en la industria farmacéutica, ya que son utilizados para mejorar las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de compuestos biológicamente activos. Con el propósito de obtener a **MFR-33** y **MFR-34**, se propusieron dos estrategias de síntesis; la primera consiste en hacer un derivado hidroximetilo que puede llevar a cabo un ataque nucleofílico a un fosfato que tiene un buen grupo saliente, formalizando un enlace covalente oxígeno-fósforo. La segunda estrategia, consiste en hacer un derivado fosfatado que contenga un buen grupo saliente y posteriormente, se lleve a cabo el ataque nucleofílico por parte del nitrógeno del núcleo bencimidazólico, formando un enlace covalente entre el nitrógeno del imidazol y el carbono de grupo fosfonoximetilo.

6.3.1 Primera estrategia para síntesis de los profármacos

6.3.1.1 Síntesis de los hidroximetilbencimidazoles **17** y **18**

La primera estrategia comenzó con la síntesis de los correspondientes hidroximetil derivados del compuesto alfa (**17a-b**) y triclabendazol (**18a-b**). Esta reacción se realizó bajo diferentes condiciones, variando el número de equivalentes de formaldehído y la temperatura, empleando CH₂Cl₂ como disolvente. Se observó que la reacción fue óptima utilizando 1.5 equivalentes de formaldehído a temperatura ambiente, con agitación constante durante 3 horas.

Cabe resaltar que se formó una suspensión al colocar **13-14** en CH_2Cl_2 , y que posteriormente al agregar el formaldehído al 37% esta suspensión se disuelve formándose de nuevo la suspensión pocos minutos después. El producto crudo se lavó con CHCl_3 frío (10 mL), obteniendo un sólido blanco del compuesto **17-18** como mezcla de regioisómeros en una proporción 50:50 (**Esquema 6.4**).



17a, 18a

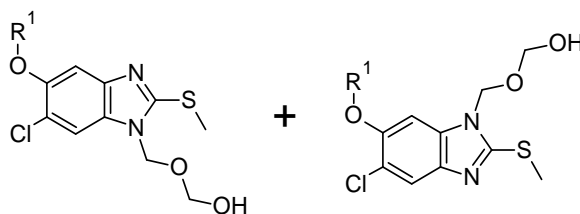
17b,18b

17a, 17b: $\text{R}^1 = 1\text{-naftilo}$

18a, 18b: $\text{R}^1 = 2,3\text{-diclorofenilo}$

Esquema 6.4. Obtención de mezcla de regioisómeros.

Se observó que además de los regioisómeros deseados (**17a, 17b; 18a, 18b**), si se agrega un exceso de formaldehído mayor a 1.5 equivalentes, se obtienen otros regioisómeros (**17a'-17b'** para el compuesto alfa y **18a'-18b'** para el triclabendazol) en menor cantidad. Estos regioisómeros corresponden a los compuestos ilustrados en la **Esquema 6.5**.



17a', 18a'

17b',18b'

17a', 17b': $\text{R}^1 = 1\text{-naftilo}$

18a', 18b': $\text{R}^1 = 2,3\text{-diclorofenilo}$

Esquema 6.5. Obtención de mezcla de regioisómeros con exceso de formaldehído.

En la **Figura 6.4** se muestra la RMN ^1H en el cual se observa la existencia de los regioisómeros **17a** y **17b**, ya que las señales se muestran duplicadas, además de la existencia de **17a'** y **17b'**. El metileno correspondiente a los regioisómeros **17a** y **17b** se visualizan en 5.45 y 5.55 ppm como señales dobles y las señales del OH aparecen en 6.82 y 6.91 como señales triples. Por otro lado, las señales correspondientes a los metilenos unidos al hidroxilo de los regioisómeros **17a'** y **17b'** se presentan en 4.67 y 4.75 ppm como señales dobles y las señales del

metileno unido al nitrógeno se localizan en 5.56 y 5.67 ppm como señales simples. Lo anterior también se observó para el compuesto **18**.

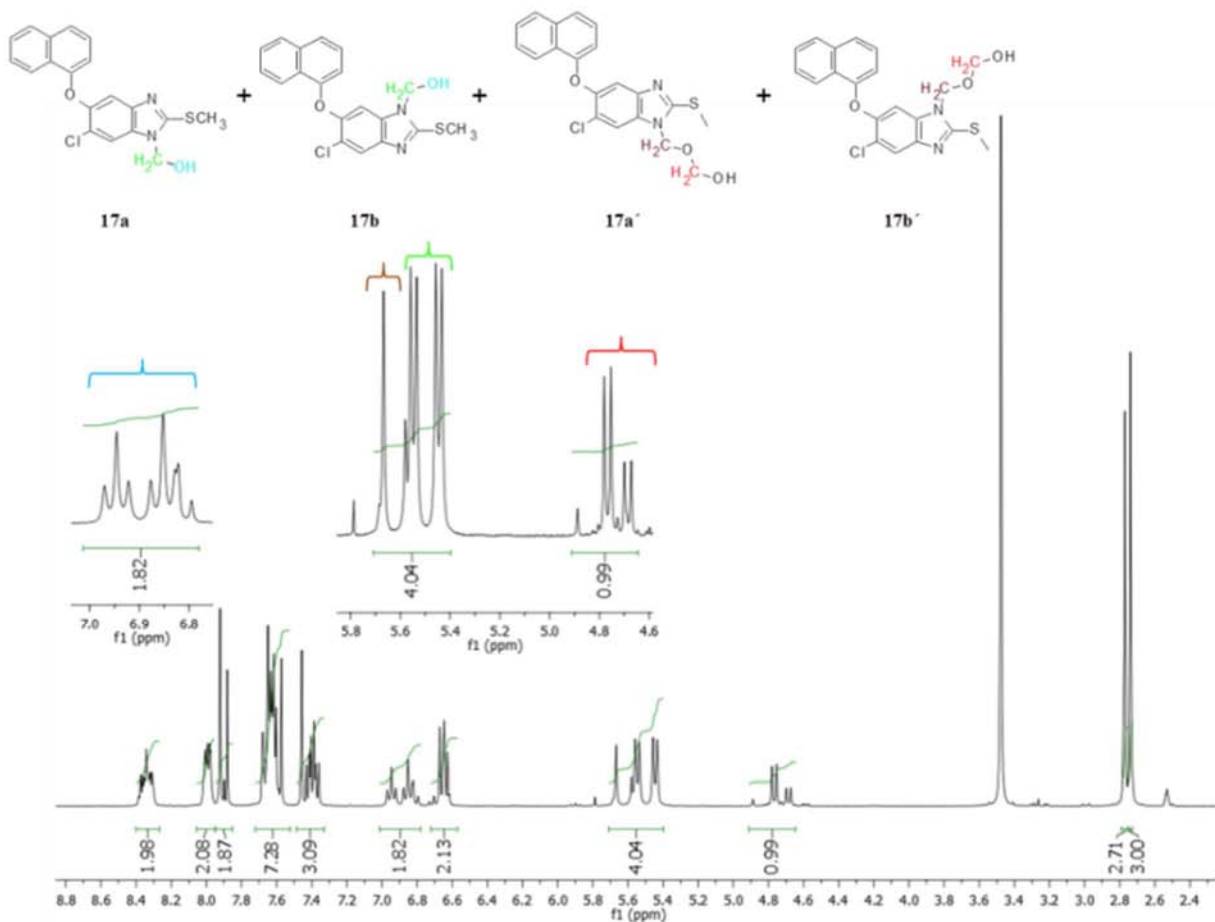
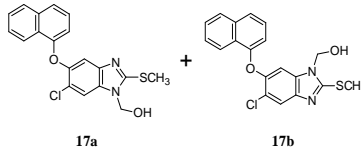
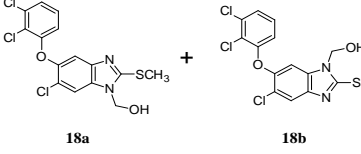
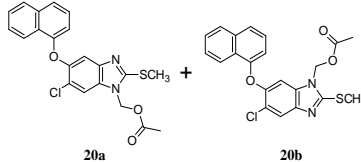
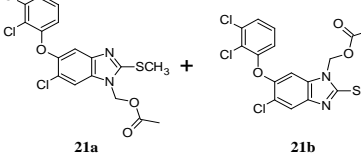


Figura 6.4. RMN ¹H de mezcla de regioisómeros **17a**, **17b**, **17a'** y **17b'**.

6.3.1.2 Síntesis de los acetiloximetilbencimidazoles **20** y **21**

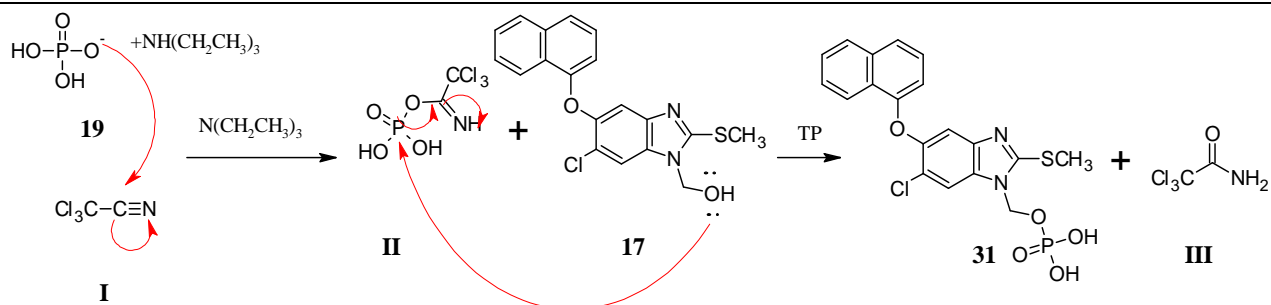
Para demostrar la existencia y estabilidad de **17-18**, se realizó una reacción de acetilación para la formación de los correspondientes ésteres (**20-21**). Se utilizó **17** o **18** (1 eq), 4-dimetilaminopiridina (0.3 eq), anhídrido acético (1.5 eq) y CH₂Cl₂ con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Culminada la reacción, la fase orgánica se lavó con agua carbonatada para eliminar los residuos ácidos formados y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Finalmente, se eliminó el disolvente obteniendo **20-21** como un sólido blanco, el cual se lavó con hexano frío. Para verificar la formación de **17a-b**, **18a-b**, **20a-b** y **21a-b**, éstos se caracterizaron por técnicas espectroscópicas y espectrométricas reportadas en la **Tabla 6.3**.

Tabla 6. 3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **17a-b**, **18a-b**, **20a-b** y **21a-b**

Estructura	Constantes espectroscópicas y espectrométricas
 <p style="text-align: center;">17a 17b</p>	RMN ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 2.74 (s, 3H), 2.77 (s, 3H), 5.45 (d, 2H, <i>J</i> =7.1 Hz), 5.55 (d, 2H, <i>J</i> =7.1 Hz), 6.63 (d, 1H, <i>J</i> =4.8 Hz), 6.66 (d, 1H, <i>J</i> =4.9 Hz), 6.82 (t, 1H, <i>J</i> =7.3 Hz), 6.91 (t, 1H, <i>J</i> =7.3 Hz), 7.35-7.50 (m, 3H), 7.58 (s, 1H), 7.60-7.73 (m, 6H), 7.88 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.98-8.06 (m, 2H), 8.28-8.39 (m, 2H). RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 14.6, 14.7, 67.0, 67.1, 104.6, 109.9, 109.9, 111.1, 112.0, 119.0, 119.7, 120.1, 121.7, 121.8, 122.7, 122.8, 125.2, 125.2, 126.4, 126.5, 126.6, 127.3, 127.3, 128.2, 133.8, 134.9, 134.9, 135.8, 141.1, 143.0, 146.3, 146.5, 153.9, 153.9, 155.2, 155.4.
 <p style="text-align: center;">18a 18b</p>	RMN ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 2.74 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 5.46 (d, 2H), 5.53 (d, 2H), 6.64-6.72 (m, 2H), 7.34-7.26 (m, 2H), 7.35-7.45 (m, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.90 (s, 1H). RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 14.6, 14.7, 67.0, 67.1, 104.4, 111.1, 115.5, 115.7, 119.0, 119.3, 119.6, 121.4, 124.8, 124.8, 129.1, 129.2, 133.3, 133.3, 134.2, 135.7, 141.4, 143.0, 145.3, 145.5, 155.0, 155.1, 155.6, 155.8.
 <p style="text-align: center;">20a 20b</p>	RMN ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 2.06 (s, 3H), 2.17 (s, 0.65H), 2.80 (s, 0.68H), 5.92 (s, 2H), 6.03 (s, 0.45H), 6.74 (d, 1H, <i>J</i> =7.6 Hz), 6.84 (d, 0.1H, <i>J</i> =7.6 Hz), 6.91 (t, 1H, <i>J</i> =7.3 Hz), 7.26 (s, 1H), 7.41-7.31 (m, 1.5H), 7.49-7.70 (m, 4H), 7.85 (s, 1H), 7.90-7.92 (m, 2H), 8.36-8.44 (m, 1H). RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 14.8, 20.7, 65.3, 110.0, 110.9, 111.7, 121.0, 122.1, 123.2, 125.7, 126.0, 126.7, 127.8, 132.6, 135.0, 142.6, 149.0, 153.3, 155.5, 170.1. EM (EI, ID) <i>m/z</i> : 412 (M ⁺ , 100%), 340 (M-72, 35%), 305 (M-107, 40%).
 <p style="text-align: center;">21a 21b</p>	RMN ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 2.06 (s, 3H), 2.11 (s, 1H), 2.76 (s, 1H), 2.77 (s, 3H), 7.27-7.35 (m, 1.35H), 7.40-7.44 (m, 1.23H), 7.50 (s, 0.24H), 7.63 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.98 (s, 0.27H). RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ: 14.4, 20.4, 65.9, 104.2, 115.4, 118.9, 119.8, 121.1, 124.6, 128.8, 132.9, 135.4, 140.6, 145.3, 154.4, 155.8, 169.7. EM (EI, ID) <i>m/z</i> : 430 (M ⁺ , 100%), 327 (M-31, 85%).

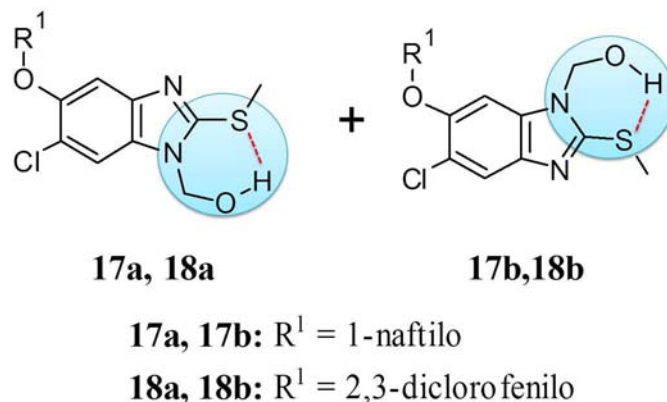
6.3.1.3 Estudio sobre la síntesis de MFR-33

Una vez sintetizado **17** y sabiendo que es un compuesto estable, se procedió a la síntesis de **MFR-33**. Primero se obtuvo **19** realizando una reacción ácido-base con 1 equivalente de H₃PO₄ y 1 equivalente de trietilamina. Posteriormente, se colocó a reaccionar con **I** para obtener el intermediario **II** que contienen en su estructura un buen grupo saliente. Consecutivamente, se colocó **17** cuyo OH llevaría a cabo un ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo de **II** generando así el compuesto deseado **31** y liberando a **III** como se muestra en la **Esquema 6.6**.



Esquema 6.6. Mecanismo de reacción propuesto en la primera estrategia para la obtención de **31**.

Es bien conocido que los intermediarios hemiaminal (carbinolaminas) son inestables, pero en este tipo de compuestos **17-18** probablemente se puedan formar puentes de hidrógeno intramoleculares entre el OH del hemiaminal y el azufre del metilitio, formando un anillo de 6 miembros que estabilice a las moléculas y den lugar a su existencia (**Esquema 6.7**).



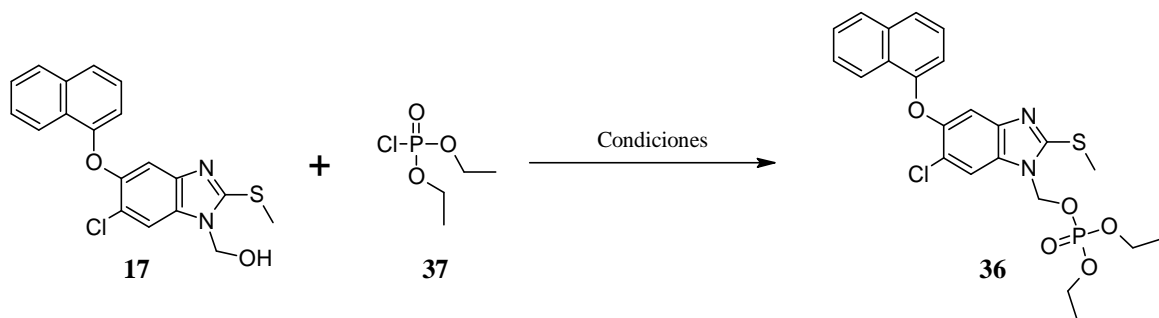
Esquema 6.7. Formación de puentes de hidrógeno en los derivados **17-18**.

Una vez optimizada la reacción para obtener **17** y **18** se continuó con la síntesis de **31**; sin embargo, los resultados espectroscópicos no muestran la existencia del compuesto deseado.

6.3.1.3.1 Reacciones adicionales utilizando el intermediario **17**

6.3.1.3.1.1 Estudio sobre **36**

Por otra parte, se realizaron otras pruebas para obtener un derivado fosfatado (**36**); sin embargo, no se llevó a cabo la reacción en la que se utilizaron diferentes disolventes, bases y temperaturas (**Esquema 6.8** y **Tabla 6.4**). Esta reacción se realizó con el propósito de formar una especie que llevará un ataque nucleofílico al compuesto **37**, con la ayuda de una base incrementar la nucleofilia del oxígeno de **17** y formar al compuesto **36**.



Esquema 6.8. Sustitución nucleofílica.

En todas las pruebas se eliminó el disolvente en el evaporador rotatorio obteniendo una resina, de la cual precipitó un sólido blanco utilizando diisopropil éter frío, el sólido formado se separó por filtración al vacío.

Tabla 6. 4. Condiciones utilizadas para obtener **36**

Reactivos	Base (2 eq)	Temperatura (°C)
a) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y DMF	NaHCO ₃	0-5 °C, 25 °C y 50 °C
b) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y MeCN		
a) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y DMF		
b) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y MeCN	N(CH ₂ CH ₃) ₃	0-5 °C, 25 °C y 50 °C
c) a) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y CH ₂ Cl ₂		
a) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y DMF		
b) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y MeCN	Sin base	0-5 °C, 25 °C y 50 °C
c) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y CH ₂ Cl ₂		
a) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y DMF		
b) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y MeCN	NaH	0-5 °C, 25 °C y 50 °C
c) 1 eq. 17 , 1.1 eq. de 37 y CH ₂ Cl ₂		

Al sólido obtenido se le realizó espectrometría de masas identificando el dímero de **36** (Figura 6.5)

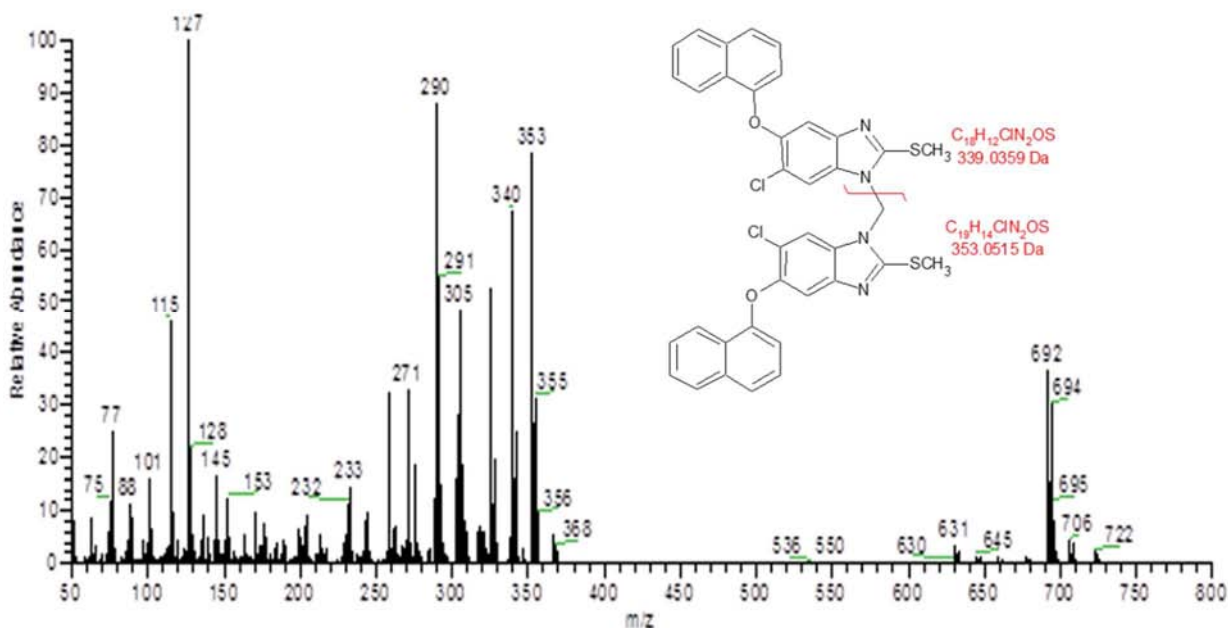
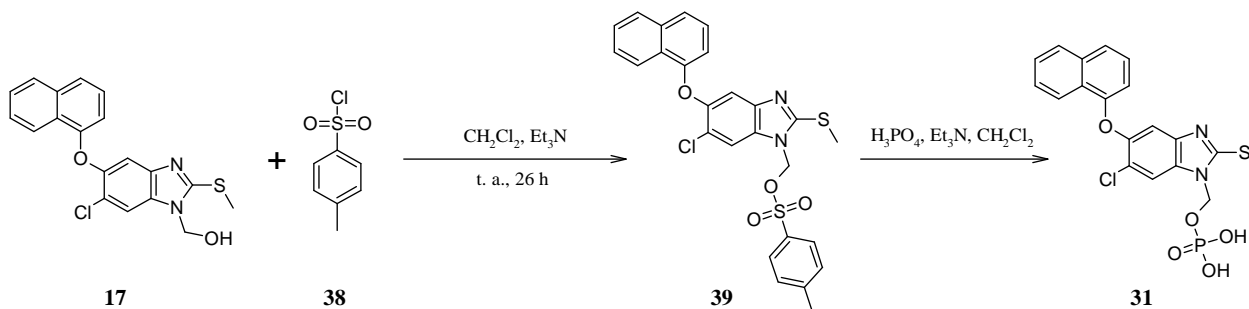


Figura 6.5. Espectro de Masas del sólido obtenido en la reacción.

6.3.1.3.1.2 Estudio sobre 39

Por otra parte, se realizó la siguiente reacción, ya que se pensaba que al formar un mejor grupo saliente se podría obtener el producto deseado **31** (Esquema 6.9).



Esquema 6.9. Sustitución nucleofílica.

Una suspensión de **17** (1 g, 2.696 mmol), trietilamina (0.4 mL, 2.965 mmol) y 10 mL de CH_2Cl_2 se colocó en baño de hielo durante 10 minutos, posteriormente se agregó lentamente cloruro de *p*-toluensulfonilo (1.114 g, 5.931 mmol) disuelto en 5 mL de CH_2Cl_2 y se agitó a temperatura ambiente durante 26 horas bajo atmósfera de N_2 . La mezcla se lavó dos veces con agua carbonatada al 5%, consecutivamente se eliminó el disolvente al vacío. El precipitado formado se lavó con hexano para finalmente filtrarlo, obteniendo un sólido blanco, con un rendimiento del 45% y un punto de fusión de 253-254°C.

En esta reacción se utilizaron diferentes bases como trietilamina, 4-dimetilaminopiridina, así como piridina (esta última como base y disolvente); también se realizaron pruebas a temperatura ambiente y a 50°C. Al colocar la reacción a temperatura ambiente se identificaron 3 productos por ccf (en una proporción 33.33% cada uno), se logró separar el producto menos polar y al utilizar una temperatura de reacción de 50 °C se observó la generación del producto menos polar en una proporción del 50% y de los otros de 25% cada uno. Del producto purificado se obtuvieron los siguientes resultados espectroscópicos, logrando identificar a 6-cloro-1-(4-toluensulfonil)-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-*H*-bencimidazol (**Figura 6.6**). Probablemente se generó el compuesto de interés **39**, aunque el rendimiento no fue óptimo.

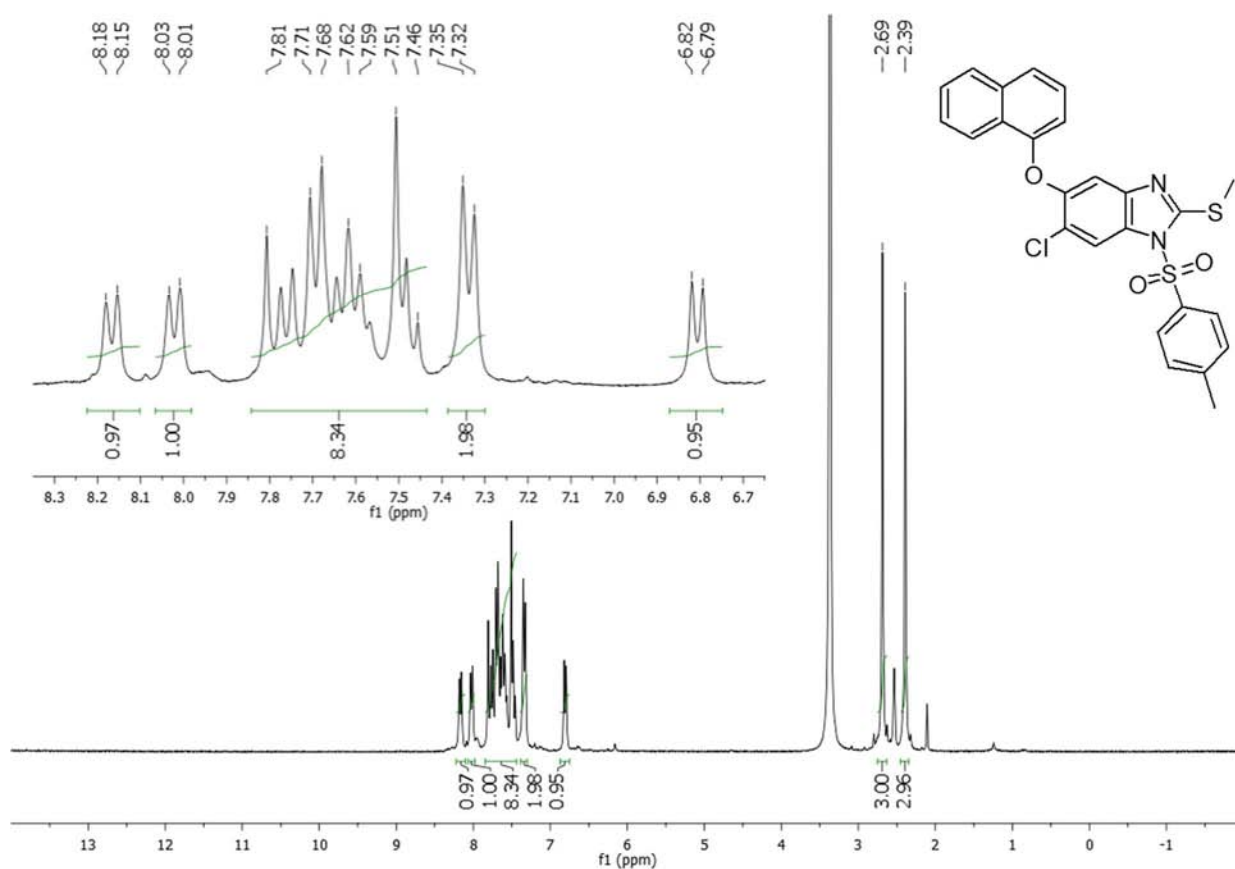


Figura 6.6. RMN ¹H de 6-cloro-1-(4-toluensulfonil)-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-*H*-bencimidazol.

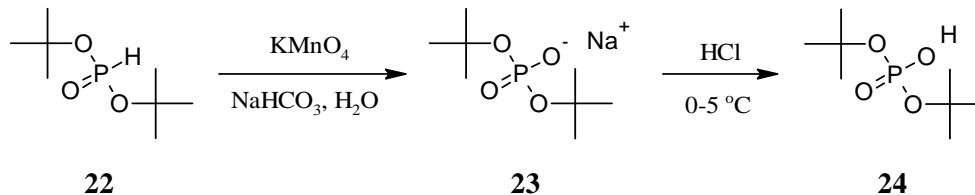
6.3.2 Segunda estrategia para síntesis de MFR-33 y MFR-34

6.3.2.1 Síntesis de fosfato monohidrógeno de di-*terc*-butilo (**24**)

El fosfato monohidrógeno de di-*terc*-butilo (**24**), ha sido utilizado ampliamente como precursor en la síntesis de profármacos de fosfato, debido principalmente a su estabilidad como

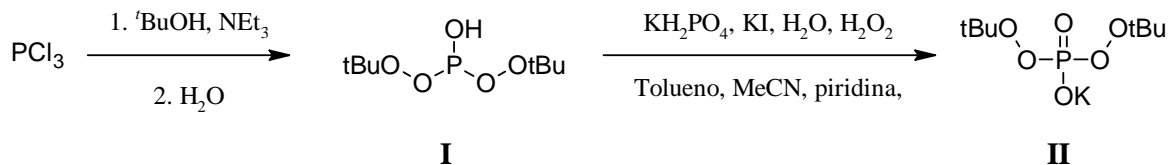
reactivo¹¹⁹ y a la fácil desprotección una vez unido al principio activo para generar la sal disódica.⁹⁹ A pesar de la importancia y simplicidad estructural de **24**, los métodos para su preparación son bastante limitados; además, se sabe que **24** ha sido producido comercialmente a través de la oxidación del fosfito de di-*tert*-butilo (**22**) con KMnO_4 .¹¹⁹⁻¹²¹ En ésta reacción se generan residuos de metales pesados (MnO_2) y además para purificar el producto deseado **22** se utiliza la técnica de liofilización. Por estas dos razones, el costo de **24** se ha mantenido muy elevado.

El fosfato monohidrógeno de di-*tert*-butilo (**24**) se sintetizó adaptando la metodología reportada en la literatura,¹¹⁹ oxidando fosfito de di-*tert*-butilo (**22**, 97%, CAS 13086-84-5) comercial de Lancaster Synthesis, Inc. (Windham, NH) con KMnO_4 . Este intermediario se obtuvo con buen rendimiento (89%, **Esquema 6.10**). Para poder determinar la estructura del compuesto **24** se utilizó RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P , señales que coinciden con lo reportado y que confirman la estructura del compuesto deseado (**24**). Obteniendo las siguientes señales (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ ppm): 1.38 (s, 18H); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ ppm): 29.7 (d, $J = 4.3$), 79.6 (d, $J = 6.9$); RMN ^{31}P (CDCl_3 , 122 MHz, δ ppm): -9.03 (s).



Esquema 6.10. Ruta de síntesis de **24**.

Debido al elevado costo y el problemático escalamiento del compuesto **24**, en 2014 se reportó una ruta sintética de dos pasos,¹²² la cual comienza a partir de PCl_3 y aprovecha una oxidación catalítica de **I** con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{KI}$ para proporcionar **23** con 81% de rendimiento y alta pureza (**Esquema 6.11**). Dado el bajo costo de los materiales de partida (PCl_3) en este paso, ya no se realizaron más estudios de optimización.

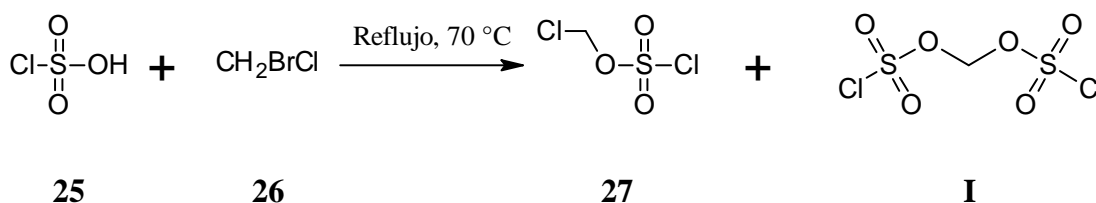


Esquema 6.11. Ruta prevista para la síntesis de **II**.

6.3.2.2 Síntesis de clorosulfato de clorometilo (27)

Clorosulfato de clorometilo (**27**) es un reactivo altamente versátil para la clorometilación de fosfatos monohidrógeno de dialquilo,¹²³ ácidos carboxílicos^{109,124,125} y aminoácidos.¹²⁶⁻¹²⁸ Los productos clorometilados son una clase importante de compuestos usados en la síntesis de profármacos.^{90,99,129-133} En 1927, Fuch y Katscher¹³⁴ reportaron por primera vez la síntesis de **27** con bajos rendimientos (30%), a través de la reacción de paraformaldehído y ácido clorosulfónico con altas temperaturas (> 80 °C). También, se ha reportado la síntesis de **27** a partir de cloroformiato de clorometilo y ácido clorosulfónico con un rendimiento modesto, pero aún se requieren altas temperaturas de reacción. Binderup y Hansen¹⁰⁹ mostraron que **27** podría ser preparado por reflujo de ClCH₂Br y ácido clorosulfónico; sin embargo, este procedimiento produce de nuevo bajos rendimientos. Recientemente, Power demostró que SO₃ podría insertarse directamente en uno de los enlaces C-Cl del CH₂Cl₂ cuando la reacción es catalizada por trimetil borato;^{135,136} no obstante, **27** se produce a temperatura ambiente pero con bajo rendimiento (33%).

Para iniciar las primeras pruebas de síntesis de fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**28**) se decidió comprar el compuesto **27** (Número de producto 656682-2 g, 1,915.00 MXP, 97% de pureza) de Sigma-Aldrich. Debido al precio relativamente elevado, se concluyó en sintetizar el compuesto **27**, encontrando en la literatura diferentes métodos de síntesis mencionados anteriormente. Por esta situación, en este trabajo se sintetizó **27** según lo reportado por Binderup y Hansen¹⁰⁹ ya que se contaban con las materias primas (**25** y **26**) en el laboratorio; sin embargo, este procedimiento generó bajos rendimientos (20%), por la generación significativa de **I**^{109,137} (**Esquema 6.12**). Para esta reacción, se colocaron trampas de NaOH y NaHSO₃ para atrapar el Br₂ y neutralizar el HCl generados; es importante mencionar que el compuesto **27** es lacrimógeno. El intermediario **27** se identificó por RMN ¹H obteniendo una señal simple en 5.58 ppm, en RMN ¹³C se observó una señal simple en 55.8 ppm y por EM *m/z* 163 (20%).

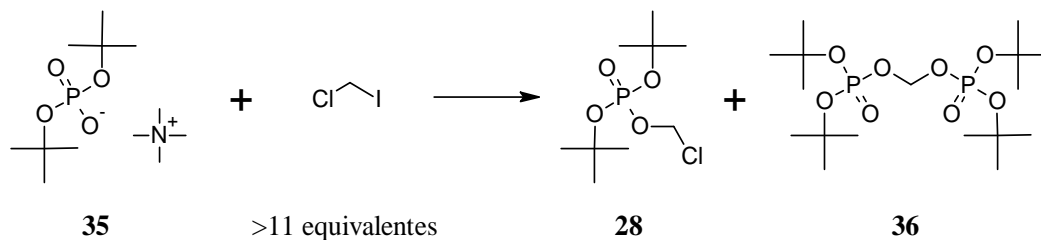


Esquema 6.12. Reacción para generar **27** y su principal impureza (**I**).

A pesar de la importancia y la aparente simplicidad estructural de esta molécula (**27**), los métodos que existen no son eficientes para prepararlo con altos rendimientos y alta pureza. Para tratar de solucionar esta situación, en el 2012 se reportó un proceso escalable y eficaz para obtener clorosulfato de clorometilo (**27**) a partir de ClCH_2I y ácido clorosulfónico. Este nuevo proceso proporciona un protocolo eficiente y escalable para **27** con 92% de rendimiento y de alta pureza (> 99% de área CG). Sin embargo, ClCH_2I aún sigue siendo un reactivo relativamente caro.

6.3.2.3 Síntesis de fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**28**)

Fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**28**) se ha convertido en uno de los reactivos más comunes para preparar profármacos con un grupo fosfonooximetilo. Generalmente son utilizados para la alquilación directa de los grupos hidroxilo o amino.^{120,121,123,138} Su síntesis se informó por primera vez en 1999 a través de reacción de fosfato de di-*terc*-butiltetrametilamonio (**35**) con ClCH_2I (rendimiento 35-63%).^{139,140} Este enfoque requiere el uso de **35** y un gran exceso de ClCH_2I (> 11 equiv) para minimizar la formación de **36**, como se ilustra en el **Esquema 6.13**.

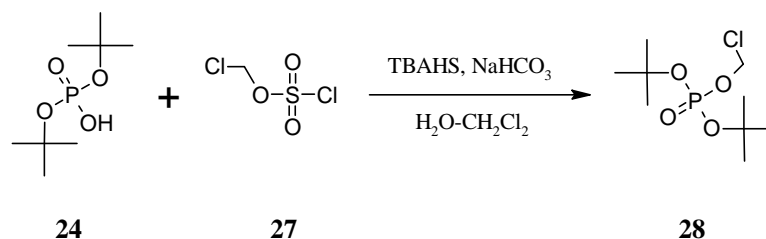


Esquema 6.13. Primera ruta propuesta.

También, se ha sintetizado di-*terc*-butilfosfato de plata, el cual es mezclado con ClCH_2I en benceno y agitación a temperatura ambiente para generar **28**.¹⁴¹ En 2002, Mäntylä y colaboradores informaron de un procedimiento mejorado que proporcionó un rendimiento del 72%, basado en la reacción de fosfato monohidrógeno de di-*terc*-butilo (**24**) con clorosulfato de clorometilo (**27**, 1.5 eq) en condiciones de transferencia de fase bifásica.¹²³ Siguiendo el ejemplo de Mäntylä con algunas modificaciones, se llevó a cabo la síntesis de este importante intermediario (**28**), utilizando dos procedimientos (procedimiento A y B).

6.3.2.3.1 Procedimiento A

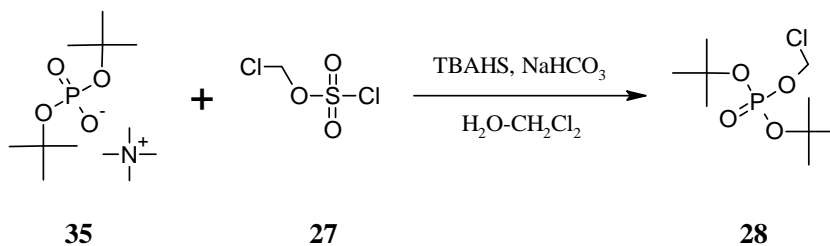
El método A se realizó conforme a lo reportado por Mäntylä, obteniendo un aceite de color pálido con un rendimiento del 50% (**Esquema 6.14**). La formación de dicho compuesto se confirmó mediante RMN ^1H mostrando una señal doble en 1.49 ppm que integraron para 18 H correspondientes a las dos cadenas hidrocarbonadas de *tert*-butilo y una señal doble en 5.56 ppm que corresponde al metileno. En RMN ^{13}C debido al acoplamiento que existe con el átomo de fósforo se observaron señales dobles en 29.8, 73.3 y 84.2 ppm que pertenecen a los tres carbonos con diferente ambiente químico dentro de la molécula (**28**). Además, en RMN ^{31}P se observó una señal simple en -11.86 ppm correspondiente a nuestro único átomo de fósforo de carácter orgánico.



Esquema 6.14. Síntesis de **28** reportado por Mäntylä.

6.3.2.3.2 Procedimiento B

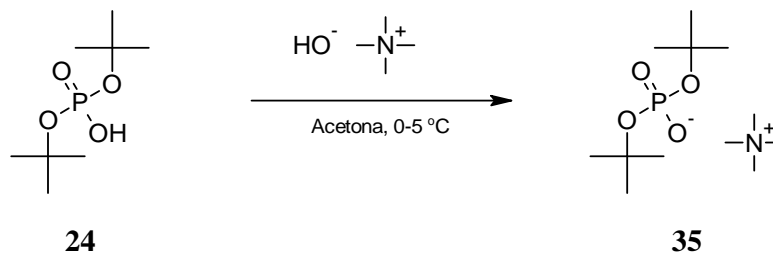
El método B se realizó conforme a lo reportado por Mäntylä con algunas modificaciones. En este caso se preparó una sal de amonio (**35**) para tratar de aumentar el rendimiento de la reacción y obtener el compuesto deseado (**28**) como se observa en el **Esquema 6.15**.



Esquema 6.15. Síntesis propuesta para obtener **28**.

La reacción para obtener **35** se llevó a cabo como se muestra en el **Esquema 6.16**.^{139,142} Se utilizó una reacción ácido-base con el correspondiente compuesto **24** y una solución de hidróxido de tetrametilamonio al 25% en agua. Este compuesto se identificó por RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P , obteniendo por RMN ^1H una señal simple en 1.25 ppm que integra para 18 H que

corresponden a los metilos de la cadena hidrocarbonada de *terc*-butilo, una señal simple que pertenece a los hidrógenos de los metilos del tetrametilamonio integrando para 12 H. En RMN ^{13}C se observa una señal doble en 30.3 ppm, una señal triple en 54.3 ppm y una señal doble en 72.8 ppm. En RMN ^{31}P se aprecia una señal simple correspondiente al fósforo orgánico en -7.79 ppm.

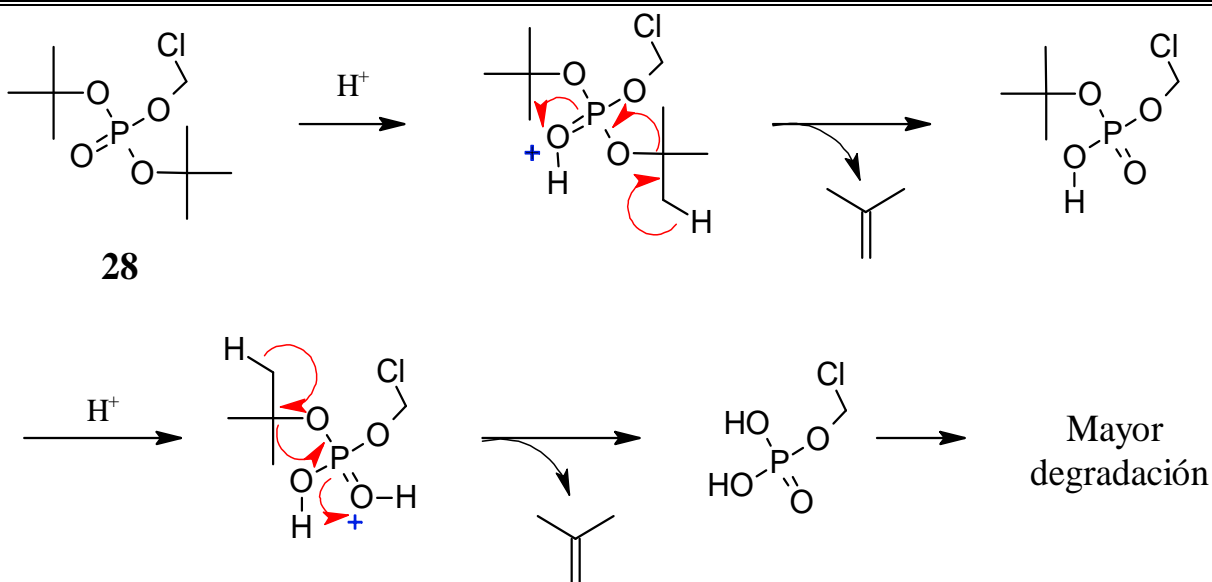


Esquema 6.16. Síntesis propuesta para obtener **35**.

Comparando el método A y B, el rendimiento del procedimiento B aumentó considerablemente por la formación del correspondiente intermediario **35**, esto podría deberse a que contiene un contraión de amonio con cadenas alifáticas el cual puede funcionar como catalizador de transferencia de fase, favoreciendo la reacción, aumentando así el rendimiento y disminuyendo el tiempo de reacción. Tanto para el método A y B se obtuvieron resultados espectroscópicos similares, de esta manera se aseguró la presencia del compuesto de interés (**28**).

Recientemente, en la literatura se ha encontrado el uso de múltiples bases como NaHCO_3 , KHCO_3 , Na_2CO_3 y K_2HPO_4 ; sin embargo, debido a diferencias experimentales, no existía ningún vínculo claro entre la selección de la base y el rendimiento de reacción entre **24** y **27**. Recientemente se ha reportado que al utilizar K_2HPO_4 (4.5 eq, pH 10) y Pr_4NCl (0.1 eq, catalizador de transferencia de fase) en CH_2Cl_2 se ha incrementado el rendimiento de **28** (90%).¹²²

En el transcurso de las reacciones, se notó que el compuesto **28** es inherentemente inestable, ya que al generar el compuesto **28** y colocándolo en almacenamiento a $0\text{ }^\circ\text{C}$ por dos días y consecutivamente utilizándolo para obtener otro derivado, este compuesto disminuyó su reactividad. Es probable que el compuesto **28** tienda a descomponerse en presencia de trazas de ácido (el compuesto **28** se obtuvo de una reacción que genera H_2SO_4) produciendo isobutileno, como se muestra en el **Esquema 6.17**.



Esquema 6.17. Ruta propuesta de descomposición de **28**.

Recientemente, se reportó que la simple adición de 5% molar de K_2CO_3 en una suspensión de 30% p/p de **28** en Cl_2CH_2 dio lugar a una robusta estabilidad a largo plazo (> 1 año a $5^\circ C$).

Por otro lado, como se ha mencionado en la síntesis de los intermediarios **24**, **27** y **28** que son clave en la preparación de muchos profármacos, se han realizado grandes avances para obtener estos compuestos a escalas industriales. Cabe mencionar que todos estos compuestos (**24**, **27** y **28**) se sintetizaron y se lograron identificar mediante RMN ya que por ccf no revelan los compuestos.

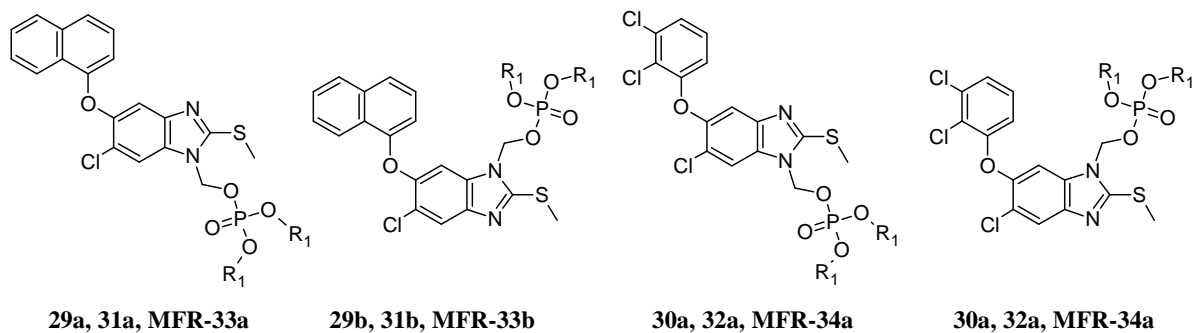
6.3.2.4 Síntesis de los intermediarios **29** y **30**

La síntesis de los intermediarios **29** y **30** se llevó a cabo de acuerdo al **Esquema 5.7** (página 36), a partir del compuesto alfa (**13**) y triclabendazol (**14**), respectivamente. Tanto **13** como **14** fueron preparados por métodos previamente reportados^{44,103,143} con algunas modificaciones descritas en este trabajo en la sección de procedimiento experimental.

Para la síntesis de **29** y **30**, se utilizó 1 eq del compuesto precursor (**13-14**), 3.5 eq de NaH, 1.3 eq de **28** en DMF a temperatura ambiente durante 24 horas. Cuando la reacción culminó, se obtuvo una resina a la cual se le realizó una ccf observando dos manchas. La resina generada se eluyó sobre gel de sílice utilizando como fase móvil AcOEt/éter de petróleo (50/50)

y posteriormente dietil éter, para eliminar todas las sales generadas en la reacción; posteriormente, se eliminaron los disolventes a presión reducida obteniendo de nuevo una resina.

La identidad de los compuestos se comprobó por sus espectros de IR, RMN y EM. A los dos productos observados por ccf se les realizó el correspondiente análisis por RMN identificando la mezcla de regioisómeros **29a-b** y **30a-b** que se muestra en el **Esquema 6.18**. Esto también se observó en la obtención de **31**, **32**, **MFR-33** y **MFR-34**.



29a-b, 30a-b= *tert*-butilo; **31a-b, 32a-b**= hidrógeno; **MFR-33a-b, MFR-34a-b**= sodio

Esquema 6.18. Mezcla de regioisómeros obtenidos.

Para el caso de **29**, después de eliminar las sales del medio de reacción, a la resina obtenida se le agregó un mezcla 85:15 hexano/AcOEt y consecutivamente se colocó en un baño de hielo con agitación, observando la precipitación de un sólido blanco que se filtró obteniendo un rendimiento de 36% y un punto de fusión de 130-130.5 °C con descomposición. Al sólido obtenido se le realizó una ccf observando sólo una mancha. La estructura de este compuesto se identificó por IR, RMN y EM; en RMN ¹H se observan las señales características del compuesto alfa (**13**), adicionalmente se cuenta con una señal doble en 5.81 ppm correspondiente al metileno que mantiene unido al nitrógeno del imidazol del compuesto precursor **13** y el oxígeno del derivado fosfatado **28** y una señal simple en 1.25 ppm que integra para 18 H del *tert*-butilo (**Figura 6.7**). Los regioisómeros no se aislaron ya que a la hora de administrar los compuestos *in vivo*, como buenos profármacos, se hidrolizarían con fosfatasa alcalina generando a su compuesto precursor.

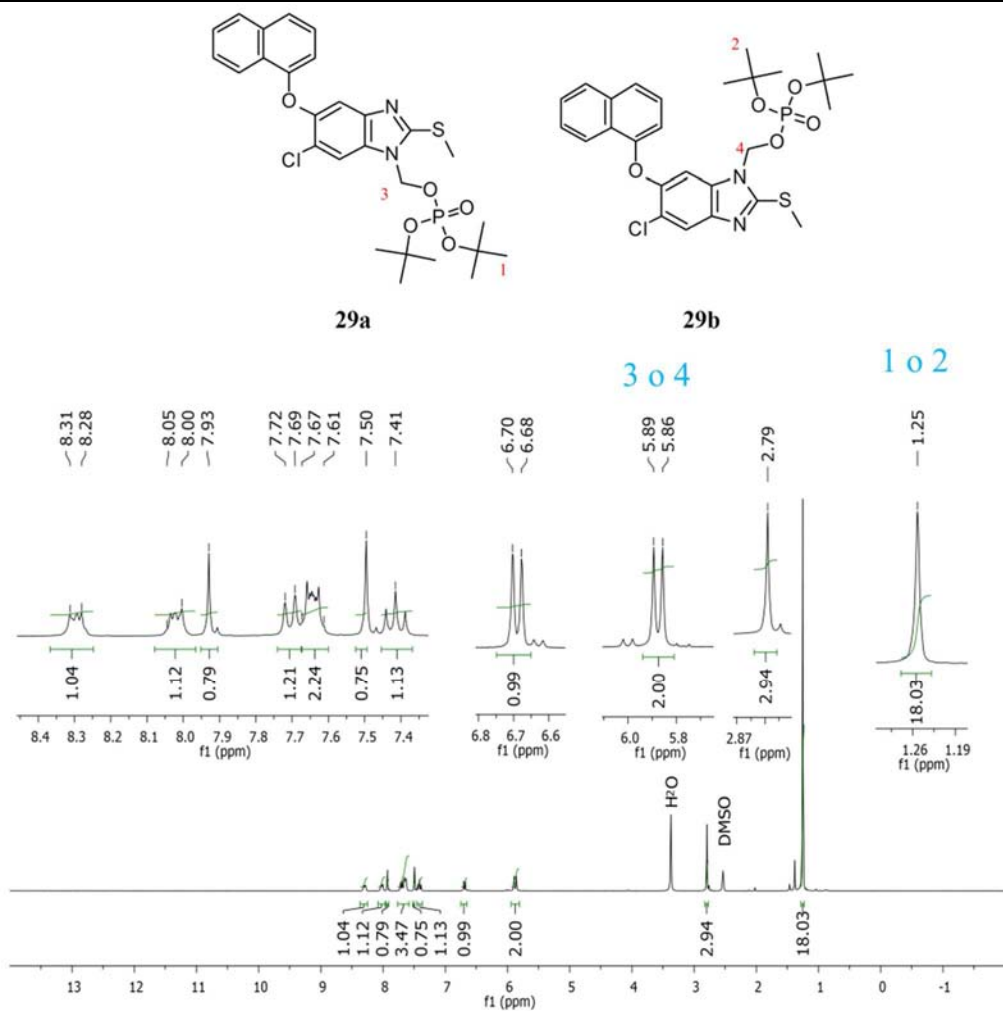


Figura 6.7. RMN ^1H del compuesto **29**.

Por otro lado, en RMN ^{13}C se observa este metileno como una señal doble en 68.9 ppm; en RMN ^{31}P se observó una señal simple en -11.78 ppm. En EMAR-ES+ se realizó el cálculo teórico para la molécula encontrada ($\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5\text{PSCl}$: 563.1536 m/z) y el resultado experimental 563.1553 m/z (30%) y un ión molecular de 473 m/z demostrando la existencia del compuesto deseado **29**.

En vista de haber logrado aislar un solo regioisómero, para poder identificarlo, se llevó a cabo un experimento de RMN NOE-1D, irradiando el metileno que se encuentra en 5.86-5.89 ppm (Figura 6.7).

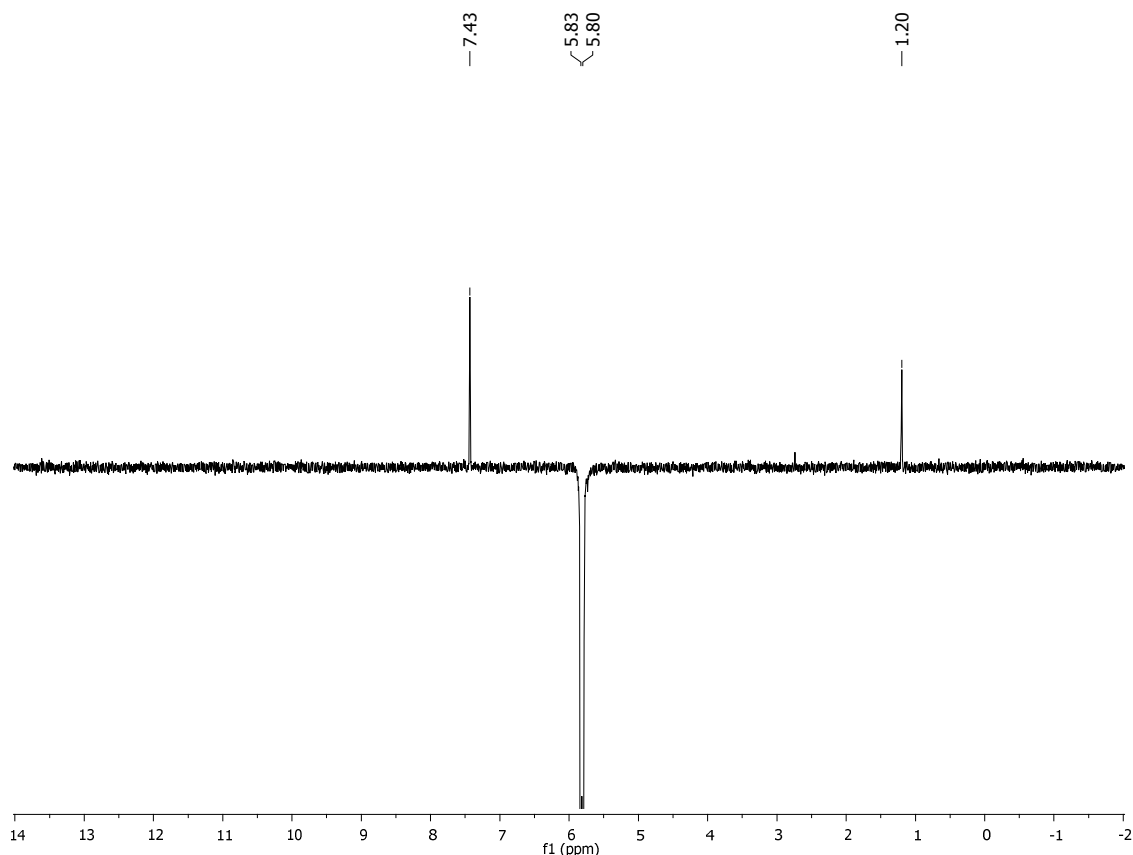
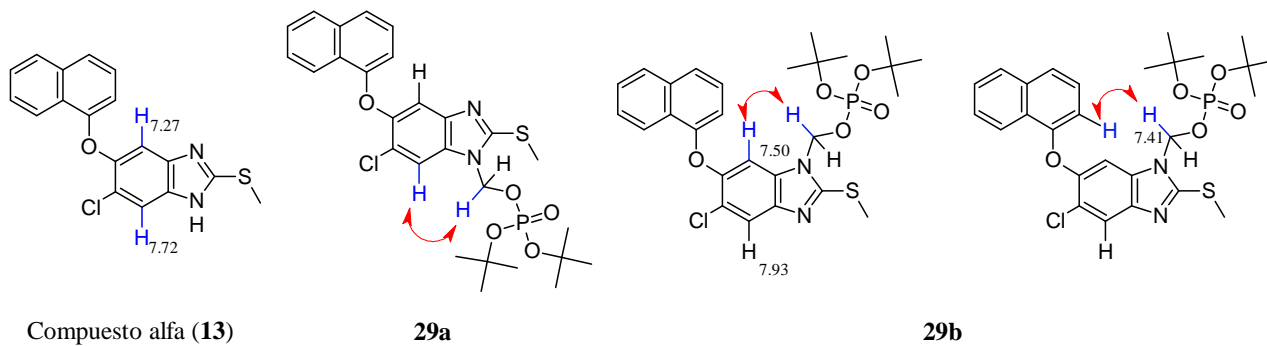


Figura 6.8. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 300 MHz, δ en ppm) experimento NOE-1D para **29a**.

Conociendo el desplazamiento químico de los hidrógenos del compuesto alfa (**13**) y el desplazamiento químico de los hidrógenos del metileno de la parte fosfatada, se logró determinar que el compuesto **29b** fue el regioisómero aislado, ya que el metileno tiene una interacción a través del espacio a 7.43 ppm, esta interacción podría ser con el hidrogeno de bencimidazol o naftalénico como se puede observar en el **Esquema 6.19**.



Esquema 6.19. Interacciones NOE para identificar el regioisómero.

Para el caso de **30**, se siguió esta misma metodología, obteniendo la mezcla de regioisómeros en una proporción 50:50, como se observa en la **Figura 6.9**. En el espectro de RMN ^1H se observa una señal en 1.30 ppm y otra en 1.36 ppm que integran para 18 H cada una, correspondientes a los *terc*-butilos; además, de unas señales dobles en 5.89-5.92 y 5.97-6.00 ppm correspondientes al metileno que une al triclabendazol y al compuesto fosfatado. En RMN ^{13}C se observó una señal triple a 68.8-68.9 ppm correspondiente al metileno. En el espectro de RMN ^{31}P se observaron 2 señales características de los fosfatos orgánicos a -11.52 y -11.75 ppm. En EMAR-ES+ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{PSCl}_3$ fue de 581.0600 (m/z) y se encontró al ión molecular de 581.0587 (m/z), estos resultados se pueden observar en el apéndice de espectros.

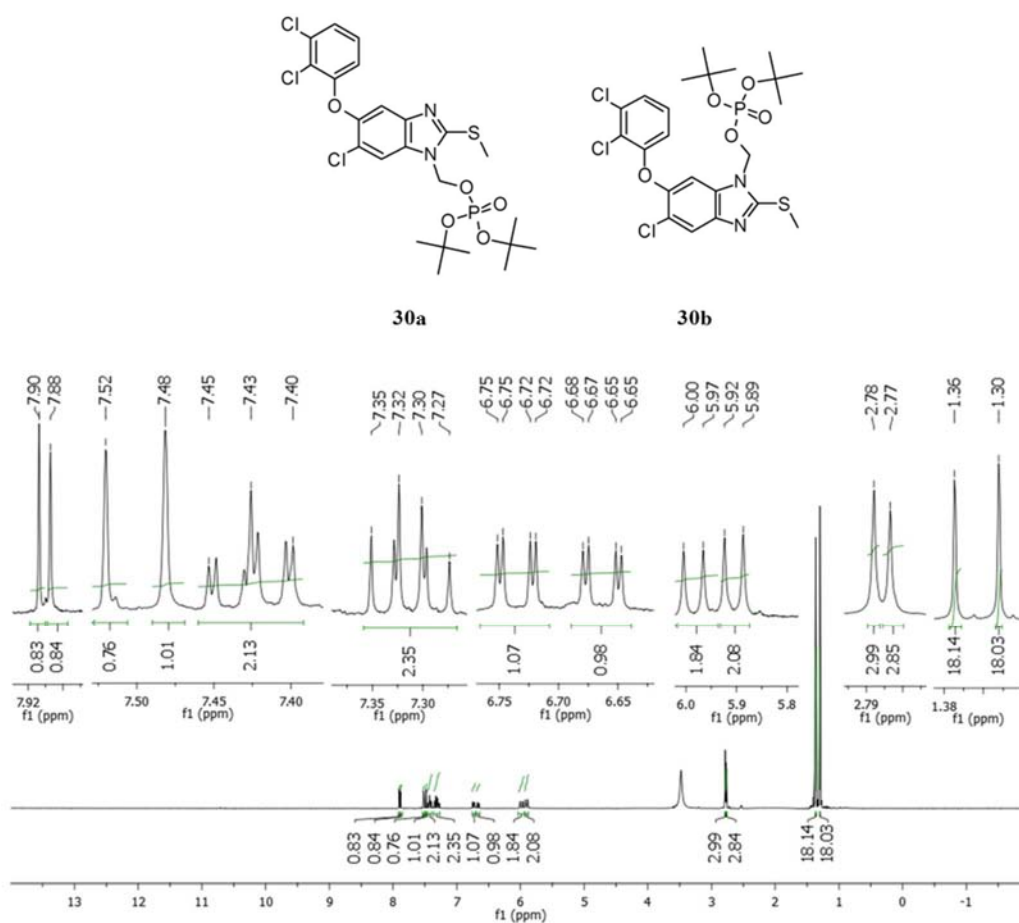


Figura 6.9. RMN ^1H para el compuesto **30** como mezcla de regioisómeros (50:50).

Es importante mencionar que en los escalamientos posteriores, los regioisómeros **29a-b**, **30a-b**, **31a-b**, **32a-b**, **MFR-33a-b** y **MFR-34a-b** no se aislaron, ya que a la hora de administrar los profármacos **MFR-33a-b** y **MFR-34a-b** *in vivo* se hidrolizarían con la enzima fosfatasa alcalina generando a los compuestos precursores (**13** y **14**).

6.3.2.5 Síntesis de los intermediarios **31** y **32**

Para la síntesis de los compuestos **31** y **32** se utilizaron los sólidos obtenidos en la reacción anterior. Para el caso de **31** solo se obtuvo el regioisómero correspondiente a **31b** mostrado en el espectro de RMN ^1H (Figura 6.10), en este espectro se observó una señal doble a 5.82-5.85 ppm correspondiente al metileno que mantiene enlazados al grupo fosfato y al compuesto alfa. En RMN ^{13}C se observa el metileno como una señal doble en 68.4-68.5 ppm; en RMN ^{31}P se observó una señal simple en -2.75 ppm. En EMAR-ES+ se realizó el cálculo teórico para la molécula $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{PSCl}$: 451.0284 m/z obteniendo como resultado experimental 451.0269 m/z demostrando la existencia del compuesto deseado **31b**.

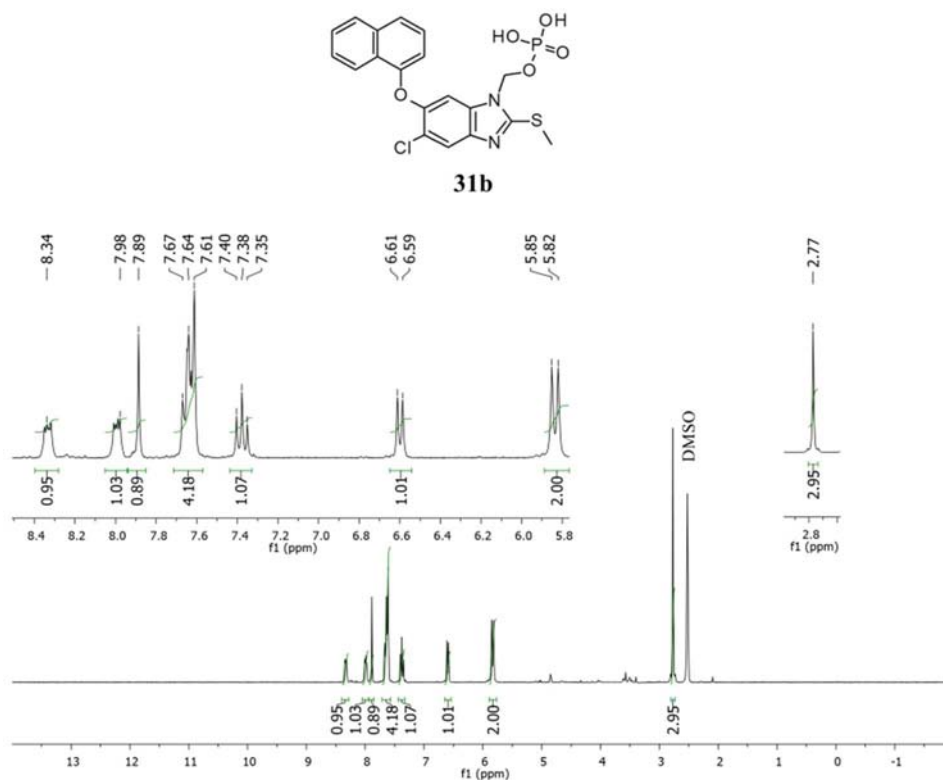


Figura 6.10. RMN ^1H para el compuesto **31b**.

Es importante mencionar que para la síntesis de **29** se observó por ccf que al lavar con el sistema 85/15 hexano/AcOEt las aguas madres contenían al otro regioisómero (**29a**). Por esta razón es conveniente solo eliminar las sales generadas de la reacción y la resina obtenida someterla a la reacción de hidrólisis, ya que precipita un sólido que mediante RMN se identificó que se obtiene la mezcla de regioisómeros (50:50) como se ilustra en la Figura 6.11, obteniendo buen rendimiento (90%) y un punto de fusión de 136-137 con descomposición. En el espectro de

RMN ^1H (Figura 6.11) se observan todas señales duplicadas que demuestran la existencia de los dos regioisómeros.

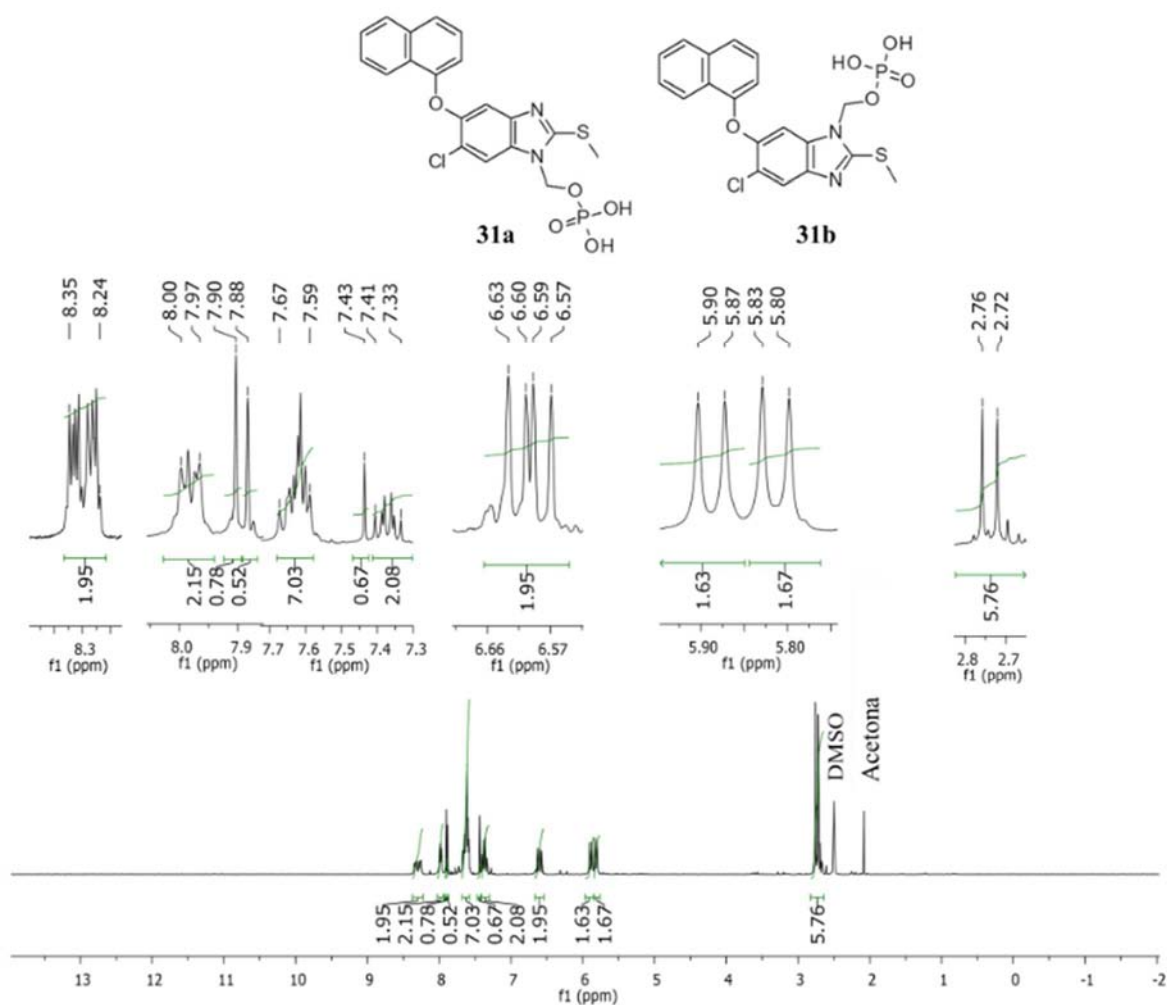


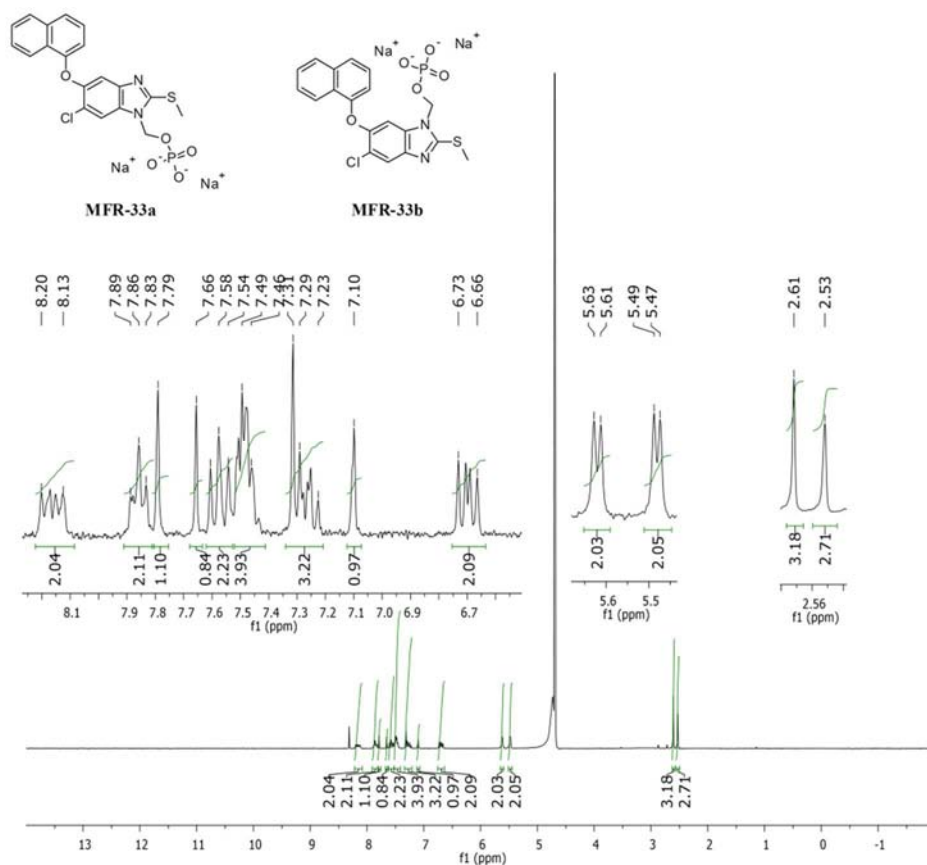
Figura 6.11. RMN ^1H de la mezcla de regioisómeros para **31**.

Esta reacción se obtuvo una mezcla de regioisómeros en una relación 1:1, demostrados por los resultados espectroscópicos obtenidos y mostrados en el apéndice de espectros.

Para el caso de **32**, se utilizó el mismo procedimiento que para **31**, por lo cual se observaron señales duplicadas en RMN ^1H y ^{13}C . En RMN ^1H se observó una señal simple a 2.73 y otra en 2.75 ppm que integran para 3H cada una de S-CH_3 ; además de los metilenos como señales dobles a 5.83 y 5.88 ppm. En RMN ^{13}C se observa el metileno a 68.4 como una señal triple. En RMN ^{31}P se observaron dos señales triples a -2.57 y -2.64 ppm. En EMAR-ES+ se realizó el cálculo teórico para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5\text{PSCl}_3$ el cual fue de 468.9348 y el encontrado experimentalmente fue de, 468.9324 (m/z), confirmando la existencia del compuesto deseado.

6.3.2.6 Síntesis de MFR-33 y MFR-34

Para la síntesis de **MFR-33** y **MFR-34**, se colocó 1 eq del correspondiente ácido (**31** ó **32**), 1 eq de NaOH en una mezcla H₂O/MeOH durante 30 minutos. Posteriormente se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo un sólido blanco con un rendimiento de 90%. La identidad de las correspondientes sales disódicas se comprobaron con las características espectroscópicas particularmente del espectro RMN ¹H realizadas utilizando D₂O, en donde las señales a 5.47-5.49 y 5.6-5.63 ppm son dos señales dobles que integran para 2H cada uno y que correspondieron a N-CH₂-O-PO₃Na₂; dos señales simples a 2.53 y 2.61 ppm cada señal integró para 3H correspondiendo a S-CH₃. En el espectro de RMN ¹³C se identificaron dos señales simples a 14.1 y 14.2 ppm correspondientes a S-CH₃ de los dos regioisómeros y también dos señales simples a 68.0 y 68.1 ppm correspondientes a los metilenos; en RMN ³¹P se identificaron dos señales simples a 1.72 y 1.49 ppm. Adicionalmente, el espectro EMAR-ES+ mostró una masa calculada para C₁₉H₁₄N₂O₅Na₃SCIP: 516.9743 (*m/z*) y se encontró un ión molecular de 516.9767 (*m/z*).


 Figura 6.12. RMN ¹H de la mezcla de regioisómeros para MFR-33.

La síntesis de **MFR-34** se realizó de la misma forma que **MFR-33**, obteniendo un rendimiento del 90%. Las señales obtenidas en RMN ^1H a 5.53-5.54 y 5.62-5.63 ppm son dos señales dobles que integran para 2H cada uno y que correspondieron a $\text{N-CH}_2\text{-O-PO}_3\text{Na}_2$; dos señales simples a 2.57 y 2.60 ppm cada señal integró para 3H correspondiendo a S-CH_3 . En el espectro de RMN ^{13}C se identificaron dos señales simples a 14.08 y 14.15 ppm correspondientes a S-CH_3 de los dos regioisómeros y también dos señales simples a 68.0 y 68.1 ppm correspondientes a los metilenos; en RMN ^{31}P se identificaron dos señales simples a 1.61 y 1.77 ppm. Adicionalmente, el espectro EMAR-ES+ mostró una masa calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}_2\text{PSCl}_3$: 512.8987 (m/z) y se encontró un ión molecular de 512.8986 (m/z). Todos los resultados espectroscópicos y espectrométricos corroboran la existencia de los compuestos finales **MFR-33** y **MFR-34**.

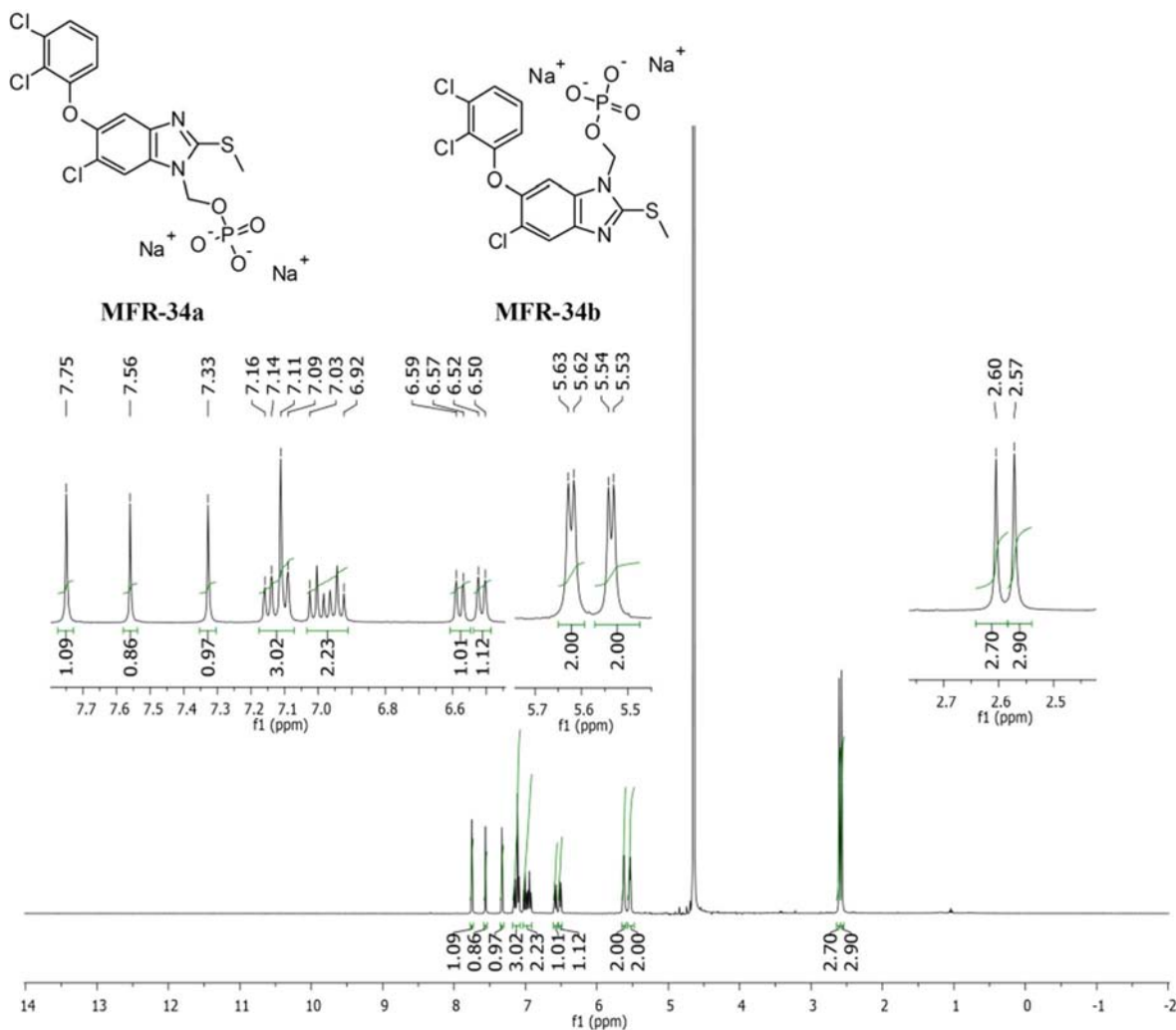


Figura 6.13. RMN ^1H de la mezcla de regioisómeros para **MFR-34**.

Todas las reacciones de la segunda estrategia se escalaron de 1-25 g con resultados reproducibles. Es importante señalar que la calidad del producto obtenido depende mucho de la pureza de las materias primas empleadas y del disolvente.

Es trascendente mencionar que los compuestos **MFR-33** y **MFR-34** mostraron un rendimiento global de 77% y 77.7%, respectivamente. Sin embargo, como se ha mencionado a lo largo de la discusión de resultados, este rendimiento global se puede optimizar utilizando las nuevas rutas sintéticas, las cuales han sido reportadas para ser escaladas a nivel industrial. Además, no es necesario separar la mezcla de regioisómeros obtenidos ya que los profármacos (**MFR-33** y **MFR-34**) son hidrolizados por la enzima fosfatasa alcalina la cual libera al compuesto alfa o triclabendazol, respectivamente.

6.4 Predicción de pK_a teórico

El software MarvinSketch de ChemAxon ofrece predicciones rápidas y precisas de las propiedades físicoquímicas básicas, tales como logP, logD, pK_a, etc.

En el 2010, Manchester¹⁴⁴ y colaboradores realizaron un estudio para determinar lo robusto de este software. En primera instancia, determinaron los valores de pK_a de 211 nuevos compuestos usando electroforesis capilar acoplada con espectroscopia UV. Estos valores se compararon con los predichos por cinco software diferentes de estimación de pK_a disponibles comercialmente. ACDLabs/pK_a, Marvin (ChemAxon), MoKa (Molecular Discovery), Epik (Schrodinger), y Pipeline Pilot (Accelrys). A pesar de que el método topológico Moka fue notablemente más rápido que ACD, la exactitud de los dos métodos y Marvin fue estadísticamente indistinguibles, con un error de raíz cuadrada media de aproximadamente 1 unidad de pK_a en comparación con el experimento. Pipeline Pilot y Epik producen deficientes estimaciones de pK_a en comparación con el experimental.

Por otro lado, el pK_a de un compuesto es una propiedad importante¹⁴⁵ ya que la preferencia de un compuesto de donar o aceptar un protón es fundamental para la comprensión de los procesos químicos y biológicos. En términos biológicos, el pK_a es un concepto trascendental en la determinación de la posibilidad de que una molécula sea absorbida por los componentes del tejido acuoso o las membranas lipídicas. Asimismo, está estrechamente relacionado con los conceptos de pH (acidez de la solución) y log P (coeficiente de reparto entre líquidos

inmiscibles).¹⁴⁶ El valor de pK_a de una molécula determina la cantidad de especies protonadas y desprotonadas a un pH específico, por ejemplo a pH fisiológico, conociendo el pK_a de una molécula nos da una idea de las propiedades farmacocinéticas. Esto último incluye la velocidad a la que una molécula se difundirá a través de membranas y otras barreras fisiológicas, tales como la barrera hematoencefálica. Normalmente, las membranas de fosfolípidos absorben fácilmente moléculas neutras, mientras que las moléculas ionizadas tienden a permanecer en el plasma o el intestino antes de ser excretadas.¹⁴⁷

Se determinaron los valores de pK_a teóricos de **MFR-33** utilizando MarvinSketch, obteniendo los siguientes resultados $pK_{a1}= 1.40$, $pK_{a2}= 4.19$ y $pK_{a3}= 6.45$ (**Figura 6.14**).

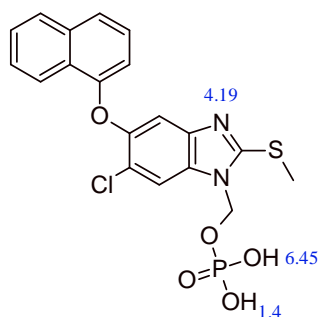
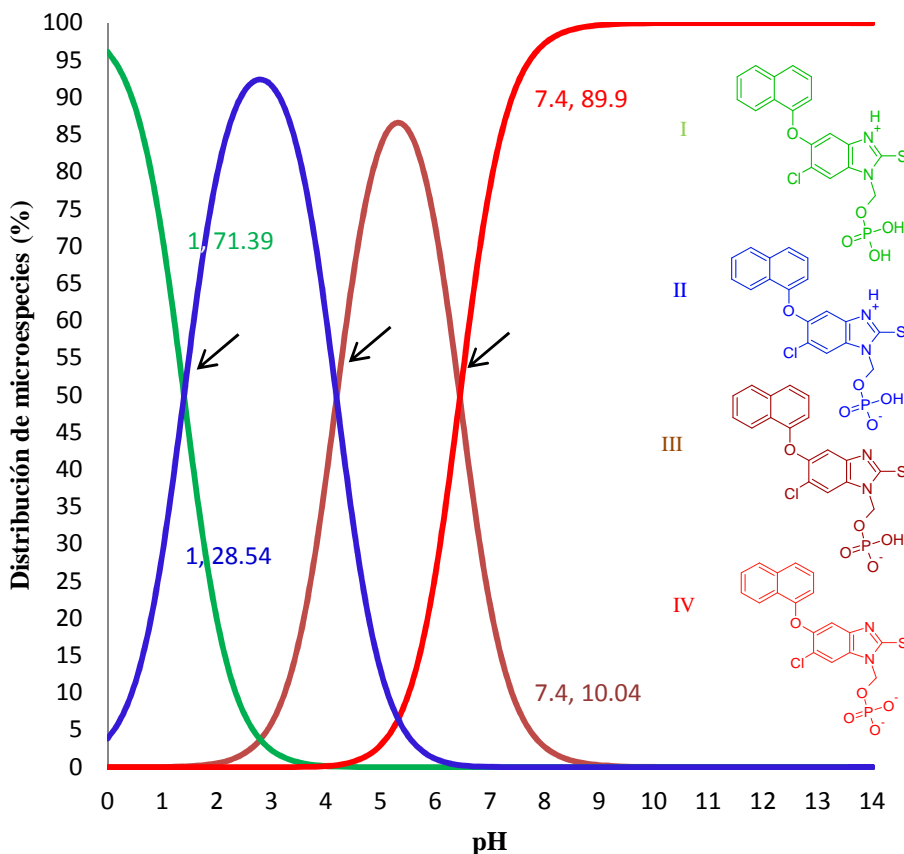


Figura 6.14. pK_a 's teóricos de **MFR-33** obtenidos de MarvinSketch.

Debido a que este compuesto se pretendía administrar por vía oral e intramuscular, se tenían que conocer las especies en equilibrio a diferentes valores de pH ($pH= 1$ y $pH= 7.4$). A pH 1 (estómago) se encuentran en equilibrio las especies **I-II** en una proporción 71.39% y 28.54%, respectivamente. A pH 7.4 (plasma) se encuentran en equilibrio **III-IV** (10.04%-89.9%) estas especies se encuentran ionizadas tendiendo a permanecer en el plasma dando pausa a llegar al hígado donde sufren la escisión, liberando al fármaco precursor (**13**), (**Gráfica 6.1**).



Gráfica 6.1. Ilustración de los valores de pK_a de **MFR-33** ($pK_{a1}=1.40$, $pK_{a2}=4.19$ y $pK_{a3}=6.45$) predicho usando el Software Marvin de ChemAxon. Este gráfico muestra la distribución de microespecies vs valores de pH.

Para hacer robusto el estudio del cálculo de pK_a , se utilizó otro programa, el cual fue ACDLab/ pK_a obteniendo los siguientes resultados.

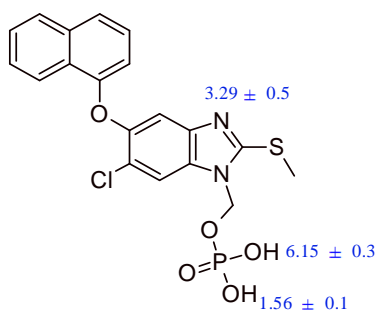


Figura 6.15. pK_a 's teóricos de **MFR-33** obtenidos de ACDLab/ pK_a .

Como se puede observar en las **Figuras 6.14** y **6.15**, los valores de pK_a son muy similares, demostrando lo robusto de estos tipos de software. Las especies dominantes en cada intervalo de pH también son mostradas observando que a un pH de 7.4 se favorecen las especies ionizadas **III** y **IV** las cuales incrementan la solubilidad del profármaco **MFR-33**. Resultados similares se

obtienen para el profármaco **MFR-34** los cuales se muestran en el procedimiento experimental (página 98).

6.5 Solubilidad acuosa de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34**

Una vez comprobada la estructura de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, se procedió a evaluar la solubilidad acuosa en agua desionizada para probar la hipótesis que considera, que al impedir la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares en el compuesto alfa y triclabendazol, además de agregar un grupo ionizable como el fosfonooximetilo, se podría favorecer una interacción soluto-disolvente y por ende, aumentar la solubilidad acuosa. Cabe destacar que tanto el compuesto alfa (**13**) como el triclabendazol (**14**) se absorben escasamente en el tracto gastrointestinal, como consecuencia se utilizan grandes cantidades en el tratamiento; sin embargo, se sabe, que del total de la dosis administrada solo el 5% es absorbida.³²

Para determinar y comprobar el incremento de la solubilidad acuosa, se evaluaron tanto los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** (como mezcla de regioisómeros (50:50) **MFR-33a-b** y **MFR-34a-b**) como sus correspondientes compuestos precursores, es decir, el compuesto alfa (**13**) y triclabendazol (**14**) (**Figura 6.16**).

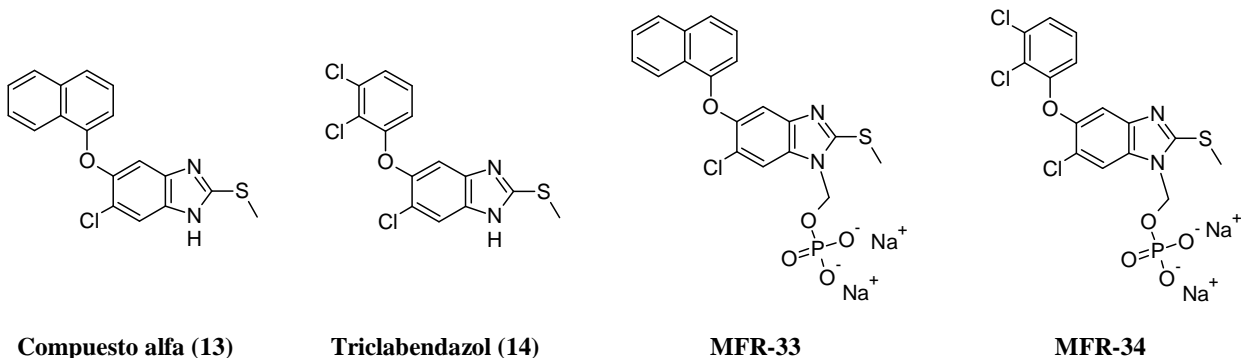


Figura 6.16. Compuestos a los cuales se les determinó solubilidad acuosa.

Para determinar la solubilidad de todos los compuestos, se construyó una curva de calibración obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 6.5**.

Tabla 6.5. Absorbancias promedio de la curva de calibración de **13**, **14**, **MFR-33** y **MFR-34**

Concentración (mg/mL)	Absorbancia		Concentración (mg/mL)	Absorbancia	
	13	14		MFR-33	MFR-34
0.2	0.025	0.019	2	0.061	0.057
1.6	0.103	0.082	4	0.121	0.115
3.2	0.258	0.168	6	0.184	0.176
6.4	0.406	0.335	10	0.296	0.293
12.8	0.804	0.658	20	0.594	0.586

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Al determinar la absorbancia de las muestras para evaluar la solubilidad acuosa, se obtuvieron los resultados que se exponen en la **Tabla 6.6**.

Tabla 6.6. Absorbancia promedio de las muestras problemas de **13**, **14**, **MFR-33** y **MFR-34**

Compuesto	Absorbancia
Compuesto alfa (13)	0.038
Triclabendazol (14)	0.018
MFR-33	0.308
MFR-34	0.313

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Realizando el correspondiente tratamiento matemático, se determinó que el compuesto **13**, **14**, **MFR-33** y **MFR-34** tienen una solubilidad acuosa de 2.6×10^{-4} mg/mL, 2.4×10^{-4} mg/mL, 20.67 mg/mL y 21.12 mg/mL, respectivamente (**Tabla 6.7**).

Tabla 6.7. Solubilidad y estabilidad acuosa de **13**, **14**, **MFR-33** y **MFR-34**

Compuesto	Solubilidad acuosa (mg/mL) ^a	Estabilidad acuosa (h) ^b
13	2.6×10^{-4}	>26
14	2.4×10^{-4}	>26
MFR-33	20.67	>26
MFR-34	21.12	>26

^a Determinado a 25 °C, ^b >95% por UV-CLAR determinado a pH 1 y 7.4 a temperatura ambiente.

La solubilidad acuosa del compuesto alfa (**13**, 2.6×10^{-4} mg/mL) y triclabendazol (**14**, 2.4×10^{-4} mg/mL) se mejoró en gran medida por los profármacos **MFR-33** y **MFR-34**, respectivamente, observando una solubilidad de 20.67 mg/mL y 21.12 mg/mL (**Tabla 6.7**). Los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** aumentaron su solubilidad acuosa 79,500 y 88,000 veces, en comparación con sus compuestos precursores. Estos resultados demuestran que el enfoque de profármacos como **MFR-33** y **MFR-34** son útiles para aumentar la solubilidad acuosa de fármacos no polares.

6.6 Estabilidad de los profármacos MFR-33 y MFR-34

Los estudios de estabilidad para los productos farmacéuticos son una parte fundamental de todo el proceso de investigación y desarrollo que debe hacerse previamente a un producto farmacéutico que será puesto a disposición de la población, con el fin de determinar el tiempo durante el cual mantiene sus especificaciones de calidad.

Un reto importante en este trabajo, es la estabilidad química, donde la precipitación es la limitante para la vida útil de muchas soluciones de profármacos. Como la mayoría de los productos, deben mantener una especificación de contenido ($\pm 10\%$) de la cantidad declarada, la vida útil de muchos fármacos es generalmente determinada por el tiempo para degradar el 10% del fármaco. La degradación química de un profármaco a menudo resulta en la formación del fármaco precursor poco soluble como el producto de degradación primario. Cuando se forma el fármaco precursor en exceso, su solubilidad en la formulación se ve afectada por la presencia de partículas insolubles.^{76,96}

En la formulación de un fármaco, el compuesto debe demostrar estabilidad química adecuada, especialmente en formas de dosificación parenterales. Los compuestos **MFR-33** y **MFR-34** mostraron estabilidad deseada ($> 95\%$ después de 26 horas) a pH de 1 y 7.4, lo que es ideal para la formulación desde un punto de vista fisiológico. Los resultados de este estudio se muestran en la **Tabla 6.7**. Con los resultados obtenidos, se demostró que **MFR-33** y **MFR-34** tienen suficiente estabilidad acuosa para confirmar que el compuesto administrado al ganado se trata del profármaco y no de los compuestos precursores. Además, se puede garantizar la administración de los profármacos a una población considerable de animales sin que los compuestos en solución sufran degradación.

6.7 Hidrólisis en solución con fosfatasa alcalina de los profármacos MFR-33 y MFR-34

En general, un profármaco ideal será perfectamente estable hasta que alcance el sitio deseado de activación, y luego de manera rápida y cuantitativa convertido al fármaco activo. Al igual que la estabilidad, la velocidad de conversión es una propiedad que se puede medir fácilmente utilizando sistemas *in vitro*. Sin embargo, a diferencia de la estabilidad, es difícil definir una velocidad de escisión óptima, es decir, mientras la escisión rápida es generalmente deseable, a su vez esta velocidad debe ser lo suficientemente lenta para que la mayoría del

profármaco pueda sobrevivir el tránsito a través de las diferentes rutas de administración como la vía oral (tracto gastrointestinal). Al igual que la estabilidad acuosa, hay pocos datos disponibles comparando las velocidades de escisión de varias clases de profármaco en las mismas condiciones.¹⁴⁸

La fosfatasa alcalina (ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa) es una enzima ampliamente distribuida que hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico (pH óptimo entre 9 y 10) liberando fosfato inorgánico. Las fosfatasas están presentes en varios tejidos de los mamíferos por ejemplo placenta, intestino, hígado, hueso, riñón y plasma.¹⁴⁹ La medida de niveles anormales de fosfatasa alcalina en el suero indican la existencia de enfermedades óseas degenerativas (raquitismo, osteomalacia, hiperparatiroidismo secundario, osteosarcoma) o bien daños hepáticos. El aumento fisiológico de fosfatasa alcalina en los niveles plasmáticos se produce en animales en fase de crecimiento (se está formando tejido óseo) o en hembras gestantes (fosfatasa alcalina de la placenta).

La disposición de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** para liberar al compuesto alfa (**13**) y triclabendazol (**14**), respectivamente, en una solución de fosfatasa alcalina, indica que los profármacos son sustrato de esta enzima (**Tabla 6.8**), lo cual es prometedor para promover el desarrollo de estos profármacos.

Tabla 6.8. Velocidad de hidrólisis de **MFR-33** y **MFR-34** en solución de fosfatasa alcalina a 37 °C

Compuesto	^a t _{1/2} (segundos) Promedio ± DE
MFR-33	7.9±2
MFR-34	13.6±4

^apromedio n=2, determinado a pH 7.4 y 37 °C.

Cabe mencionar que no todos los compuestos con un grupo fosfato y una porción orgánica son sustratos de esta enzima.¹⁵⁰ Además, para la hidrólisis de **MFR-33** y **MFR-34** se utilizaron como mezcla de regioisómeros, es decir **MFR-33a** y **MFR-33b** para el profármaco **MFR-33** y **MFR-34a** y **MFR-34b** para el profármaco **MFR-34**, demostrando que los dos regioisómeros de cada profármaco son sustrato de fosfatasa alcalina. Por lo anterior, se concluye que este tipo de compuestos aunque se encuentren como mezcla de regioisómeros, la enzima fosfatasa alcalina es capaz de hidrolizar y generar a su correspondiente compuesto precursor.

6.8 Evaluación *in vitro* del profármaco MFR-33

El profármaco **MFR-33** se evaluó *in vitro* contra metacercarias de *F. hepatica* recién desenquistadas a concentraciones de 10 y 50 mg/L como se puede observar en la **Tabla 6.9**. A una concentración de 50 mg/L y 24 horas, el compuesto **MFR-33** demostró alta eficacia fasciolicida del 100%; a una concentración de 10 mg/L la eficacia fue de 96.83% a 24 y 48 horas, obteniendo 100% de eficacia hasta las 72 horas post-tratamiento. Estos resultados se compararon con el fármaco de elección triclabendazol (Fasinex®, Novartis) como control de referencia. Sin embargo, la actividad fasciolicida de **MFR-33** en las pruebas *in vitro* a 10 mg/L indica que el parásito no expresa fosfatasa alcalina que pueda liberar el compuesto activo (**13**), y que probablemente **MFR-33** posea actividad fasciolicida o que sea hidrolizado con el tiempo.

Tabla 6. 9. Porcentaje de mortalidad *in vitro* de *F. hepatica* después del tratamiento con **MFR-33**

Compuesto y concentración (mg/L)	Eficacia (%)		
	24 h Promedio ± DE	48 h Promedio ± DE	72 h Promedio ± DE
MFR-33 (50)	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
MFR-33 (10)	95.8±0.1	95.8±0.1	100.0±0.1
Triclabendazol (50) ^a	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
Triclabendazol (10) ^a	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
Control ^b	0.0	0.0	0.0

^aTriclabendazol (Fasinex®-Novartis) como control de referencia, ^bcontrol sin tratamiento.

6.9 Evaluación de la actividad fasciolicida *in vivo* de MFR-33 y MFR-34

Cuando se introduce un fármaco en el organismo, debe superar numerosas barreras biológicas antes de llegar al receptor, dependiendo de la vía de administración. Para que un fármaco pueda ejercer su acción, debe alcanzar una concentración adecuada y lugar adecuado.

La vía parenteral presenta, en relación a la vía oral, una serie de ventajas para la administración de medicamentos. Entre ellas destacan la rapidez de acción con la vía intravenosa, su elevada biodisponibilidad y la ausencia del efecto de primer paso. Además, con el uso de la vía intramuscular o subcutánea es posible controlar el proceso de liberación durante largos periodos de tiempo, que pueden alcanzar varios meses.¹⁵¹ Esta forma de administración se utiliza cuando no es posible por vía oral por inconciencia (pacientes que no pueden deglutir, que presentan vómitos intensos, etc.), falta de cooperación del paciente (son dolorosas), por inactivación del fármaco o falta de absorción en el tracto intestinal.

Los profármacos de fosfato se utilizan a menudo para desarrollar formulaciones inyectables de fármacos precursores poco solubles y muchos son comercializados.¹⁵² Después de la administración parenteral, los profármacos se escinden enzimáticamente por fosfatasas alcalinas endógenas produciendo el fármaco precursor.^{85,152} Ejemplos de estos profármacos incluyen fosfenitoína (Cerebryx®, Pfizer),⁸² para el tratamiento de la epilepsia, profármacos de glucocorticoides tales como dexametasona (Decadron-Phosphate®),¹⁵³ y fosfato de etopósido (Etopophos® , Bristol-Myers Squibb) para el tratamiento de cáncer de pulmón.¹⁵⁴ Fosfato de estramustina, que está disponible en ambas formulaciones intravenosa y oral,¹⁵⁵ la cual ha estado en el mercado de Europa y los Estados Unidos como Emcyt® (Pharmacia) para el tratamiento de cáncer de próstata. Sin embargo, muy pocos profármacos de fosfato orales han llegado al mercado, a pesar de las características de solubilidad favorables y su estabilidad química inherente.¹⁵⁶ Algunos profármacos orales fallan debido a la falta de beneficios clínicamente relevantes sobre el fármaco precursor, como el fosfato de etopósido que fue indetectable en plasma después de la administración oral; además, la toxicidad del fosfato de etopósido y etopósido por vía oral fue similar.¹⁵⁷ Otros fracasan porque no mejoran la velocidad y el grado de absorción del fármaco original en modelos animales, tales como LY307853,¹⁵⁸ o fracasan debido a la mala bioconversión enzimática, tales como ésteres de fosfato de taxol (**Figura 6.17**).¹⁵⁹

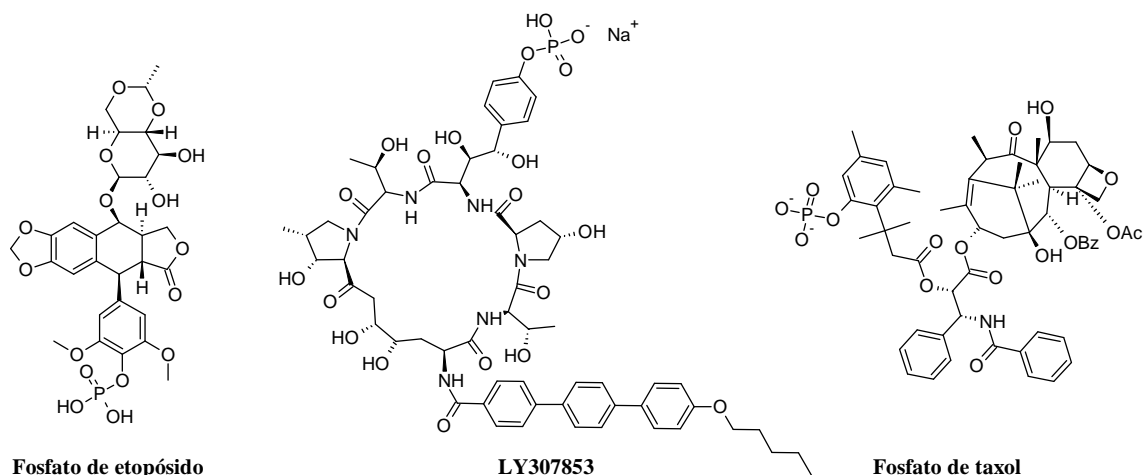


Figura 6.17. Estructuras de los profármacos de fosfato de etopósido, LY307853 y fosfato de taxol.

El profármaco **MFR-33** se evaluó en ovinos contra *F. hepatica* de 10 semanas de edad, usando diferentes rutas de administración como la vía oral, intramuscular y subcutánea (**Tabla 6.10**). Los resultados obtenidos muestran una eficacia de 87.8% a una dosis intramuscular de 4 mg/kg, demostrando que mediante esta vía de administración se obtuvo mejor actividad fasciolicida en comparación con la vía oral y subcutánea. En estudios previos, la actividad

fasciolicida del compuesto alfa (**13**) se determinó demostrando una eficacia de 86.9% contra fasciolas maduras y juveniles a una dosis de 15 mg/kg por vía oral.⁴⁴ Es evidente que la actividad fasciolicida del profármaco **MFR-33**, a una dosis menor vía intramuscular es comparable a la administrada oralmente del compuesto alfa (**13**) demostrando efectos similares. Sin embargo, el resultado de reducción de huevos por vía intramuscular no fue tan impactante como la reducción de fasciolas. Con los resultados obtenidos de la administración por vía oral de **MFR-33**, se asegura que la gran mayoría del compuesto es propenso a la ruptura prematura en el tracto gastrointestinal, liberando al compuesto precursor (**13**). Por lo tanto, se puede decir que **MFR-33** por vía oral se hidroliza rápidamente generando a su compuesto precursor (**13**) obteniendo mala absorción y generando actividad fasciolicida similar a **13** (**MFR-33**, 83.3% y 95.5%; **13**, 86.9% y 100%). Por otro lado, por vía intramuscular **MFR-34** es transportado en el plasma hasta llegar al hígado donde la escisión es suficientemente rápida para proporcionar niveles eficaces del fármaco activo y generar buena actividad fasciolicida.

Tabla 6.10. Eficacia de **MFR-33** expresada como porcentaje de reducción de F. hepatica y huevos en ovinos infectados artificialmente

Grupo y ruta de administración (n=6)	Dosis (mg/Kg)	Promedio ± EE ^a		Eficacia (%)	
		Fasciolas recuperadas	Huevos recuperados	Reducción de fasciolas	Reducción de huevos
1 (oral)	12	12.3±7.3	3.6±1.7	83.3	95.2
2 (intramuscular)	4	9.0±2.8	37.5±14.8	87.8	50.8
3 (subcutánea)	4	28.5±7.4	23.0±11.4	61.4	69.8
4 (grupo control)	Sin tratamiento	74.0±4.7	76.3±26.8	0	0

^aEE. Error estándar.

Con base en los resultados obtenidos por vía intramuscular del profármaco **MFR-33**, solo se evaluó a **MFR-34** por esta vía. La evaluación de **MFR-34** se llevó a cabo de manera similar que **MFR-33**. Los resultados adquiridos (**Tabla 6.11**) muestran que el profármaco **MFR-34** posee buena actividad fasciolicida a una dosis de 4, 6 y 8 mg/kg obteniendo un porcentaje de reducción de fasciolas de 96.8%, 98.3% y 99.2%, respectivamente, en comparación a la obtenida por el fármaco de elección (triclabendazol) administrada por vía oral a una concentración de 12 mg/kg con una reducción del 99.9%. Por otro lado, en la **Tabla 6.11** se aprecia que **MFR-34** en todas las concentraciones reduce la emisión de huevos de *F. hepatica* al 100% al igual que triclabendazol por vía oral. De manera similar que **MFR-33**, **MFR-34** administrado por vía intramuscular disminuyó la dosis obteniendo resultados similares al fármaco precursor. Es pertinente señalar que en todos los grupos tratados, no se observaron reacciones clínicas post-

tratamiento; además, que los animales no mostraron signos de dolor al administrar los profármacos por vía parenteral.

Tabla 6.11. Eficacia de **MFR-34** expresada como porcentaje de reducción de *F. hepatica* y huevos en ovinos infectados artificialmente

Grupo y vía de administración (n=6)	Dosis (mg/Kg)	Promedio ± EE ^a		Eficacia (%)	
		Fasciolas recuperadas	Huevos recuperados	Reducción de fasciolas	Reducción de huevos
1 (intramuscular)	4	3.5±1.4	0±0	96.8	100
2 (intramuscular)	6	1.7±1.1	0±0	98.3	100
3 (intramuscular)	8	0.8±0.6	0±0	99.2	100
4 Triclabendazol (14 , oral)	12	0.1±0.1	0±0	99.9	100
5 (grupo control)	Sin tratamiento	102.6±12.3	31.5±4.7	0	0

^aEE. Error estándar.

Las formulaciones parenterales presentan algunos desafíos únicos en comparación con las formulaciones orales. Los dos más evidentes son la necesidad de esterilidad y que la formulación para uso intravenoso debe estar libre de partículas. La esterilidad se puede lograr ya sea a través de filtración estéril o esterilización por calor. Los profármacos por su diseño, están destinados a ser metaestables para ser escindidos por vía química o enzimática y generar el fármaco activo. La mayoría de las soluciones de profármacos no pueden ser esterilizadas por calor; debido a que son demasiado inestables químicamente a temperatura ambiente para ser formuladas como soluciones listas para su uso, incluso cuando el profármaco requiere escisión enzimática. Como resultado, muchos profármacos parenterales se formulan como productos liofilizados para evitar la hidrólisis.⁷⁶

Cabe resaltar que **MFR-33** y **MFR-34** se administraron disueltos únicamente en agua desionizada, sin previa formulación. Por esta razón, es necesario utilizar tecnología farmacéutica para obtener una formulación adecuada para dichos profármacos. Por lo anterior, es probable mejorar la actividad fasciolicida con el uso de algunos excipientes.

Los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** a diferencia del Fasiject[®]Plus (Agrovvetmarket S.A.) tienen una serie de ventajas, como por ejemplo la disminución de la dosis administrada obteniendo actividad fasciolicida similar a los compuestos precursores, al administrar menores dosis se excreta menor cantidad de compuestos obteniendo como respuesta menor contaminación ambiental; además de generar un nuevo compuesto altamente hidrosoluble del triclabendazol (**MFR-34**) se obtuvo también un nuevo compuesto bioisómero del triclabendazol es decir a **MFR-33** el cual no ha reportado ninguna resistencia.

Capítulo 7. Conclusiones

Después de diseñar y sintetizar los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** para incrementar la solubilidad acuosa del compuesto alfa (**13**) y triclabendazol (**14**), los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron que el diseño aplicado a estos derivados biorreversibles presentó características que los ubican con las mejores perspectivas para dicho cometido.

En las primeras pruebas para sintetizar los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** se observó que al utilizar los compuestos **17** y **18** como intermediarios con un grupo hemiaminal presentan estabilidad bajo ciertas condiciones de reacción y que al modificarlas para obtener los derivados de interés provocan la descomposición de dichos intermediarios, por lo tanto, bajo las condiciones utilizadas en esta investigación no fueron idóneas para generar los profármacos deseados.

Se lograron obtener dos nuevos compuestos altamente hidrosolubles del triclabendazol (**MFR-34**) y del compuesto alfa (**MFR-33**). Estas sales de fosfato disódico (**MFR-33** y **MFR-34**) se escalaron de 1-25 g con un rendimiento global de 84%. Para la síntesis de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** se utilizaron varios compuestos intermediarios (**27**, **22** y **24**) obtenidos con bajos rendimientos y relativamente costosos; sin embargo, a pesar de estas desventajas actualmente existen alternativas que pueden utilizarse para mejorar estas características. En la síntesis de **29**, **30**, **31**, **32**, **MFR-33** y **MFR-34**, se obtuvieron como mezcla de regioisómeros en una proporción 50:50, logrando aislar y caracterizar a **29a**.

Se determinó la solubilidad acuosa de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** demostrando que al impedir la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares y agregar un grupo ionizable al compuesto alfa y triclabendazol, se logró incrementar la solubilidad acuosa, favoreciendo la interacción soluto-disolvente. La solubilidad acuosa de los compuestos precursores (**13**, 2.6×10^{-4} mg/mL; **14**, 2.4×10^{-4} mg/mL) se mejoró en gran medida por los profármacos **MFR-33** y **MFR-34**, observando una solubilidad de 20.67 mg/mL y 21.12 mg/mL, es decir, se consiguió aumentar la solubilidad acuosa 79,500 y 88,000 veces, en comparación con sus compuestos precursores.

Los compuestos **MFR-33** y **MFR-34** mostraron una estabilidad acuosa >95% después de 26 horas a pH de 1 y 7.4, lo que es ideal para la formulación desde un punto de vista fisiológico.

Con estos resultados, se demostró que **MFR-33** y **MFR-34** tienen suficiente estabilidad acuosa para confirmar que el compuesto administrado al ganado se trata del profármaco y no de los compuestos precursores, garantizando la administración de los profármacos a una población considerable de animales sin que los compuestos en solución sufran degradación.

La disposición de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** para liberar al compuesto alfa (**13**) y triclabendazol (**14**), respectivamente, en una solución de fosfatasa alcalina, indica que los profármacos son sustrato de esta enzima y que esta liberación es adecuada ya que no mostró síntomas anormales en el animal (como la hidrólisis del compuesto y la posterior precipitación) y el efecto fasciolicida se conservó, disminuyendo la dosis administrada. Una característica importante del compuesto alfa bioisómero del triclabendazol, es que no ha reportado ninguna resistencia y que elimina a las cepas resistentes a este fármaco de elección.

Con la intención de evaluar la actividad intrínseca de **MFR-33** frente a *F. hepatica*, se llevaron a cabo estudios *in vitro* con el parásito recién desenquistado (fase juvenil). Los resultados indican que **MFR-33** por sí mismo tiene actividad fasciolicida o que se hidroliza con el tiempo generando al compuesto precursor.

El profármaco **MFR-33** se evaluó *in vivo* en ovinos contra *F. hepatica* de 10 semanas de edad, administrado por vía oral, intramuscular y subcutánea. Los resultados muestran una eficacia de 87.8% a una dosis intramuscular de 4 mg/kg obteniendo la mejor actividad fasciolicida en comparación a la vía oral y subcutánea. Además, los resultados demuestran una actividad fasciolicida similar al compuesto precursor administrado por vía oral (**13**, 86.9% y 15 mg/kg). Sin embargo, la reducción de huevos (50.8%) por vía intramuscular no fue tan alentadora como la reducción de fasciolas. Por otro lado, posiblemente **MFR-33** administrado por vía oral se hidroliza rápidamente generando a su compuesto precursor (**13**) obteniendo mala absorción y generando actividad fasciolicida similar a **13**. Además, por vía intramuscular la escisión de **MFR-34** en el hígado es suficientemente rápida para proporcionar niveles eficaces del fármaco activo y generar buena actividad fasciolicida.

Al evaluar *in vivo* al profármaco **MFR-34** los resultados por vía intramuscular demuestran buena actividad fasciolicida (4 mg/kg, 96.8%; 6 mg/kg, 98.3%; 8 mg/kg 99.2%) en comparación a la obtenida por el fármaco de elección (**14**, 15 mg/kg, 99%) administrada por vía oral. Por otro lado, se aprecia que **MFR-34** en todas las concentraciones reduce la emisión de huevos de *F.*

hepatica al 100% al igual que triclabendazol por vía oral. De manera similar que **MFR-33**, **MFR-34** administrado por vía intramuscular disminuyó la dosis obteniendo resultados similares al fármaco precursor (**14**).

Al realizar las diferentes reacciones para obtener los compuestos **13** y **14**, los cuales se utilizaron como materias primas para obtener los profármacos **MFR-33** y **MFR-34** se demostró que la reacción de S_NAr para obtener **7** y **8** manifestaba pobre rendimiento, afectando el rendimiento global. Al estudiar la reacción de S_NAr se logró optimizar este proceso utilizando como materia prima 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (**3**) y vacío, consiguiendo aumentar el rendimiento de la reacción (90%), en comparación al reportado (71%).

Además de comprobar la identidad del compuesto alfa por técnicas espectroscópicas y espectrométricas, se logró obtener cristales para realizar estudios de difracción de rayos x. En este estudio se observaron en la celda unitaria interacciones intermoleculares como π - π y puentes de hidrógeno que mantienen unidas a estas moléculas, estas interacciones son las causantes de la pobre solubilidad acuosa que caracterizan a los compuestos bencimidazólicos.

Capítulo 8. Procedimiento experimental

Para mayor claridad, esta sección se divide en tres partes. La primera, involucra la síntesis del compuesto alfa, triclabendazol y sus profármacos. La segunda, la analítica, se presenta la determinación de la solubilidad acuosa, estabilidad acuosa e hidrólisis enzimática de los profármacos **MFR-33** y **MFR-34**. La tercera, la biológica, se describe la evaluación de la eficacia *in vitro* e *in vivo* sobre *Fasciola hepatica*.

8.1 Parte Química

8.1.1 Instrumentación y materiales

Tanto en la síntesis como en la evaluación se utilizaron los siguientes instrumentos.

- El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria OHAUS E4000, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.
- Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla automática IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.
- La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida por medio de un rotaevaporador Büchi R-114 con baño B-480 acoplado a una bomba de vacío marca Gast 0523-V47-6528DX ajustada a 50 mmHg y un condensador de alta eficiencia conectado a un enfriador VWR Scientific modelo 1107, o bien, acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un elemento refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC30. Para disminuir la presión del Sistema se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2.
- Las cromatografías en capa fina (CCF) para el monitoreo de reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® F254 20X20 cm. Como revelador se utilizó una lámpara UV UVGL-25 Mineralight®. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck® con una distribución de tamaño de partícula de 0.2-0.5 mm.
- La hidrogenación catalítica se realizó empleando un hidrogenador marca Parr Modelo 3916 EG con 60 lb/pulg² y 250 cc como máxima capacidad, utilizando un tanque de hidrógeno de la casa INFRA y como catalizador Ni-Raney (al 30%) de la casa Aldrich.

- El punto de fusión (*pf*) de los intermediarios y los compuestos finales, se determinaron en un aparato Büchi B-540, utilizando capilares de vidrio; dichos puntos de fusión no se encuentran corregidos.
- Los espectros de Infrarrojo (IR), se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer de transformada de Fourier modelo Spectrum 400. Los espectros se obtuvieron con el accesorio de reflectancia por ATR. La frecuencia de las señales se reporta en cm^{-1} .
- Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ^1H) se realizaron en espectrómetros Varian modelo Unity Inova de 300 y 400 MHz usando tetrametilsilano como referencia interna. Los disolventes deuterados empleados fueron dimetilsulfóxido, y agua. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm. Las constantes de acoplamiento *J* se dan en Hertz. Los símbolos correspondientes a la multiplicidad de las señales son: s = señal simple, d = señal doble, dd = señal doble de doble, t = señal triple, m = señal múltiple.
- El análisis de difracción de rayos X se utilizó un Difractómetro Gemini Oxford Diffraction Xcalibur Atlas.
- Los espectros de masas (EM) se realizaron por introducción directa en un espectrómetro de masas JEOL modelo JMS-SX102A utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) o mediante la técnica FAB+. También la espectroscopia de masas de alta resolución se llevó a cabo en un Waters Synapt® G2-S acoplado con una fuente de ionización electrospray (IES). La simbología empleada es: m/z (masa/carga), M+ (ión molecular), M+1, M+2, M+Na (picos isotópicos).

8.1.2 Sistemas cromatográficos

Para el desarrollo experimental de este trabajo se usan los sistemas cromatográficos que se muestran en la **Tabla 8.1**.

Tabla 8.1. Sistemas cromatográficos utilizados en este trabajo.

Sistema	Componentes	Proporción
I	Cloroformo-Metanol	95:5
II	Cloroformo-Metanol	99:1
III	Cloroformo-Metanol	90:10
IV	Cloroformo-Metanol	98:8
V	Hexano-Cloroformo-Acetato de etilo	50:35:15

8.1.3 Procedimientos sintéticos

8.1.3.1 Síntesis de los intermediarios

8.1.3.1.1 *N*-(3,4-Diclorofenil)acetamida (2)

A 25.52 g (23.8 mL, 250 mmol, 1.5 eq) de anhídrido acético se añadieron lentamente 27 g (166.6 mmol, 1 eq) de 3,4-dicloroanilina pulverizada (**1**) con agitación constante utilizando una varilla de teflón y manteniendo la temperatura debajo de 60 °C. Se continuó la agitación por 30 minutos y se formó un sólido café claro, el cual se dejó en reposo 15 min. Posteriormente se adicionaron 50 mL de agua, el sólido formado se filtró, pulverizó en un mortero y se lavó con agua hasta pH neutro. El producto crudo se secó en la estufa a 77 °C hasta peso constante. Se obtuvieron 31.95 g (94%) de un sólido blanco el cual mostró ser un solo compuesto por ccf con R_f de 0.30 Sistema I y pf de 123.7-124.3 °C. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.08 (s, 3H), 7.48 (dd, 1H, $J=8.8$, 2.4 Hz), 7.57 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 8.00 (d, 1H, $J=2.4$ Hz), 10.26 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.1, 119.0, 120.1, 124.4, 130.6, 130.9, 139.4, 168.9. EM (EI, ID) m/z : 203 (M^+ , 30%), 161 ($\text{M}-42$, 100%). Apéndice de espectros, páginas 115-117 (espectros 1-3).

8.1.3.1.2 *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3)

Se disolvieron 30.82 g (151 mmol, 1 eq) del compuesto **2** en 123 mL de H_2SO_4 concentrado previamente enfriado en un baño de hielo y manteniendo la temperatura entre 5-10 °C. De manera simultánea, se preparó la mezcla sulfonítrica con 8.18 mL de HNO_3 (181.2 mmol, 1.2 eq) que se agregaron lentamente sobre 20 mL de H_2SO_4 , evitando que la temperatura se elevará por encima de 10 °C. Posteriormente, la mezcla sulfonítrica se agregó gota a gota al compuesto **2** disuelto en H_2SO_4 , a 5-10 °C y se dejó reaccionar por 30 minutos más. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió sobre 2 kg de hielo agitando con una varilla de teflón y el sólido formado de color amarillo pálido se separó por filtración al vacío, se lavó con abundante agua hasta pH neutro, se dejó secar al aire. El sólido crudo se suspendió en 80 mL de metanol frío, se agitó y se filtró con vacío. Se obtuvieron 30.09 g (80%) de un sólido amarillo pálido el cual mostró ser un solo compuesto por ccf con R_f de 0.39 Sistema II y pf de 125.8-126.5 °C. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.13 (s, 3H), 8.01 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 10.43 (sa, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 23.9, 126.3, 127.0, 127.0, 131.7, 136.8, 141.1, 169.3. EM (EI, ID) m/z : 206 (M^+ , 100%), 160 ($\text{M}-46$, 28%), 133 ($\text{M}-73$, 30%). Apéndice de espectros, páginas 119-121 (espectros 5-7).

8.1.3.1.3 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (4)

A una suspensión de 29.98 g (120.4 mmol) del compuesto **3** en 50 mL de MeOH, se le adicionó lentamente, una solución de 9.63 g (240.8 mmol, 2 eq) de NaOH en 5 mL de H₂O y se calentó a una temperatura entre 70-80 °C durante 15 minutos con agitación magnética. Finalmente, la mezcla de reacción se vertió en 300 g de hielo-agua, formando un sólido amarillo que se separó por filtración al vacío y se lavó con agua helada hasta pH neutro. Se obtuvieron 22.68 g (91%) de un sólido amarillo que mostró ser un solo compuesto en ccf con R_f de 0.57 Sistema II y pf 178.8-179.5 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 7.30 (s, 1H), 7.65 (sa, 2H), 8.14 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 116.8, 120.3, 126.9, 129.7, 138.7, 145.6. EM (EI, ID) m/z : 206 (M⁺, 100%), 160 (M-46, 68%), 133 (M-73, 70%). Apéndice de espectros, páginas 123-125 (espectros 9-11).

8.1.3.1.4 Procedimiento general de S_NAr (7 y 8)*8.1.3.1.4.1 A partir de 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (4)*

En un matraz de 250 mL, acondicionado con termómetro, columna Vigreux y atmósfera de nitrógeno, se preparó una suspensión de **4** (97 mmol, 1 eq.), **5** ó **6** (106.7 mmol, 1.1 eq.) y K₂CO₃ (145.5 mmol, 1.5 eq) en 72 mL de DMF y 2 mL de H₂O. Luego, la mezcla se calentó a 115 °C durante 6 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Terminada la reacción (ccf) se eliminó el disolvente a presión reducida, el producto resinoso se suspendió en 100 mL de H₂O y se agitó durante 24 horas para obtener un sólido de color café, el cual se separó por filtración al vacío y dejó secar con succión. El producto se purificó por filtración sobre alúmina neutra, en una relación de 1g del compuesto **7** u **8** por 5 g de alúmina, usando CH₂Cl₂ como fase móvil. Posteriormente, el filtrado se concentró a presión reducida obteniendo el compuesto crudo correspondiente (**7** u **8**), el cual se usó como tal en reacciones posteriores.

8.1.3.1.4.2 A partir de N-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3)

En un matraz de 100 mL, acondicionado con termómetro, columna Vigreux y vacío de 150-200 mmHg del laboratorio (250 mm de Hg) se preparó una solución de **3** (40.15 mmol), **5** ó **6** (44.16 mmol, 1.1 eq) y K₂CO₃ (60.22 mmol, 1.5 eq) en 40 mL de DMF. Luego se calentó a 70 °C durante 6 horas. Terminada la reacción se eliminó la DMF a presión reducida, se agregaron 100 mL de agua y se obtuvo un sólido amarillo. El producto crudo se suspendió en 30 mL de MeOH

frio, se agitó y se filtró con vacío, se lavó con 10 mL de MeOH helado y se dejó secar. El producto obtenido se usó como tal en reacciones posteriores.

8.1.3.1.4.1.1 Síntesis de 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (7)

Empleando el método 8.1.3.1.4.1 se obtuvieron 21.98 g (72%) de **7** como un sólido amarillo intenso, el cual mostró una mancha principal por ccf con R_f de 0.56 Sistema III. Una muestra analítica se recrystalizó de MeOH dando 95% de cristales amarillo-naranja con pf 145.8-146.5 °C. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.25 (s, 1H), 7.39 (dd, 1H, $J= 7.5, 0.9$ Hz), 7.46 (sa, 2H), 7.58-7.66 (m, 3H), 7.82 (dd, 1H, $J= 7.5, 2.2$ Hz), 7.95 (d, 1H, $J= 8.4$ Hz), 8.08 (dd, 1H, $J= 6.9, 2.3$ Hz), 8.20 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 104.0, 110.0, 117.7, 121.2, 126.2, 126.3, 126.5, 126.8, 127.6, 127.6, 127.7, 128.8, 135.3, 147.4, 149.6, 159.6. EM (EI, ID) m/z : 314 (M^+ , 95%), 279 ($M-35$, 80%), 233 ($M-81$, 100%). Apéndice de espectros, páginas 133-135 (espectros 19-21).

8.1.3.1.4.1.2 Síntesis de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (8)

Empleando el método 8.1.3.1.4.1 se obtuvieron 22 g (68%) de un sólido amarillo intenso, el cual mostró una mancha principal por ccf con R_f de 0.60 Sistema III. Una muestra analítica se recrystalizó de MeOH dando 92% de cristales amarillo-naranja con pf 149-150 °C. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.32 (s, 1H), 7.44 (dd, 1H, $J= 8.2, 1.5$ Hz), 7.55, (sa, 2H), 7.56 (t, 1H, $J= 8.2$ Hz), 7.70 (dd, 1H, $J= 8.1, 1.5$ Hz), 8.18 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 104.1, 109.7, 122.3, 125.0, 126.6, 127.8, 128.6, 130.1, 133.7, 147.3, 151.1, 156.7. EM (EI, ID) m/z : 332 (M^+ , 65%), 262 ($M-70$, 100%), 251 ($M-81$, 45%). Apéndice de espectros, páginas 156-158 (espectros 42-44).

8.1.3.1.4.2.1 Síntesis de N-[4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (15)

Empleando el método 8.1.3.1.4.2 se obtuvieron 12.9 g (90%) de un sólido amarillo, el cual mostró una mancha principal por ccf con R_f de 0.58 Sistema IV. Una muestra analítica se recrystalizó de MeOH dando 90% de cristales amarillos con pf 176-177 °C. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.93 (s, 3H), 7.10 (s, 1H), 7.39 (d, 1H, $J= 7.3$ Hz), 7.56-7.65 (m, 3H), 7.85 (d, 1H, $J= 7.6$ Hz), 7.94 (d, 1H, $J= 8.2$ Hz), 8.07 (d, 1H, $J= 7.7$ Hz), 8.31 (s, 1H), 10.21 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.0, 111.2, 117.2, 117.6, 121.2, 126.1, 126.5, 126.7, 127.7, 127.7,

127.8, 128.8, 133.1, 135.2, 136.6, 149.8, 157.9, 169.0. EM (EI, ID) m/z : 356 (M^{+} , 100%), 310 ($M-46$, 45%), 279 ($M-77$, 78%). Apéndice de espectros, páginas 129-131 (espectros 15-17).

8.1.3.1.4.2 Síntesis de N-[4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (16)

Empleando el método 8.1.3.1.4.2 se obtuvieron 13.1 g (87%) de un sólido amarillo pálido, el cual mostró una mancha principal por ccf con R_f de 0.56 Sistema IV. Una muestra analítica se recrystalizó de MeOH obteniendo 92% de cristales amarillo-naranja con pf 160.5-161.2 °C. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.04 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.43 (dd, 1H, $J = 8.1, 1.4$ Hz), 7.56 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.69 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.4$ Hz), 8.31 (s, 1H), 10.32 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.1, 111.2, 117.6, 121.9, 124.8, 127.9, 128.6, 130.1, 133.1, 133.8, 137.1, 151.2, 156.0, 169.2. EM (EI, ID) m/z : 374 (M^{+} , 20%), 332 ($M-42$, 100%), 262 ($M-112$, 45%). Apéndice de espectros, páginas 152-154 (espectros 38-40).

8.1.3.1.4 Procedimiento general para hidrólisis de acetamidas 15 y 16 en medio básico

En un matraz de 100 mL, equipado con termómetro y agitación magnética, se trató una suspensión de **15** ó **16** (36.2 mmol, 1 eq.) en 50 mL de MeOH con una solución de 54.3 mmol (1.5 eq) de NaOH en 5 mL de H₂O y se calentó a una temperatura entre 70-80 °C durante 15 minutos. La mezcla de reacción se dejó llegar a la temperatura ambiente y luego se vertió sobre 100 g de hielo-agua. El sólido anaranjado que se formó se separó por filtración al vacío y se lavó con agua helada hasta pH neutro. Este producto mostró las mismas características físicas, espectroscópicas y espectrométricas expuestas en el punto 8.1.3.1.4.1.1 y 8.1.3.1.4.1.2, pero aumentado los correspondientes rendimientos de los compuestos deseados (**7**, 10.8 g, 95%; **8**, 11.4 g, 96%).

8.1.3.1.5 Procedimiento general para hidrogenación catalítica

Una mezcla de **7** u **8** (38.12 mmol), 30% en peso de Ni-Raney y 150 mL de metanol se agitó con cargas constantes de 60 lb/in² de hidrógeno hasta consumirse la materia prima. El catalizador se eliminó por filtración al vacío sobre Celita y el filtrado se concentró a presión reducida con lo que se obtuvo la diamina correspondiente (**9-10**). Los productos de reducción se sometieron sin previa purificación a la siguiente reacción.

8.1.3.1.6 Procedimiento general de ciclocondensación

En un matraz de tres bocas de 250 mL, equipado con termómetro, refrigerante en posición de reflujo, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se preparó xantato de etilpotasio mezclando KOH (60 mmol, 1.5 eq), 30 mL de EtOH-H₂O en una relación 80:20, CS₂ (60 mmol, 1.5 eq) y agitando durante 30 minutos. Posteriormente, se agregó lentamente una solución de la *o*-fenilendiamina **9** ó **10** cruda en etanol (30 mL) y la mezcla se calentó a reflujo a 60 °C durante 4 horas, después se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 150 mL de H₂O, se neutralizó con ácido acético al 10% y se formó un sólido blanco. El sólido se separó por filtración al vacío y se lavó con H₂O repetidas veces hasta alcanzar pH neutro.

8.1.3.1.6.1 Síntesis de 5-Cloro-2-(mercapto)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**11**)

Se obtuvieron 11.10 g (85%) de un sólido beige que mostró ser un solo compuesto por ccf con *R_f* de 0.4 Sistema III, y *pf* 273-275 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6) δ: 6.75 (d, 1H, *J*=7.6 Hz), 6.85 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.40 (t, 1H, *J*=8.0 Hz), 7.35-7.38 (m, 2H), 7.68 (d, 1H, *J*=8.2 Hz), 7.96-7.98 (m, 1H), 8.15-8.18 (m, 1H), 12.60 (sa, 2H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6) δ: 102.8, 111.1, 111.4, 119.4, 121.7, 123.5, 125.4, 126.5, 126.8, 127.4, 128.3, 130.1, 132.6, 134.9, 147.5, 153.2, 170.2. EM (EI, ID) *m/z*: 326 (M⁺, 100%), 291 (M-35, 60%). Apéndice de espectros, páginas 137-139 (espectros 26-28).

8.1.3.1.6.2 Síntesis de 5-Cloro-2-(mercapto)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol (**12**)

Se obtuvieron 12.02 g (87%) de un sólido beige que mostró ser un solo compuesto por ccf con *R_f* de 0.35 Sistema III y *pf* 294-295 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6) δ: 6.80 (dd, 1H, *J*=8.3, 1.4 Hz), 6.98 (s, 1H), 7.32 (t, 1H, *J*=8.2 Hz), 7.36 (s, 1H), 7.44 (dd, 1H, *J*=8.1, 1.4 Hz), 12.75 (s, 1H), 12.79 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6) δ: 103.2, 111.2, 116.4, 119.5, 121.8, 125.3, 129.3, 130.7, 132.6, 133.4, 146.1, 154.6, 170.4. EM (EI, ID) *m/z*: 344 (M⁺, 100%), 274 (M-70, 70%). Apéndice de espectros, páginas 160-162 (espectros 46-48).

8.1.3.1.7 Procedimiento general de S-alquilación con yoduro de metilo

Una mezcla de **11** ó **12** (40 mmol), KOH (44 mmol, 1.1 eq) y 36 mL de acetona se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La solución oscura resultante se colocó en un baño de hielo y se enfrió entre 0-5 °C. Posteriormente se agregaron gota a gota 4 mmol (1 eq) de yoduro de metilo diluido en 5 mL de acetona. Culminada la adición, la mezcla se agitó a

temperatura ambiente durante 30 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida, consecutivamente, la mezcla se vertió sobre 100 mL de agua y se neutralizó con una solución de HCl al 20%. El sólido resultante se separó por filtración al vacío; inmediatamente, se sometió a una filtración en columna con alúmina neutra utilizando una relación de 1 g del compuesto **13** ó **14** y 5 g de alúmina neutra como fase móvil CH₂Cl₂.

8.1.3.1.7.1 Síntesis de 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**13**)

Se obtuvieron 12.95 g (95%) de un sólido blanco que mostró ser un solo compuesto por ccfc con R_f de 0.4 Sistema III. Se recrystalizó de MeOH dando 80% de cristales con pf 192-193 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 2.69 (s, 1H), 6.64 (d, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.27 (s, 1H), 7.37 (t, 1H, $J=8.0$ Hz), 7.62-7.54 (m, 2H), 7.64 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.72 (s, 1H), 7.93-8.00 (m, 1H), 8.23-8.30 (m, 1H), 12.73 (sa, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 14.3, 110.2, 119.2, 121.8, 122.8, 125.3, 126.4, 126.5, 127.2, 128.2, 134.9, 146.3, 153.9, 154.2. EM (EI, ID) m/z : 340 (M⁺, 100%), 305 (M-35, 65%), 290 (M-50, 55%). Apéndice de espectros, páginas 141-143 (espectros 27-29).

8.1.3.1.7.2 Síntesis de 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol (**14**)

Se obtuvieron 13.23 g (92%) de un sólido blanco que mostró ser un solo compuesto en ccfc con R_f 0.45 Sistema III. Se recrystalizó de MeOH dando 85% de cristales con pf 176-177 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 2.73 (s, 1H), 6.68 (dd, 1H, $J=8.3, 1.4$ Hz), 7.28 (t, 1H, $J=8.2$ Hz), 7.38 (s, 1H), 7.39 (dd, 1H, $J=8.1, 1.4$ Hz), 7.72 (s, 1H), 12.84 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 14.9, 106.3, 115.3, 116.5, 120.9, 121.9, 125.5, 129.3, 133.4, 133.9, 135.6, 146.9, 154.4, 154.9. EM (EI, ID) m/z : 358 (M⁺, 100%), 327 (M-31, 85%). Apéndice de espectros, páginas 164-166 (espectros 50-52).

8.1.3.2 Síntesis de los productos finales

8.1.3.2.1 Procedimiento general para la síntesis de hidroximetilbencimidazoles

Una suspensión de **13-14** (23.47 mmol), formaldehído (35.20 mmol, 1.5 eq, solución de formaldehído al 37% m/m en agua, 10-15% de metanol como estabilizador y 25 mL de CH₂Cl₂, se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas bajo atmósfera de N₂. Culminada la reacción, la mezcla se colocó en un embudo de separación para eliminar el agua contenida en el formaldehído y la fase orgánica se secó sobre una cama de Na₂SO₄ anhidro. Por último, se eliminó el disolvente

al vacío. Se formó un sólido blanco, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con 10 mL de una mezcla fría de hexano-CHCl₃ (60:40).

8.1.3.2.1.1 Síntesis de 6-Cloro-1-(hidroximetil)-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (17a) y 5-Cloro-1-(hidroximetil)-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (17b)

Se obtuvieron 6.52 g (75%) de un sólido blanco que mostró ser dos compuestos en ccf con R_f 0.25 y 0.3 Sistema II y pf 134.5-135 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 2.74 (s, 3H), 2.77 (s, 3H), 5.45 (d, 2H, $J=7.1$ Hz), 5.55 (d, 2H, $J=7.1$ Hz), 6.63 (d, 1H, $J=4.8$ Hz), 6.66 (d, 1H, $J=4.9$ Hz), 6.82 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 6.91 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 7.35-7.50 (m, 3H), 7.58 (s, 1H), 7.60-7.73 (m, 6H), 7.88 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.98-8.06 (m, 2H), 8.28-8.39 (m, 2H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 14.6, 14.7, 67.0, 67.1, 104.6, 109.9, 109.9, 111.1, 112.0, 119.0, 119.7, 120.1, 121.7, 121.8, 122.7, 122.8, 125.2, 125.2, 126.4, 126.5, 126.6, 127.3, 127.3, 128.2, 133.8, 134.9, 134.9, 135.8, 141.1, 143.0, 146.3, 146.5, 153.9, 153.9, 155.2, 155.4. Apéndice de espectros, páginas 145-147 (espectros 31-33).

8.1.3.2.1.2 Síntesis de 6-Cloro-1-(hidroximetil)-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol (18a) y 6-Cloro-1-(hidroximetil)-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol (18b)

Se obtuvieron 7.13 g (78%) de un sólido blanco que mostró ser dos compuestos en ccf con R_f 0.27 y 0.31 Sistema II y pf 144-145 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 2.74 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 5.46 (d, 2H), 5.53 (d, 2H), 6.64-6.72 (m, 2H), 7.34-7.26 (m, 2H), 7.35-7.45 (m, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.90 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 14.6, 14.7, 67.0, 67.1, 104.4, 111.1, 115.5, 115.7, 119.0, 119.3, 119.6, 121.4, 124.8, 124.8, 129.1, 129.2, 133.3, 133.3, 134.2, 135.7, 141.4, 143.0, 145.3, 145.5, 155.0, 155.1, 155.6, 155.8. Apéndice de espectros, páginas 168-170 (espectros 54-56).

8.1.3.2.2 Procedimiento general para la síntesis de acetiloximetilbencimidazoles

Una mezcla de **17a-b** o **18a-b** (16.17 mmol), 4-dimetilaminopiridina (5.39 mmol, 0.3 eq) y 50 mL de CH₂Cl₂ se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos; enseguida se agregó lentamente anhídrido acético (24.5 mmol, 1.5 eq). Culminada la adición, se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se lavó dos veces con 20 mL agua carbonatada al 5% y se secó sobre una cama de Na₂SO₄ anhidro. Finalmente se eliminó el disolvente al vacío generando un sólido blanco, se filtró y se lavó con hexano frío.

8.1.3.2.2.1 Síntesis de Acetato de [6-Cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (**20a**) y Acetato de [5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (**20b**)

Se obtuvieron 6.00 g (90%) de un sólido blanco que mostró ser dos compuestos en ccf con R_f 5.2 y 5.6 Sistema II y pf 172-173 °C. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.06 (s, 3H), 2.17 (s, 0.65H), 2.80 (s, 0.68H), 5.92 (s, 2H), 6.03 (s, 0.45H), 6.74 (d, 1H, $J=7.6$ Hz), 6.84 (d, 0.1H, $J=7.6$ Hz), 6.91 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 7.26 (s, 1H), 7.41-7.31 (m, 1.5H), 7.49-7.70 (m, 4H), 7.85 (s, 1H), 7.90-7.92 (m, 2H), 8.36-8.44 (m, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.8, 20.7, 65.3, 110.0, 110.9, 111.7, 121.0, 122.0, 123.2, 125.7, 126.0, 126.7, 127.8, 132.6, 135.0, 142.6, 149.0, 153.3, 155.5, 170.1. EM (EI, ID) m/z : 412 (M^+ , 100%), 340 ($M-72$, 35%), 305 ($M-107$, 40%). Apéndice de espectros, páginas 148-150 (espectros 34-36).

8.1.3.2.2.2 Síntesis de 6-Cloro-1-acetilmetil-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-H-bencimidazol (**21a**) y 5-Cloro-1-acetilmetil-2-metiltio-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-H-bencimidazol (**21b**)

Se obtuvieron 5.93 g (85%) de un sólido blanco que mostró ser dos compuestos en ccf con R_f 0.33 y 0.41 Sistema II y pf 113-114 °C. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.06 (s, 3H), 2.11 (s, 1H), 2.76 (s, 1H), 2.77 (s, 3H), 7.27-7.35 (m, 1.35H), 7.40-7.44 (m, 1.23H), 7.50 (s, 0.24H), 7.63 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.98 (s, 0.27H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.4, 20.4, 65.9, 104.2, 115.4, 118.9, 119.8, 121.1, 124.6, 128.8, 132.9, 135.4, 140.6, 145.3, 154.4, 155.8, 169.7. EM (EI, ID) m/z : 430 (M^+ , 100%), 327 ($M-31$, 85%). Apéndice de espectros, páginas 170-172 (espectros 56-58).

8.1.3.2.3 Síntesis de intermediarios con fósforo

8.1.3.2.3.1 Síntesis de fosfato monohidrógeno de di-*terc*-butilo (**24**)

Una mezcla de 25 mL (25 g, 128.08 mmol) de fosfito de di-*terc*-butilo (**22**), 10.75 g (128.08 mmol, 1 eq) de $NaHCO_3$ y 80 mL de agua desionizada se agitó a 0 °C en un baño de hielo-sal, una vez alcanzada la temperatura se dejó reaccionar por 20 minutos, posteriormente se dividieron 16.19 g (102.47 mmol, 0.8 eq) de $KMnO_4$ en 3 partes iguales y se agregaron cada 20 minutos a la reacción. Se observó la formación de un precipitado de color café y la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora, después se filtró al vacío y el sólido café residual se lavó con 10 mL de agua desionizada. Las aguas madres de color púrpura se trataron con 2 g de carbón activado y se colocaron a reflujo durante 15 minutos a 60 °C, luego se filtró al

vacío sobre una cama de Celita y se lavó con 10 mL de agua desionizada. Las aguas madres traslucidas obtenidas, se colocaron en un baño de hielo-sal a 0 °C y se agregó gota a gota HCl concentrado hasta pH 1 (se monitoreó el pH conforme se agregó el HCl). El sólido blanco que se obtuvo se separó por filtración con vacío, se lavó con 5 mL de agua desionizada fría y se dejó secar al aire. Este producto se disolvió en cloroformo y se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío originando 24.1 g (89%) de un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.38 (s, 18H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 29.7 (d, *J*= 4.3 Hz), 79.6 (d, *J*= 6.9 Hz); RMN ³¹P (122 MHz, DMSO-*d*₆,) δ: -9.03 (s). Apéndice de espectros, páginas 177-179 (espectros 63-65).

8.1.3.2.3.2 Síntesis de fosfato de di-*terc*-butiltetrametilamonio (35)

Una suspensión de 20 g (95.14 mmol) de fosfato monohidrógeno de di-*terc*-butilo (**24**) y 80 mL de acetona se agitó a 0 °C en un baño de hielo-sal durante 30 minutos con agitación vigorosa. Posteriormente, se agregaron lentamente 25.86 mL (95.14 mmol) de hidróxido de tetrametilamonio (el hidróxido de tetrametilamonio se tomó de una solución al 25% en agua) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Culminado el tiempo, el disolvente se removió a presión reducida para dar un semi-sólido. Finalmente se agregaron 10 mL de hexano y se colocó en refrigeración durante 24 horas. Se obtuvieron 23.4 g (87%) de un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.25 (s, 18H), 3.14 (s, 12H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 30.3 (d, *J*= 4.2 Hz), 54.3 (t, *J*=4.1), 72.8 (d, *J*= 7.2 Hz); RMN ³¹P (122 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -7.79 (s). Apéndice de espectros, páginas 180-182 (espectros 66-68).

8.1.3.2.3.3 Síntesis de clorosulfato de clorometilo (27)

En un matraz bola de tres bocas de 250 mL, equipado con embudo de adición, termómetro y baño de hielo sal, se colocaron 20 mL (300 mmol, 2 eq) de ácido clorosulfónico (**25**) y se le agregaron lentamente 10 mL (150 mol) de bromoclorometano (**26**). Posteriormente, se adaptó un refrigerante con trampas de NaOH y se procedió a calentar a reflujo (70 °C) con agitación durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se dejó llegar a temperatura ambiente y se vertió lentamente sobre 50 g de hielo. Se extrajo con CH₂Cl₂ (20 x2 mL). Los extractos orgánicos se reunieron y se lavaron con 10 mL de agua fría, consecutivamente se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se destiló de bulbo-bulbo a presión reducida (utilizando un horno de vidrio para microdestilaciones Kugelrohr) y se colectó el compuesto

deseado a 59 °C, 16 mmHg. Se obtuvieron 5 g de **27** como un aceite traslúcido con un rendimiento de 20.2%. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5.58 (s). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55.8. Apéndice de espectros, páginas 174-176 (espectros 60-62).

8.1.3.2.3.4 Síntesis de fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**28**)

Una suspensión de 20 g (70.58 mmol) de fosfato de di-*terc*-butiltetrametilamonio (**35**), 23.71 g (282.34 mmol) de NaHCO₃ en 150 mL de agua desionizada y 2.39 g (7.05 mmol) de TBAHS (sulfato monohidrógeno de tetrabutylamonio) se agitó a 0 °C por 10 minutos y posteriormente se agregaron 80 mL de CH₂Cl₂. Consecutivamente se agregó, gota a gota, una mezcla de 13.97 g (9.65 mL, 84.70 mmol) de clorosulfato de clorometilo (**27**) en 60 mL de CH₂Cl₂ y terminada la adición, la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La fase orgánica se separó, se lavó con 40 mL de una solución saturada de NaCl y con 40 mL de una solución al 2% de NaHCO₃. Por último, la fase orgánica se secó sobre una cama de Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el CH₂Cl₂ a presión reducida (a 20 °C). Se formó un aceite de color amarillo pálido 0.71 g con rendimiento de 89%. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.49 (d, 18H, *J*= 0.7 Hz), 5.66 (d, 2H, *J*=14.9 Hz); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 29.9 (d, *J*= 4.3 Hz), 73.3 (d, *J*= 7.0 Hz), 84.2 (d, *J*= 7.9 Hz); RMN ³¹P (122 MHz, CDCl₃) δ: -11.86 (s). Apéndice de espectros, páginas 183-186 (espectros 69-72).

8.1.3.2.4 Procedimiento general para la obtención de los profármacos MFR-33 y MFR-34

8.1.3.2.4.1 Síntesis de los fosfatos de di-*terc*-butilo (**29a-b** y **30a-b**)

Una suspensión de NaH (102.69 mmol, 3.5 eq., este compuesto se encuentra al 60% en aceite mineral) y 50 mL de DMF anhidro se agitó durante 15 minutos a 0 °C en un baño de hielo-sal. Lentamente se agregaron **13** ó **14** (29.34 mmol, 1 eq) y se añadió gota a gota una solución de fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**28**) (38.14 mmol, 1.3 eq) en 15 mL de DMF. La mezcla resultante se agitó durante 24 horas. Culminado el tiempo, se filtró al vacío y el sólido sobrenadante se lavó con 10 mL de DMF. El filtrado obtenido se concentró a presión reducida hasta sequedad. La resina obtenida se eluyó sobre una columna con 10 g de gel de sílice (columna de 20 cm de alto x 1.5 cm de diámetro) utilizando como fase móvil 100 mL de una mezcla de AcOEt/éter de petróleo al 50/50 y posteriormente 100 mL de éter dietílico, todas las fracciones se juntaron y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo una resina. La

resina se suspendió en un sistema 85/15 hexano/AcOEt y se agitó a 0 °C. Se observó la precipitación de un sólido blanco, se filtró al vacío y se lavó con hexano frío.

8.1.3.2.4.1.1 Síntesis de Fosfato de [5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metil di-*terc*-butilo (29b)

En esta reacción se logró purificar un solo regioisómero. Se obtuvieron 6.01 g (36.4%) de un sólido blanco que mostró ser una mancha en ccf con R_f 0.3 sistema V y pf de 130-130.5 °C con descomposición. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) 1.20 (s, 18H), 2.74 (s, 3H), 5.82 (d, 2H, $J= 11$ Hz), 6.64 (d, 1H, $J=6.8$ Hz), 7.36 (t, 1H,), 7.44 (s, 1H), 7.58-7.60 (m, 2H), 7.65 (d, 1H, $J= 8.5$ Hz), 7.87 (s, 1H), 7.95-7.98 (m, 1H), 8.23-8.25 (m, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 15.0, 29.6 (d, $J= 4.2$ Hz), 68.8 (d, $J= 5.8$ Hz), 83.2 (d, $J= 7.3$ Hz), 104.5, 110.5, 119.4, 120.6, 121.7, 123.3, 125.4, 126.3, 126.7, 127.4, 128.3, 135.0, 135.6, 140.7, 147.0, 153.6, 155.8; RMN ^{31}P (122 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) -11.78 EMAR-ES+ Calculado para $C_{22}H_{32}N_2O_6SClP$: 563.1536 (m/z), encontrado: 563.1553 (m/z). Apéndice de espectros, páginas 187-191 (espectros 73-77).

8.1.3.2.2 Síntesis de los fosfatos dihidrógeno (31a-b y 32a-b)

Una suspensión de **29a-b** o **30a-b** (10.65 mmol) y 15 mL de dioxano anhidro se agitó a 0 °C durante 10 minutos; consecutivamente, se adicionó 15 mL de una solución 4N de HCl en dioxano. La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 45 minutos en atmósfera de nitrógeno y se originó un precipitado blanco. El precipitado formado se filtró al vacío utilizando dioxano frío para lavar y las aguas madres se concentraron a presión reducida a la mitad de su volumen. Se generó un sólido blanco, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con dioxano frío.

8.1.3.2.2.1 Síntesis de Fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (31a) y Fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (31b)

Las aguas madres de la reacción 8.1.3.2.4.1.1, las cuales provienen del lavado con el sistema 85/15 hexano/AcOEt, se concentraron a presión reducida hasta sequedad, y sin previa purificación la resina obtenida se sometió a la hidrólisis de los *terc*-butilos obteniendo el otro regioisómero. Por esta razón se sugiere que después de haber pasado por la columna (utilizando como fase móvil 50/50 AcOEt/éter de petróleo 100 mL y posteriormente 100 mL de éter

dietílico) someter a hidrólisis a la resina resultante. Después de someter a hidrólisis la resina anteriormente descrita se obtuvo un precipitado blanco con las siguientes características:

Sólido blanco (4.32 g, 90%) de una mezcla de regioisómeros en una proporción (50:50) y *pf* 136-137 °C con descomposición. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) 2.72 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 5.81 (d, 2H, *J*= 9.3 Hz), 5.89 (d, 2H, *J*= 9.3 Hz), 6.58 (d, 1H, *J*=7.6 Hz), 6.62 (d, 1H, *J*=7.6 Hz), 7.31-7.41 (m, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.59-7.67 (m, 7H), 7.88 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.97-8.00 (m, 2H), 8.24-8.35 (m, 2H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 14.9, 14.9, 68.4 (t, *J*= 3.6 Hz), 105.4, 109.4, 110.1, 111.3, 112.3, 119.3, 120.2, 120.9, 121.8, 121.8, 122.7, 123.0, 125.1, 125.3, 126.5, 126.5, 126.6, 127.4, 127.4, 128.2, 128.3, 133.7, 134.9, 134.9, 135.8, 141.0, 142.9, 146.3, 147.1, 153.8, 154.0, 155.9 156.1; RMN ³¹P (122 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) -2.57; -2.70 AREM-ES+ Calculado para C₁₉H₁₇N₂O₅SCIP: 451.0284 (*m/z*), encontrado: 451.0269 (*m/z*). Apéndice de espectros, páginas 196-199 (espectros 79-85).

8.1.3.2.2 Síntesis de Fosfato dihidrógeno de [5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (32a) y Fosfato dihidrógeno de [6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (32b)

Se obtuvieron 4.65 g (93%) de un sólido blanco como mezcla de regioisómeros en una proporción 50:50 con un *pf* 134-135 con descomposición. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) 2.73 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 5.83 (d, 2H, *J*= 9.5), 5.88 (d, 2H, *J*= 9.5), 6.63-6.67 (m, 2H), 7.24-7.29 (m, 2H) 7.37-7.40 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.89(s, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) 14.9, 14.9, 68.4 (t, *J*= 3.2 Hz), 105.2, 111.3, 112.5, 115.3, 115.7, 115.9, 119.4, 119.8, 120.4, 124.8, 124.9, 129.2, 129.2, 133.4, 133.4, 134.1, 135.7, 141.3, 142.9, 145.4, 145.6, 146.0, 154.9, 155.0, 156.3, 156.4; RMN ³¹P (122 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) -2.57, -2.64; (*m/z*)AR-ES+ calculado para C₁₅H₁₃N₂O₅PSCl₃: 468.9348, encontrado: 468.9324 (*m/z*). Apéndice de espectros, páginas 211-214 (espectros 97-100).

8.1.3.2.3 Síntesis de los fosfatos disódicos (MFR-33 y MFR-34)

Una suspensión de **31a-b** o **32a-b** (22.18 mmol) y 80 mL de una mezcla MeOH/H₂O (95:5) se agitaron durante 30 min a 0 °C en un baño de hielo-sal, posteriormente se agregó gota a gota una solución de NaOH (22.18 mmol, 1 eq) en 5 mL de H₂O bajo agitación vigorosa. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se concentró y secó a presión reducida obteniendo un sólido blanco, el cual se lavó con hexano frío.

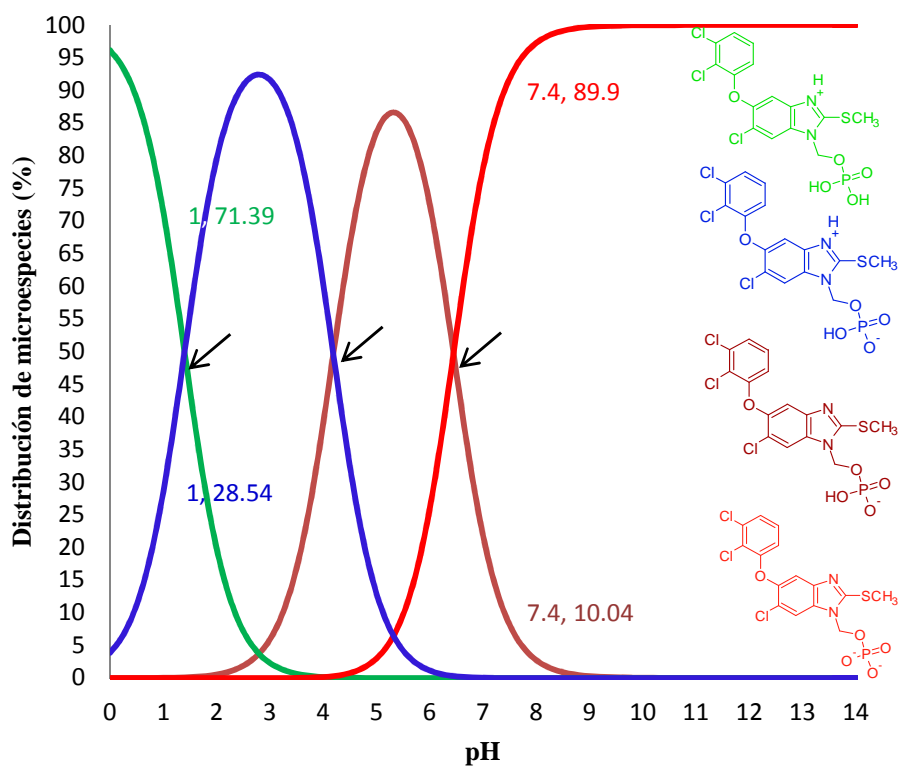
8.1.3.2.3.1 Síntesis de fosfato disódico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (MFR-33a) y fosfato disódico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (MFR-33b)

Se obtuvieron 9.87 g (90%) de un sólido blanco como una mezcla de regioisómeros (50:50). RMN ¹H (300 MHz, D₂O, δ ppm) 2.53 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 5.48 (d, 2H, *J* = 4.2 Hz), 5.62 (d, 2H, *J* = 4.7 Hz), 6.68 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz); 6.72 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.10 (s, 1H); 7.36 (s, 1H), 7.23-7.29 (m, 3H), 7.31 (s, 1H), 7.46-7.51 (m, 4H), 7.54-7.61 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.83-7.89 (m, 2H), 8.13-8.20 (m, 2H); RMN ¹³C (75 MHz, D₂O, δ ppm) 14.1, 14.2, 68.0, 68.1, 103.2, 108.7, 111.4, 111.6, 111.8, 118.0, 120.3, 120.4, 121.3, 121.3, 123.2, 123.2, 125.1, 126.0, 126.1, 126.4, 126.4, 127.0, 127.1, 127.8, 127.9, 132.6, 134.5, 134.6, 134.9, 139.4, 141.6, 147.7, 147.8, 152.8, 153.0, 156.6, 156.7, 171.0; RMN ³¹P (122 MHz, D₂O, δ ppm) 1.72; 1.49 EMAR-ES+ Calculado para C₁₉H₁₄N₂O₅Na₃SCIP: 516.9743 (*m/z*), encontrado: 516.9767 (*m/z*). Apéndice de espectros, páginas 201-204 (espectros 87-90).

8.1.3.2.3.2 Síntesis de fosfato disódico de [5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (MFR-34a) y fosfato disódico de [6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (MFR-34b)

Se obtuvieron 10.25 g (90%) de un sólido blanco como una mezcla de regioisómeros (50:50). RMN ¹H (300 MHz, D₂O, δ ppm) 2.57 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 5.54 (d, 2H, *J* = 4.5 Hz), 5.62 (d, 2H, *J* = 4.9 Hz), 6.51 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.58 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.92-7.03 (m, 2H); 7.09-7.16 (m, 3H), 7.33 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.75 (s, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, D₂O, δ ppm) 14.1, 14.1, 68.0, 68.01, 103.5, 103.5, 109.1, 109.2, 111.8, 111.9, 115.8, 118.0, 118.1, 120.3, 121.67, 121.7, 124.8, 127.9, 128.0, 133.1, 133.2, 133.3, 134.8, 139.8, 141.5, 146.2, 146.2, 153.9, 154.0, 156.9; RMN ³¹P (122 MHz, D₂O, δ ppm) 1.61, 1.77; EMAR-ES+ Calculada para C₁₅H₁₁N₂O₅Na₂PSCl₃: 512.8987 (*m/z*), encontrando: 512.8986 (*m/z*). Apéndice de espectros, páginas 216-219 (espectros 102-105).

8.2 Predicción de pK_a teórico para MFR-34



Gráfica 8.2.1. Ilustración de los valores de pK_a de **MFR-34** ($pK_{a1}=1.40$, $pK_{a2}= 4.19$ y $pK_{a3}=6.45$) predicho usando el Software Marvin de ChemAxon. Este gráfico muestra la distribución de microespecies vs valores de pH. <http://www.chem.uwec.edu/marvin/>

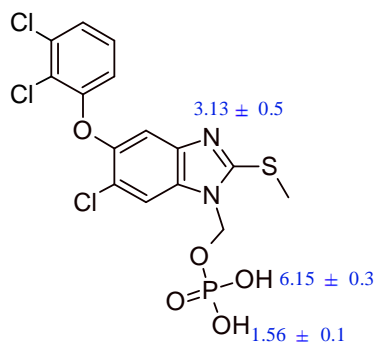


Figura 8.2.1. pK_a's teóricos de **MFR-34** obtenidos de ACDLab/pKa.

8.3 Parte analítica

8.3.1 Solubilidad acuosa

Para la determinación de la solubilidad acuosa de los derivados hidrosolubles del compuesto alfa y triclabendazol se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV 1601 con dos lámparas, una de deuterio que lee de 190-350 nm y otra de tungsteno que lee de 350-1100 nm.

8.3.1.1 Datos para elaboración de curva estándar de los compuestos 13 y 14

Una solución de 8 mg del compuesto alfa (**13**) o triclabendazol (**14**), 1 mL de DMSO y 14 mL de metanol se sónico 10 minutos y aforó a 25 mL con metanol (solución A, concentración: 320 µg/mL). De la solución A se tomó 1 mL y se aforó a 10 mL (solución B, concentración: 32 µg/mL). La solución patrón B se utilizó para preparar las correspondientes concentraciones. Las lecturas se tomaron a una longitud de onda de 305 y 306 nm, respectivamente.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia de 13 ¹	Absorbancia de 14 ¹
12.8	0.804	0.658
6.4	0.406	0.335
3.2	0.258	0.168
1.6	0.103	0.082
0.2	0.025	0.019

¹Absorbancia promedio de tres determinaciones.

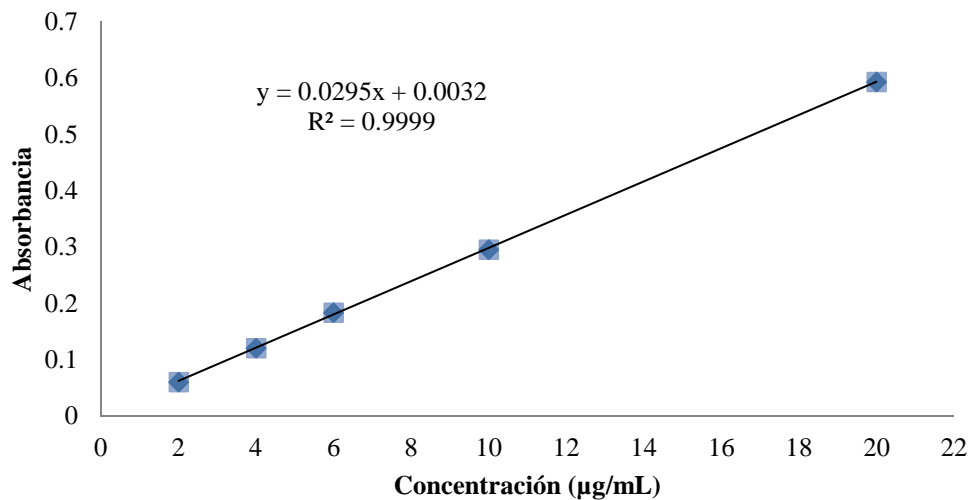
8.3.1.2 Datos para elaboración de curva estándar para MFR-33 y MFR-34

Una mezcla de 10 mg de **MFR-33** o **MFR-34** y 50 mL de agua se agitó y se aforó a 100 mL con el mismo disolvente (Solución A concentración 100 µg/mL). Posteriormente, se tomaron 5 mL de A y se aforaron a 25 mL con agua (Solución B concentración 20 µg/mL). De la solución B se realizaron las respectivas diluciones para preparar la curva de calibración.

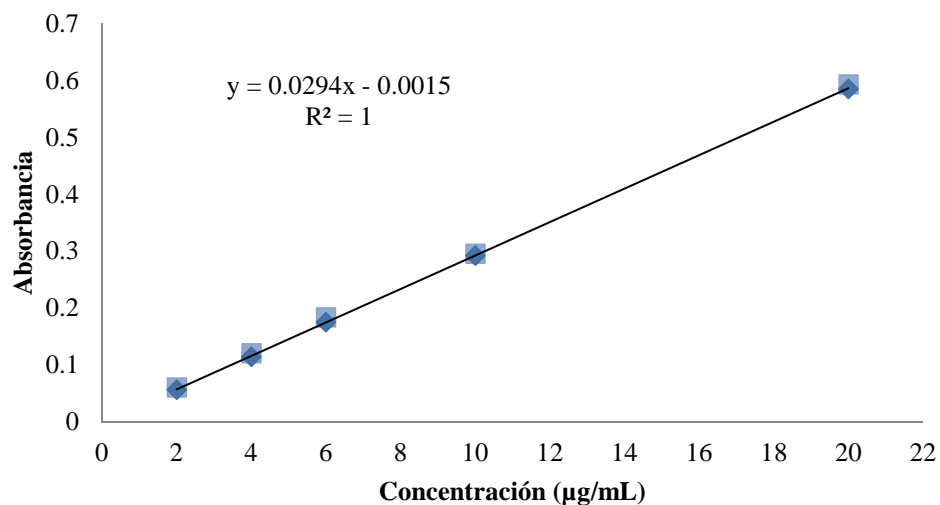
Concentración (µg/mL)	Absorbancia de MFR-33 ¹	Absorbancia de MFR-34 ¹
20	0.594	0.586
10	0.296	0.293
6	0.184	0.176
4	0.121	0.115
2	0.061	0.057

¹Absorbancia promedio de tres determinaciones.

Curva de calibración de MFR-33



Curva de calibración de MFR-34



8.3.1.3 Preparación de las muestras

8.3.1.3.1 Preparación de la muestra 13 y 14

Se colocaron 10 mg del compuesto alfa o triclabendazol y 10 mL de agua en un tubo con agitación a temperatura ambiente durante 48 horas. Culminado el tiempo, la muestra se filtró a través de un filtro WHATMAN 25 mm GD/X CA y se tomó el sobrenadante claro para finalmente leer.

8.3.1.3.2 Preparación de las muestras MFR-33 y MFR-34

Se colocaron 50 mg de **MFR-33** o **MFR-34** en 2 mL de agua en un vial con agitación a temperatura ambiente durante 48 horas en un agitador marca Lab-line ORBIT Shaker 3520. De la solución anterior se tomó una alícuota de 0.1 mL y se aforó a 100 mL, de ésta se tomó 1 mL y se aforó a 2 mL.

8.3.2 Estabilidad acuosa

Para determinar la estabildades de los profármacos se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC) con detector UV y una columna Zorbax SB C8 4.6 mm x 50 mm 5 μ m.

Se preparó una solución del compuesto alfa (**13**) o profármaco **MFR-33** a una concentración de 1 mg/mL. En el caso de **13** la suspensión se filtró a través de un filtro WHATMAN 25 mm GD/X CA. Los filtrados, así como la solución de **MFR-33** se diluyeron con 5 mL de agua. Las soluciones se guardaron a temperatura ambiente (25 °C) por 26 horas; posteriormente, las muestras se diluyeron, 5 mL en 10 mL de agua y se analizaron por UV-HPLC. La estabilidad del compuesto **13** y **MFR-33** se determinó por comparación de las áreas bajo la curva correspondientes a los compuestos, al tiempo cero (t_0) y después de 24 horas de incubación. El tiempo de retención para el profármaco **MFR-33** fue de 1.5 minutos, mientras que el tiempo de retención del compuesto alfa (**13**) fue de 3 minutos.

8.3.3 Hidrólisis enzimática

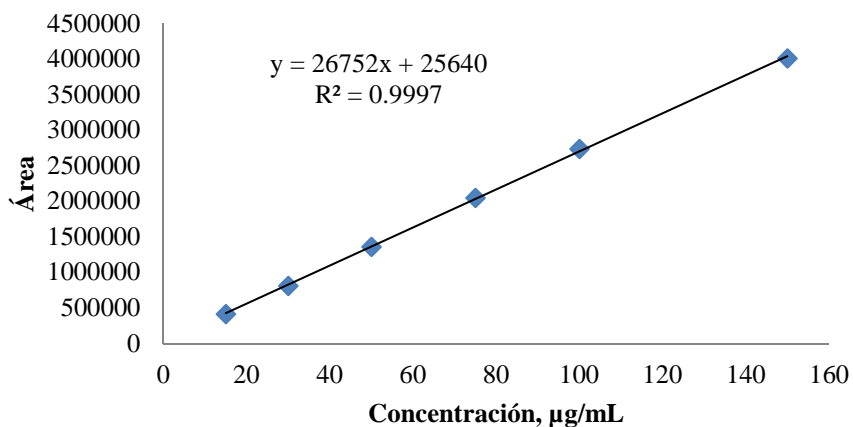
Elaboración de la curva para la cuantificación de **MFR-33** y **MFR-34** por HPLC

Solución patrón: 10 mg de **MFR-33**/10 mL de H₂O bidestilada (1000 μ g/mL)

Cantidad de inyección a la columna 20 μ L

Tiempo de retención para el **MFR-33**: 2.87 \pm 2 min

Concentración (µg/mL)	Área	Área	Área	Promedio	DE ²	EE ³
150	3914332	4054592	4059404	4009442.67	82403.386	47575.6171
100	2739113	2725776	2743180	2736023	9104.16822	5256.29397
75	2080888	2025853	2047830	2051523.67	27702.8011	15994.2196
50	1330334	1366487	1391636	1362819	30815.1662	17791.1445
30	804186	823257	813176	813539.667	9540.69968	5508.32553
15	390978	442244	416138	416453.333	25634.4547	14800.0593



Solución patrón: 10 mg de **MFR-34**/10 mL de H₂O bidestilada (1000 µg/mL)

Fase móvil: MeOH: ACN: Buffer acetatos pH 5 (40:30:30)

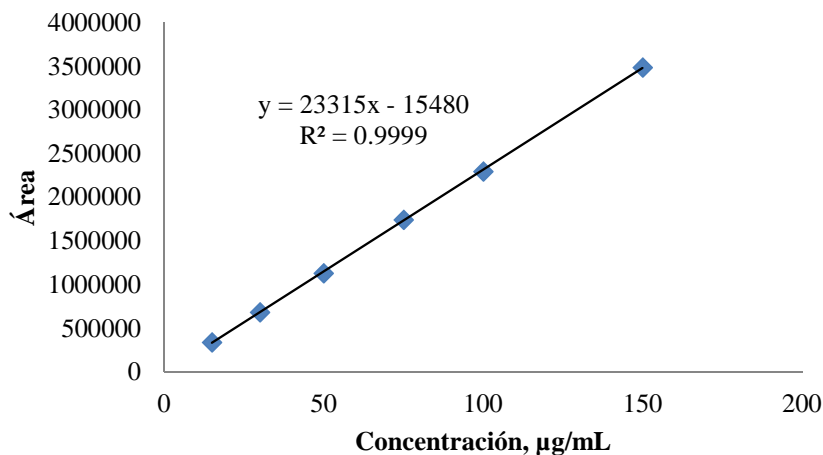
Velocidad: 1 mL/minuto

Tiempo de corrida 15 minutos

Presión 90 kg/cm²

λ 304 nm; Cantidad de inyección a la columna 20 µL; Tiempo de retención para el compuesto **MFR-34**: 2.999±2 min

Concentración (µg/mL)	Área	Área	Área	Promedio	DE ²	EE ³
150	3468843	3521273	3478743	3489619.67	27855.9264	2014732.85
100	2320971	2262935	2314186	2299364	31730.3181	1327538.42
75	1720402	1772803	1747880	1747028.33	26210.8795	1008647.28
50	1138990	1110215	1157950	1135718.33	24035.087	655707.285
30	685576	678076	693926	685859.333	7928.79772	395981.071
15	346272	336405	342672	341783	4993.21169	197328.507



La muestra se preparó pesando 12.84 g de MFR-33 y 12.37mg de MFR34 y aforando a 100 mL de una solución buffer Tris 100 mM.

8.4 Parte biológica

8.4.1 Evaluación *in vitro*

Se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos marca NUNC® y en cada pozo se depositaron 1.6 mL de medio de cultivo (RPMI/suero bovino), 0.2 mL de la concentración de compuesto a probar y 0.2 mL de RPMI conteniendo 10 fasciolas por pozo. Por cada placa se utilizaron pozos testigo conteniendo fasciolas sin compuesto, además se incluyó un grupo testigo con un fármaco de referencia (Triclabendazol-Fasinex®-Novartis). Cada concentración se realizó por triplicado. Cada prueba permaneció en incubación a 37 °C durante 4 días bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Las fasciolas bajo estudio se examinaron a las 24, 48 y 72 horas post-exposición al compuesto mediante un microscopio invertido a 40 x. La actividad de los extractos se midió comparando la sobrevivencia de las fasciolas tratadas con relación a las fasciolas del grupo testigo. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. La eficacia se midió utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de efectividad} = \frac{\text{No de fasciolas en el grupo testigo} - \text{No de Fasciolas en el grupo tratado}}{\text{No de Fasciolas en el grupo testigo}} \times 100$$

Cuando el extracto muestra una eficacia *in vitro* mayor al 80% se considera que posee actividad fasciolicida.^{113,114}

8.4.2 Evaluación *in vivo*

Se utilizaron 24 ovinos criollos, de sexo indistinto, entre 10 y 12 meses de edad, libres de infección por *F. hepatica*. Los animales se infectaron por vía oral con 200 metacercarias del parásito por ovino. Dichas metacercarias se obtuvieron de caracoles *Lymnaea bulimoides* infectados en el laboratorio con miracidios de origen bovino. El profármaco **20** se administró en una dosis única por diversas vías de administración: 12 mg/Kg/vía oral, 4 mg/Kg/vía intramuscular y 4 mg/Kg/vía subcutánea. De todos los ovinos se tomaron muestras de heces durante los días 0, 95 y 105, con la finalidad de diagnosticar positivo o negativo a huevos de *F. hepatica* utilizando la técnica de sedimentación. A los 15 días post-tratamiento, todos los ovinos se sacrificaron con la finalidad de extraer su hígado para colectar y contar el número de fasciolas presentes, determinando el porcentaje de reducción de trematodos en los grupos tratados en relación con el número de parásitos presentes en el grupo testigo. La eficacia se midió utilizando la siguiente fórmula.¹¹³

$$\% \text{ de efectividad} = \frac{\text{No de fasciolas en el grupo testigo} - \text{No de Fasciolas en el grupo tratado}}{\text{No de Fasciolas en el grupo testigo}} \times 100$$

Referencias

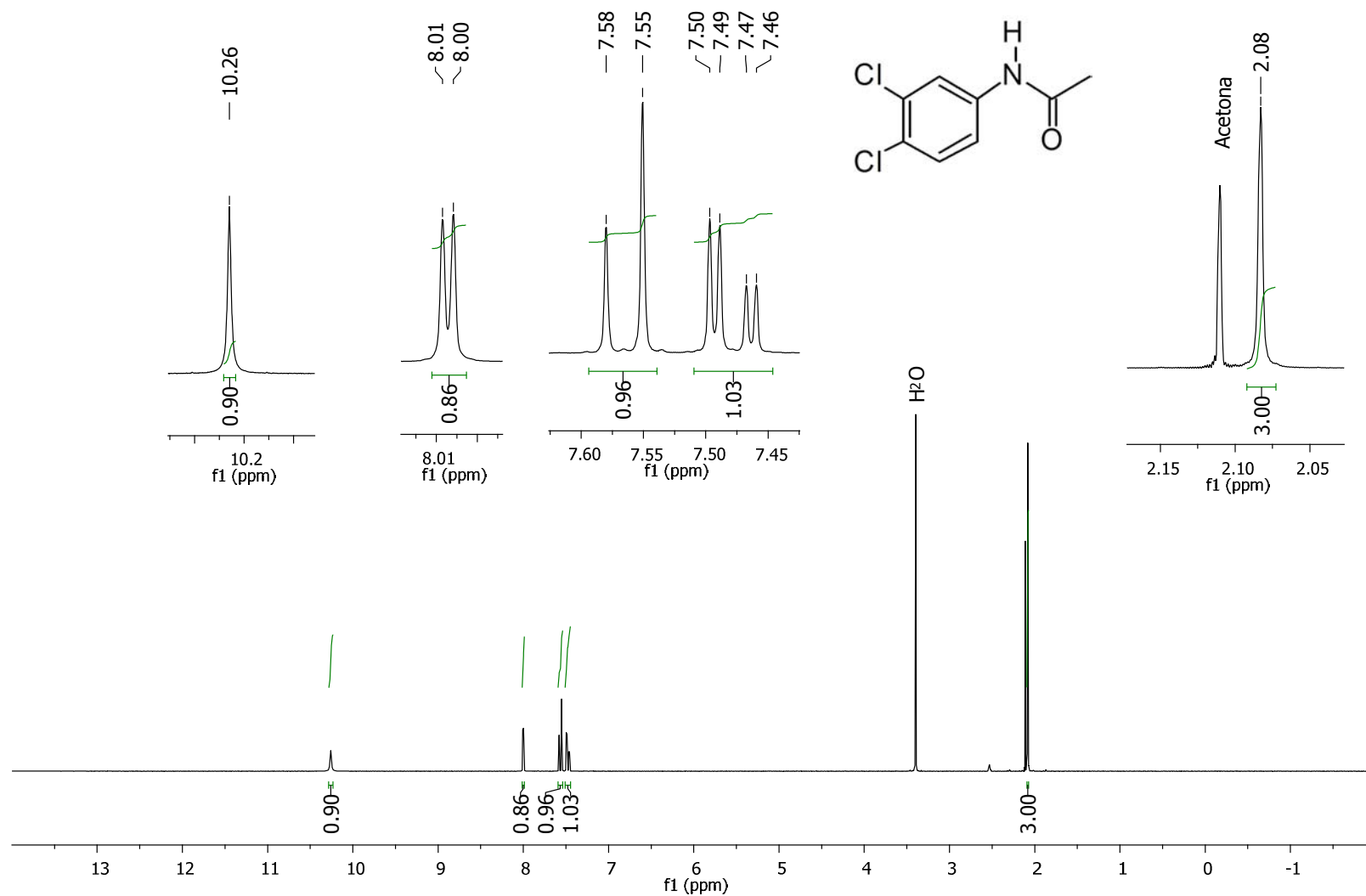
- (1) Mas-Coma, S. *J. Helminthol.* **2005**, 79 (3), 207.
- (2) Mas-Coma, S.; Valero, M. A.; Bargues, M. D. *Adv. Parasitol.* **2009**, 69 (09), 41.
- (3) Mas-Coma, S. *Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control*; 2007.
- (4) Mas-Coma, M. S.; Esteban, J. G.; Bargues, M. D. *Bull. World Health Organ.* **1999**, 77 (4), 340.
- (5) Esteba, J. G. *Res. Rev. Parasitol.* **1998**, 58 (1), 13.
- (6) Martínez-Valladares, M.; Robles-Pérez, D.; Martínez-Pérez, J. M.; Cordero-Pérez, C.; Famularo, M. D. R.; Fernández-Pato, N.; González-Lanza, C.; Castañón-Ordóñez, L.; Rojo-Vázquez, F. A. *Parasites & Vectors.* **2013**, 6 (1), 282.
- (7) Mitchell, G. *In Pract.* **2002**, 24, 378.
- (8) Van Dijk, J.; Sargison, N. D.; Kenyon, F.; Skuce, P. J. *Animal* **2010**, 4 (3), 377.
- (9) Mas-Coma, S.; Valero, M. A.; Bargues, M. D. *Vet. Parasitol.* **2009**, 163 (4), 264.
- (10) Kenyon, F.; Sargison, N. D.; Skuce, P. J.; Jackson, F. *Vet. Parasitol.* **2009**, 163 (4), 293.
- (11) Bargues, M. D.; Artigas, P.; Khoubbane, M.; Ortiz, P.; Naquira, C.; Mas-Coma, S. *Parasit. Vectors* **2012**, 5, 174.
- (12) Quiroz Romero, Héctor Ibarra Velarde, F. In *Temas selectos de parasitología*; Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF., 2000; pp 84–98.
- (13) Carrada-Bravo, T.; Escamilla Martínez, J. R. *Rev. Mex. Patol. Clínica* **2005**, 52, 83.
- (14) Boray, J. C. In *Food and Agricultural Organization of the United Nations: Rome*; 1994.
- (15) Olaechea, F. In *Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en cono sur de América*; 2007; pp 4–17.
- (16) Fairweather, I.; Boray, J. C. *Vet. J.* **1999**, 158 (2), 81.
- (17) Turner, K.; Armour, J.; Richards, R. *Vet. Rec.* **1984**, 114 (2), 41.
- (18) Smeal, M. G.; Hall, C. A. *Aust. Vet. J.* **1983**, 60 (11), 329.
- (19) Boray, J.; Crowfoot, P.; Strong, M.; Allison, J.; Schellenbaum, M.; Von Orelli, M.; Sarasin, G. *Vet. Rec.* **1983**, 113 (14), 315.
- (20) Hobrecker, F. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1872**, 5 (2), 920.
- (21) Ladenburg, A. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1875**, 8 (1), 677.
- (22) Wundt, E. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1878**, 11 (1), 826.
- (23) Programa ACD labs (Advanced Chemistry Development) Software.
- (24) Cheng, J.; Xie, J.; Luo, X. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 267.
- (25) Özden, S.; Atabey, D.; Yildiz, S.; Göker, H. *Bioorganic Med. Chem.* **2005**, 13, 1587.
- (26) Pawar, N. S.; Dalal, D. S.; Shimpi, S. R.; Mahulikar, P. P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, 21, 115.
- (27) Bansal, Y.; Silakari, O. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, 20 (21), 6208.
- (28) Aparicio, P.; Rodríguez, E.; Gárate, T.; Molina, R.; Soto, A.; Alvar, J. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2003**, 21 (10), 579.
- (29) Jiménez-González, A.; De Armas-Serra, C.; Criado-Fornelio, A.; Casado-Escribano, N.; Rodríguez-Cabeiro, F.; Díez, J. C. *Vet. Parasitol.* **1991**, 39, 89.
- (30) Katiyar, S. K.; Gordon, V. R.; McLaughlin, G. L.; Edlind, T. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (9), 2086.
- (31) Savioli, L.; Chitsulo, L.; Montresor, A. *Bull. World Health Organ.* **1999**, 77, 300.
- (32) Sanyal, P. K.; Gupta, S. C. *Vet. Parasitol.* **1996**, 63, 75.
- (33) Foreyt, W. J. *Am. J. Vet. Res.* **1989**, 50 (3), 431.
- (34) Calvopiña, M.; Guderian, R. H.; Paredes, W.; Cooper, P. J. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97 (4), 451.
- (35) Overend, D. J.; Bowen, F. L. *Aust. Vet. J.* **1995**, 72, 275.
- (36) Alvarez-Sanchez, M.; Mainar-Jaime, R.; Pérez-García, J.; Rojo-Vázquez, F. *Vet. Rec.* **2006**, 159 (13), 424.
- (37) Moll, L.; Gaasenbeek, C. P.; Vellema, P.; Borgsteede, F. H. *Vet. Parasitol.* **2000**, 91 (1-2), 153.
- (38) Olaechea, F.; Lovera, V.; Larroza, M.; Raffo, F.; Cabrera, R. *Vet. Parasitol.* **2011**, 178 (3-4), 364.
- (39) Wolstenholme, A. J.; Fairweather, I.; Prichard, R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N. C. *Trends Parasitol.* **2004**, 20 (10), 469.
- (40) Gordon, D.; Zadoks, R.; Skuce, P.; Sargison, N. *Vet. Rec.* **2012**, 171 (6), 159.
- (41) Winkelhagen, A. J. S.; Mank, T.; de Vries, P. J.; Soetekouw, R. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, 18 (6), 1028.
- (42) Fetterer, R. H. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1986**, 9 (1), 49.
- (43) Fairweather, I. *J. Helminthol.* **2005**, 79 (3), 227.
- (44) Hernández-Campos, A.; Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Rivera-Fernández, N.; Castillo, R. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50 (5), 649.
- (45) Ibarra Velarde, F.; García Sánchez, E.; Fernández Ruvalcaba, M.; Vera Montenegro, Y.; Castillo Bocanegra, R.; Hernández-Campos, A. *Vet. México* **1997**, 28 (4), 291.
- (46) Ibarra Velarde, F.; Vera Montenegro, Y.; Hernández Campos, A.; Castillo Bocanegra, R. *Vet. México* **1997**, 28 (4), 287.
- (47) Ibarra Velarde, F.; Montenegro Cristino, N.; Crespo Flores, J.; Hernández Campos, A.; Castillo Bocanegra, R. *Vet. México* **2000**, 31 (1), 47.
- (48) McConville, M.; Brennan, G. P.; McCoy, M.; Castillo, R.; Hernandez-Campos, A.; Ibarra, F.; Fairweather, I. *Parasitol. Res.* **2007**, 100 (2), 365.
- (49) McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Hanna, R. E. B.; Edgar, H. W. J.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Parasitol. Res.* **2009**, 105 (3), 757.

- (50) McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; McCoy, M.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Vet. Parasitol.* **2008**, *153* (1-2), 52.
- (51) McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Parasitology* **2009**, *136* (6), 665.
- (52) McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; Hanna, R. E. B.; McCoy, M.; Gordon, A. W.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Vet. Parasitol.* **2009**, *162* (1-2), 75.
- (53) McConville, M.; Brennan, G. P.; McCoy, M.; Castillo, R.; Hernandez-Campos, A.; Ibarra, F.; Fairweather, I. *Parasitology* **2006**, *133* (Pt 2), 195.
- (54) McConville, M.; Hanna, R. E. B.; Brennan, G. P.; McCoy, M.; Edgar, H. W. J.; McConnell, S.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Parasitol. Res.* **2010**, *106* (2), 311.
- (55) Toner, E.; Brennan, G. P.; Hanna, R. E. B.; Edgar, H. W. J.; Fairweather, I. *Vet. Parasitol.* **2011**, *177* (1-2), 79.
- (56) Ibarra, F.; Vera, Y.; Quiroz, H.; Cantó, J.; Castillo, R.; Hernández, A.; Ochoa, P. *Vet. Parasitol.* **2004**, *120* (1-2), 65.
- (57) Vera, Y.; Ibarra, F.; Cantó, G. J.; Soria, O.; Castillo, R.; Hernández, A. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **2006**, *53* (3), 145.
- (58) Arzaluz Ayala, S. Evaluación toxicológica del compuesto fasciolicida alfa en vacas gestantes, Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM, 2002.
- (59) Mckellar, Q. A.; Scott, E. W. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1990**, *13* (3), 223.
- (60) Lecaillon, J. B.; Godbillon, J.; Campestrini, J.; Naquira, C.; Miranda, L.; Pacheco, R.; Mull, R.; Poltera, A. A. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *45* (6), 601.
- (61) Ramírez, N.; Mayet, L.; Del Rivero, L.; Ibarra-Velarde, F.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Jung-Cook, H. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, *32*, 154.
- (62) Hennessy, D. R. *Vet. Parasitol.* **1997**, *72*, 367.
- (63) Jouyban, A. *Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals*; 2009.
- (64) Myrdal, P. B.; Yalkowsky, S. H. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*; 2007; pp 3311–3333.
- (65) Lombardino, J. G.; Lowe, J. a. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 853.
- (66) Ekins, S.; Nikolsky, Y.; Nikolskaya, T. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26* (4), 202.
- (67) Kubinyi, H. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 665.
- (68) Ferres, H. *Drugs of Today* **1983**, *19*, 499.
- (69) Albert, A. *Nature* **1958**, *182* (4633), 421.
- (70) *Prodrugs: challenges and rewards. P. 1*; Stella, V., Borchardt, R., Hageman, M., Oliyai, R., Maag, H., Tilley, J., Eds.; Springer Science & Business Media, 2007.
- (71) Testa, B. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68* (11), 2097.
- (72) Testa, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 338.
- (73) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (3), 255.
- (74) Etmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (10), 2393.
- (75) Leppänen, J.; Huuskonen, J.; Nevalainen, T.; Gynther, J.; Taipale, H.; Järvinen, T. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1379.
- (76) Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 677.
- (77) Huttunen, K. M.; Raunio, H.; Rautio, J. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63* (3), 750.
- (78) Heimbach, T.; Fleisher, D.; Kaddoumi, A. *Prodrugs*; Stella, V. J., Borchardt, R. T., Hageman, M. J., Oliyai, R., Maag, H., Tilley, J. W., Eds.; Biotechnology: Pharmaceutical Aspects; Springer New York, 2007; Vol. V.
- (79) Schultz, C. *Bioorganic Med. Chem.* **2003**, *11*, 885.
- (80) Westheimer, F. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1* (30), 70.
- (81) Meier, C. *Synlett* **1998**, *3* (3), 233.
- (82) Stella, V. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *19*, 311.
- (83) Varia, S. A.; Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73* (8), 1080.
- (84) Hanson, B. A.; Schowen, R. L.; Stella, V. J. *Pharm. Res.* **2003**, *20* (7), 1031.
- (85) Kearney, A. S.; Stela, V. J. *Pharm. Res.* **1992**, *9* (4), 497.
- (86) Herries, D. *Biochem. Educ.* **1981**, *9* (2), 76.
- (87) Stella, V.; Borchardt, R.; Hageman, M.; Oliyai, R.; Maag, H.; Tilley, J. *Prodrugs: Challenges and Rewards Part 1 & 2*; New York, NY: Springer: AAPS Press, c2007: New York, 2007.
- (88) Kolling, H.; Thomas, H.; Widdig, A.; Wollweber, H. Substituted phenylguanidines and processes for their preparation and use. US 3993682 A, 1976.
- (89) Nafissi-Varchei, M. Google Patents 1983, p US 4406893.
- (90) Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Cedillo, R.; Castillo, R. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1359.
- (91) Dransch, G.; Mildenerger, H.; Düwel, D.; Kirsch, R. Substituted 2-Alkoxy-carbonylamino-5-(6)-phenylmercapto-benzimidazoles. US3980796 A, 1976.
- (92) Nielsen, L. S.; Sløk, F.; Bundgaard, H. *Int. J. Pharm.* **1994**, *102* (1-3), 231.
- (93) Nielsen, L. S.; Bundgaard, H.; Falch, E. *Acta Pharm. Nord.* **1992**, *4* (1), 43.
- (94) Dhaneshwar, S. R.; Khadikar, P. V.; Chaturvedi, S. C. *Indian Drugs* **1990**, *28*, 625.
- (95) Hartel, K.; Kirsch, R.; Rochling, H. Bis-triazinobenzimidazoles and their preparation. US3928345 A, 1975.
- (96) Krise, J. P.; Narisawa, S.; Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88* (9), 922.

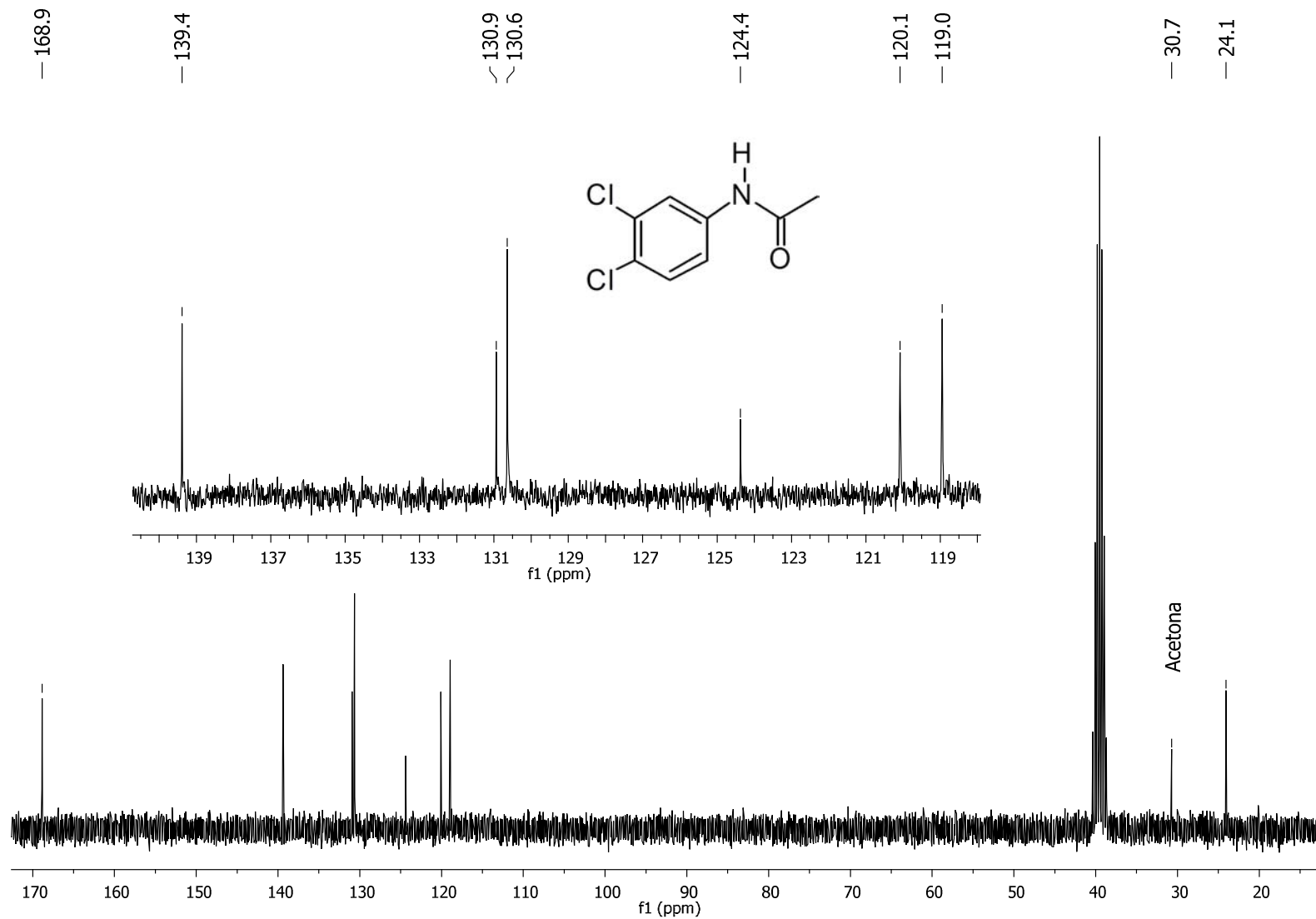
- (97) Krise, J. P.; Zygmunt, J.; Georg, G. I.; Stella, V. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (16), 3094.
- (98) Mäntylä, A.; Garnier, T.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Vepsäläinen, J.; Koskinen, A.; Croft, S. L.; Järvinen, T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (1), 188.
- (99) Chassaing, C.; Berger, M.; Heckerth, A.; Ilg, T.; Jaeger, M.; Kern, C.; Schmid, K.; Uphoff, M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (5), 1111.
- (100) Christophe, P. A.; Chassaing, S. Novel benzimidazole(thio)carbamates with antiparasitic activity and the synthesis thereof., WO 2007014846 A1, **2007**.
- (101) Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (10), 2393.
- (102) Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (12), 4755.
- (103) Ramkrishna Appaji, R.; Sudhakar, V.; Thangavel, A. Process for preparation of triclabendazole., WO 2012070068 A2, **2012**.
- (104) Gallay, J. J.; Kuhne, M.; Meyer, A.; Rechsteiner, O.; Schellenbaum, M. 2-Alkylthio-, 2-alkylsulphinyl- and 2-alkylsulfonyl-6-phenylbenzimidazoles as anthelmintic agents, US 4197307 A, **1980**.
- (105) Romo Macillas, R. A. Síntesis de profármacos del fasciolicida experimental 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol y su estudio de solubilidad en medio acuoso., Tesis de Licenciatura, UNAM., 2005.
- (106) Cornforth, R. H.; Popják, G. *Methods Enzymol.* **1969**, *15*, 359.
- (107) Castillo Bocanegra, R. Synthesis and Biological Activity of Farnesyl Pyrophosphate Analogs., PhD thesis, University of California, San Francisco, 1977.
- (108) De Montellano, P. R.; Wei, J. S.; Castillo, R.; Hsu, C. K.; Boparai, A. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 243.
- (109) Binderup, E.; Hansen, E. T. *Synth. Commun.* **1984**, *14* (9), 857.
- (110) Yalkowsky, S. H.; Valvani, S. C.; Roseman, T. J. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72* (8), 866.
- (111) Mäntylä, A.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Keski-Rahkonen, P.; Vepsäläinen, J.; Järvinen, T. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23* (2), 151.
- (112) Kumpulainen, H.; Järvinen, T.; Mannila, A.; Leppänen, J.; Nevalainen, T.; Mäntylä, A.; Vepsäläinen, J.; Rautio, J. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34* (2-3), 110.
- (113) Ibarra, O. F.; Jenkins, D. C. *Z. Parasitenkd.* **1984**, *70*, 655.
- (114) Elango, G.; Rahuman, A. A. *Parasitol. Res.* **2011**, *108* (3), 513.
- (115) Budavari, S.; O'Neil, M.; Smith, A.; Heckelman, P.; Obenchain, J. *The Merck Index: Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals.*, Twelfth Ed.
- (116) Eckert, J.; Schneider, G.; Wolff, K. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochr.* **1984**, *91*, 249.
- (117) Hernández Campos, M. A. Síntesis y actividad biológica de análogos del triclabendazol, Tesis de Licenciatura, UNAM., 2014.
- (118) Flores-Ramos, M.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Flores-Alamo, M. *Acta Crystallogr. Sect. E. Struct. Rep. Online* **2014**, *E70*, o77.
- (119) Zwierzak, A.; Kluba, M. *Tetrahedron* **1971**, *27*, 3163.
- (120) Belardinelli, L.; Zeng, D.; Zhong, H. Use of a2b adenosine receptor antagonists for treating pulmonary hypertension, WO2012003220A1, 2012.
- (121) Nguyen, T.; De Hostos, E., WO2013019169A1, **2013**.
- (122) Zheng, B.; Fox, R. J.; Sugiyama, M.; Fritz, A.; Eastgate, M. D. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18* (5), 636.
- (123) Mäntylä, A.; Vepsäläinen, J.; Järvinen, T.; Nevalainen, T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3793.
- (124) Pop, E.; Wu, W. M.; Bodor, N. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (8), 1789.
- (125) Ingram, A. M.; Stirling, K.; Faulds, K.; Moore, B. D.; Graham, D. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (15), 2869.
- (126) Harada, N.; Hongu, M.; Tanaka, T.; Kawaguchi, T.; Hashiyama, T.; Tsujihara, K. *Synth. Commun.* **1994**, *24* (6), 767.
- (127) Ingram, A.; Byers, L.; Faulds, K.; Moore, B. D.; Graham, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (36), 11846.
- (128) Ouyang, H.; Borchardt, R. T.; Siahhan, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (4), 577.
- (129) Velázquez, C. a; Chen, Q.-H.; Citro, M. L.; Keefer, L. K.; Knaus, E. E. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (6), 1954.
- (130) Kawaguchi, M.; Okabe, T.; Okudaira, S.; Hanaoka, K.; Fujikawa, Y.; Terai, T.; Komatsu, T.; Kojima, H.; Aoki, J.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (31), 12021.
- (131) Azéma, J.; Guidetti, B.; Malet-Martino, M.; Martino, R.; Roques, C. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14* (8), 2569.
- (132) Binderup, E.; Björkling, F.; Hjarnaa, P. V.; Latini, S.; Baltzer, B.; Carlsen, M.; Binderup, L. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (10), 2491.
- (133) Nudelman, a; Ruse, M.; Aviram, a; Rabizadeh, E.; Shaklai, M.; Zimrah, Y.; Rephaeli, a. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (4), 687.
- (134) Fuchs, K.; Katscher, E. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* **1927**, *60* (10), 2288.
- (135) Geering, E. J.; Island, G. Process for preparing methyl chlorosulfates, US 4649209 A, **1987**.
- (136) Power, N. P.; Bethell, D.; Proctor, L.; Latham, E.; Dawson, P. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (10), 1554.
- (137) Zheng, B.; Sugiyama, M.; Eastgate, M. D.; Fritz, A.; Murugesan, S.; Conlon, D. a. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16* (11), 1827.
- (138) Leahy, D. K.; Pack, S. K. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17* (11), 1440.
- (139) Stella, V.; Krise, J. Water soluble prodrugs of secondary and tertiary amine containing drugs and methods of making thereof., US 5985856 A, **1999**.
- (140) Krise, J. P.; Zygmunt, J.; Georg, G. I.; Stella, V. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (16), 3094.
- (141) Bonsen, P. P. M.; De Haas, G. H. *Chem. Phys. Lipids* **1967**, *1* (2), 100.

-
- (142) Muhammad, N.; Bley, K. Prodrugs and methods of making and using the same, WO2008070149A2, **2008**.
- (143) Gallay, J.; Kuhne, M.; Meyer, A. 2-Alkylthio-, 2-alkylsulphinyl- and 2-alkylsulfonyl-6-phenylbenzimidazoles as anthelmintic agents, US 4197307, **1980**.
- (144) Manchester, J.; Walkup, G.; Rivin, O.; You, Z. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50 (4), 565.
- (145) Harding, A. P.; Wedge, D. C.; Popelier, P. L. A. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49 (8), 1914.
- (146) Perrin, D. D.; Dempsey, B.; Serjeant, E. P. *pK a Prediction for Organic Acids and Bases*; Springer Netherlands: Dordrecht, 1981.
- (147) Toure, O.; Dussap, C.-G.; Lebert, A. *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. d'IFP Energies Nouv.* **2013**, 68 (2), 281.
- (148) Hecker, S. J.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2328.
- (149) Yora, T.; Sakagishi, Y. *Biochem. Mol. Biol.* **1986**, 3 (85B), 649–658.
- (150) Wang, K.; Kirichian, A. M.; Al Aowad, A. F.; Adelstein, S. J.; Kassis, A. I. *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18 (3), 754.
- (151) Reddy, K. R. *Ann. Pharmacother.* **2000**, 34 (7-8), 915.
- (152) Fleisher, D.; Bong, R.; Stewart, B. H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, 19, 115.
- (153) Rohdewald, P.; Möllmann, H.; Barth, J.; Rehder, J.; Derendorf, H. *Biopharm. Drug Dispos.* **1987**, 8 (3), 205.
- (154) Hande, K. *Eur. J. Cancer* **1998**, 34 (10), 1514.
- (155) Gunnarsson, P. O.; Andersson, S. B.; Johansson, S.; Nilsson, T.; Plym-Forsshell, G. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, 26 (1), 113.
- (156) Kearney, A. S.; Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **1993**, 82 (1), 69.
- (157) De Jong, R. S.; Mulder, N. H.; Uges, D. R.; Kaul, S.; Winograd, B.; Sleijfer DTH; Groen, H. J.; Willemse, P. H.; van der Graaf, W. T.; de Vries, E. G. *Br. J. Cancer* **1997**, 75 (11), 1660.
- (158) Hawser, S. R.; Marion, R. F. H. *Curr. Opin. Anti-Infect. Invest. Drugs* **1999**, 1, 353.
- (159) Ueda, Y.; Mikkilineni, A. B.; Knipe, J. O.; Rose, W. C.; Casazza, A. M.; Vyas, D. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3 (8), 1761.

Apéndice 1. Espectros

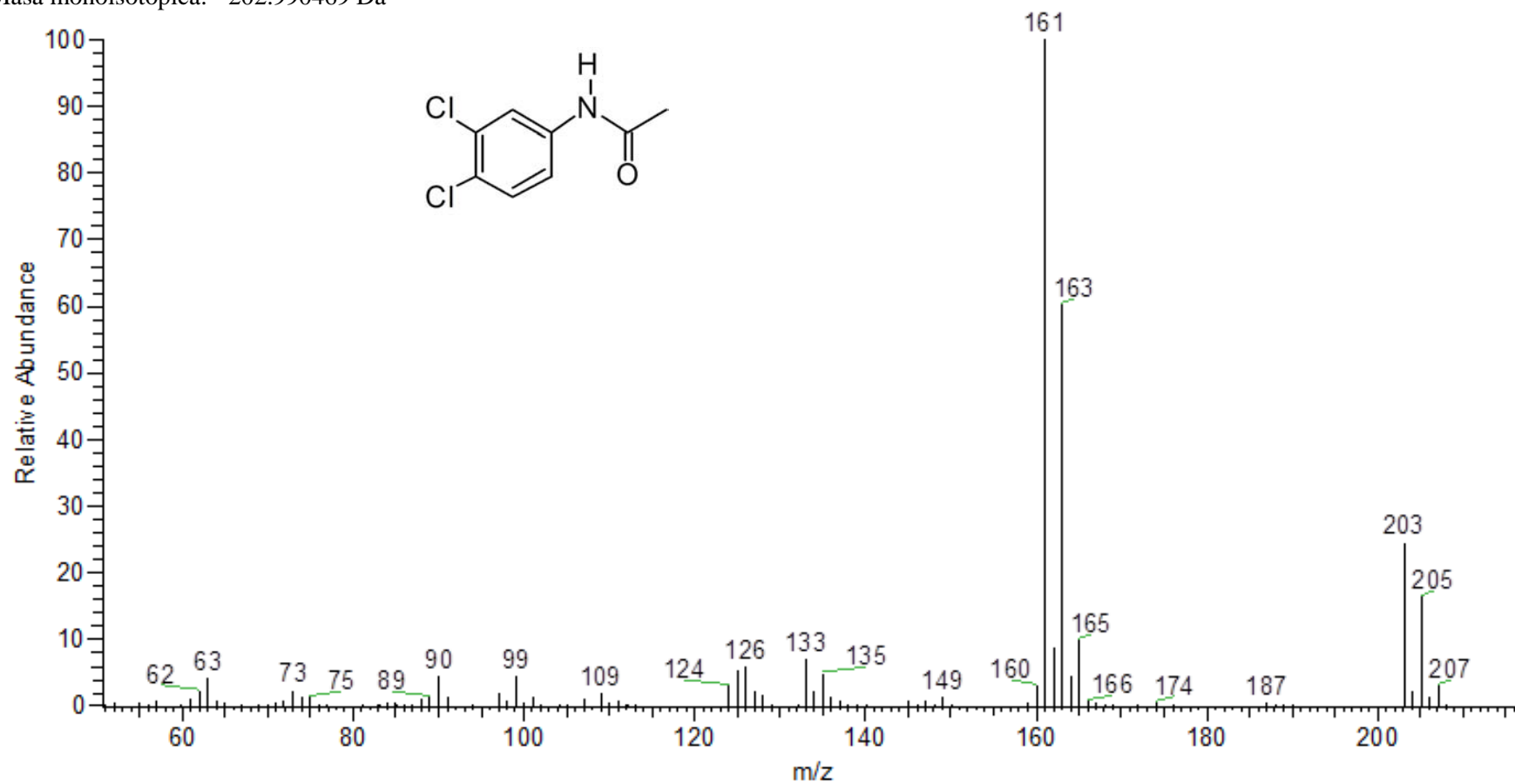


Espectro 1. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (2).

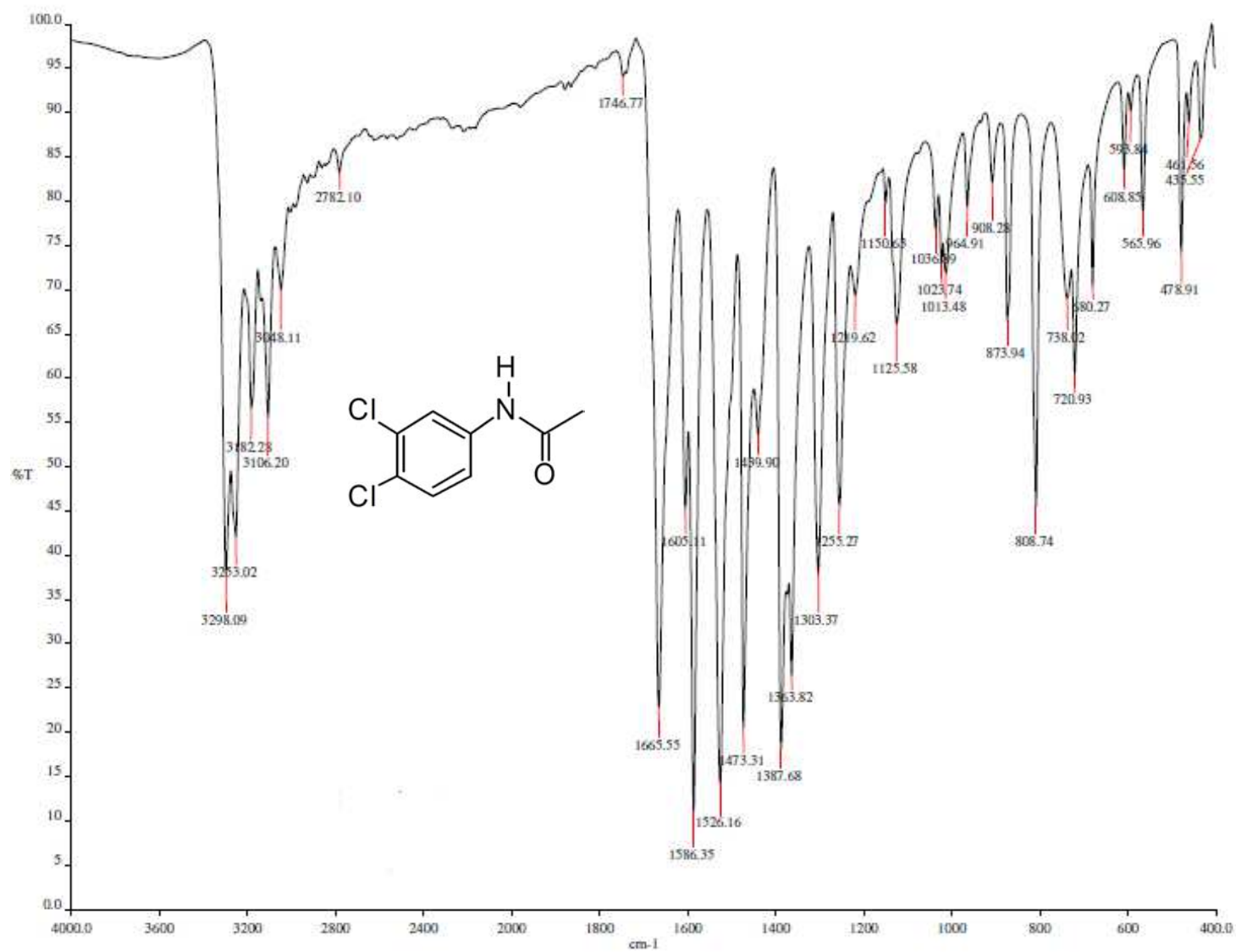


Espectro 2. RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (2).

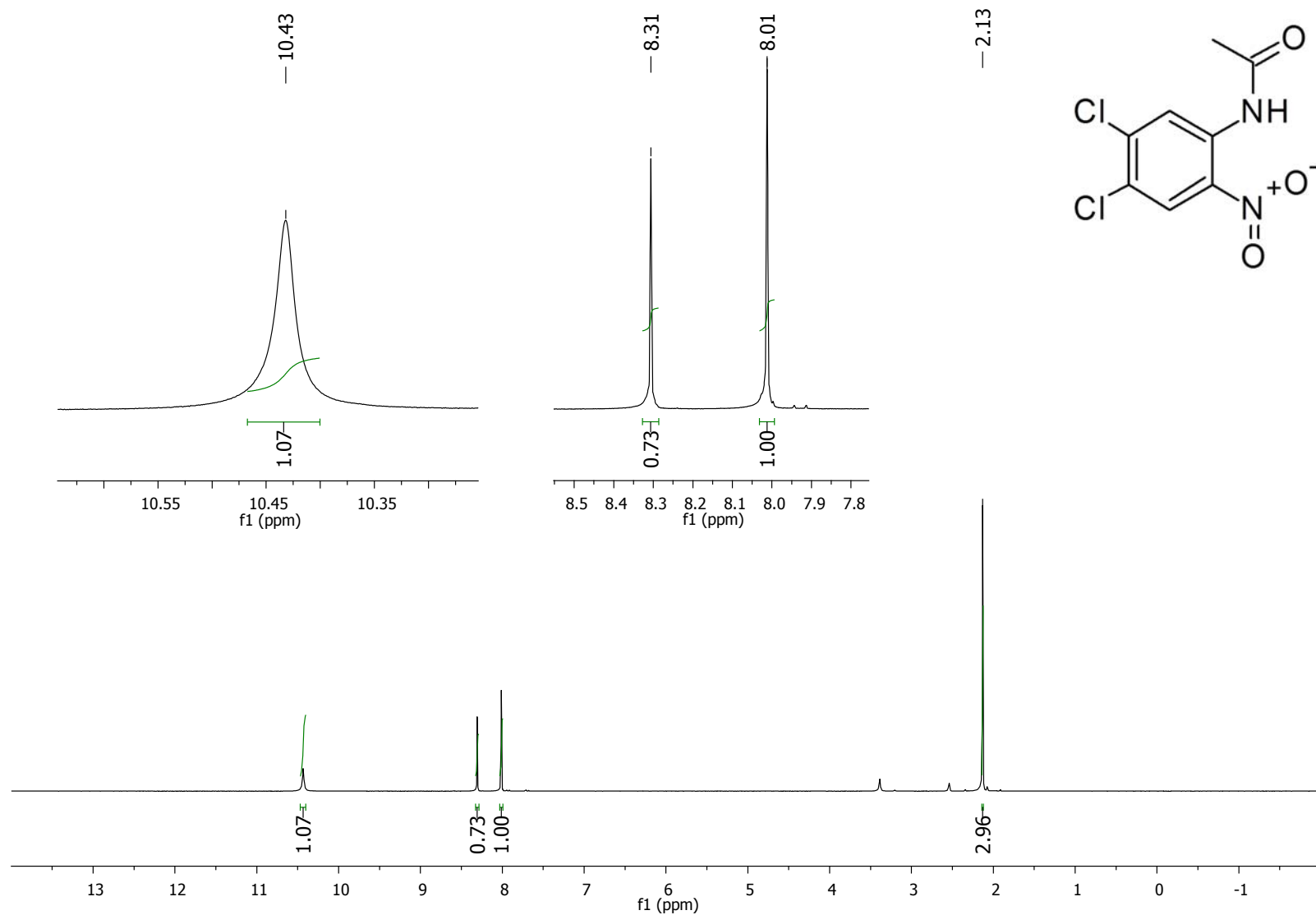
Masa monoisotópica: 202.990469 Da



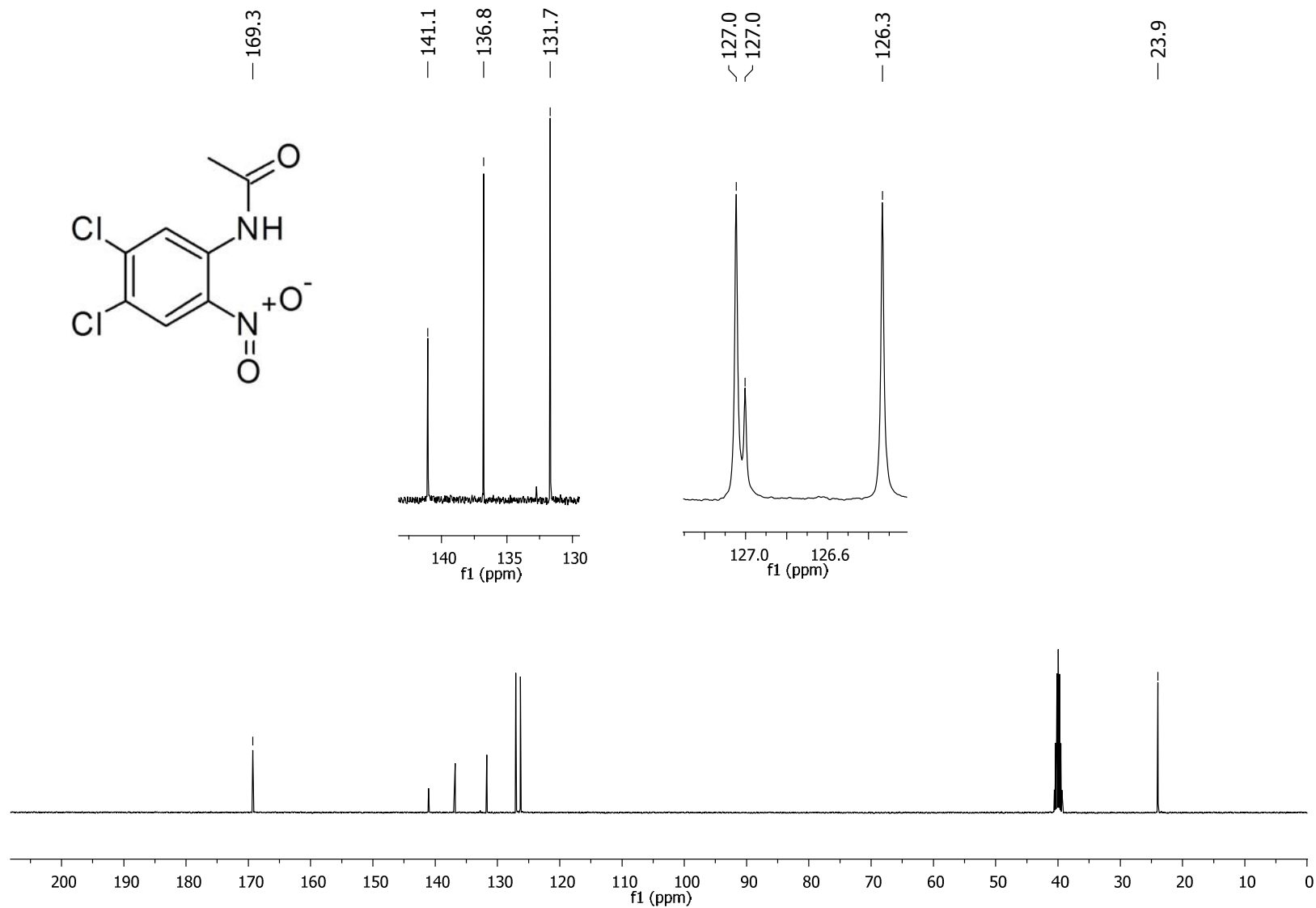
Espectro 3. EM (ID, IE) del compuesto *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (2).



Espectro 4. IR (ATR) del compuesto *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (2).

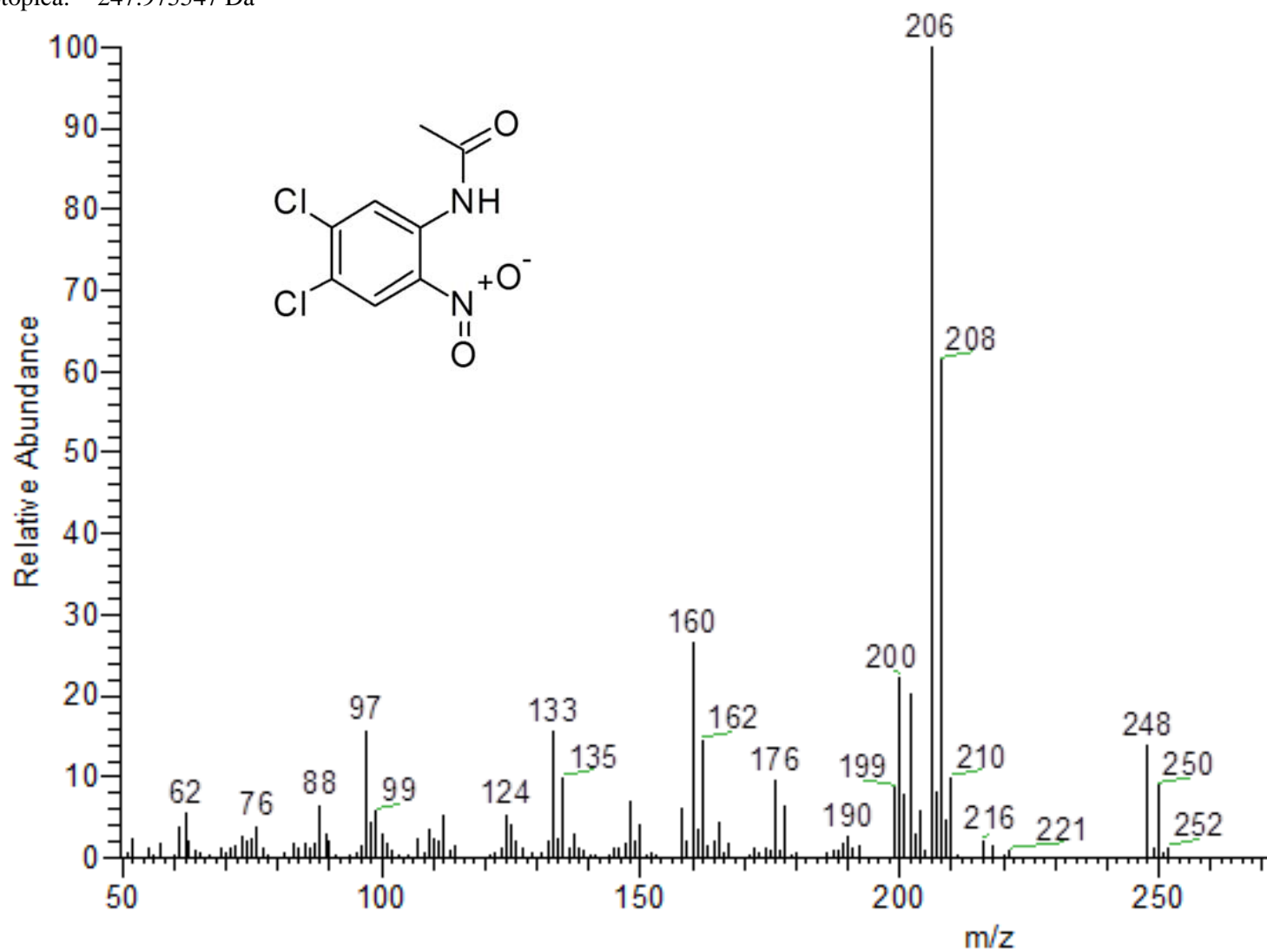


Espectro 5. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3).

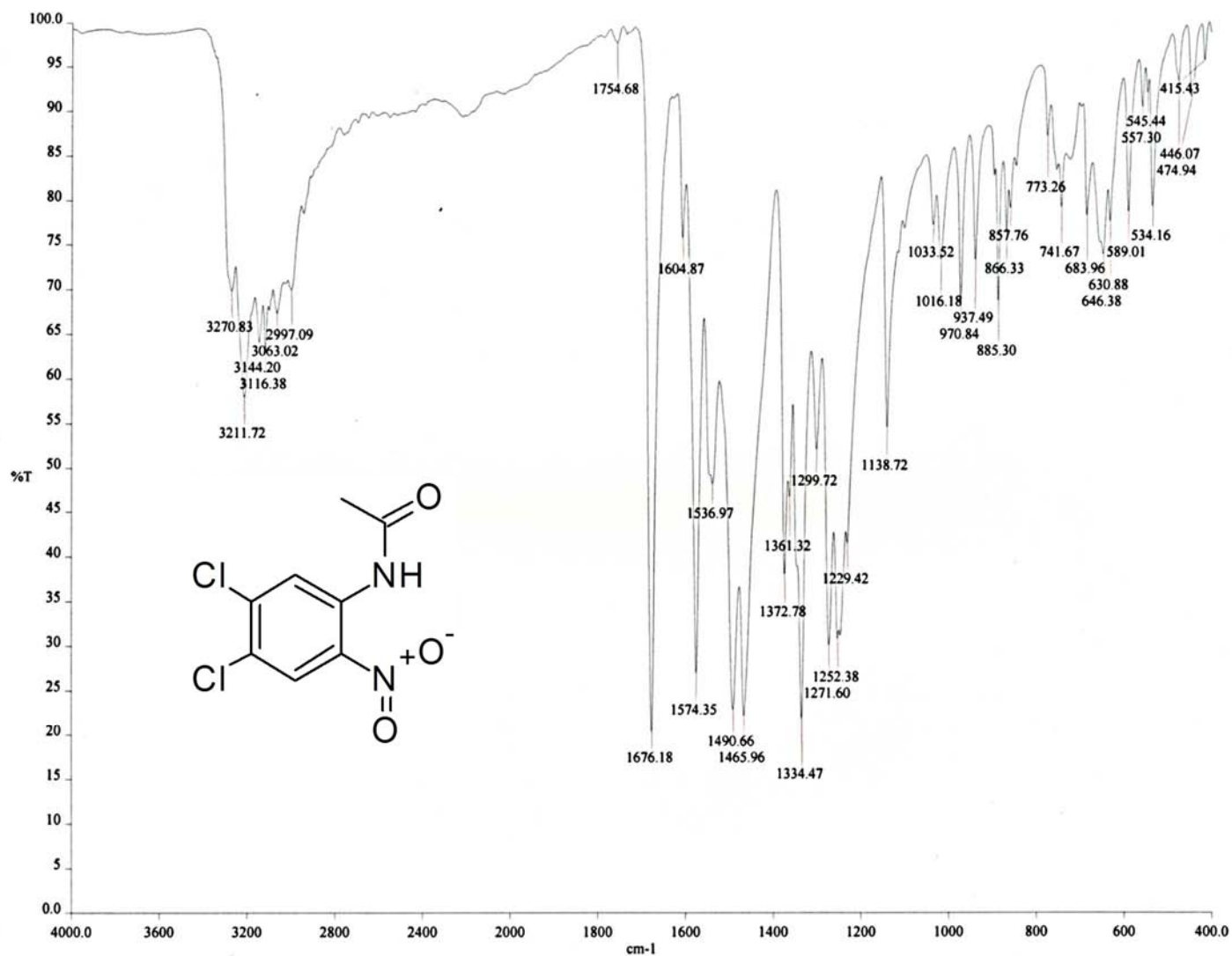


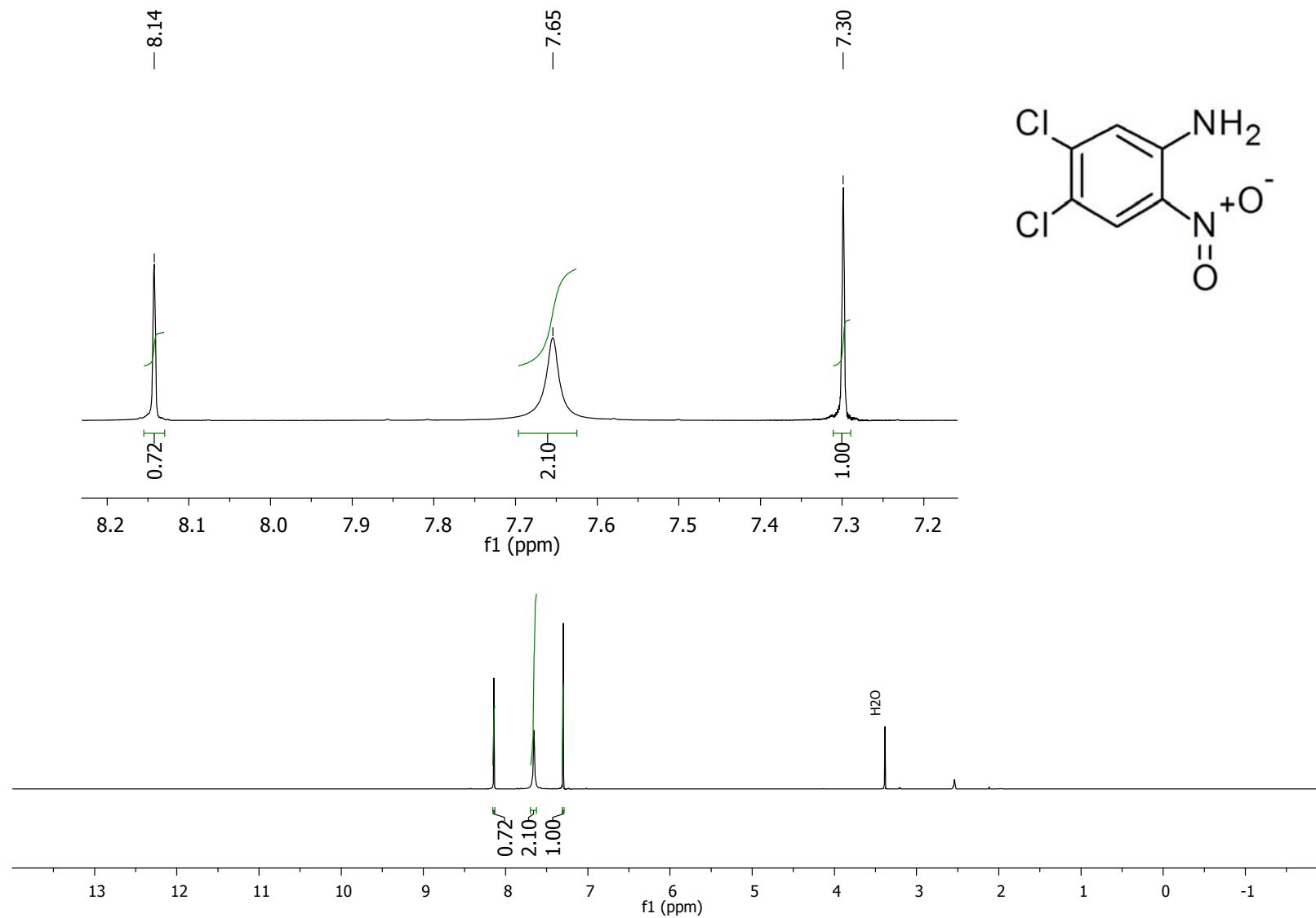
Espectro 6. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3).

Masa monoisotópica: 247.975547 Da

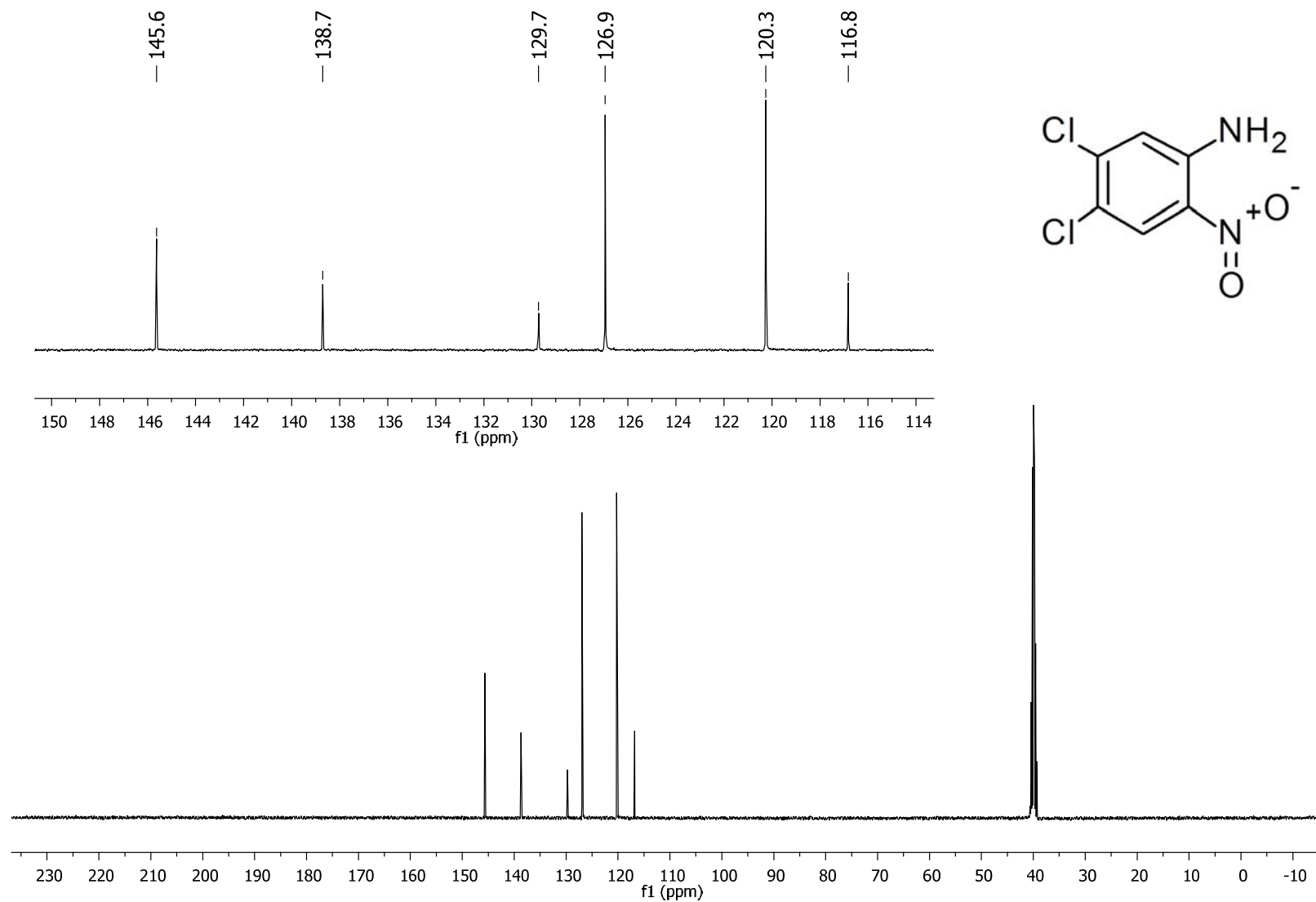


Espectro 7. EM (ID, IE) del compuesto *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida(3).

Espectro 8. IR (ATR) del compuesto *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3).

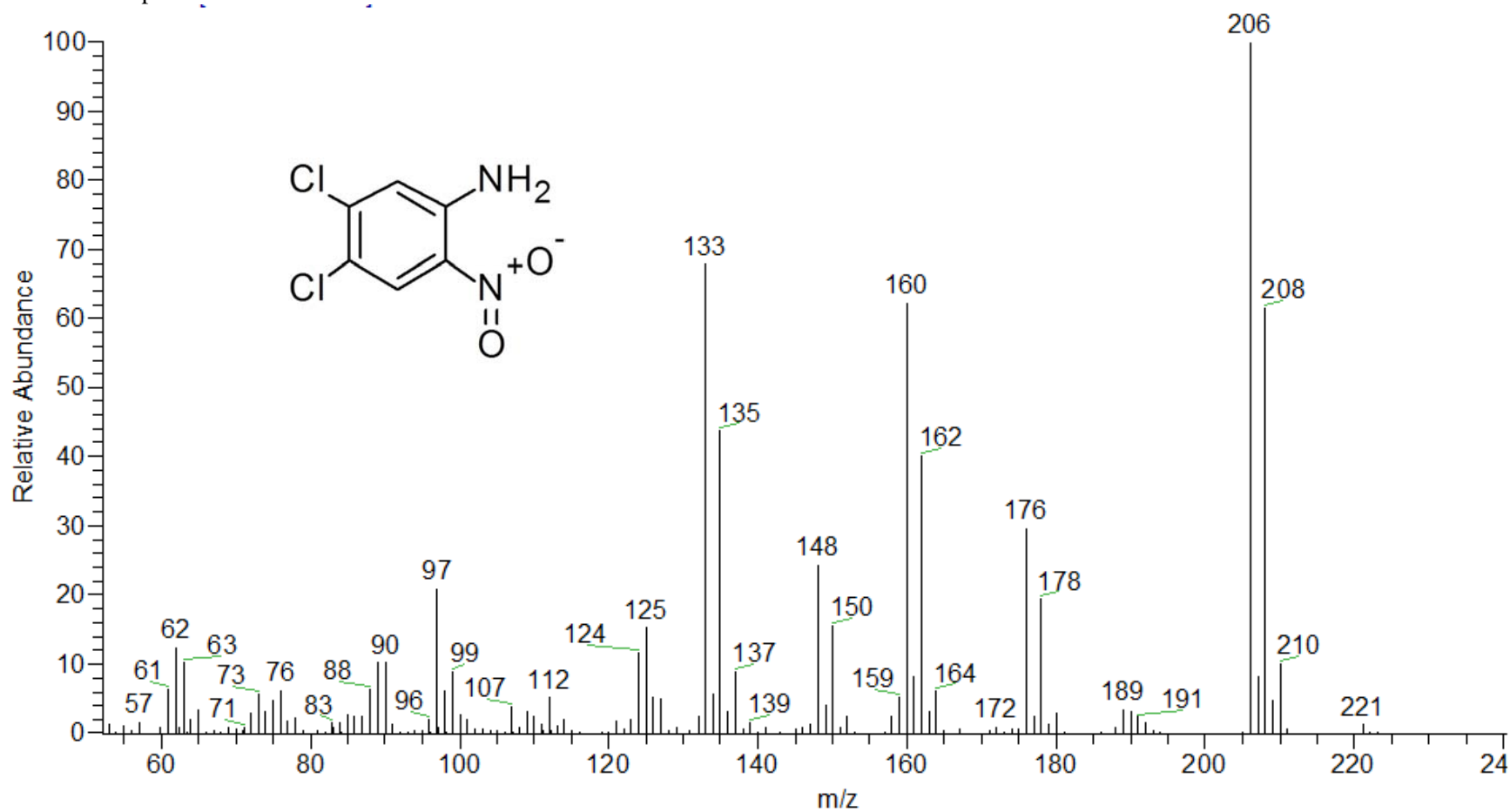


Espectro 9. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4**).

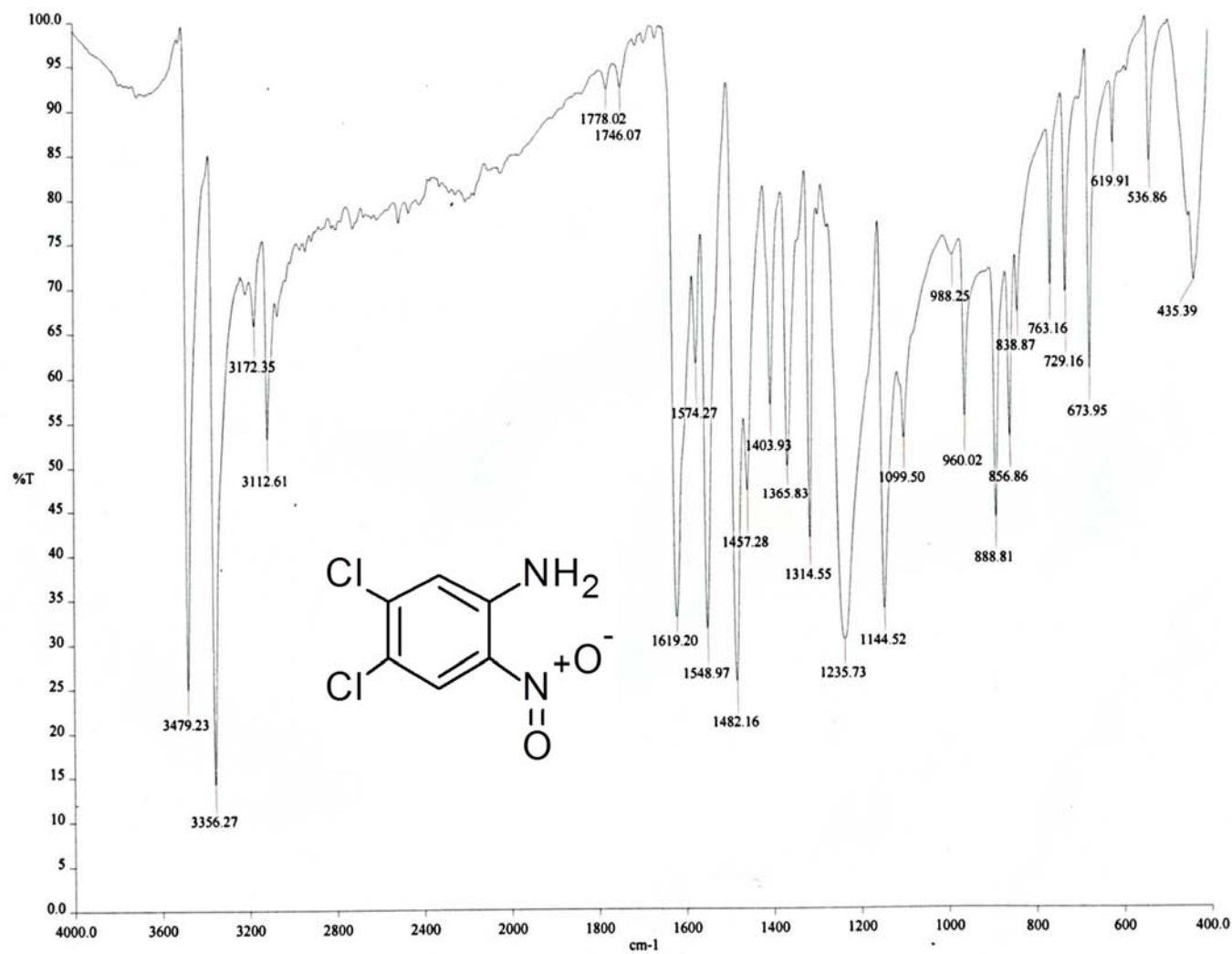


Espectro 10. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4**).

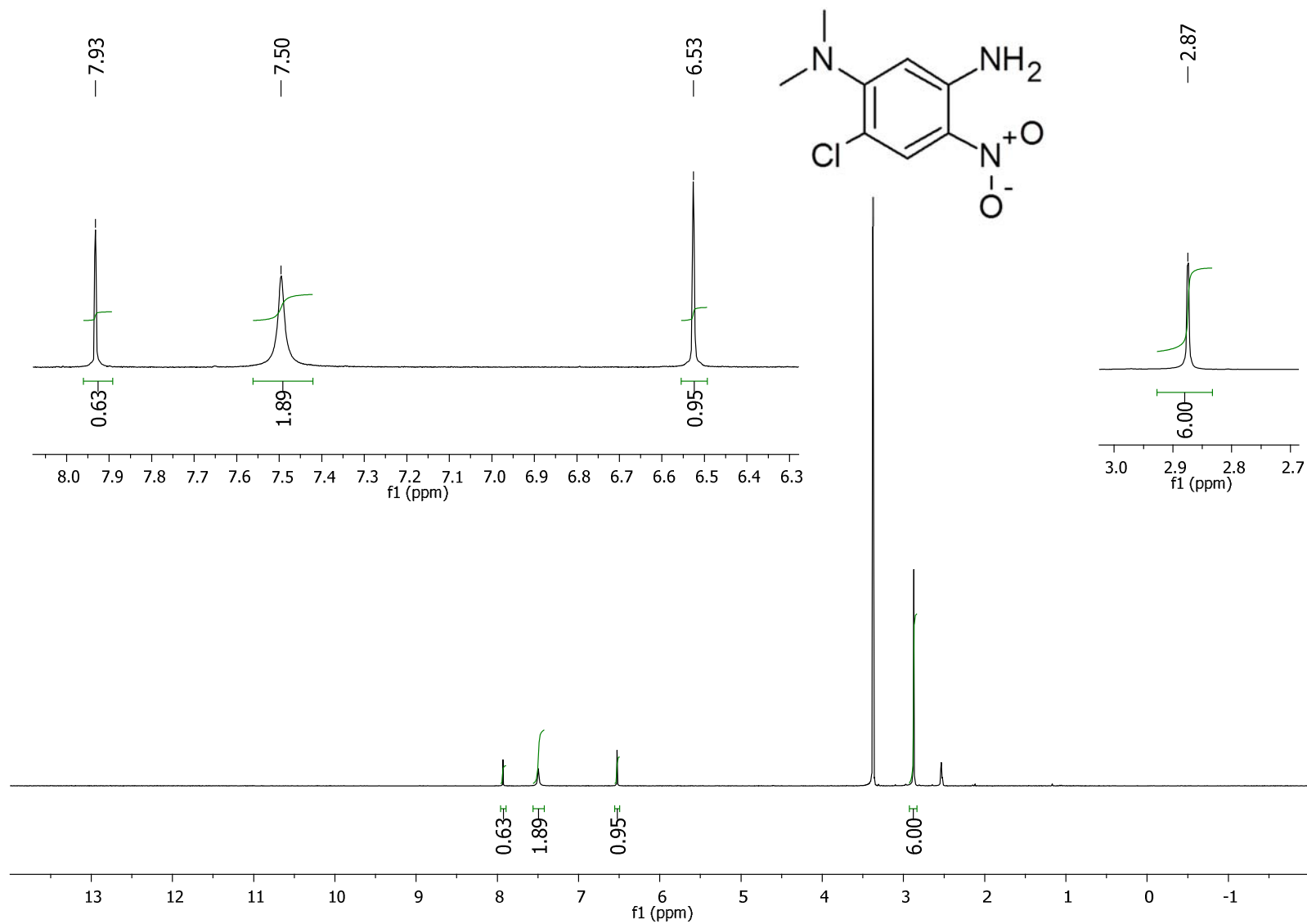
Masa monoisotópica: 205.964983 Da



Espectro 11. EM (ID, IE) del compuesto 4,5-dicloro-2-nitroanilina (4).

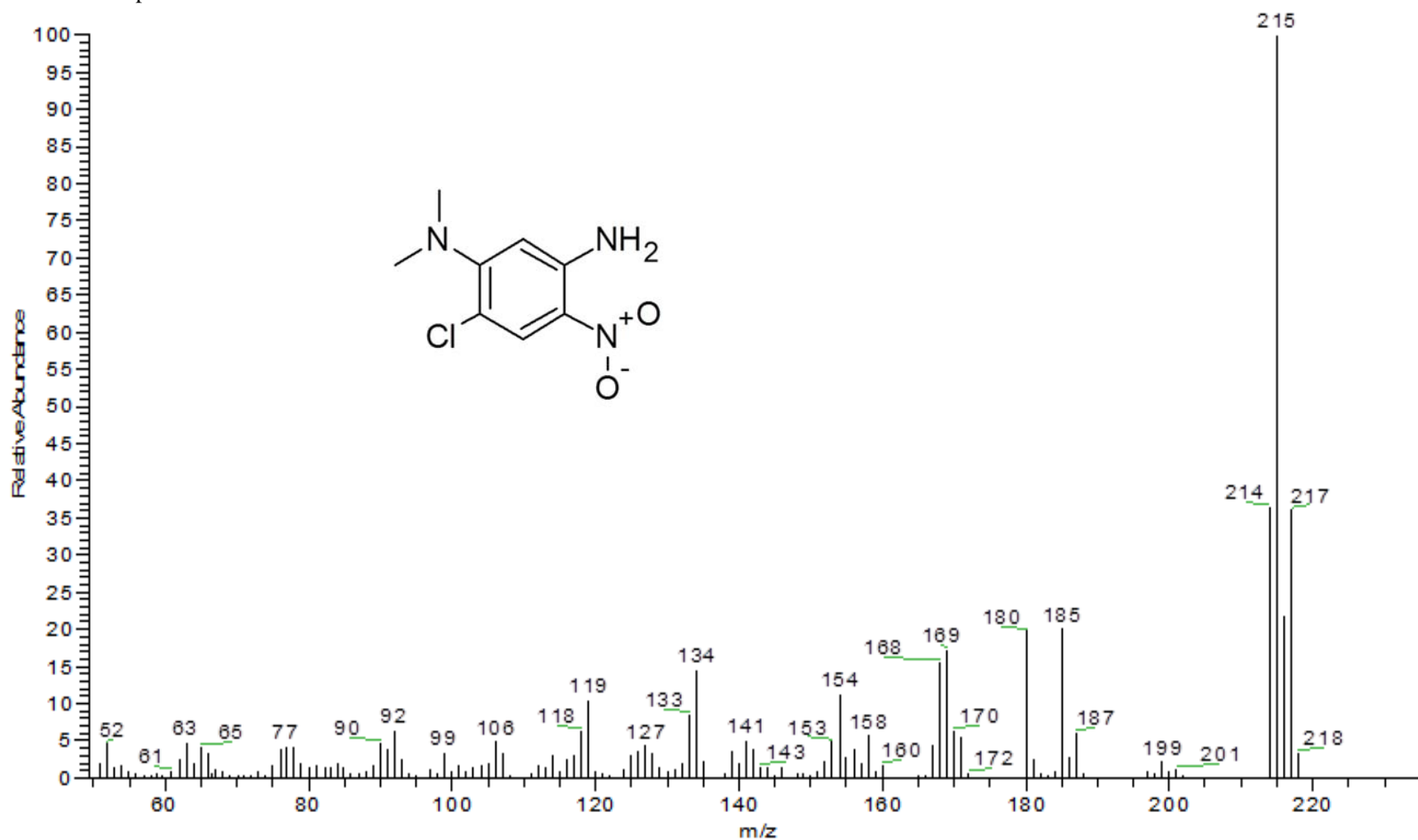


Espectro 12. IR (ATR) del compuesto 4,5-dicloro-2-nitroanilina (4).

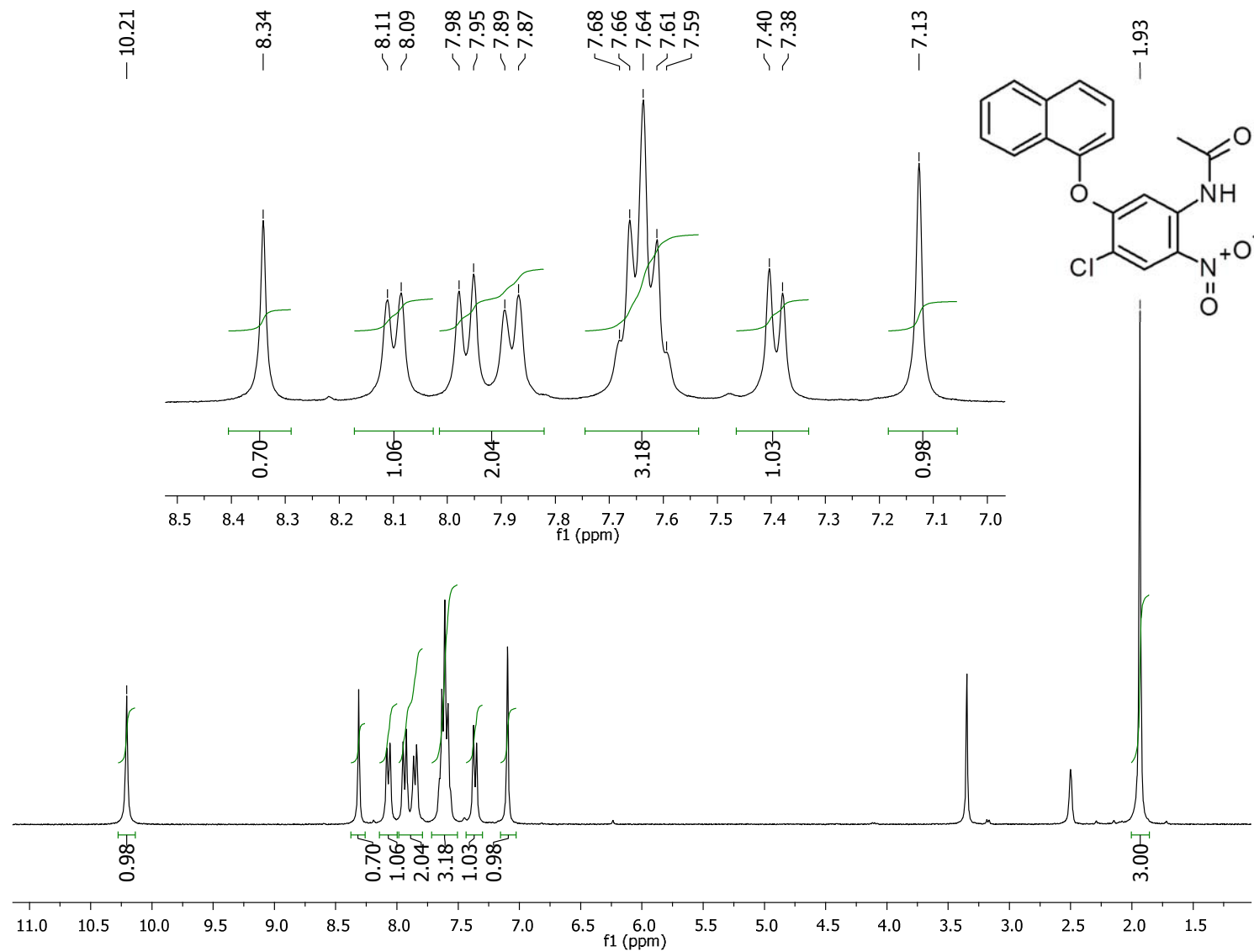


Espectro 13. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(dimetilamino)-2-nitroanilina.

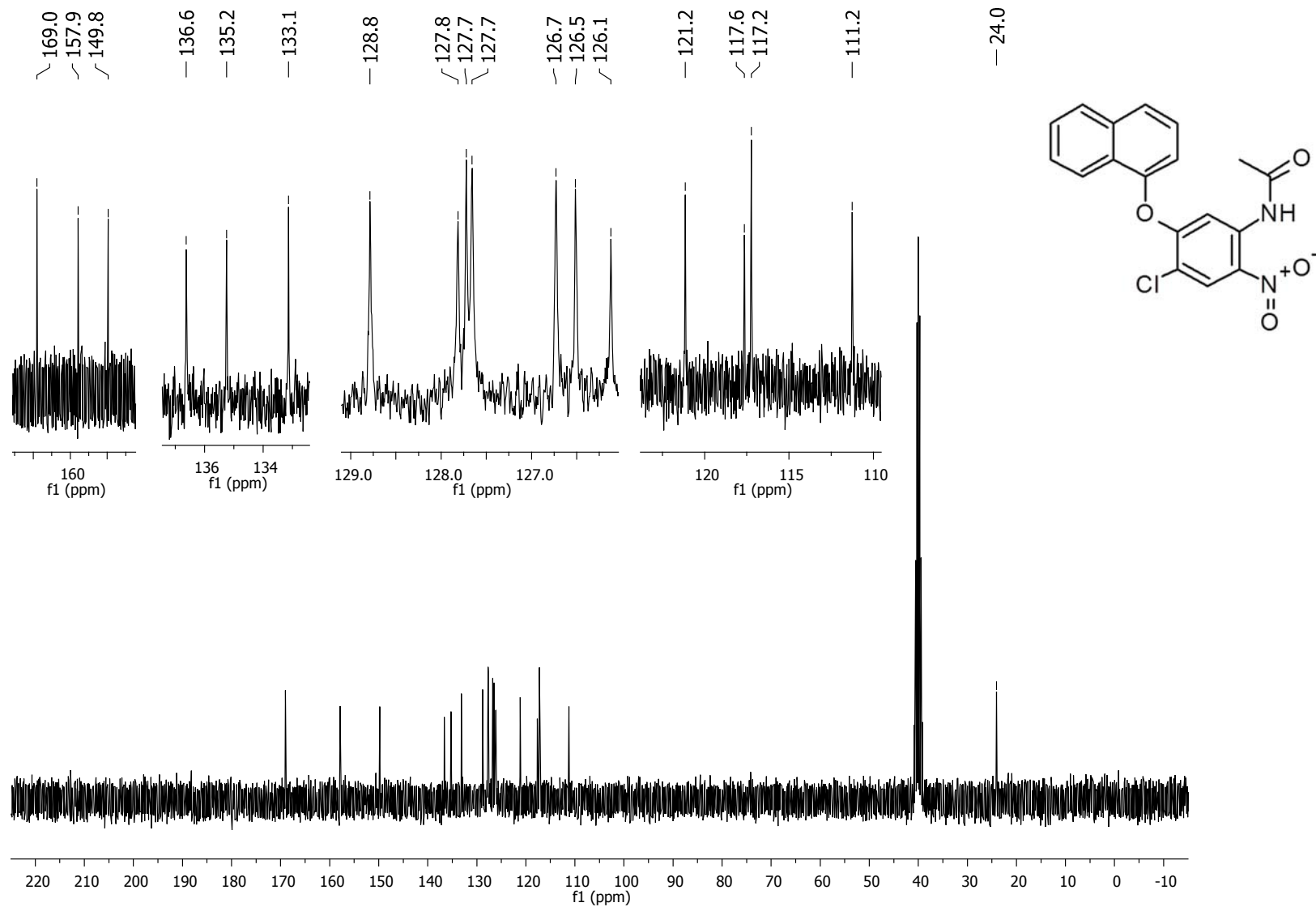
Masa monoisotópica: 215.046154 Da



Espectro 14. EM (ID, IE) del compuesto 4-cloro-5-(dimetilamino)-2-nitroanilina.

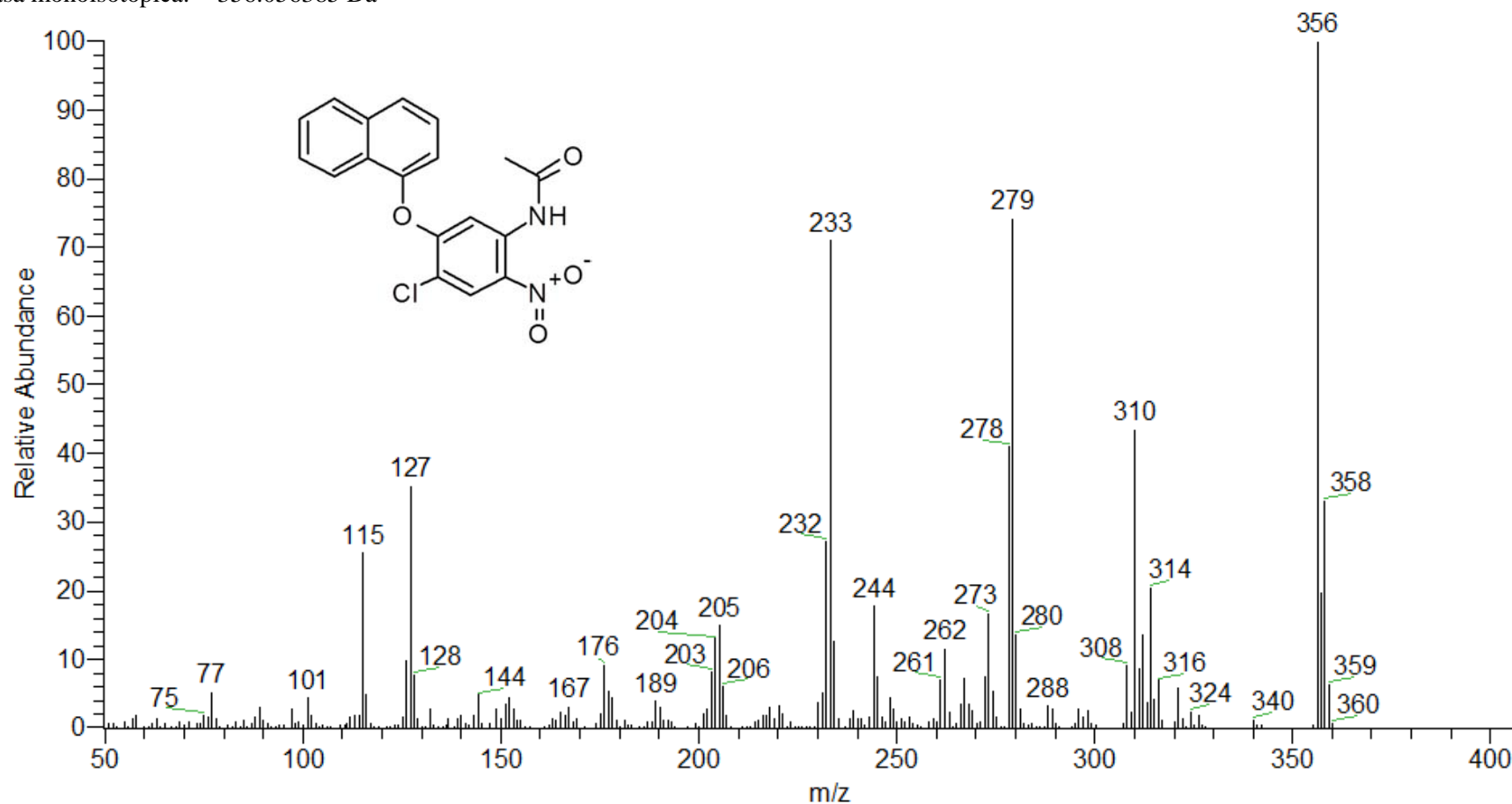


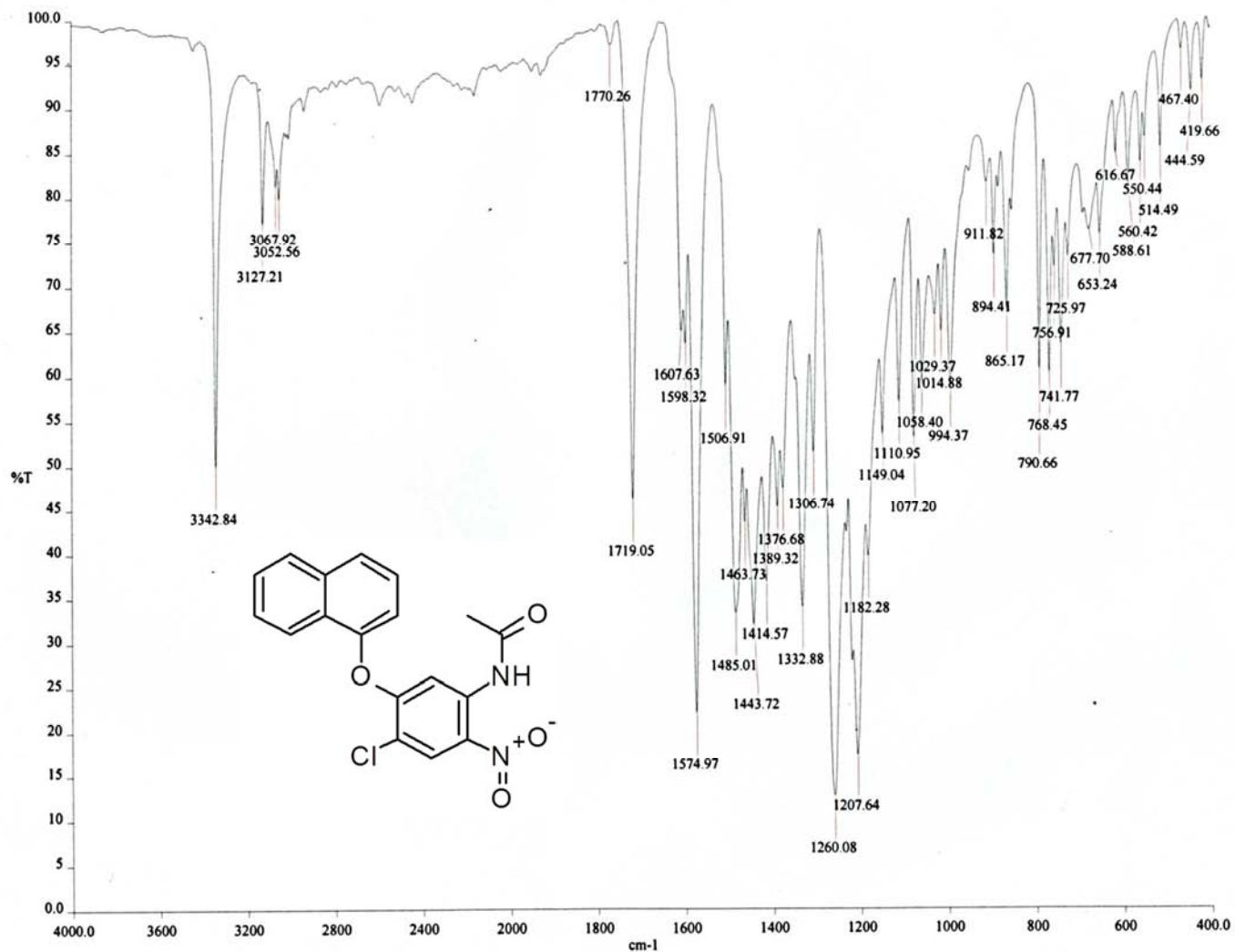
Espectro 15. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (15).



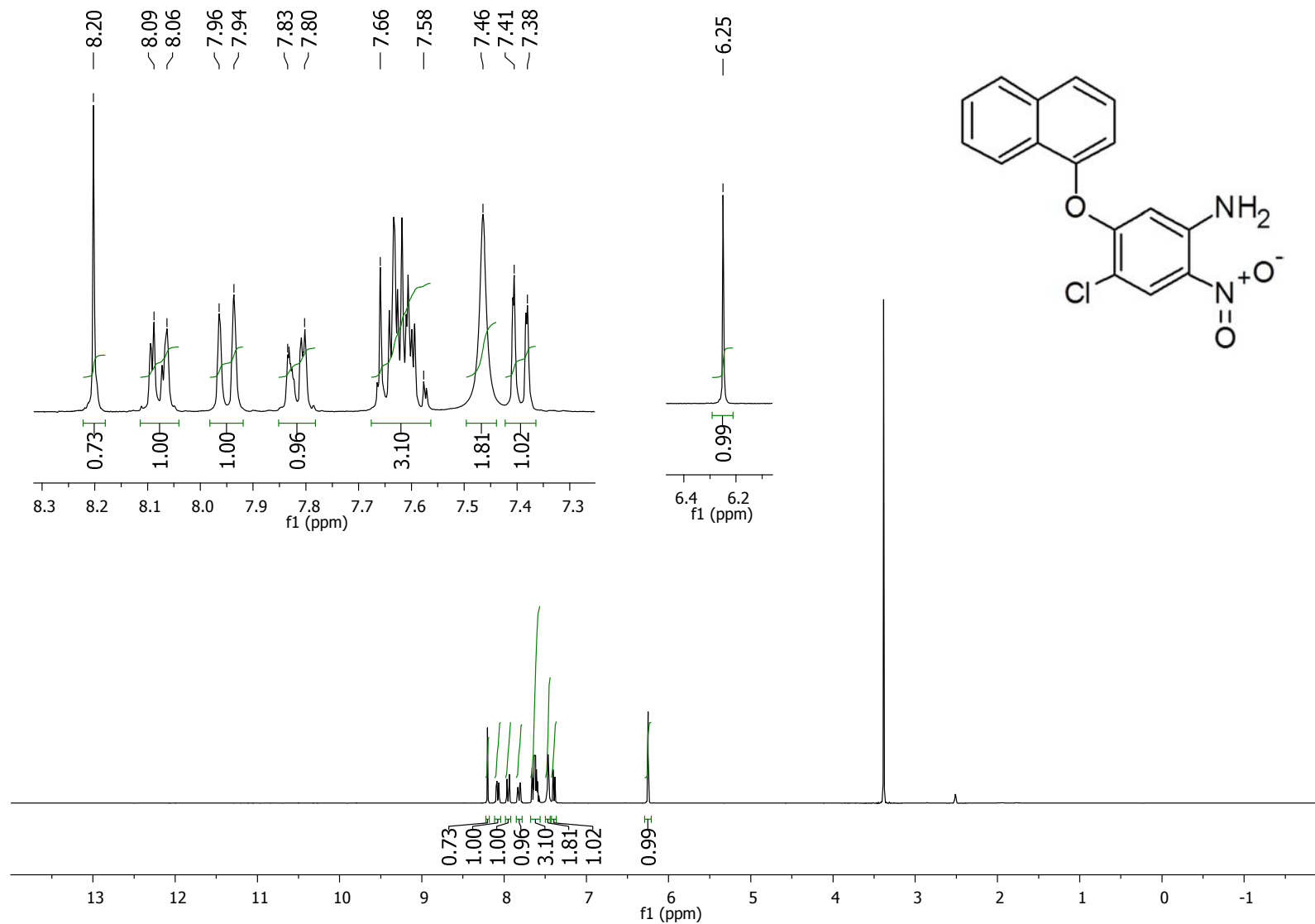
Espectro 16. RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz, δ en ppm) del *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (15).

Masa monoisotópica: 356.056385 Da

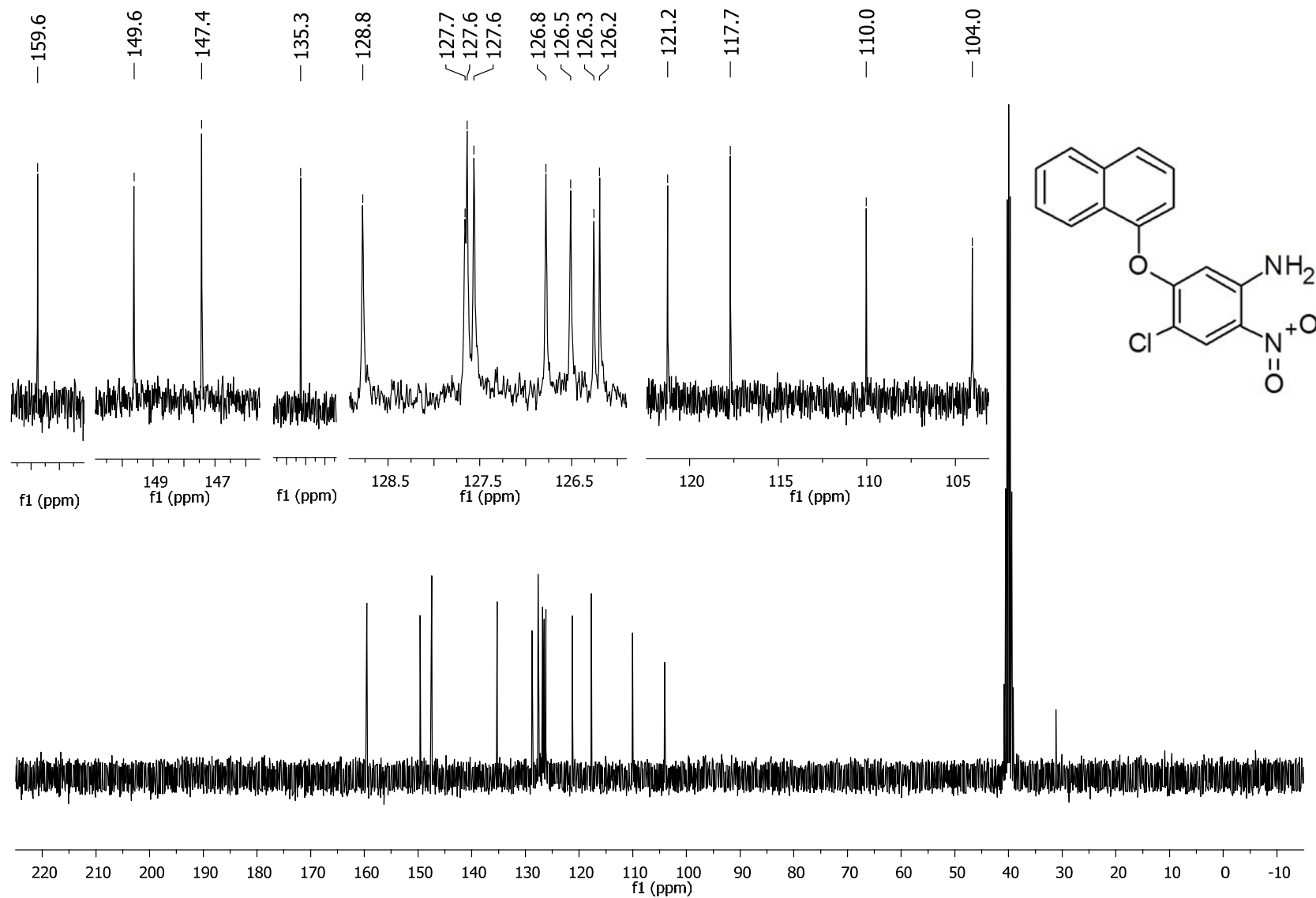
**Espectro 17.** EM (ID, IE) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (**15**).



Espectro 18. IR (ATR) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (15).

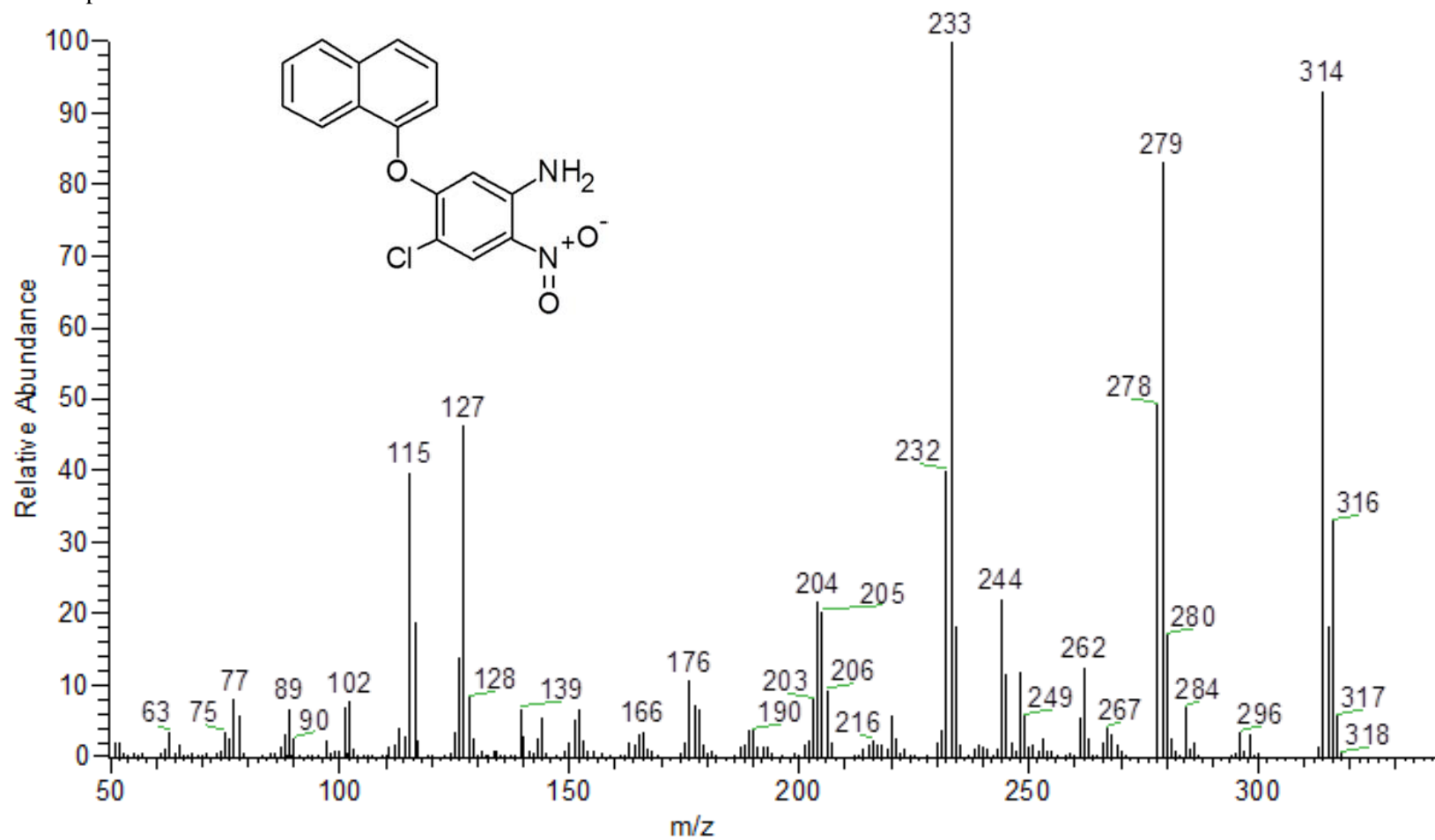


Espectro 19. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (7).

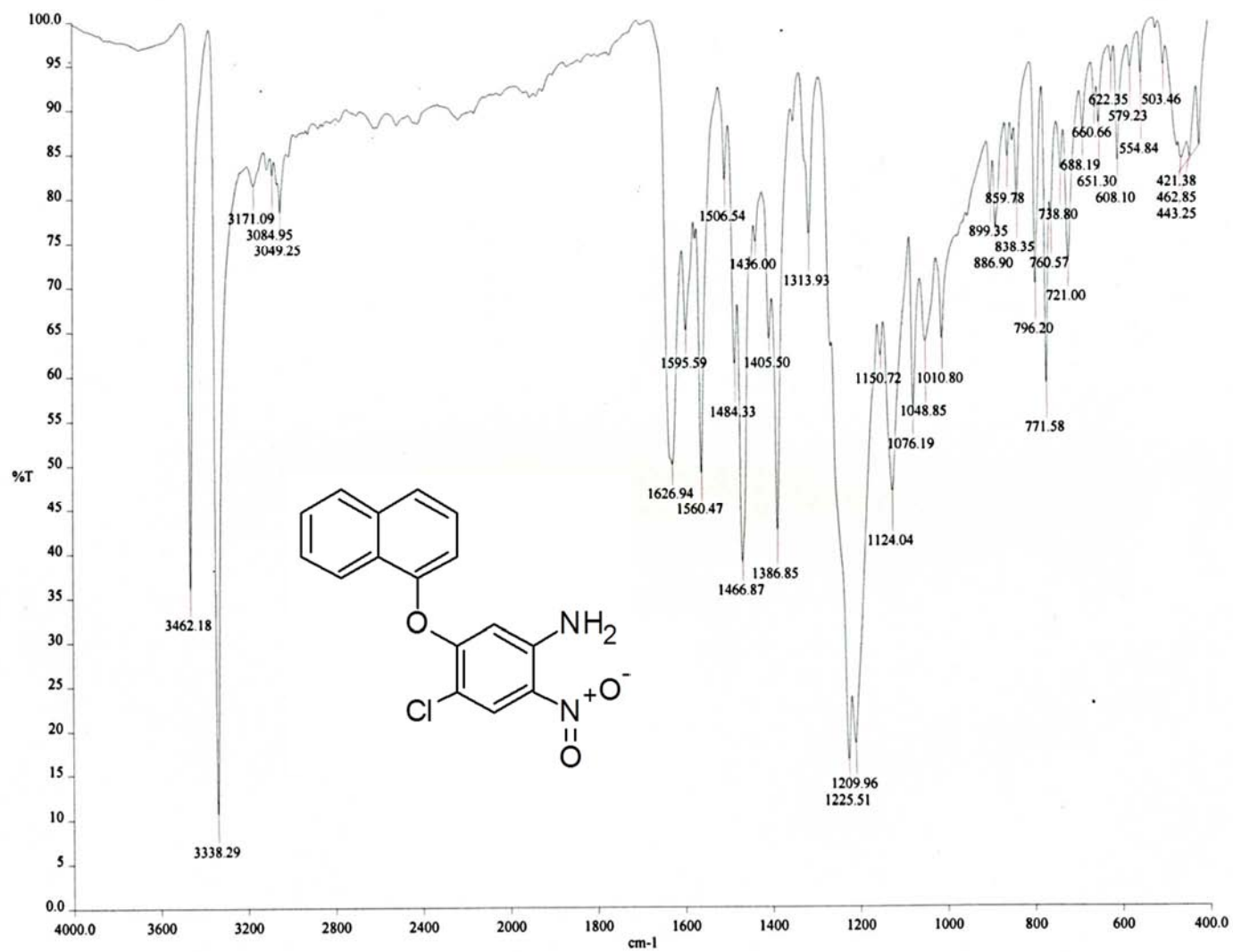


Espectro 20. RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (7).

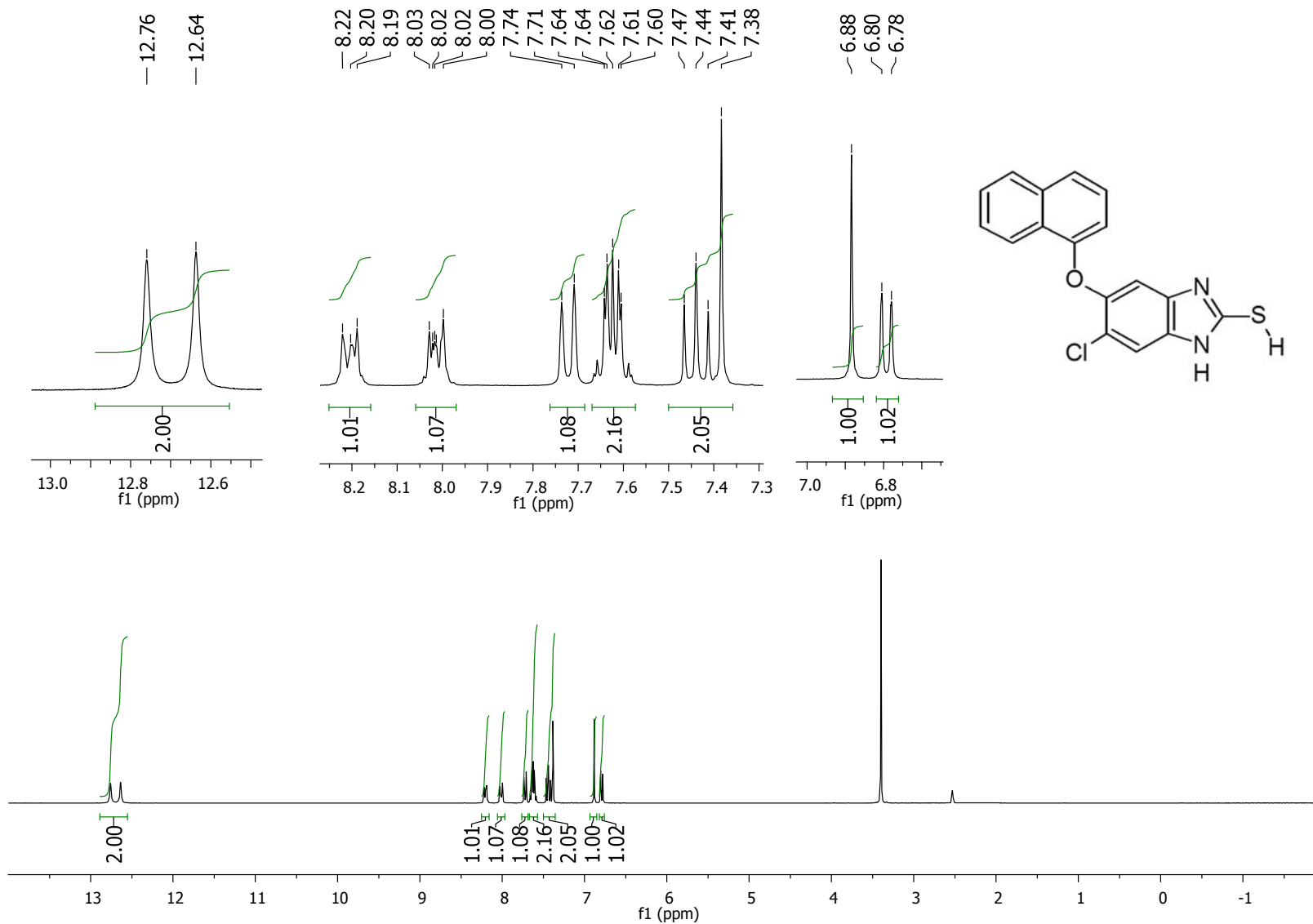
Masa monoisotópica: 314.04582 Da



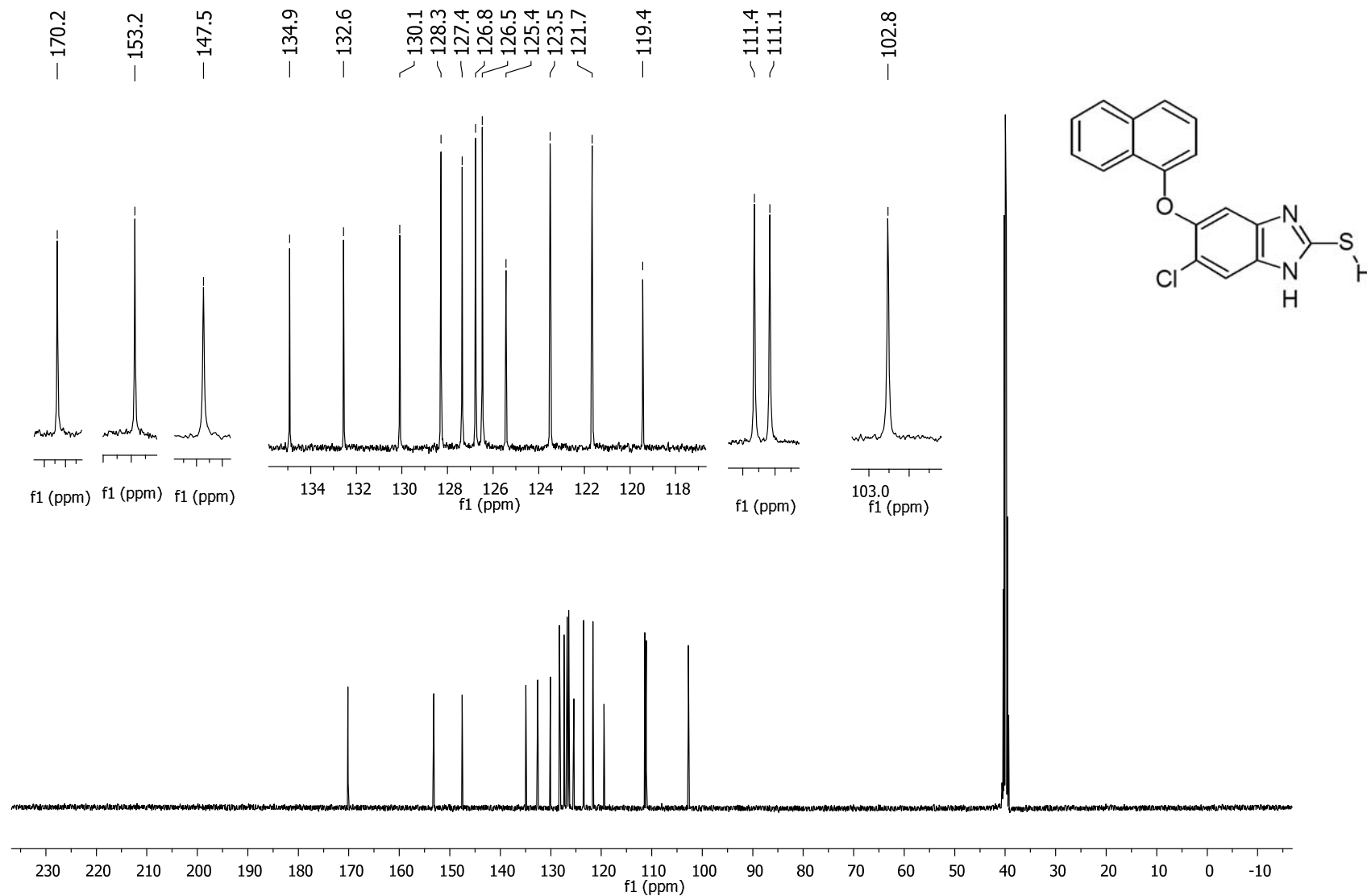
Espectro 21. EM (ID, IE) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (7).



Espectro 22. IR (ATR) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (7).

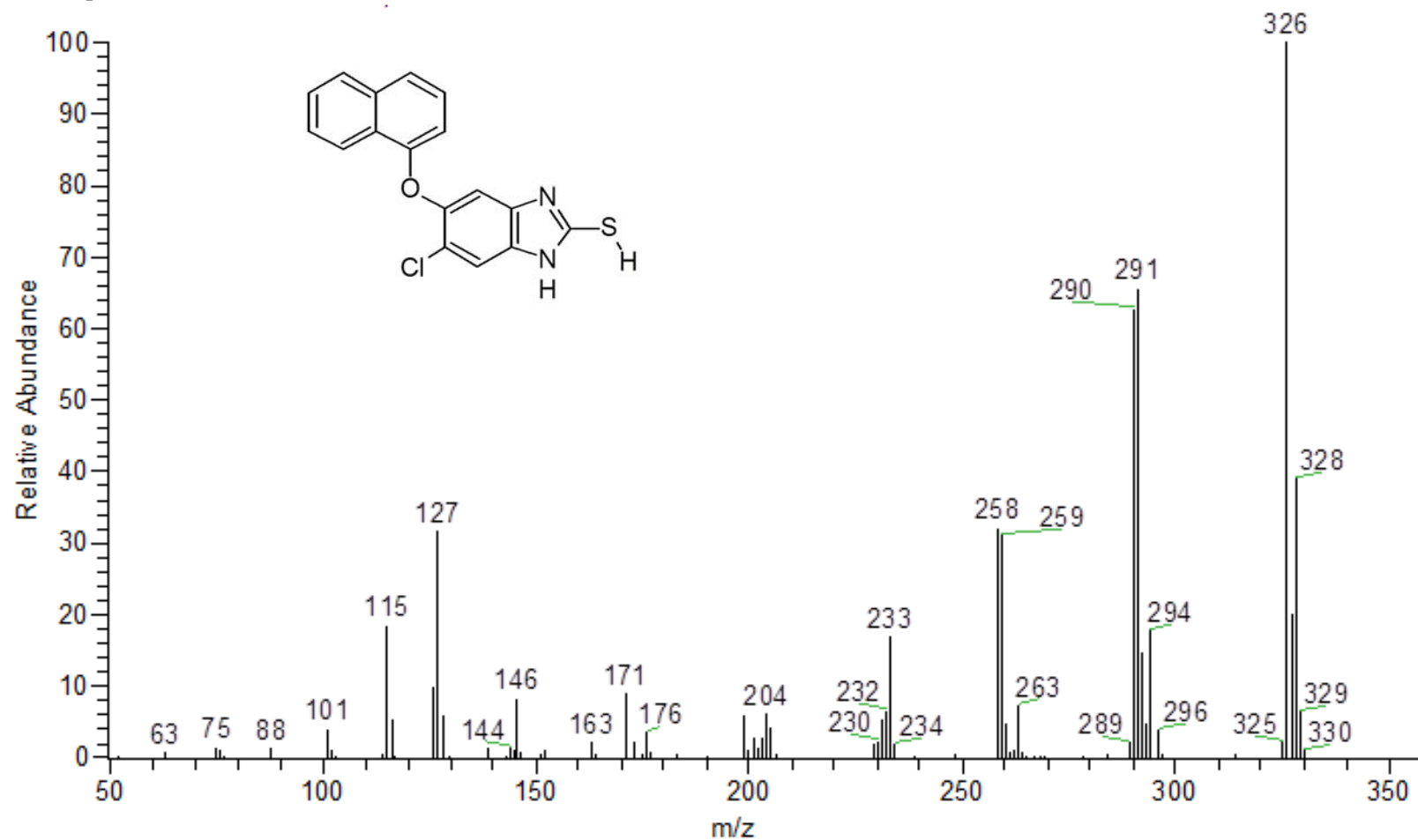


Espectro 23. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (**11**).

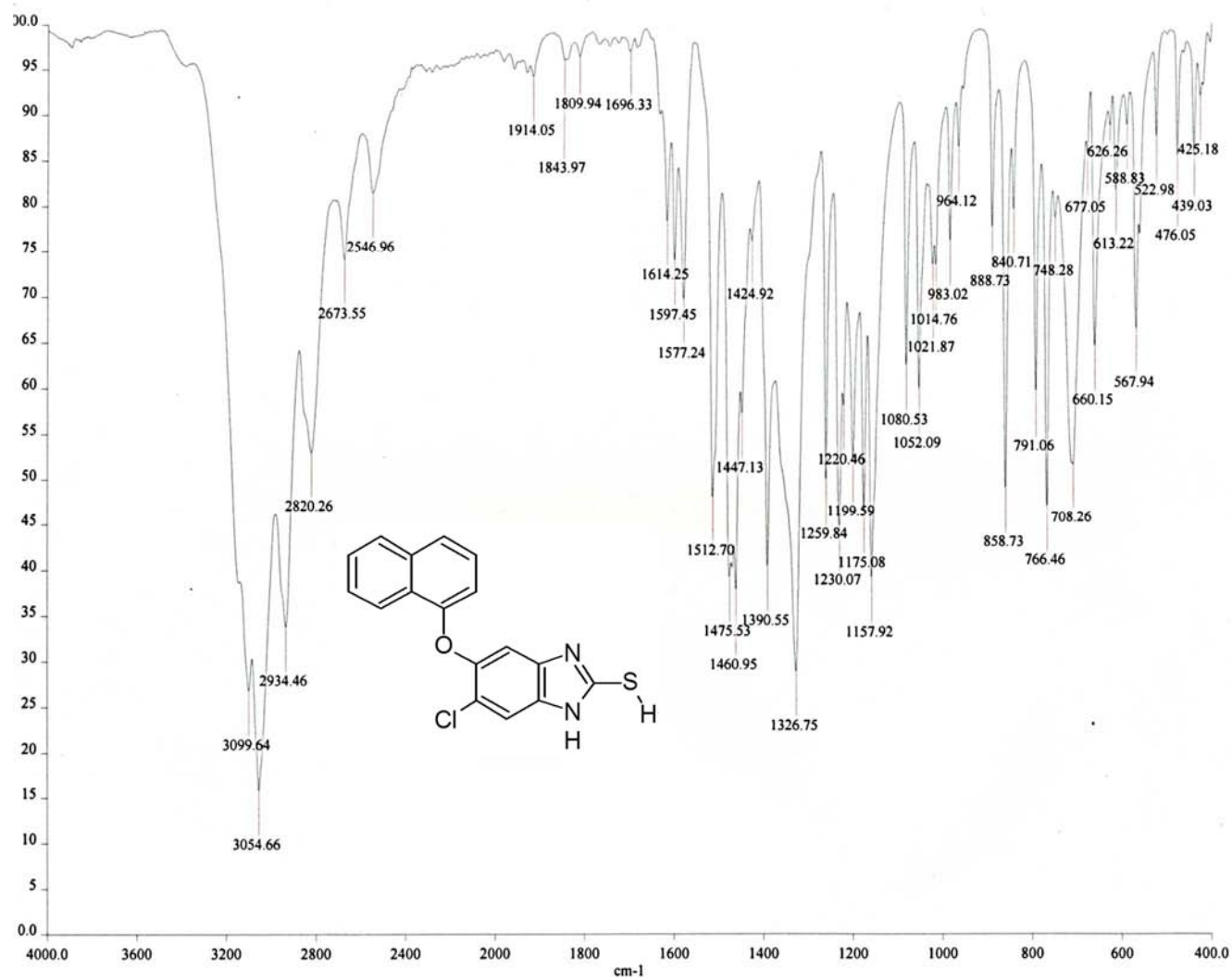


Espectro 24. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (11).

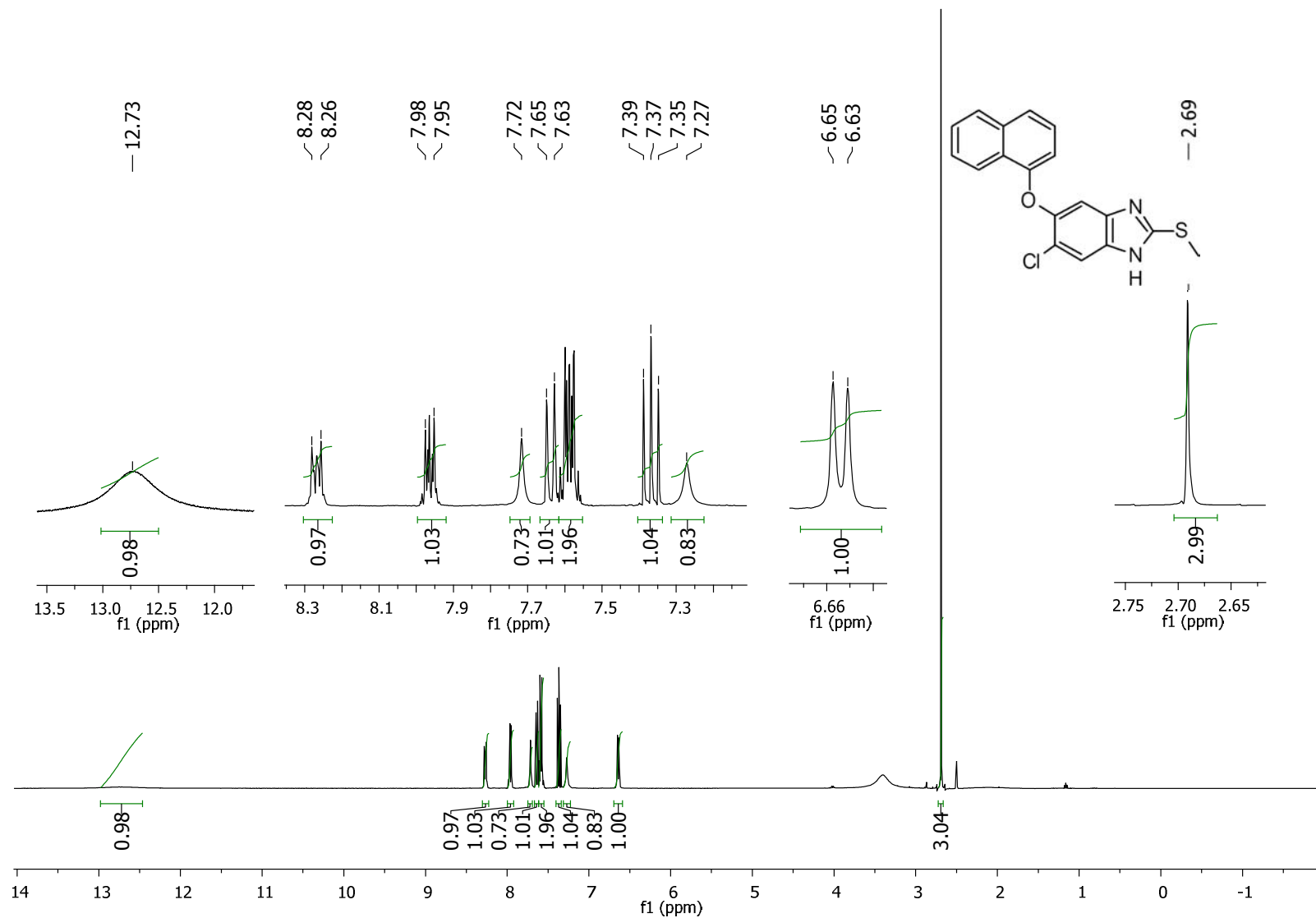
Masa monoisotópica: 326.028061 Da



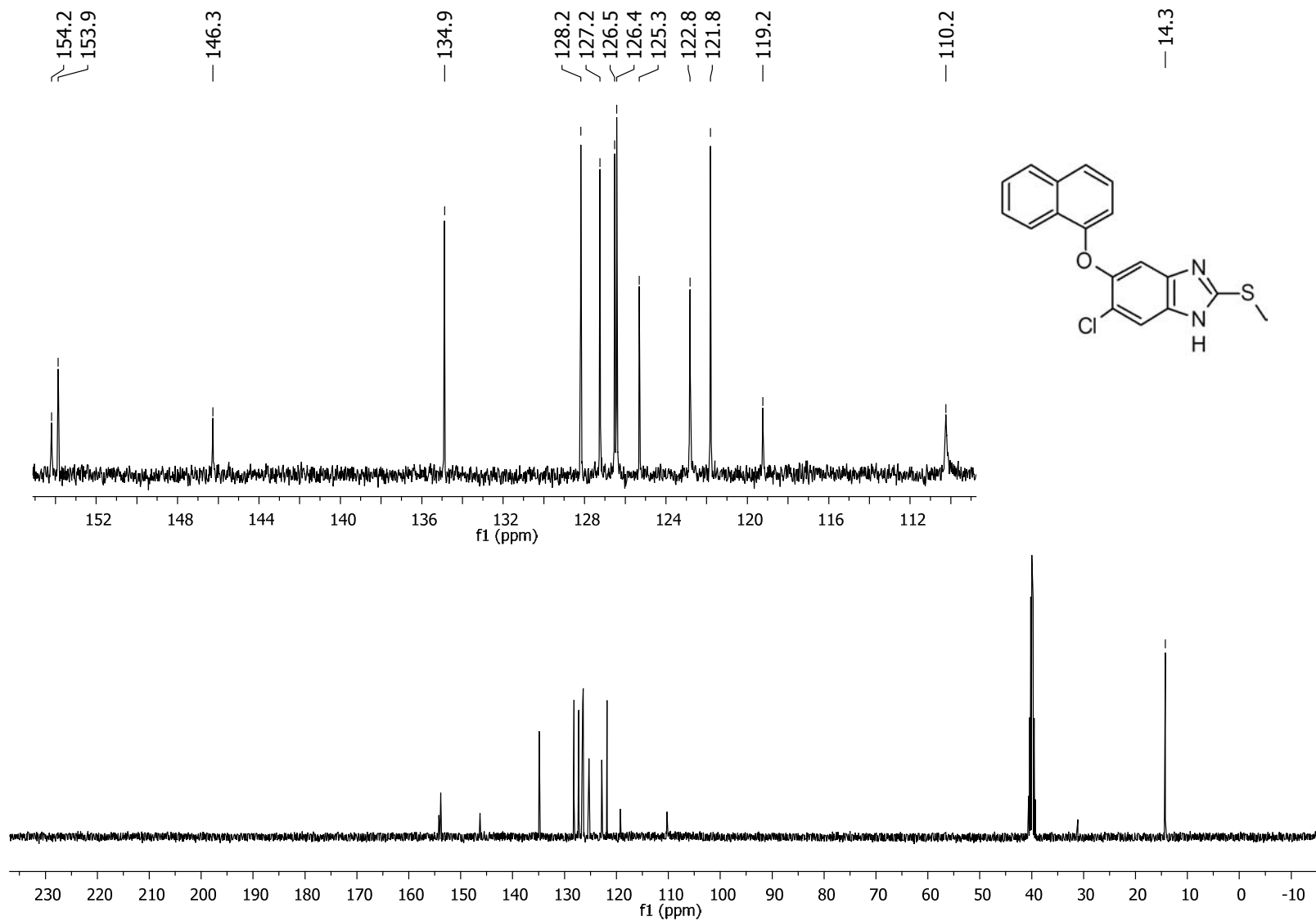
Espectro 25. EM (ID, IE) del compuesto 5-cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (**11**).



Espectro 26. IR (ATR) del compuesto 5-cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (11).

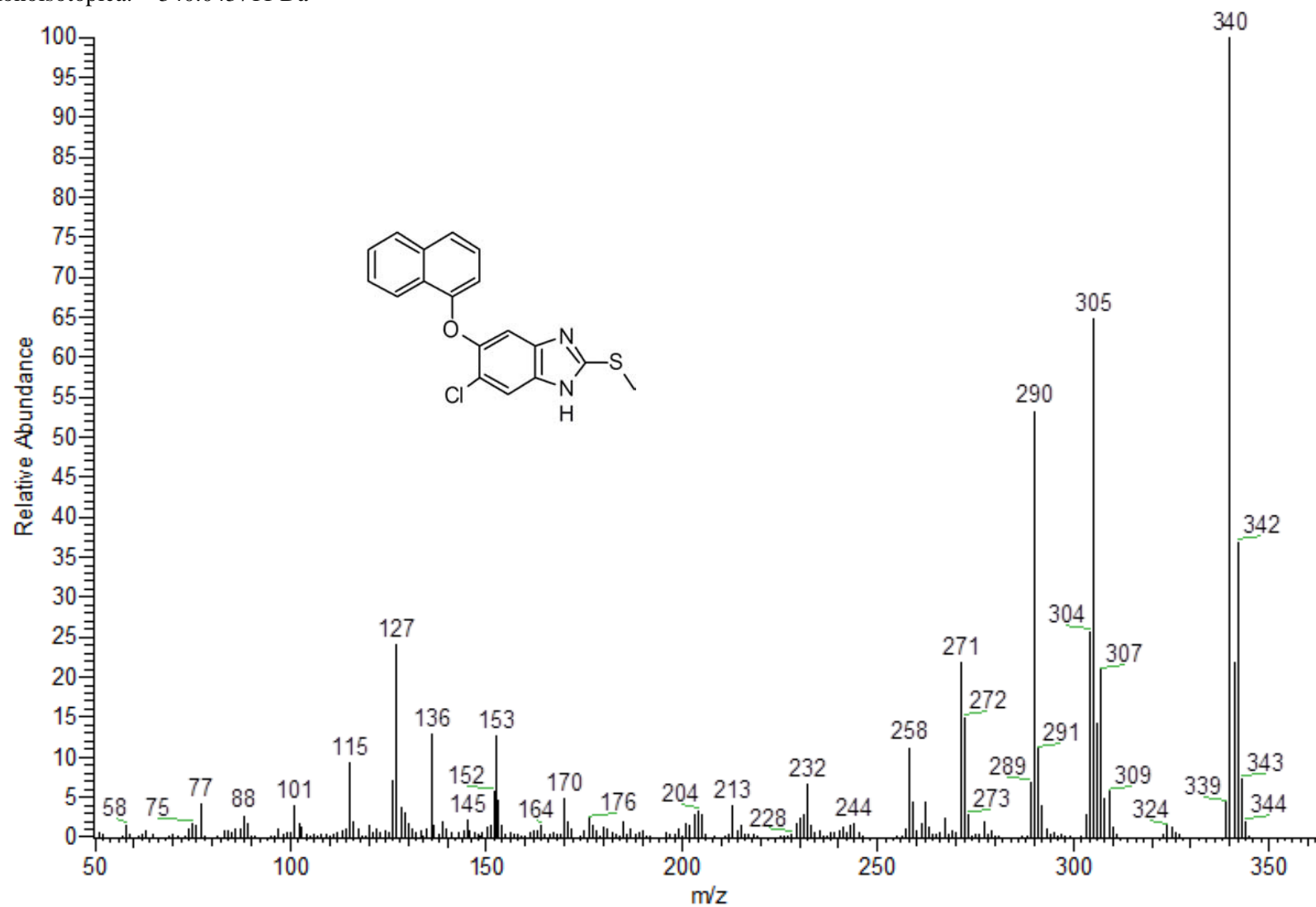


Espectro 27. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (**13**).

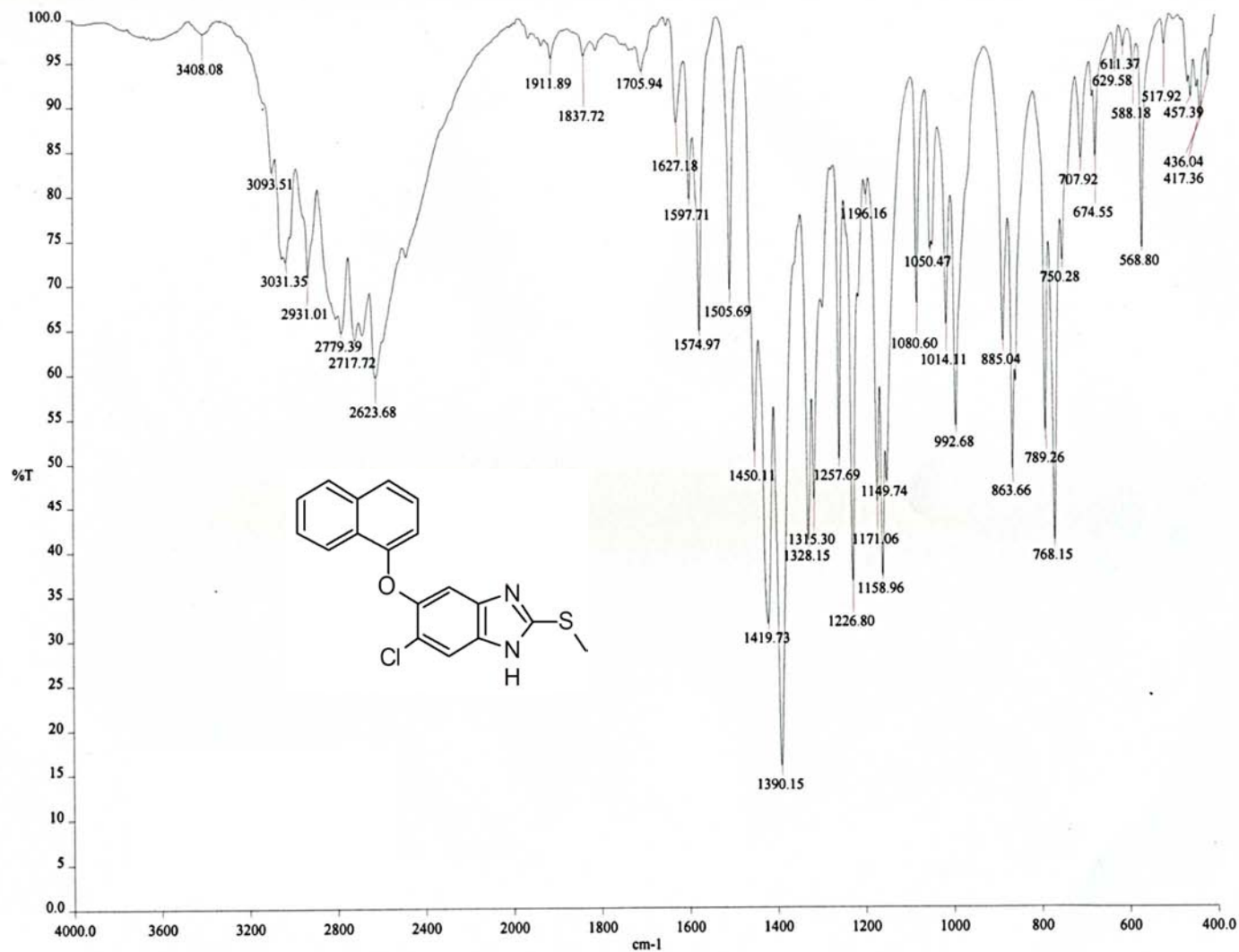


Espectro 28. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (13).

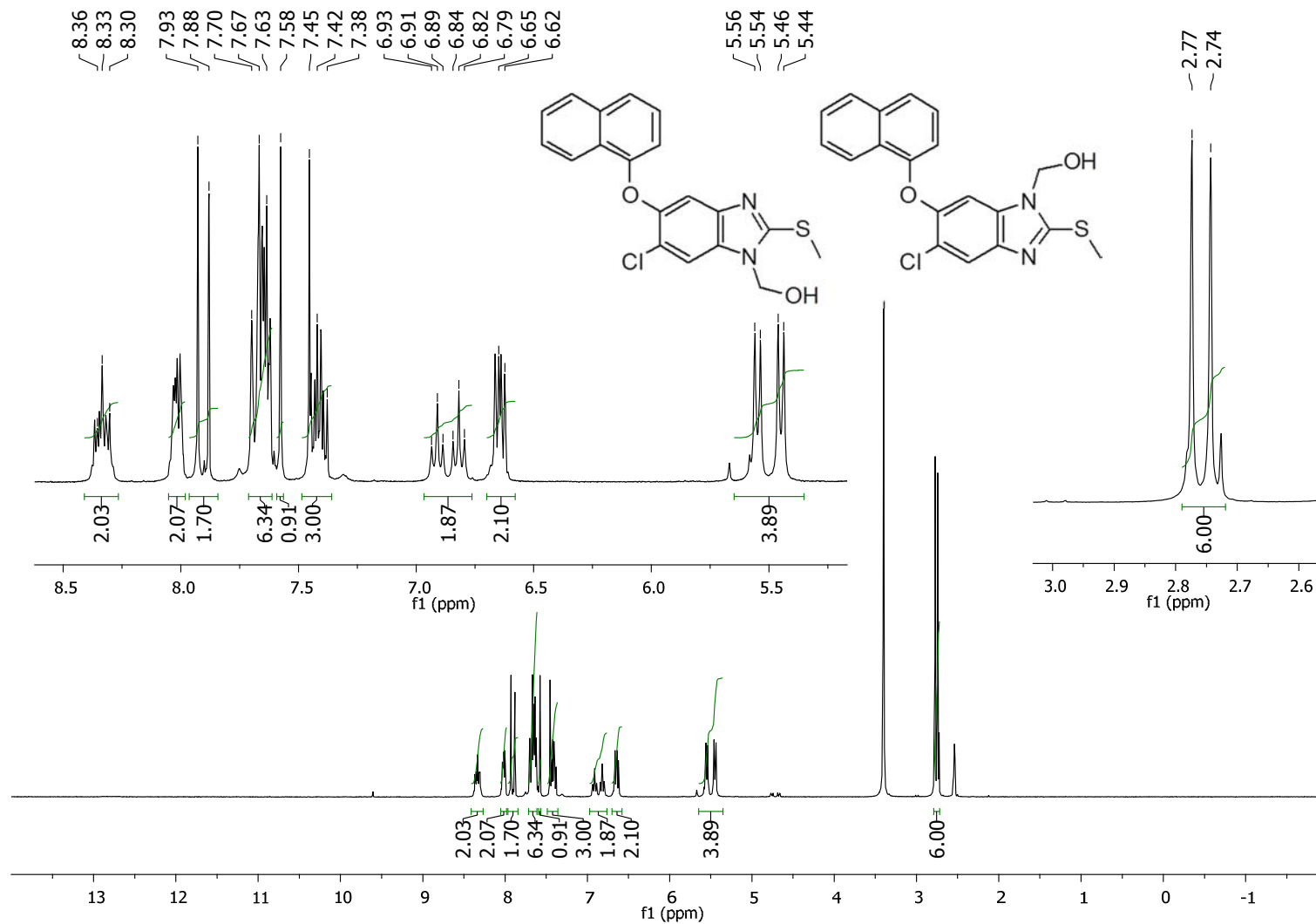
Masa monoisotópica: 340.043711 Da



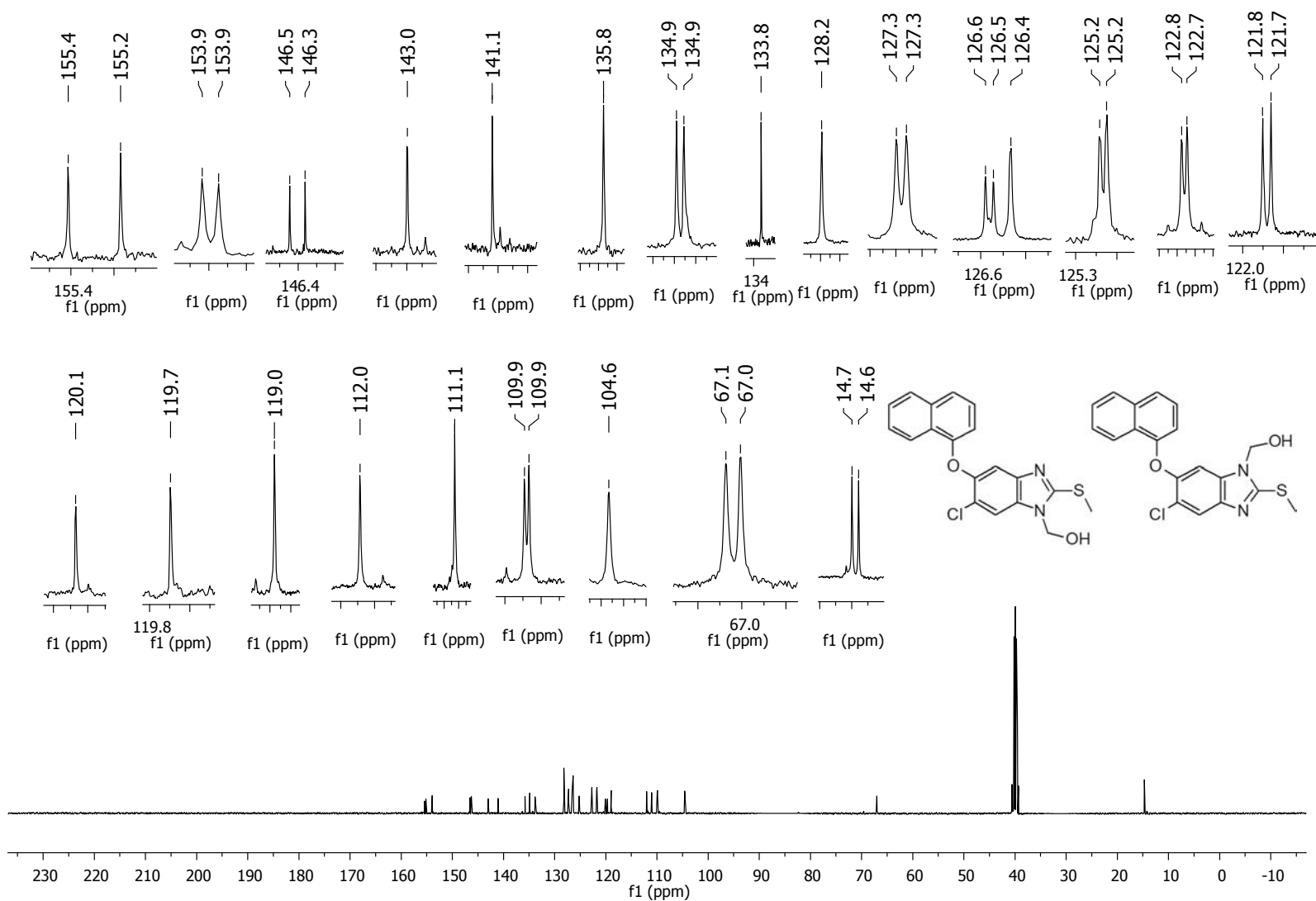
Espectro 29. EM (ID, IE) del compuesto del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (13).



Espectro 30. IR (ATR) del compuesto 5-cloro-2-(metiltilio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (13).

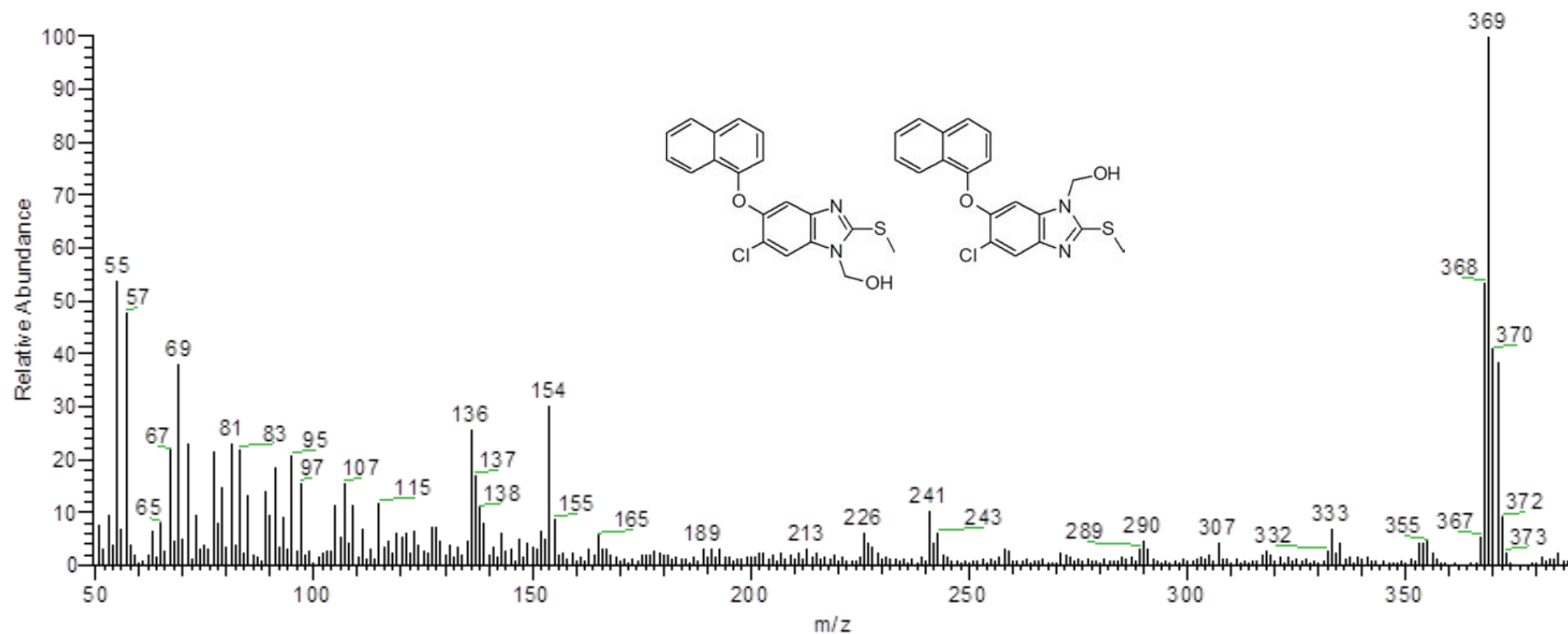


Espectro 31. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm) para [6-cloro-2-(1-naftiloxi)-5-(1H-metiltio)-1H-benzimidazol-1-il]metanol (**17a**) y [5-cloro-2-(1-naftiloxi)-6-(1H-metiltio)-1H-benzimidazol-1-il]metanol (**17b**).

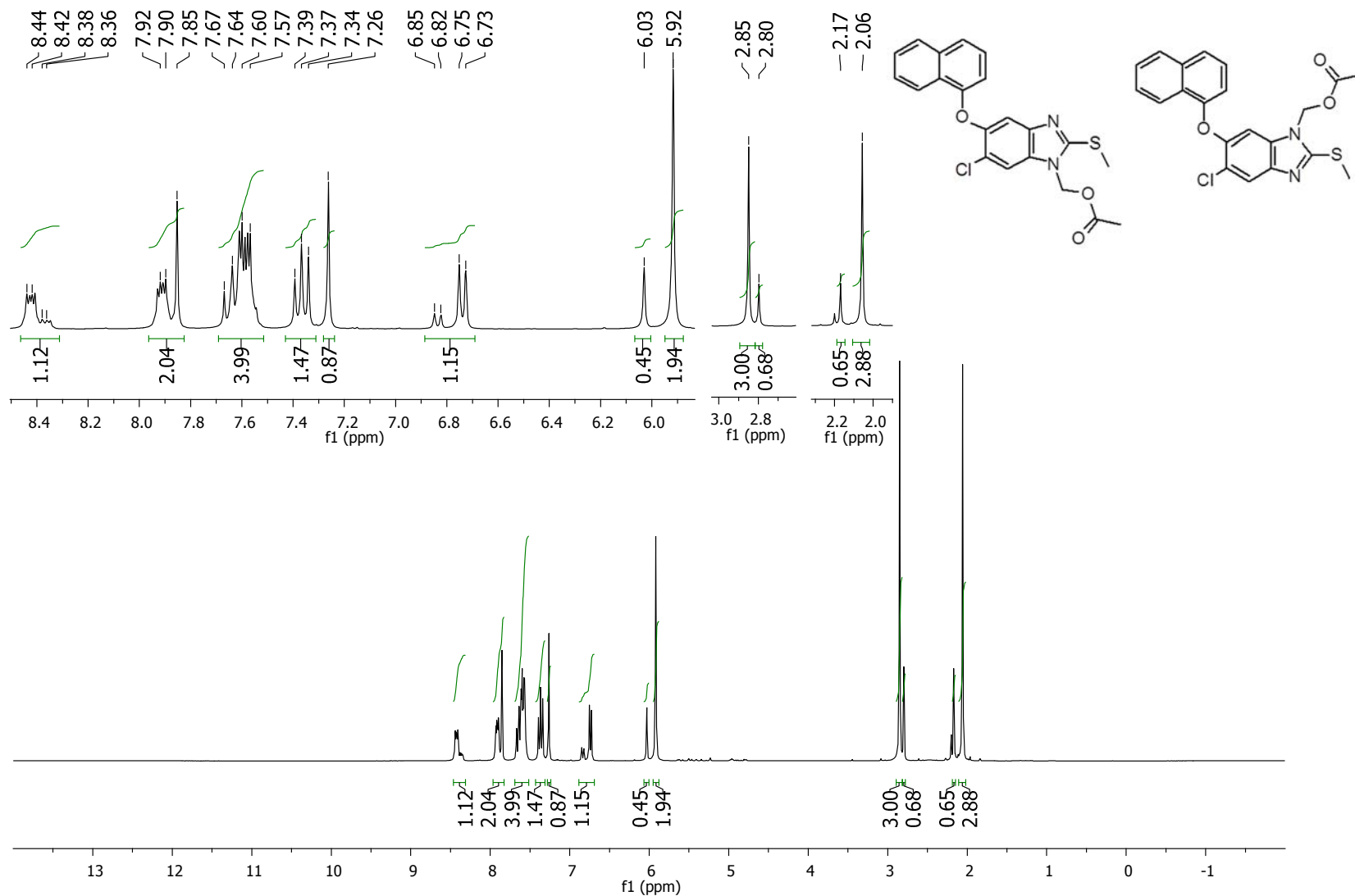


Espectro 32. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metanol (**17a**) y [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metanol (**17b**).

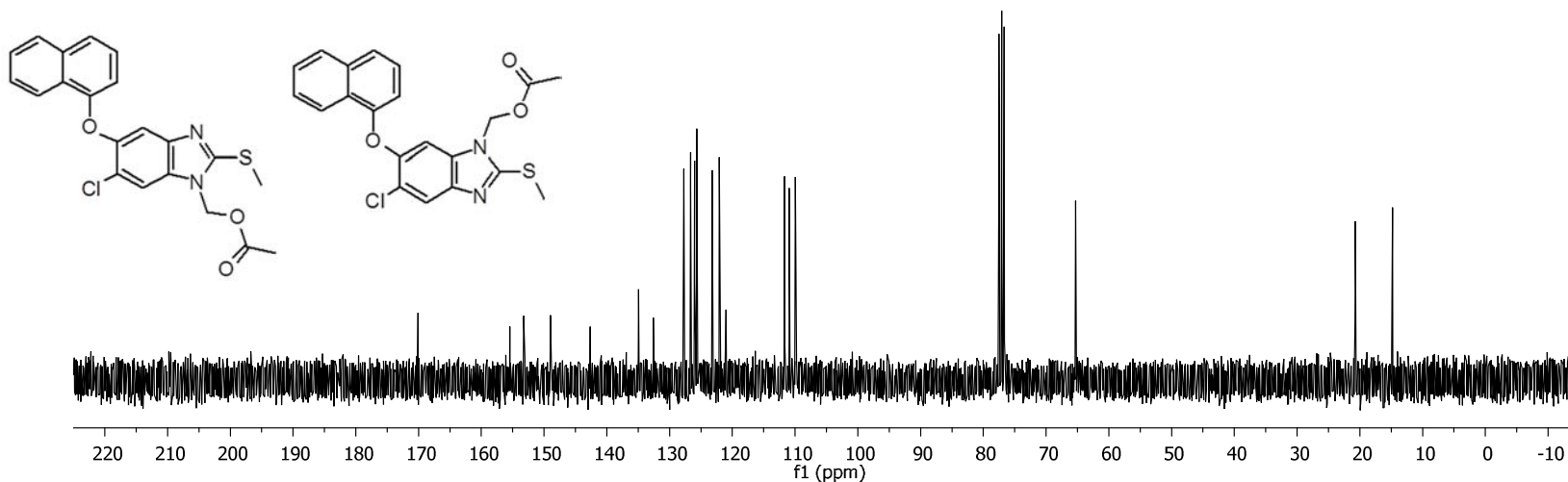
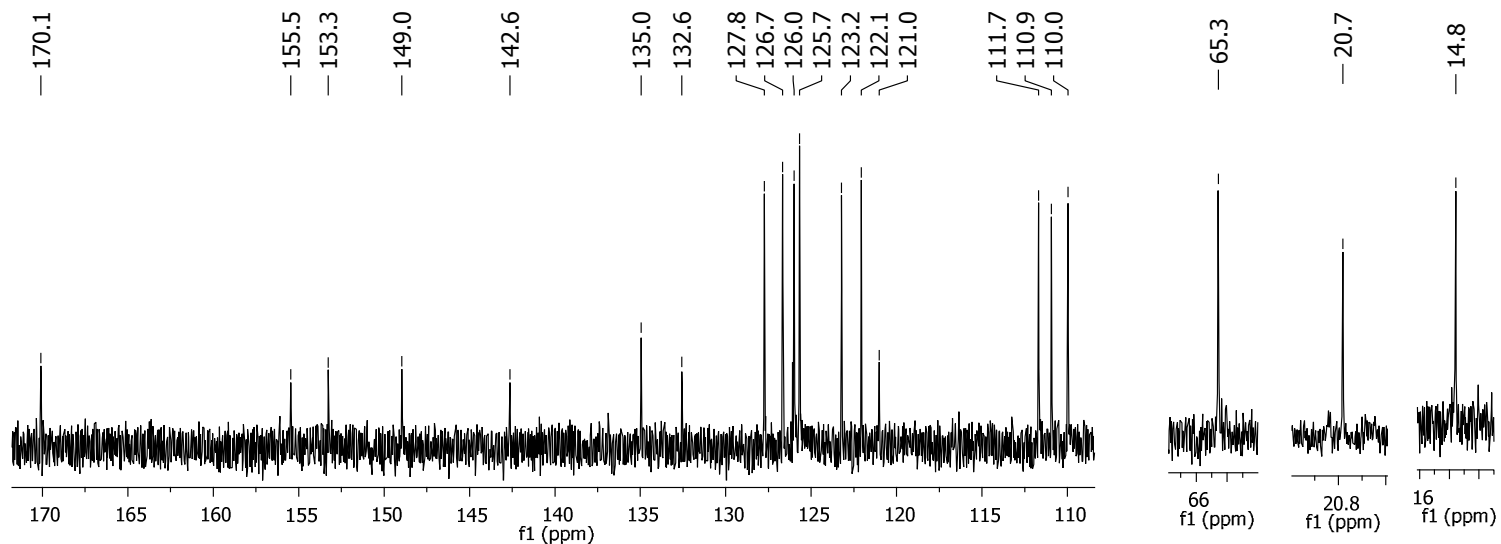
Masa monoisotópica: 370.054275 Da



Espectro 33. EM (ID, IE) para [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (**17a**) y [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (**17b**).

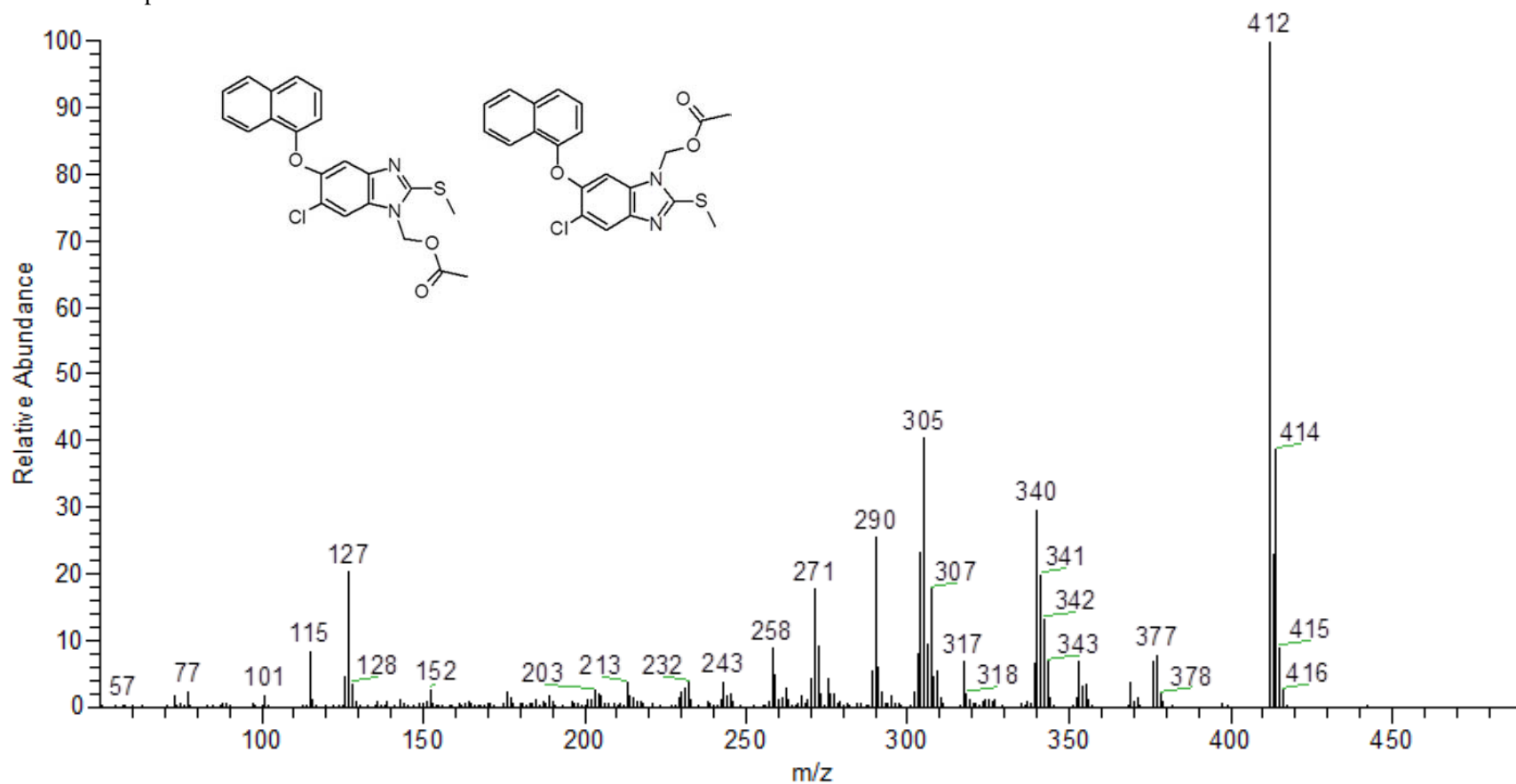


Espectro 34. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) para acetato de acetato de [6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**20a**) y [5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**20b**).

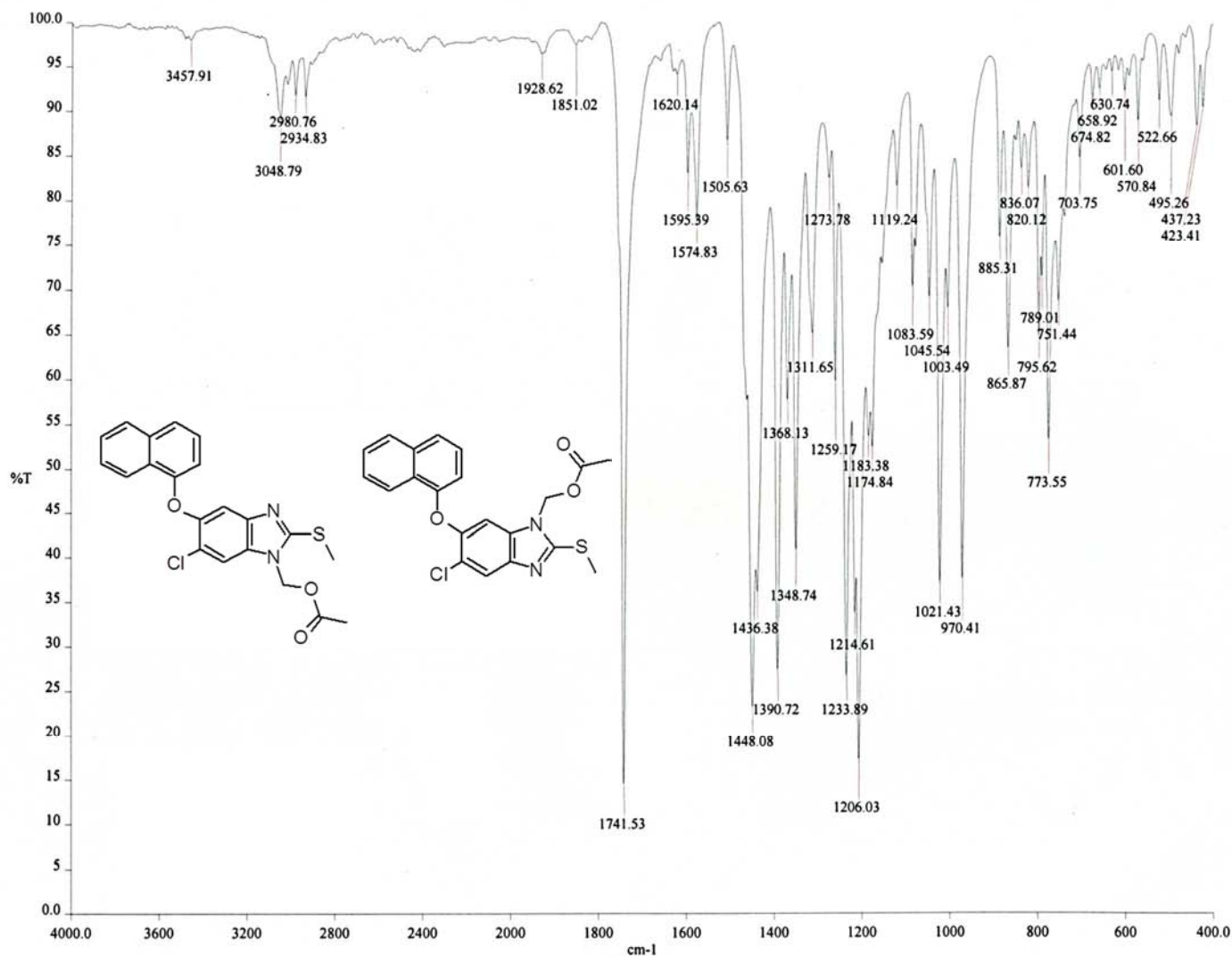


Espectro 35. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para acetato de [6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**20a**) y acetato de [5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**20b**).

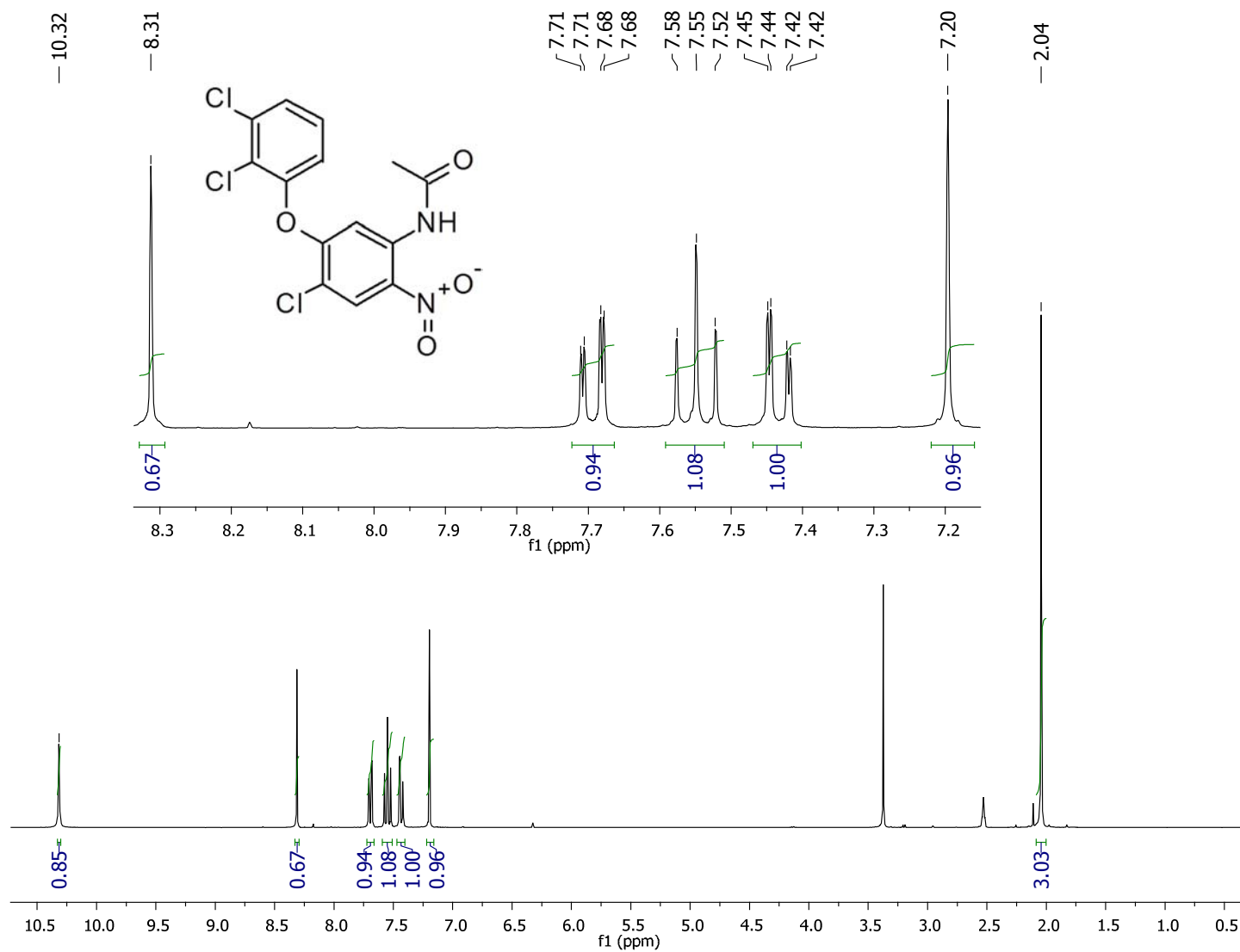
Masa monoisotópica: 412.06484 Da



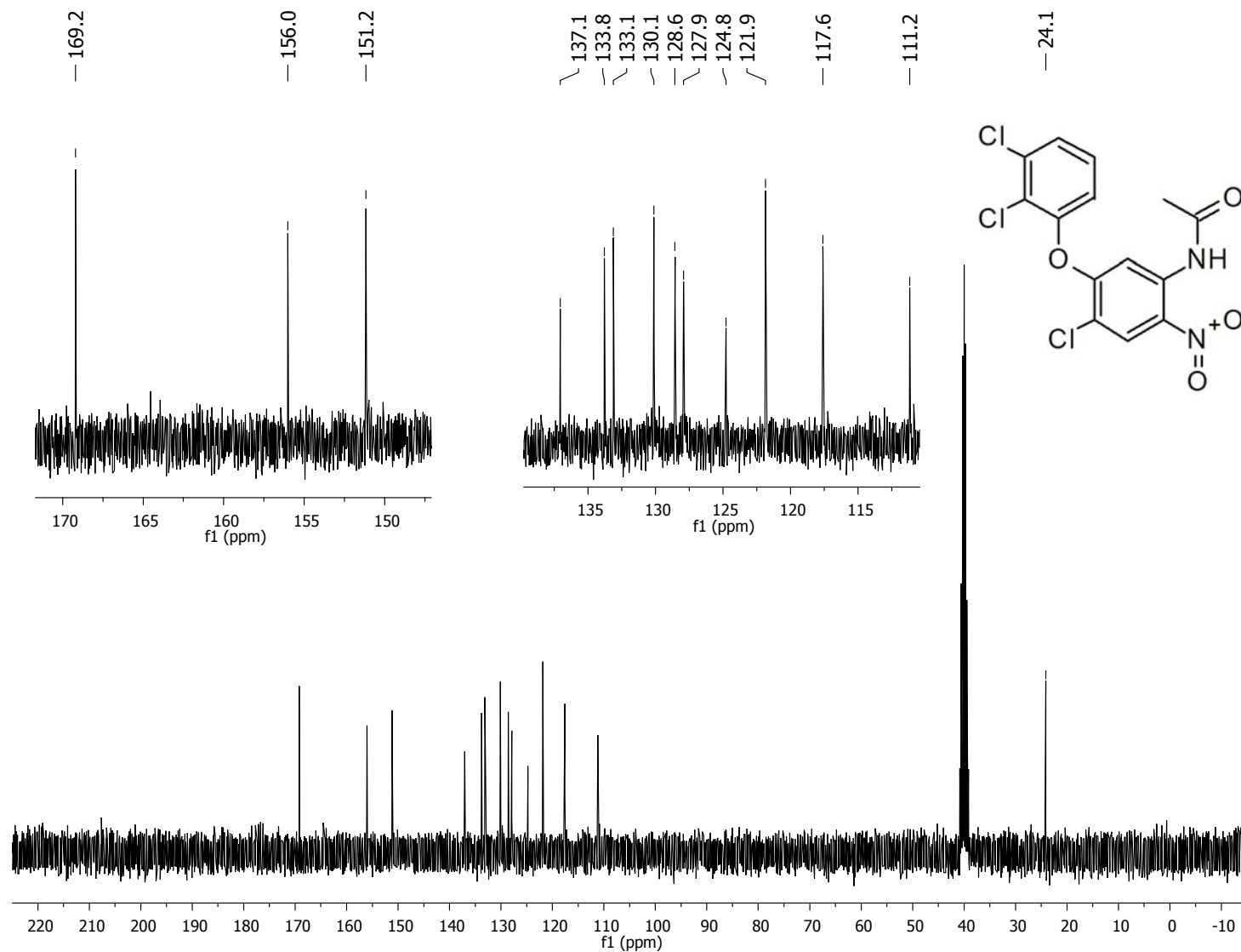
Espectro 36. EM (ID/IE, m/z) para acetato de acetato de [6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**20a**) y [5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo(**20b**).



Espectro 37. IR (ATR) para acetato de acetato de [6-cloro-2-metilitio-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**20a**) y [5-cloro-2-metilitio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo(**20b**).

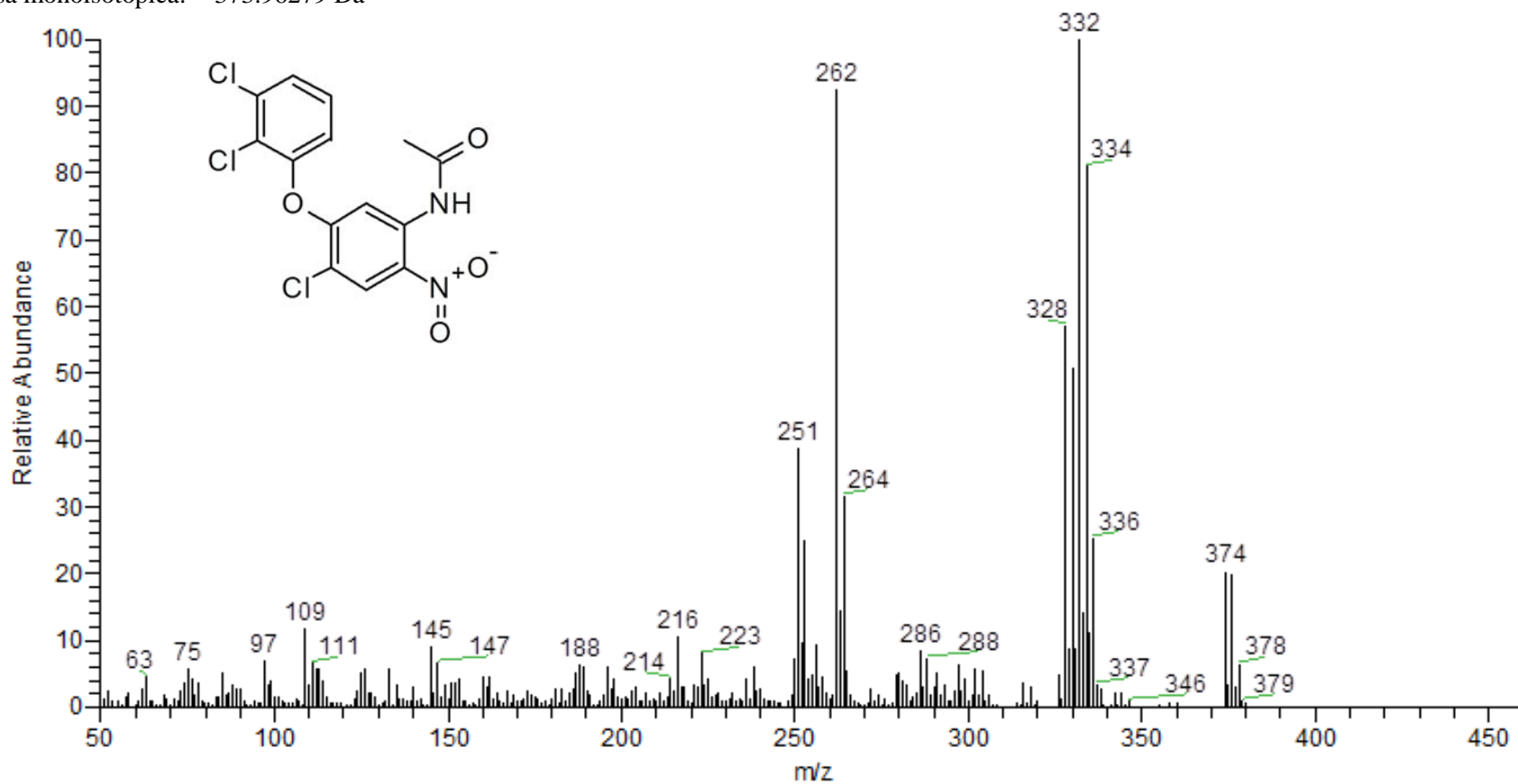


Espectro 38. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (**16**).

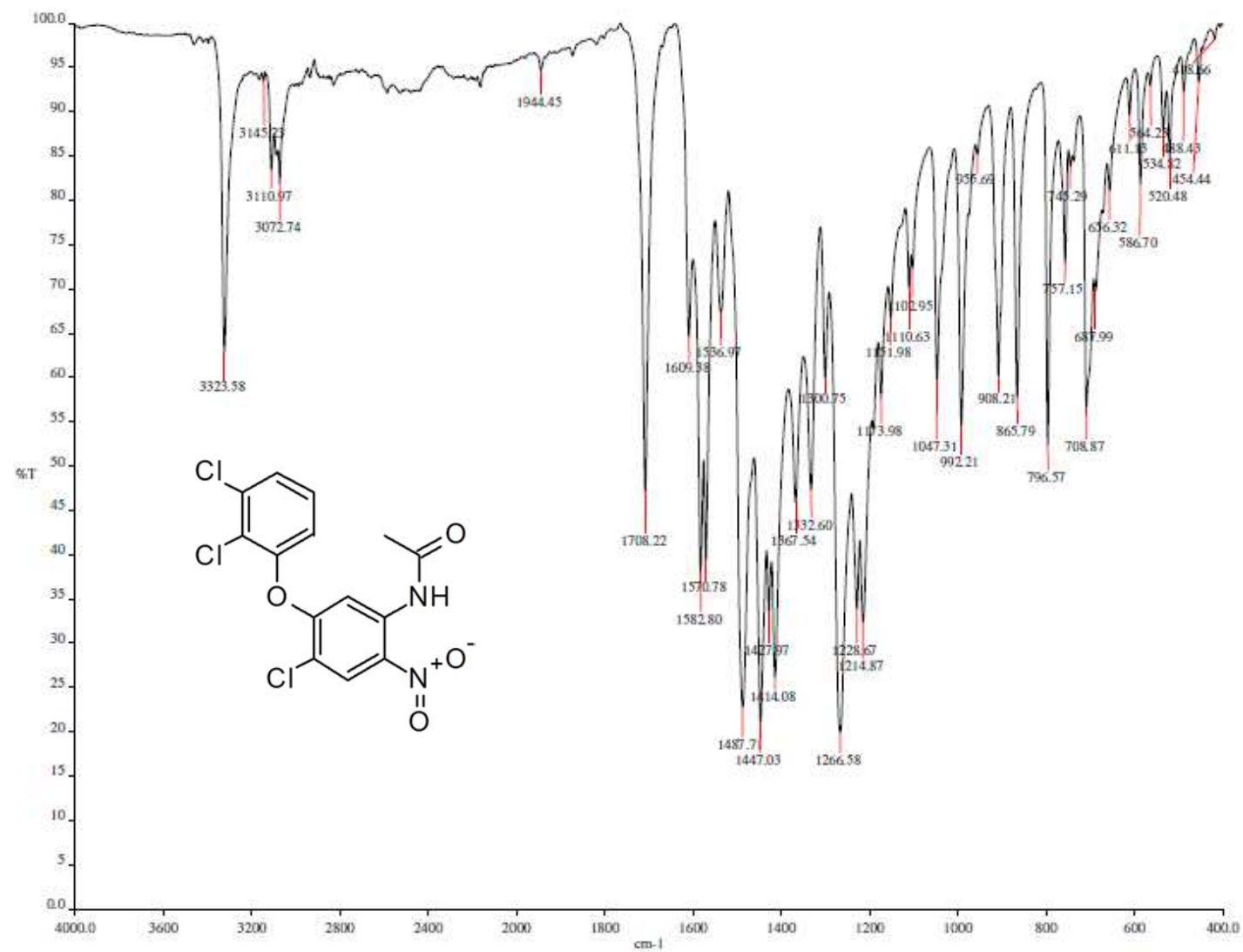


Espectro 39. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) del *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (16).

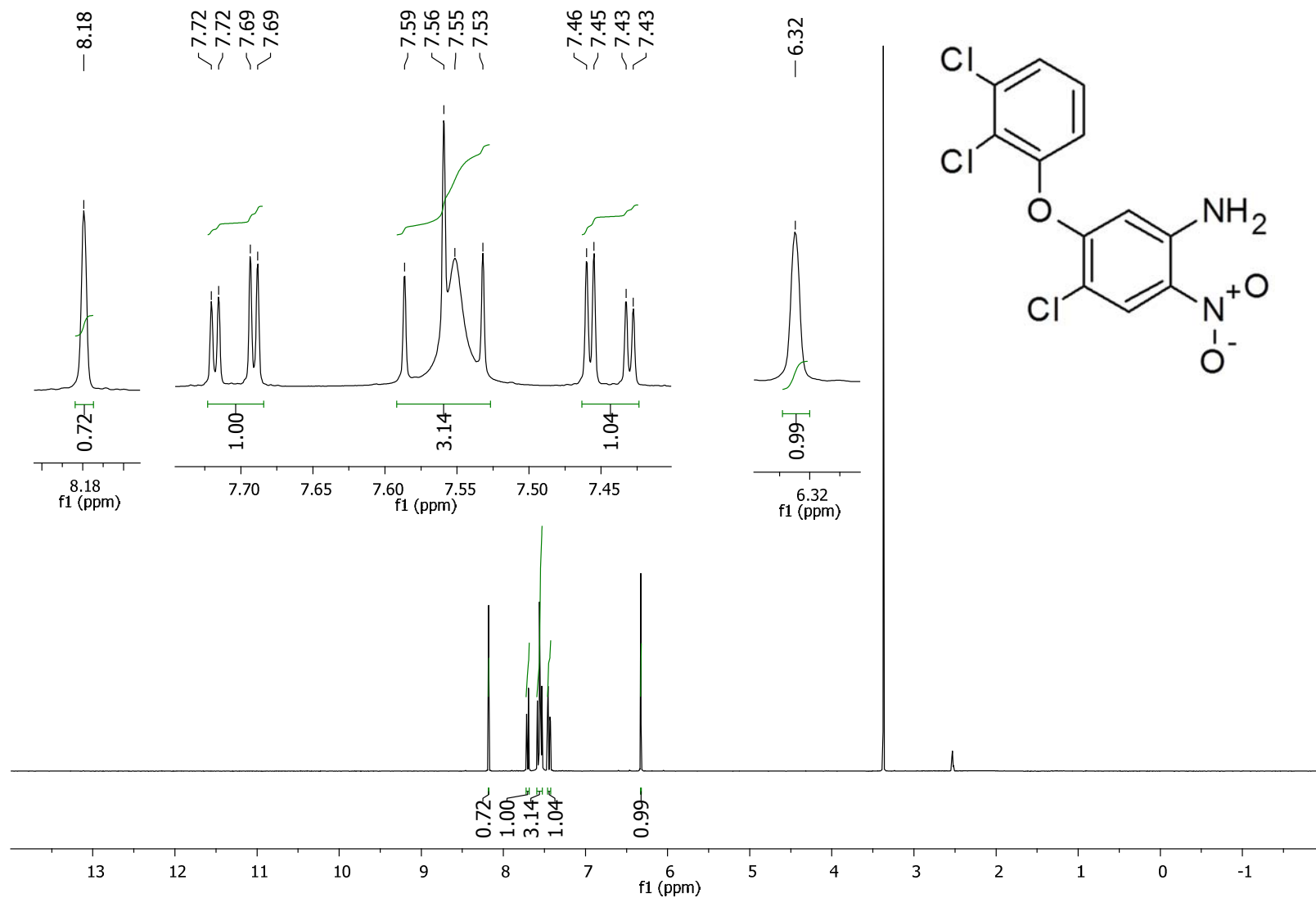
Masa monoisotópica: 373.96279 Da



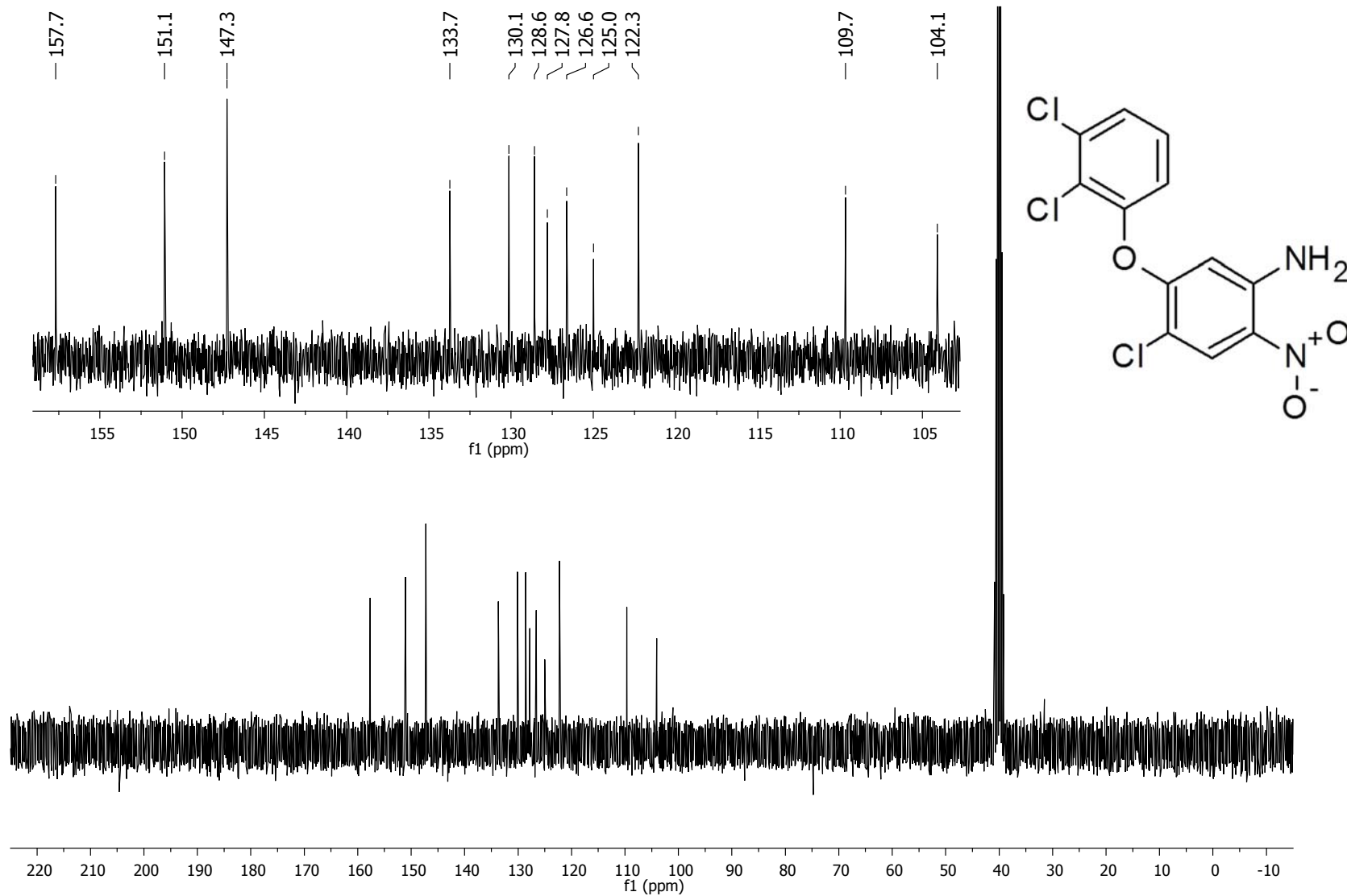
Espectro 40. EM (ID, IE) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (**16**).



Espectro 41. IR (ATR) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (16).

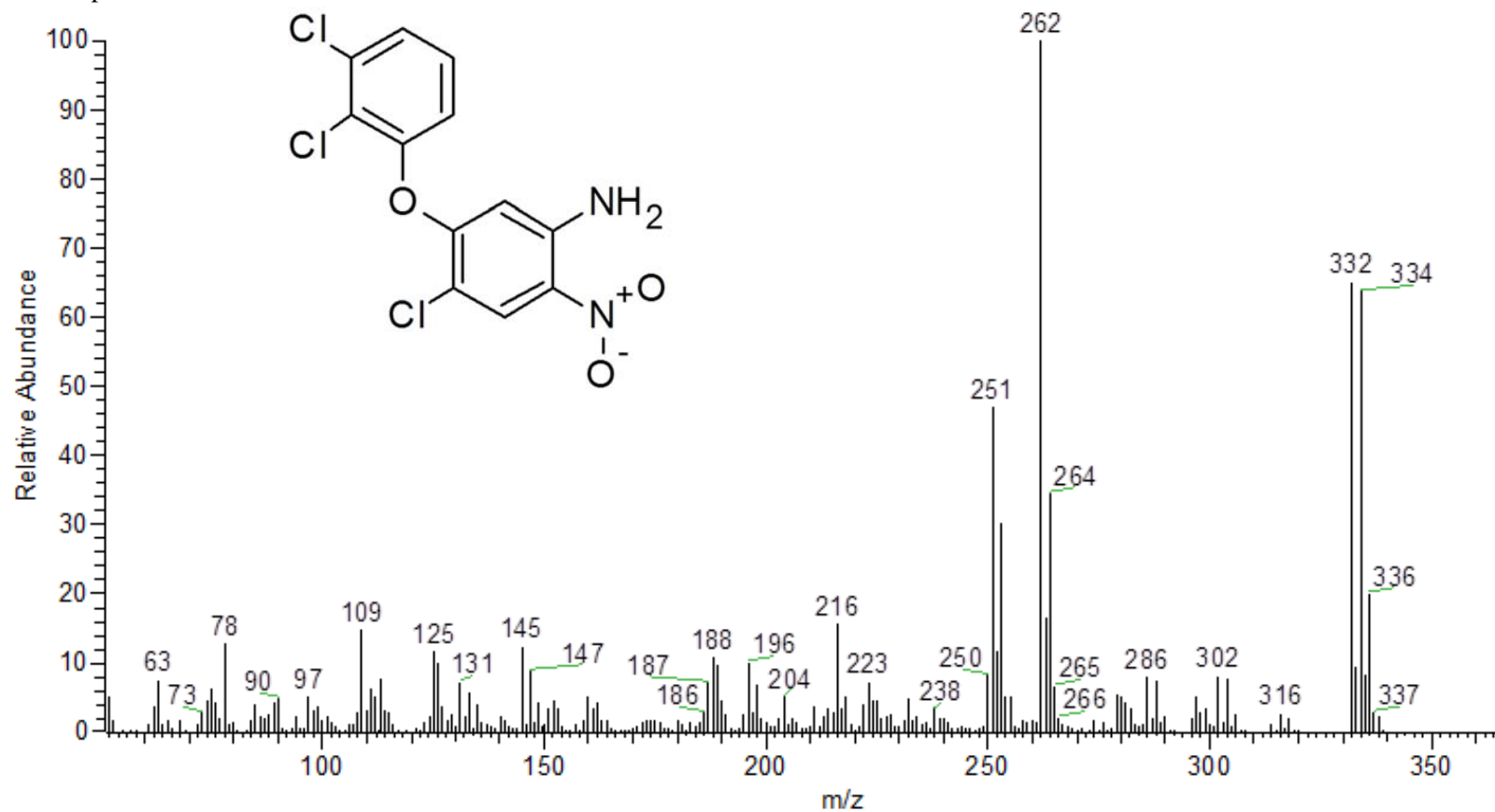


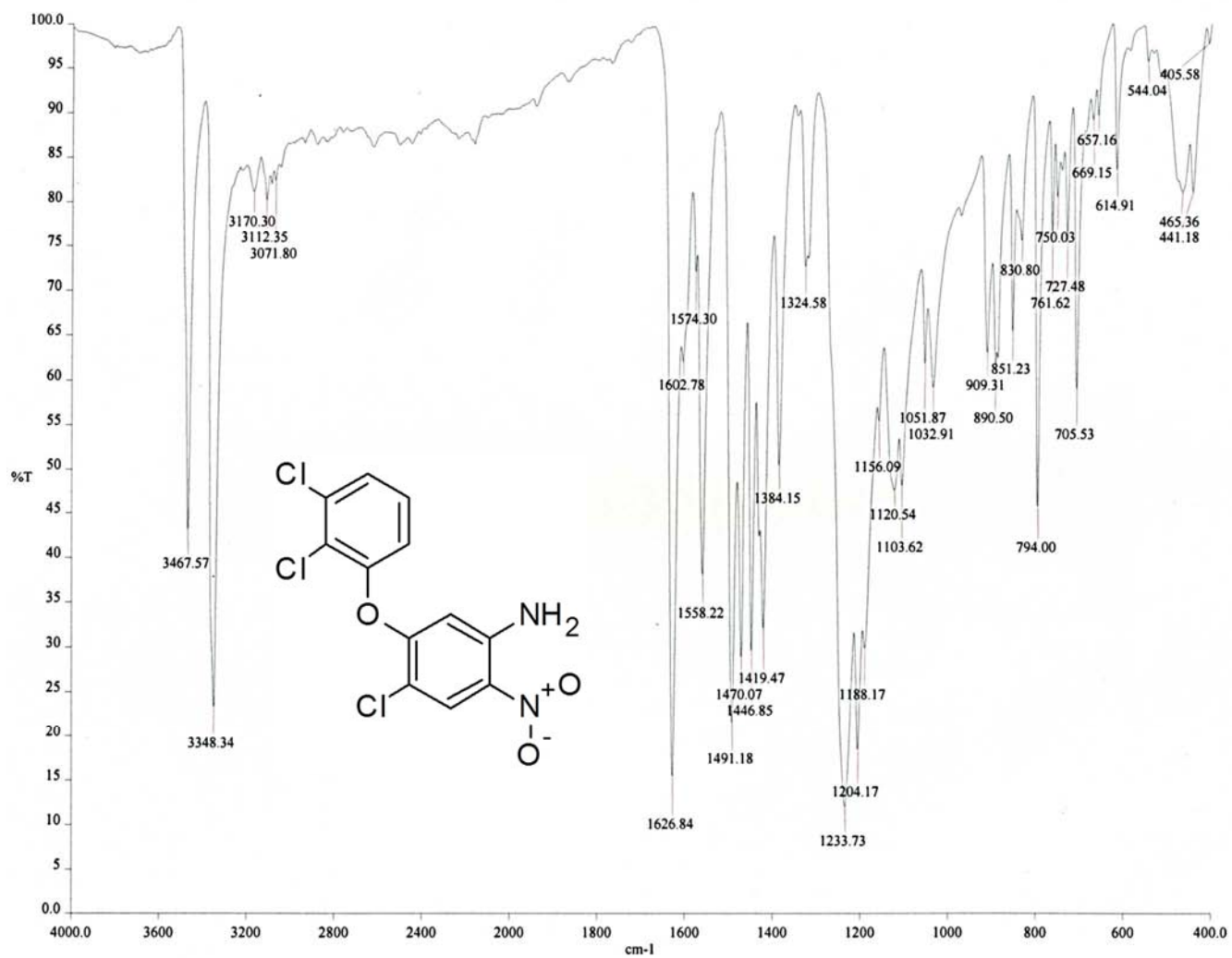
Espectro 42. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**8**).



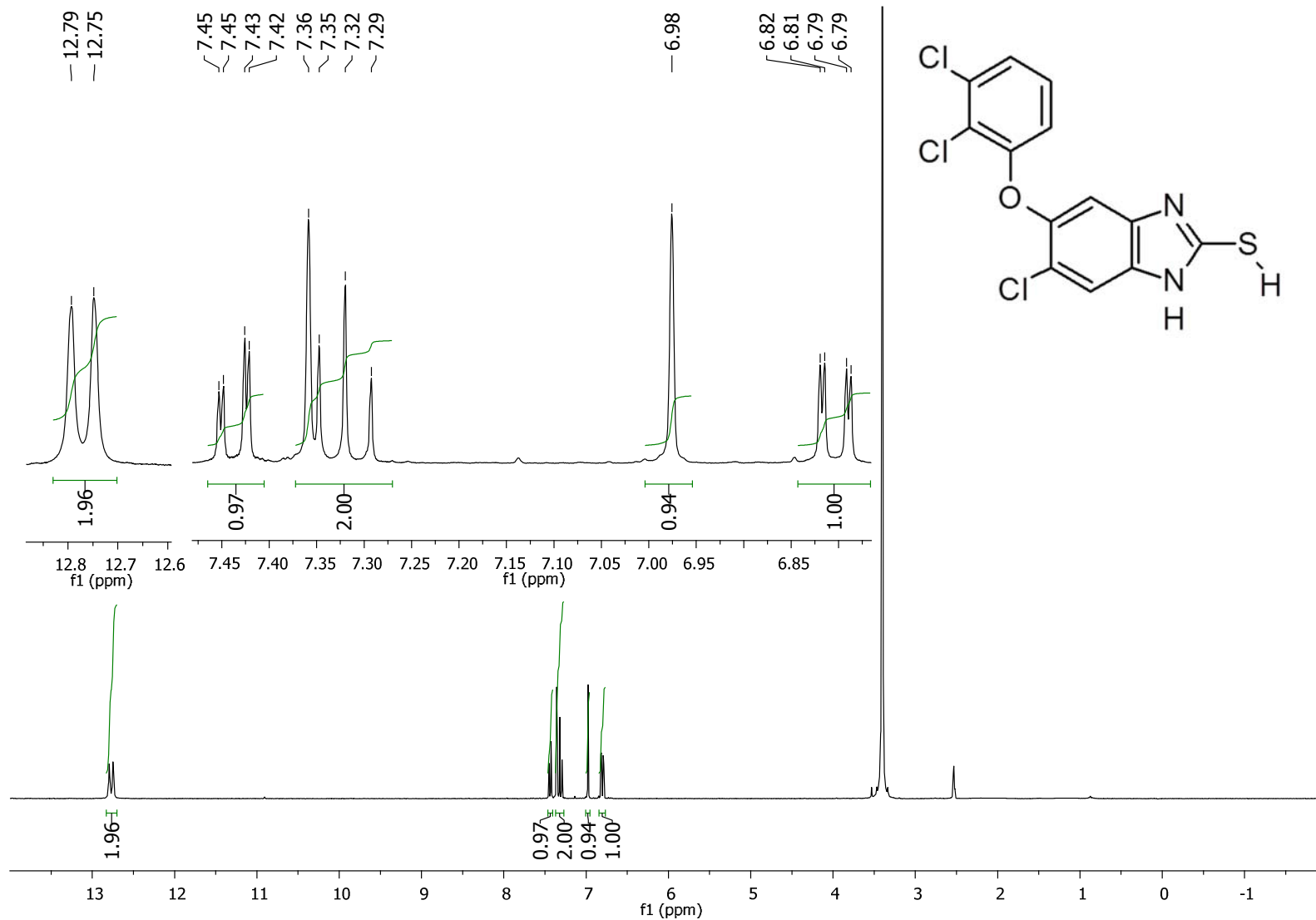
Espectro 43. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitroanilina (**8**).

Masa monoisotópica: 331.952225 Da

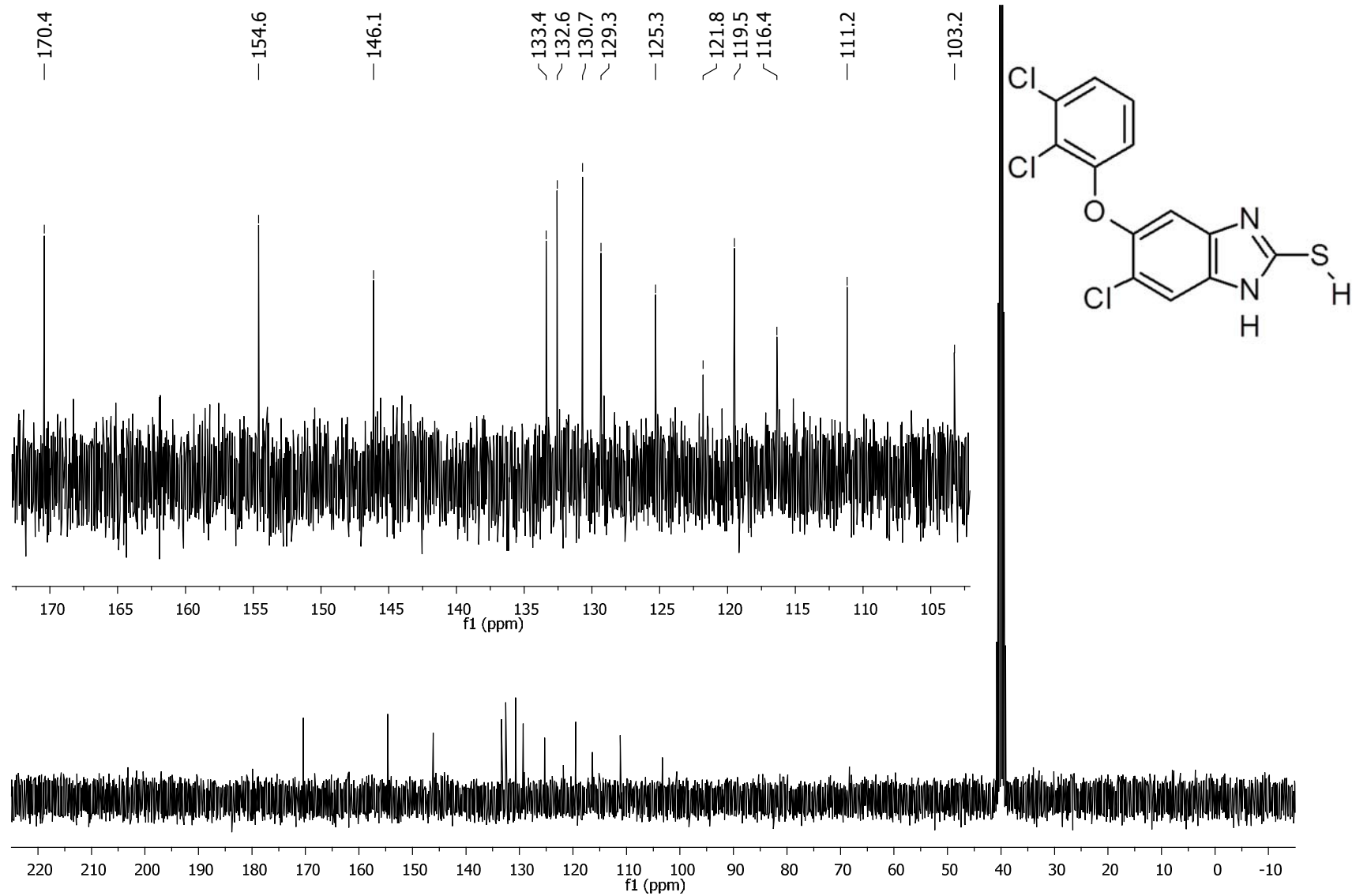
**Espectro 44.** EM (ID, IE) del compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**8**).



Espectro 45. IR (ATR) del compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitroanilina (10).

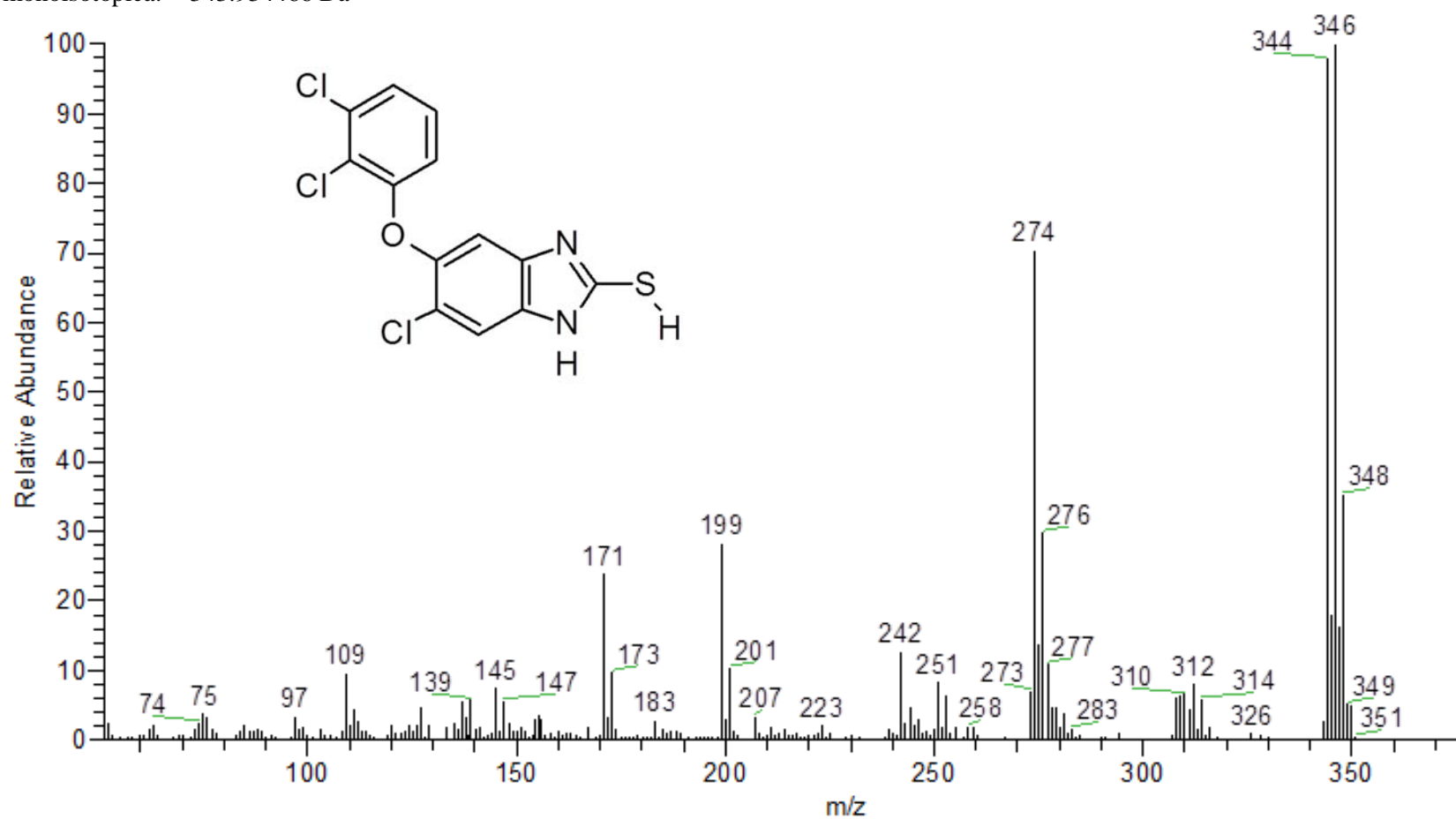


Espectro 46. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) para 5-cloro-2-mercapto-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol (**12**).

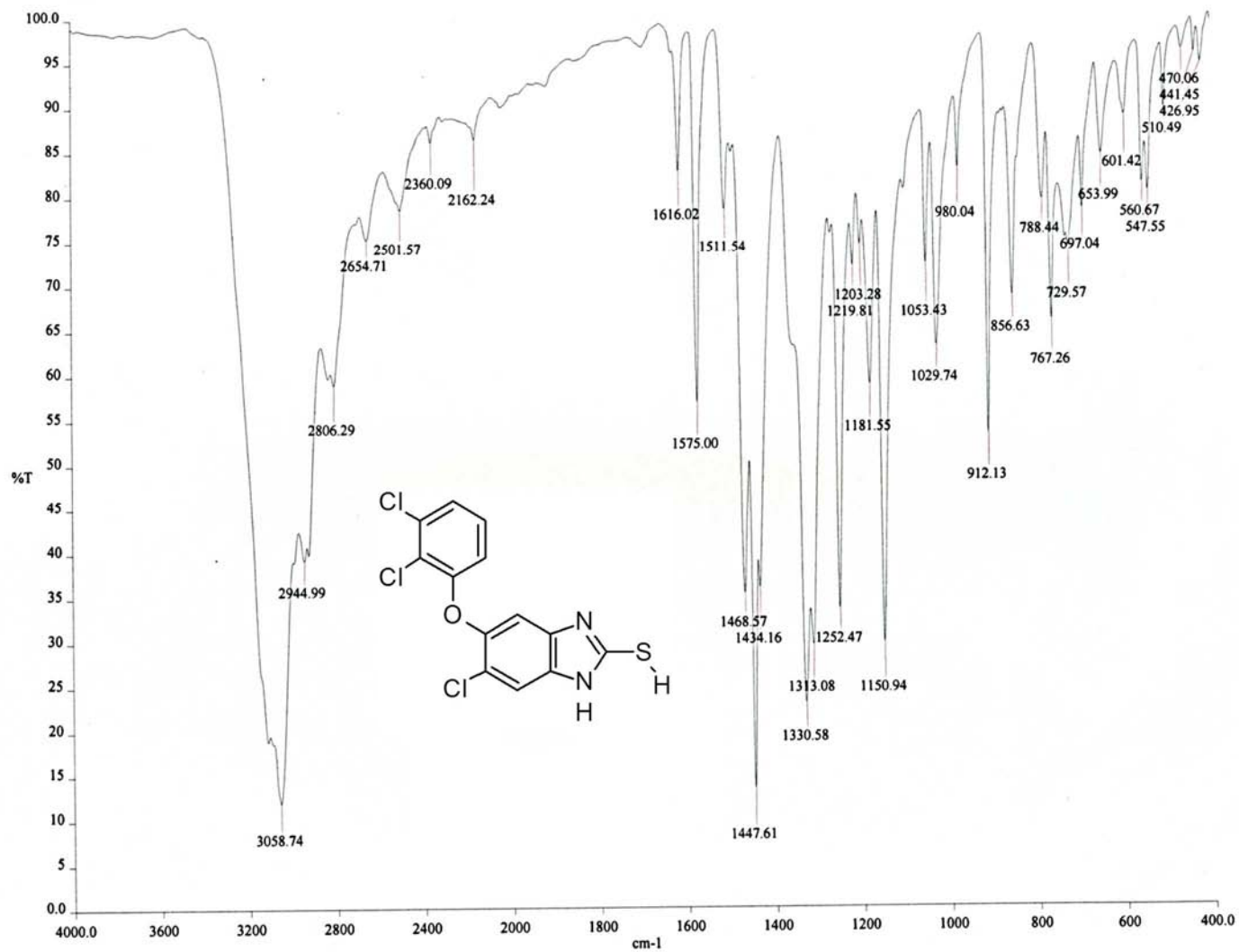


Espectro 47. RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz, δ en ppm) para 5-cloro-2-mercapto-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol (12).

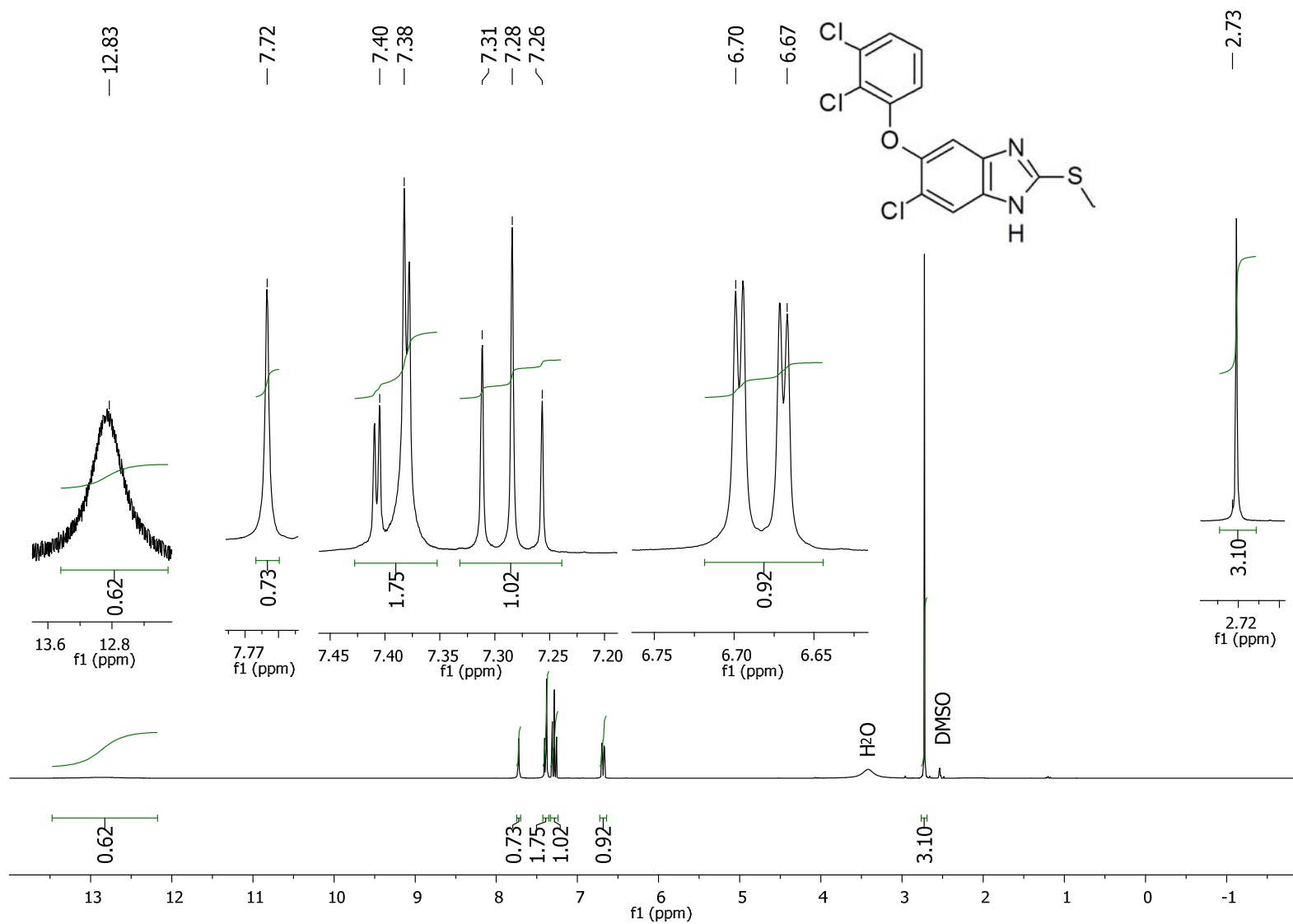
Masa monoisotópica: 343.934466 Da



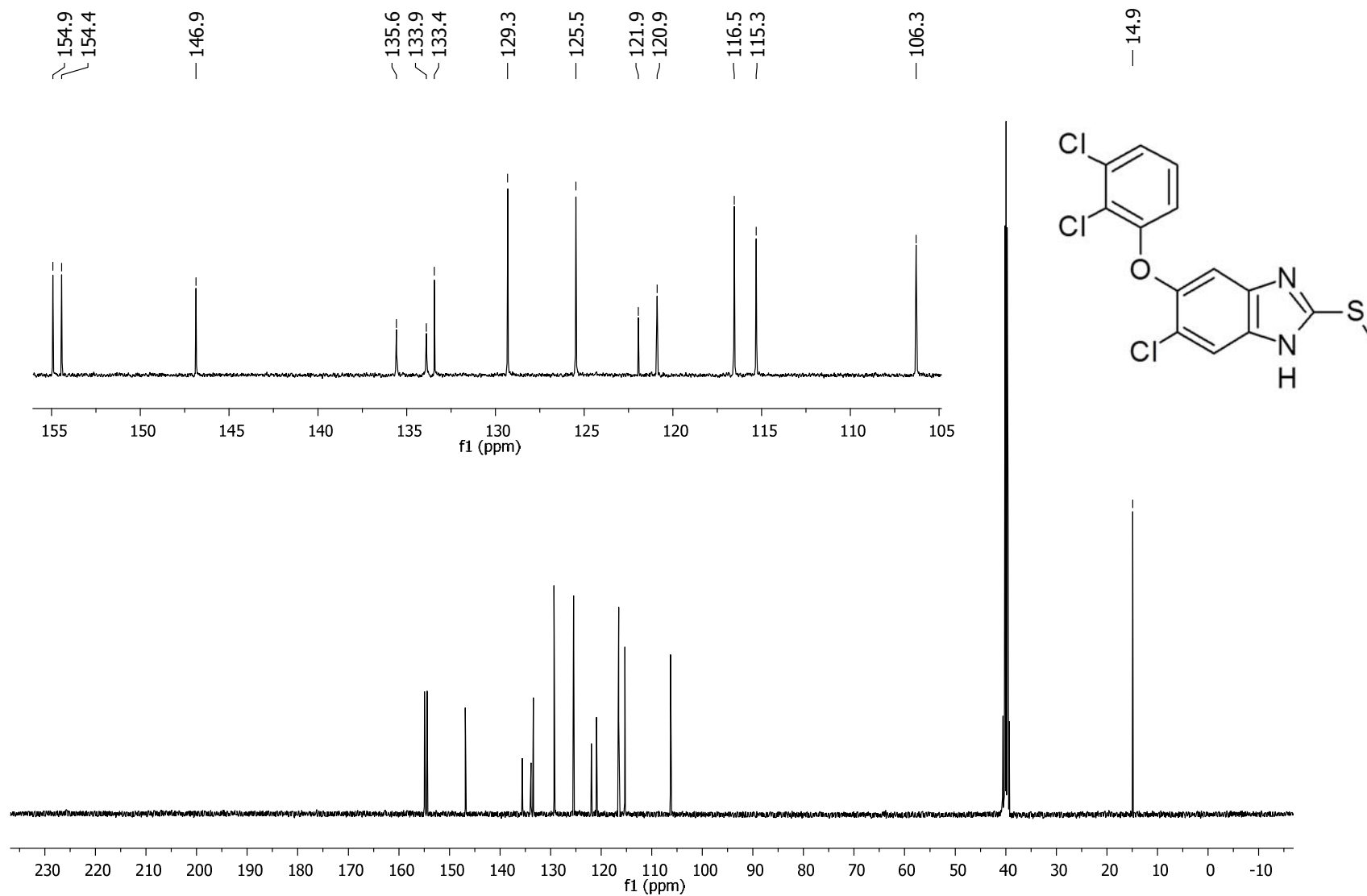
Espectro 48. EM (ID, IE) para 5-cloro-2-mercapto-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol (**12**).



Espectro 49. IR (ATR) para 5-cloro-2-mercapto-6-(2,3-diclorofenoxy)-1H-bencimidazol (**12**).

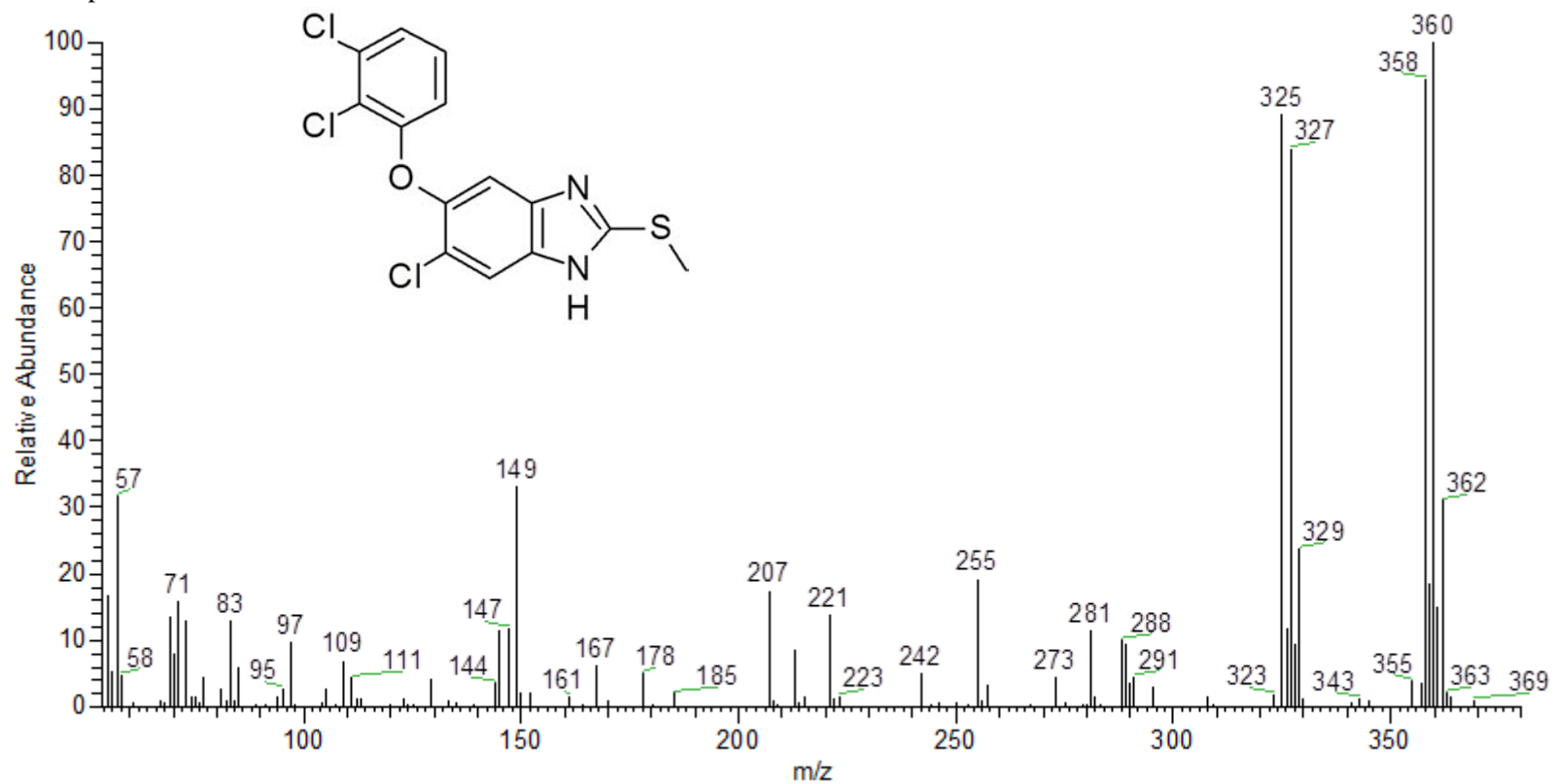


Espectro 50. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm) para 5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol (14).

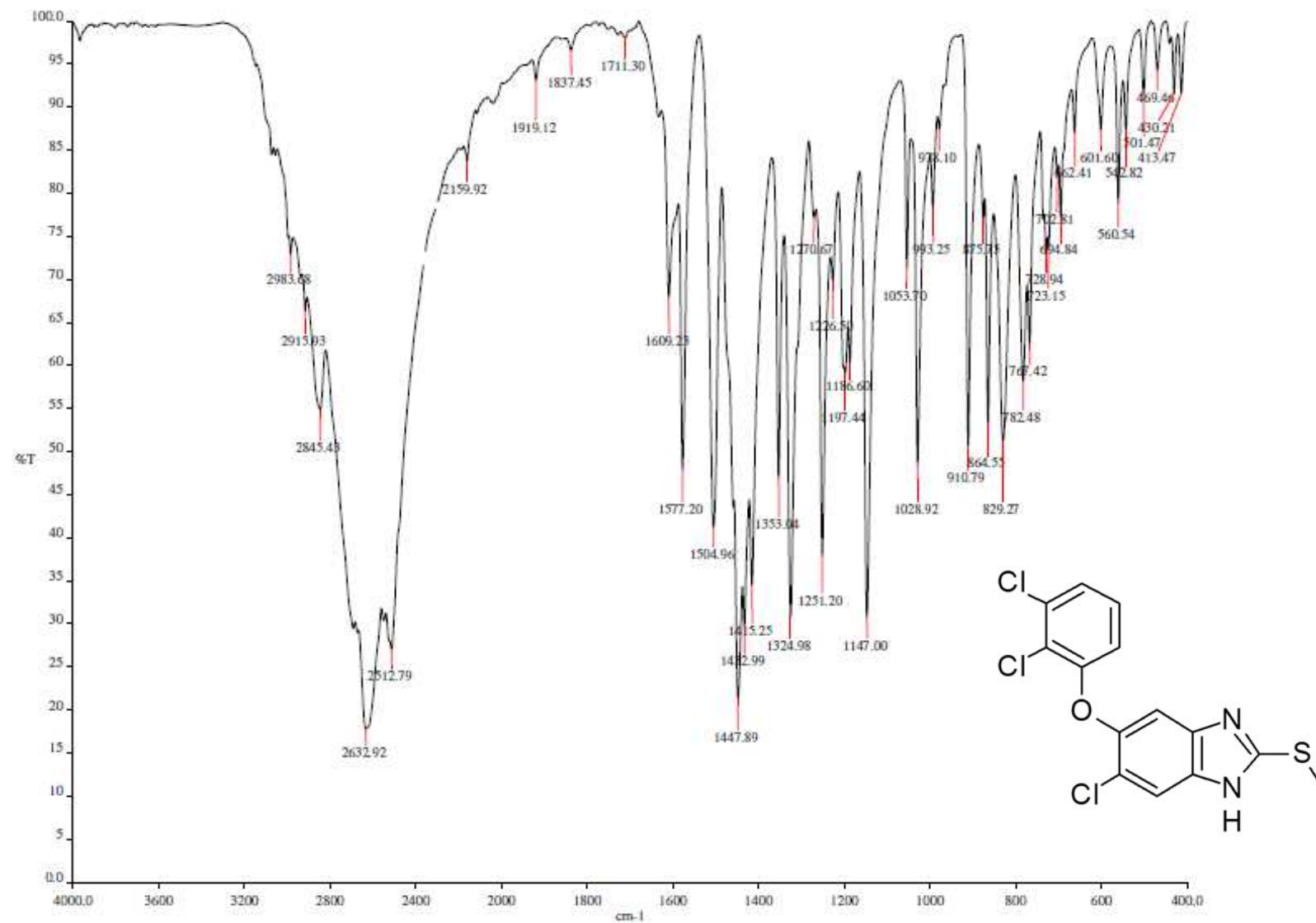


Espectro 51. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para 5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol (**14**).

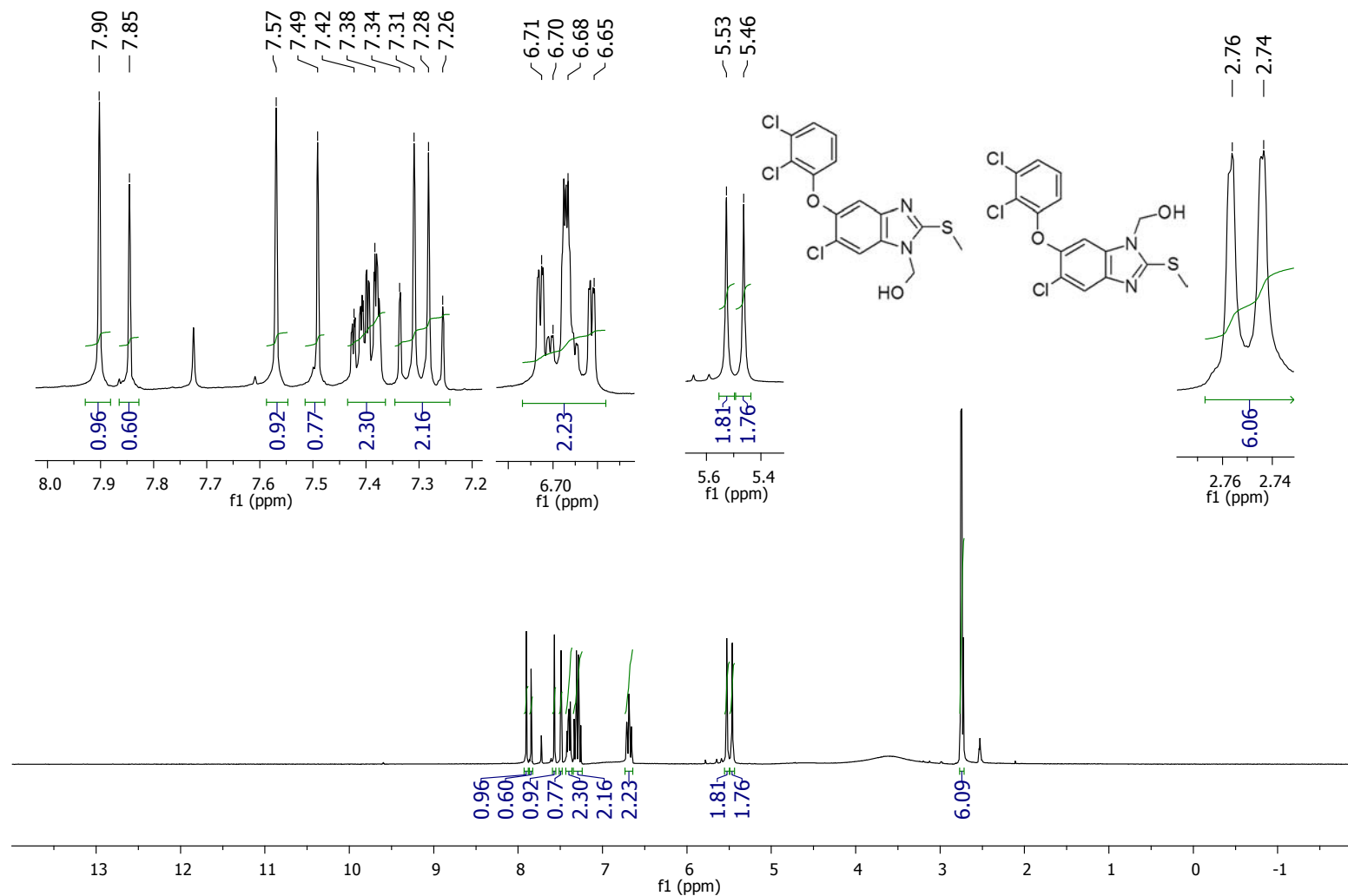
Masa monoisotópica: 357.950116 Da



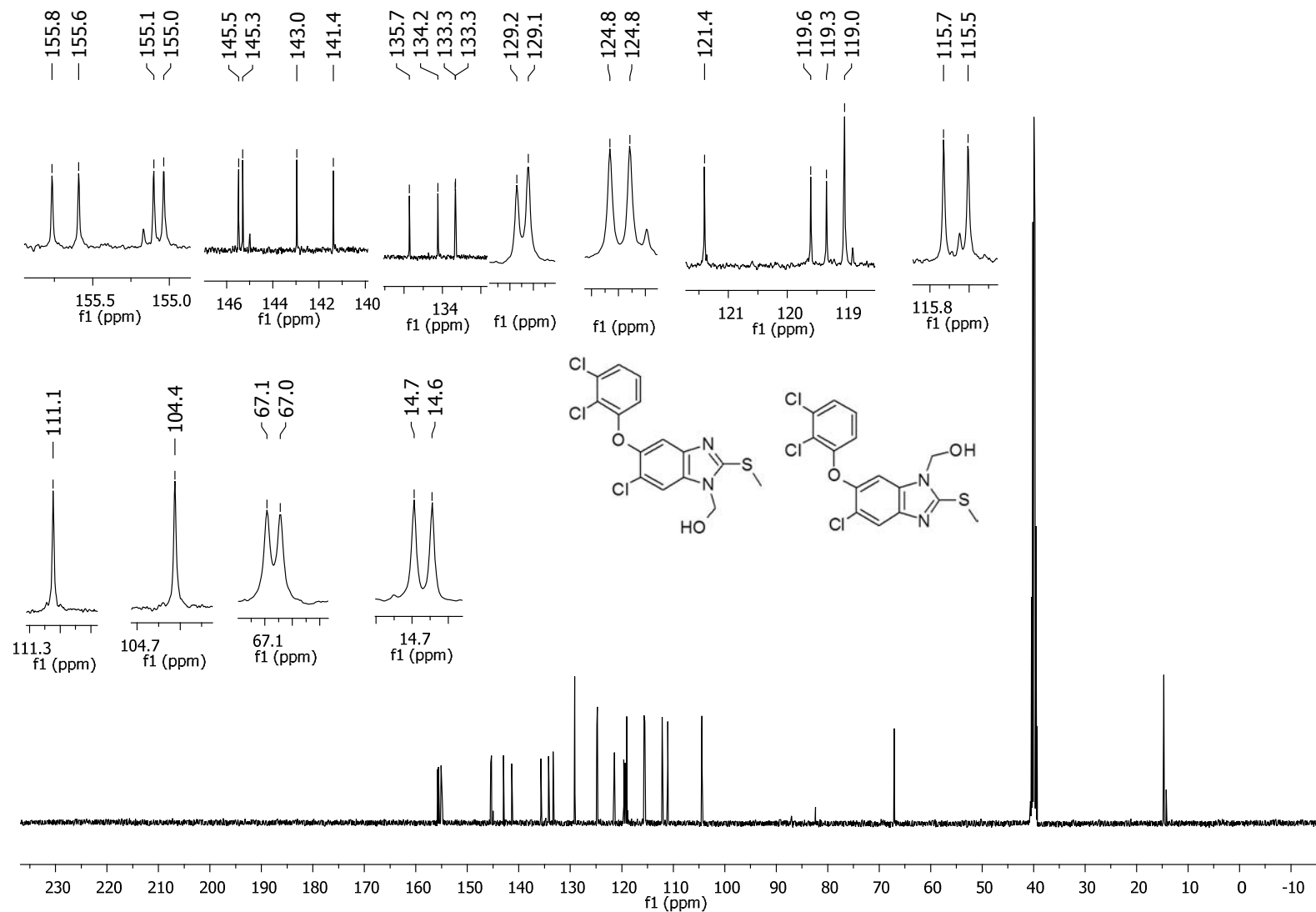
Espectro 52. EM (ID, IE) para 5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol (**14**).



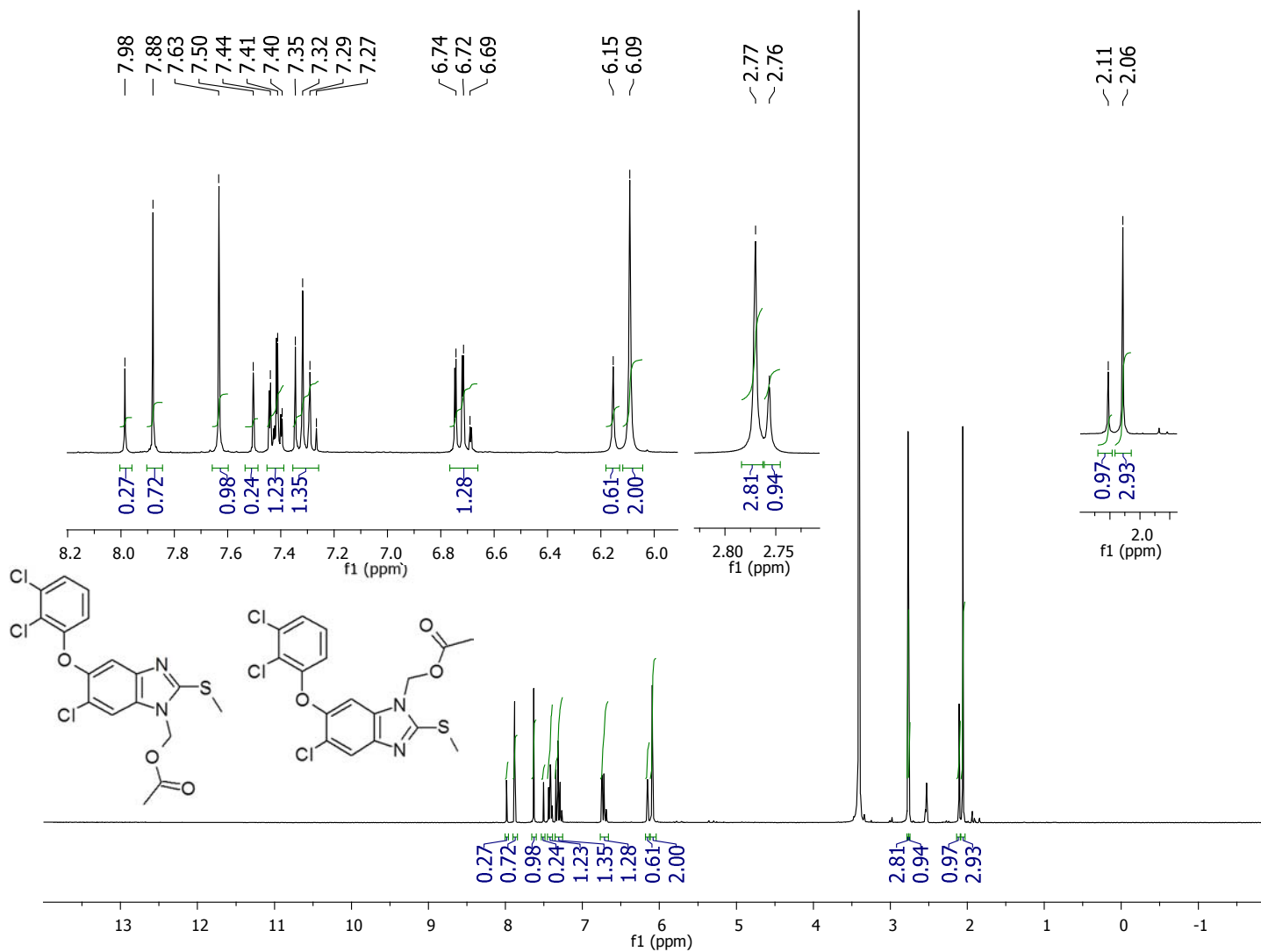
Espectro 53. IR (ATR) para 5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol (14).



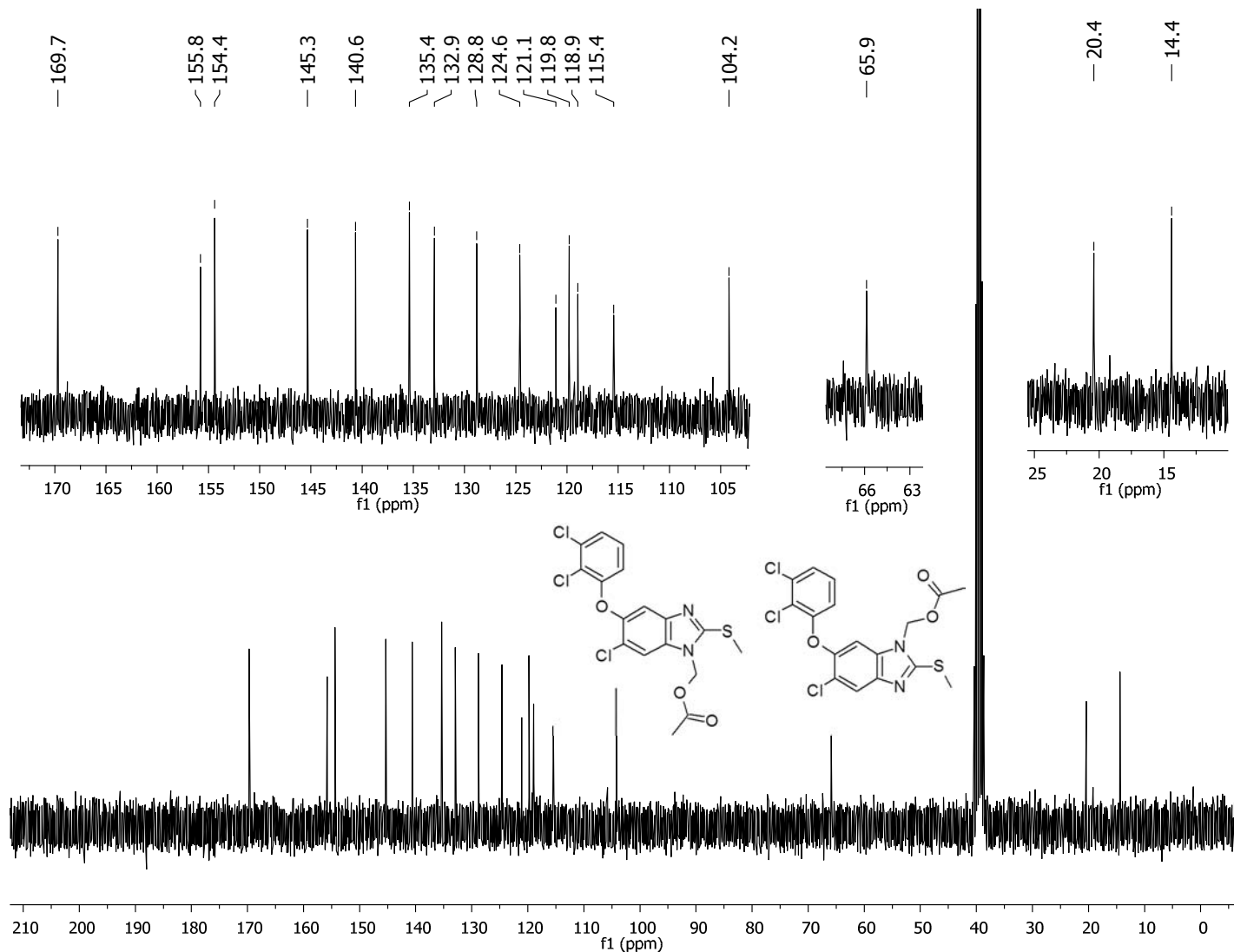
Espectro 54. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 300 MHz, δ en ppm) para [6-cloro-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-1-il]metanol (**18a**) y [5-cloro-2-metiltio-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-1-il]metanol (**18b**).



Espectro 55. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 75 MHz, δ en ppm) para [6-cloro-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (**18a**) y [5-cloro-2-metiltio-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (**18b**).

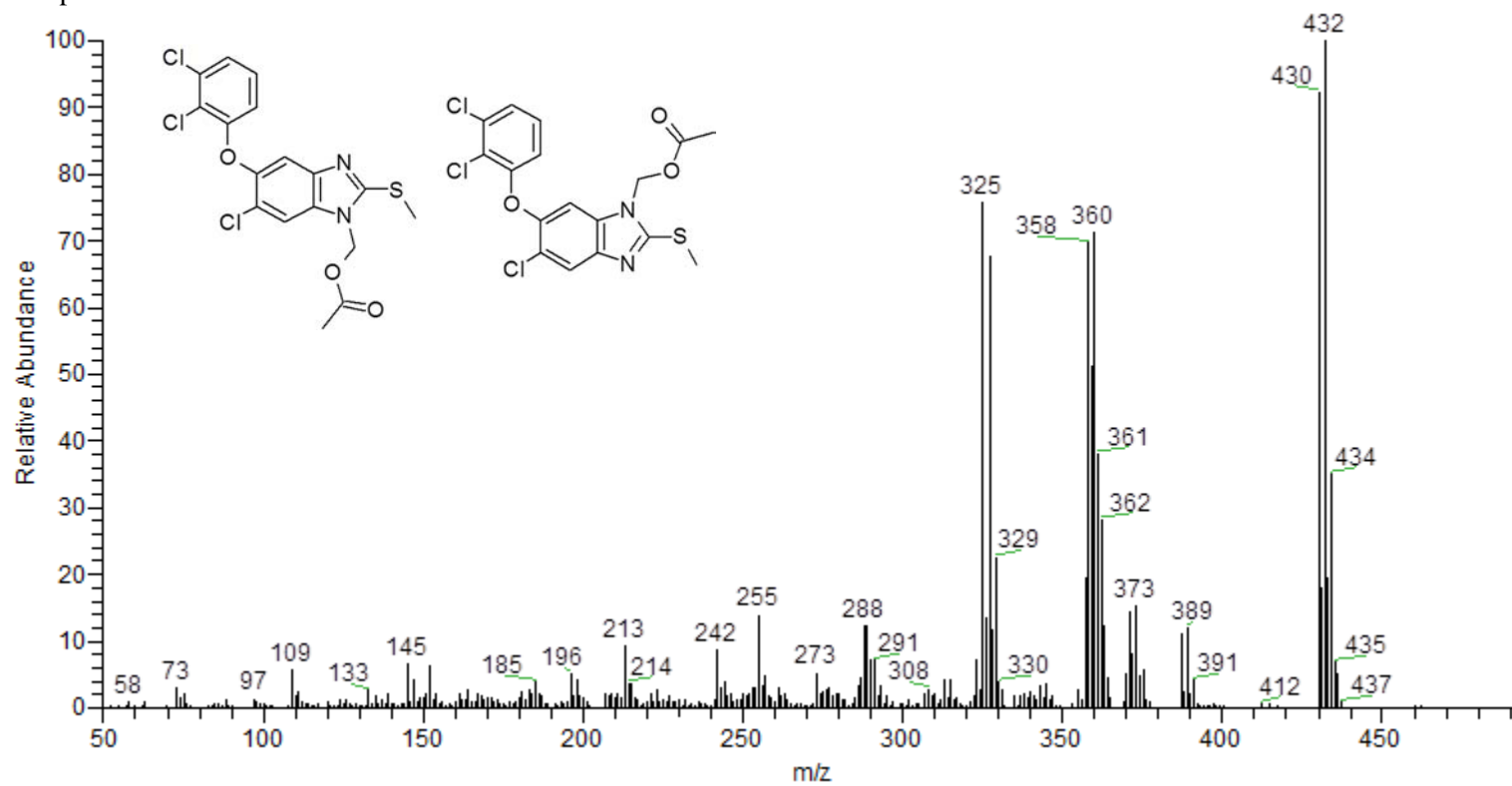


Espectro 56. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) para acetato de [6-cloro-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**21a**) y acetato de [5-cloro-2-metiltio-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo metanol (**21b**).

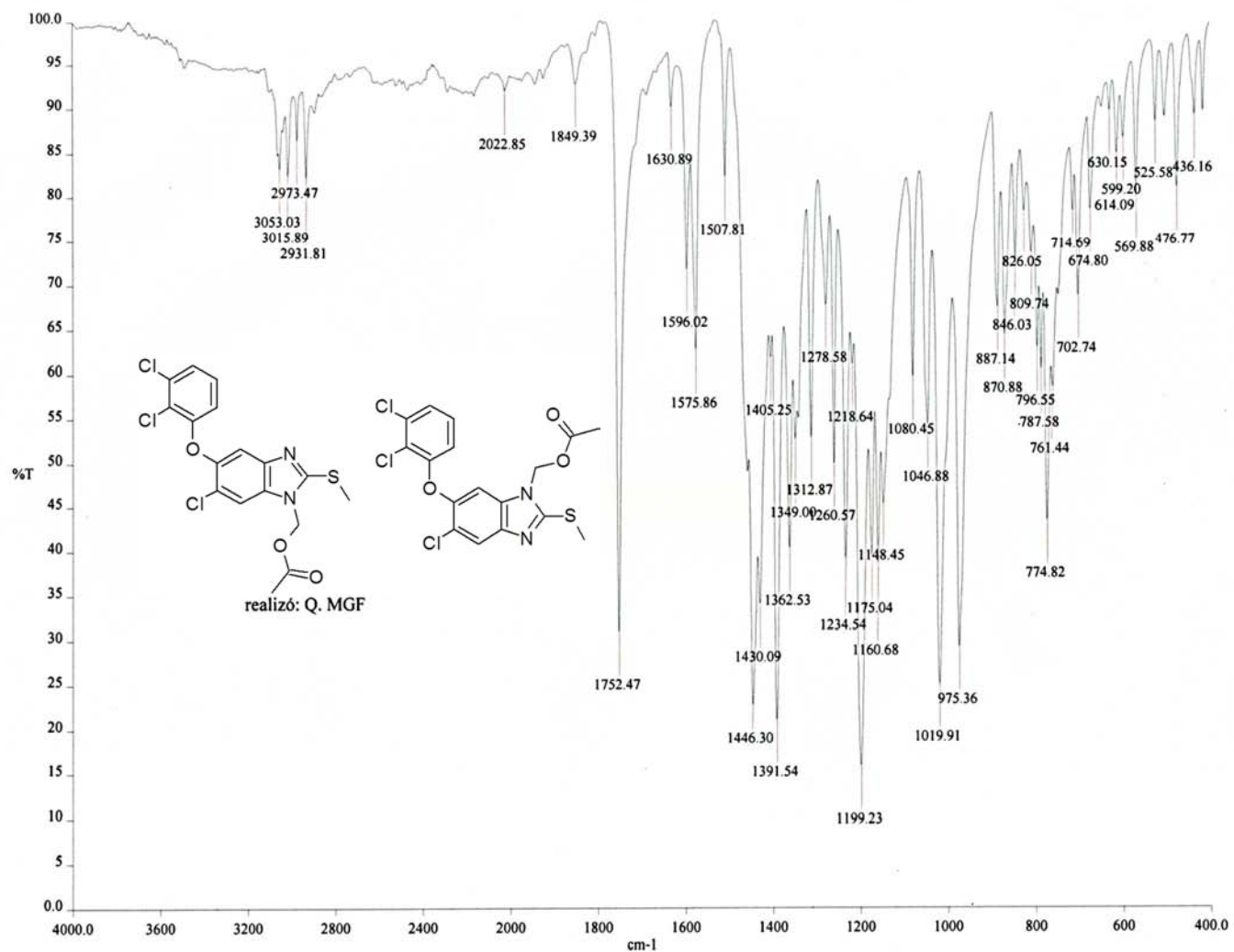


Espectro 57. RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz, δ en ppm) para acetato de [6-cloro-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**21a**) y acetato de [5-cloro-2-metiltio-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo metanol (**21b**).

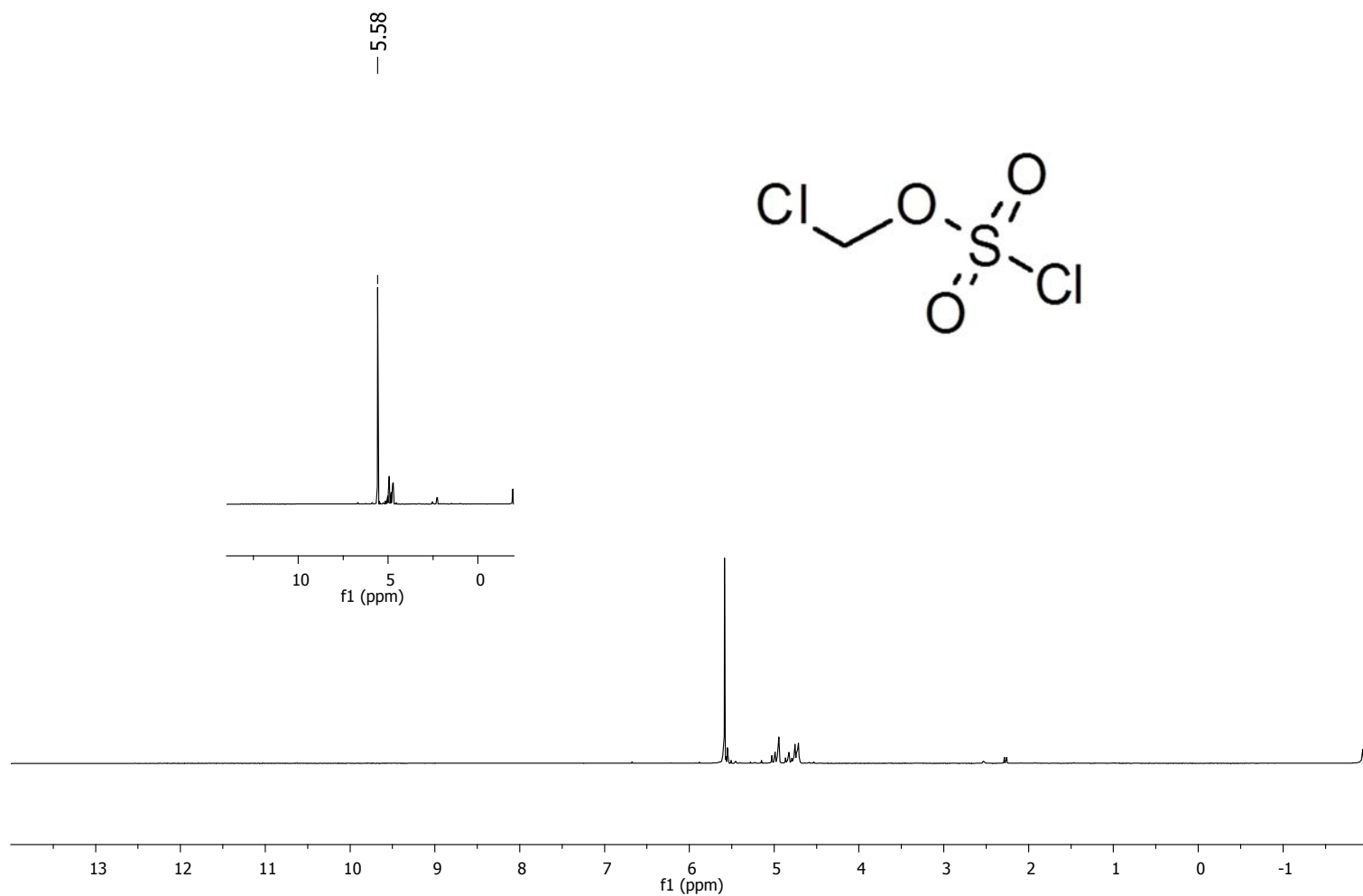
Masa monoisotópica: 429.971245 Da



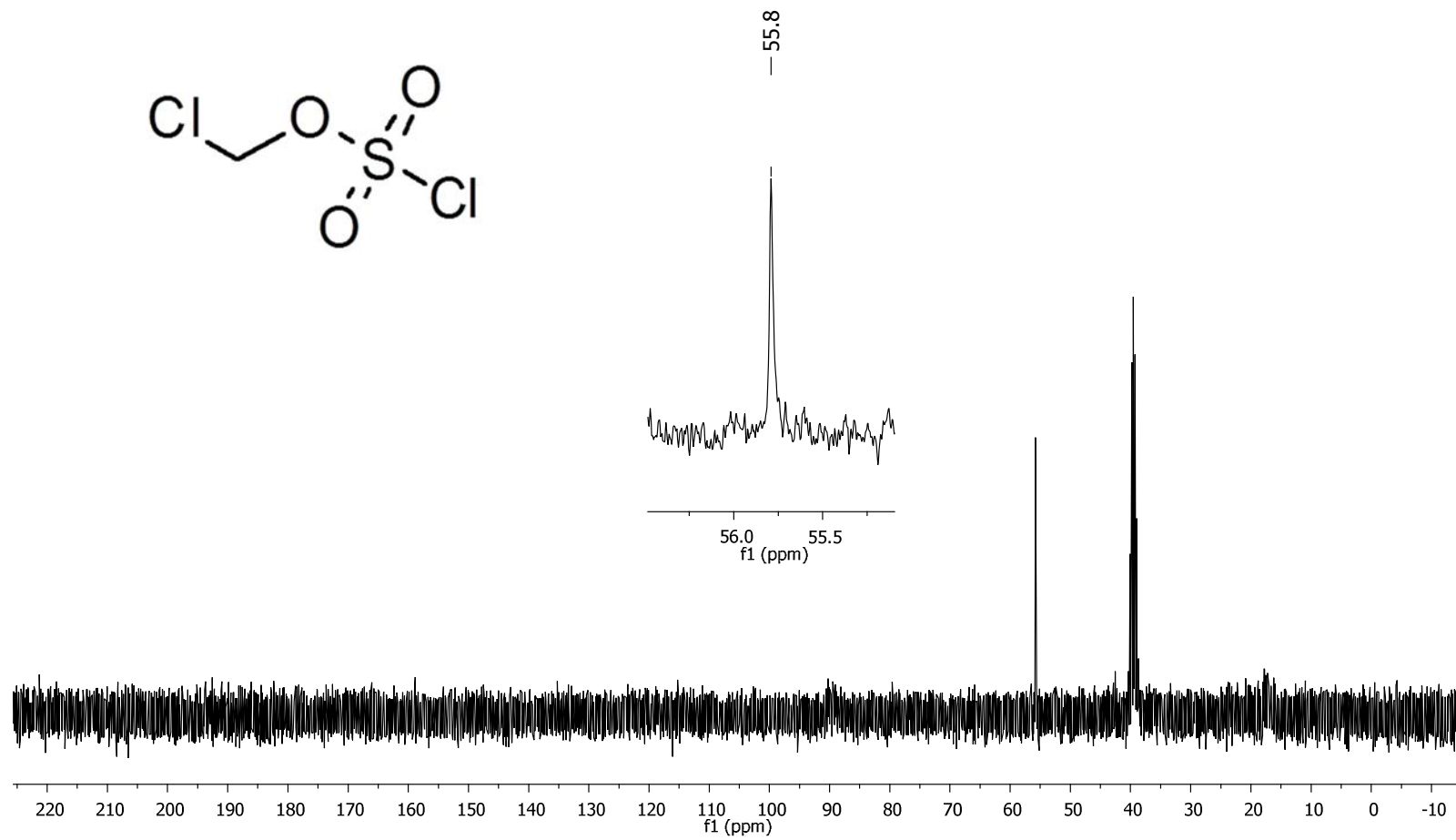
Espectro 58. EM (ID, IE) para acetato de [6-cloro-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**21a**) y acetato de [5-cloro-2-metiltio-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo metanol (**21b**).



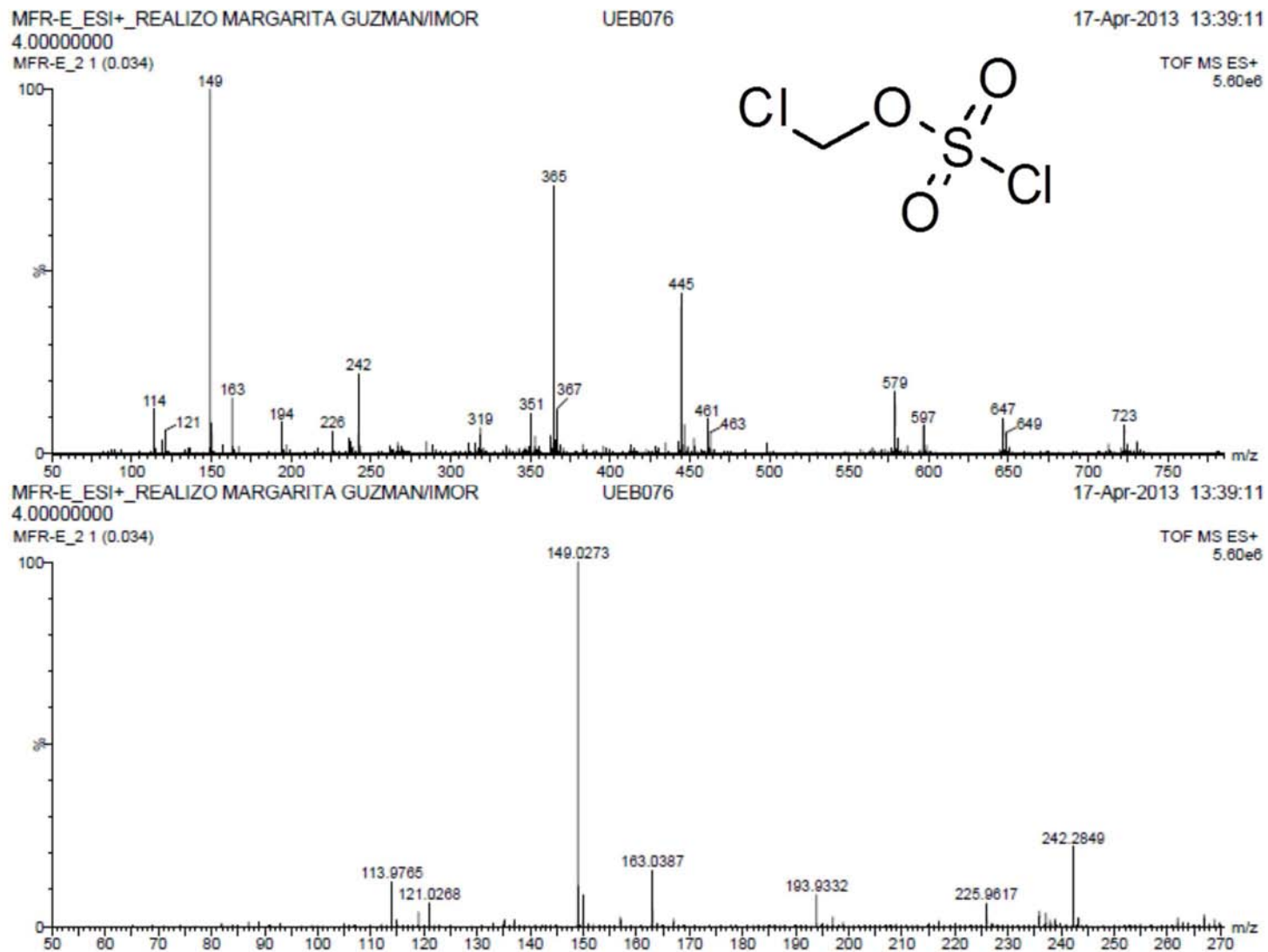
Espectro 59. IR (ATR) para acetato de [6-cloro-2-metiltio-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo (**21a**) y acetato de [5-cloro-2-metiltio-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metilo metanol (**21b**).



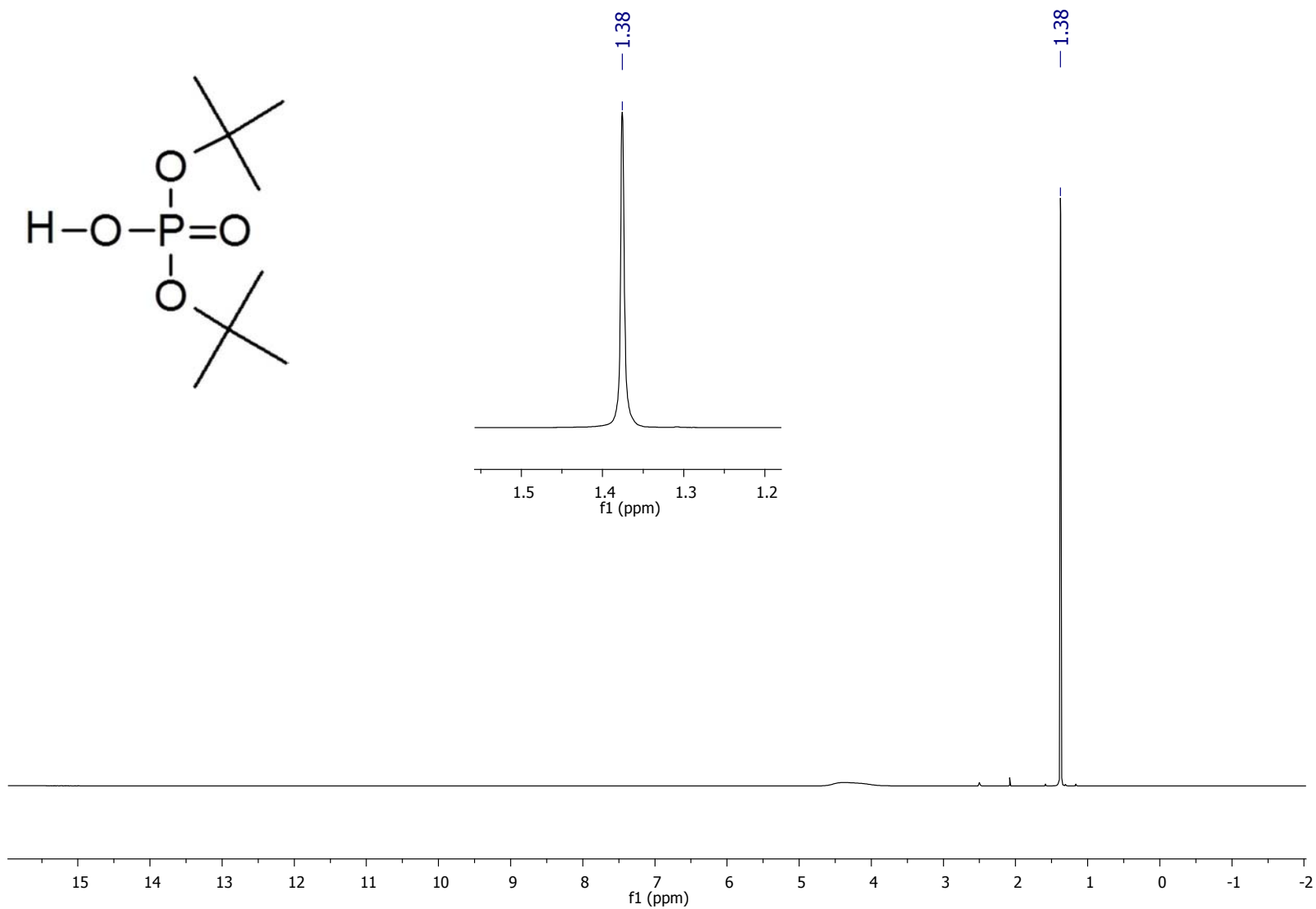
Espectro 60. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, δ en ppm) para clorosulfato de clorometilo (27).



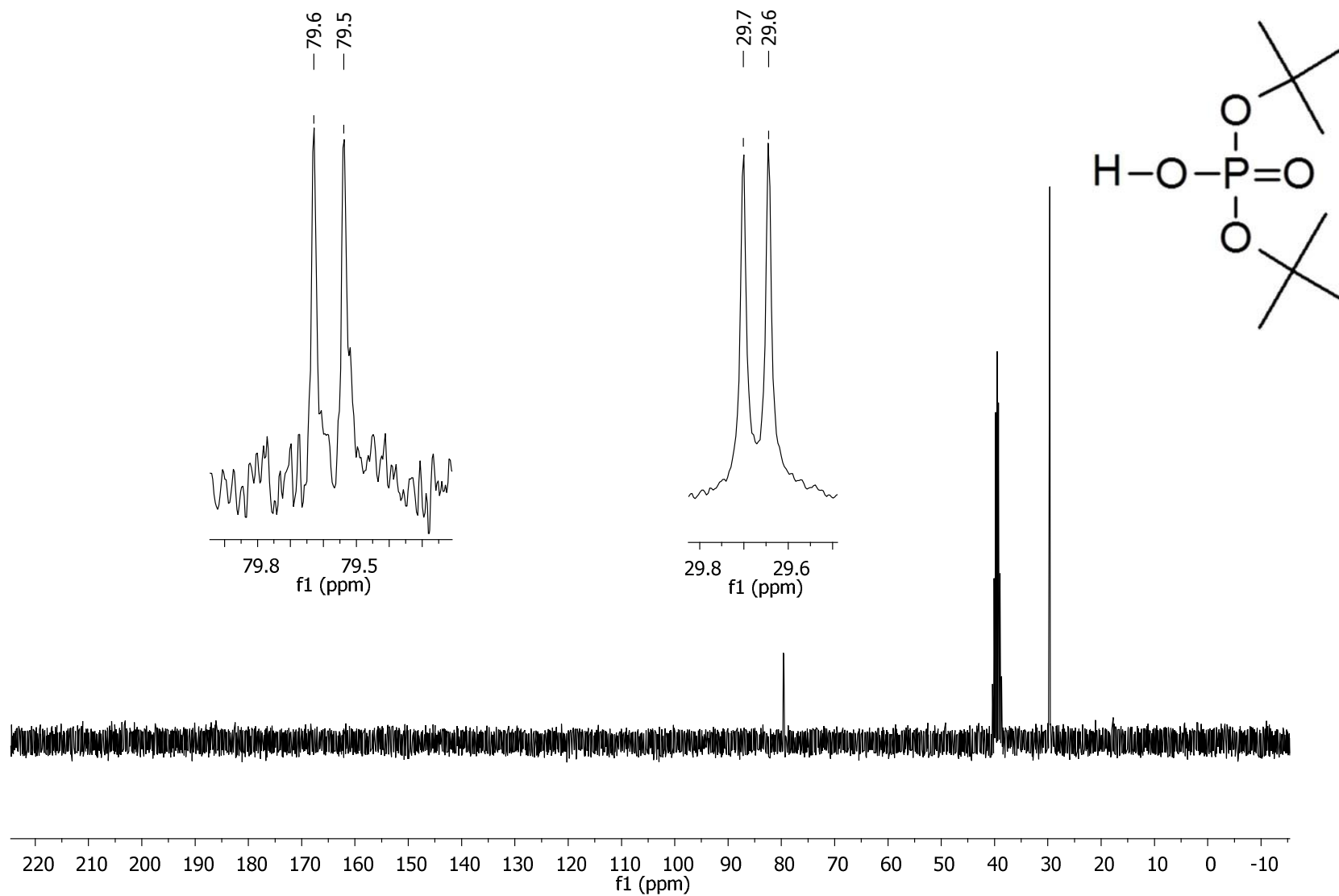
Espectro 61. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para clorosulfato de clorometilo (27).



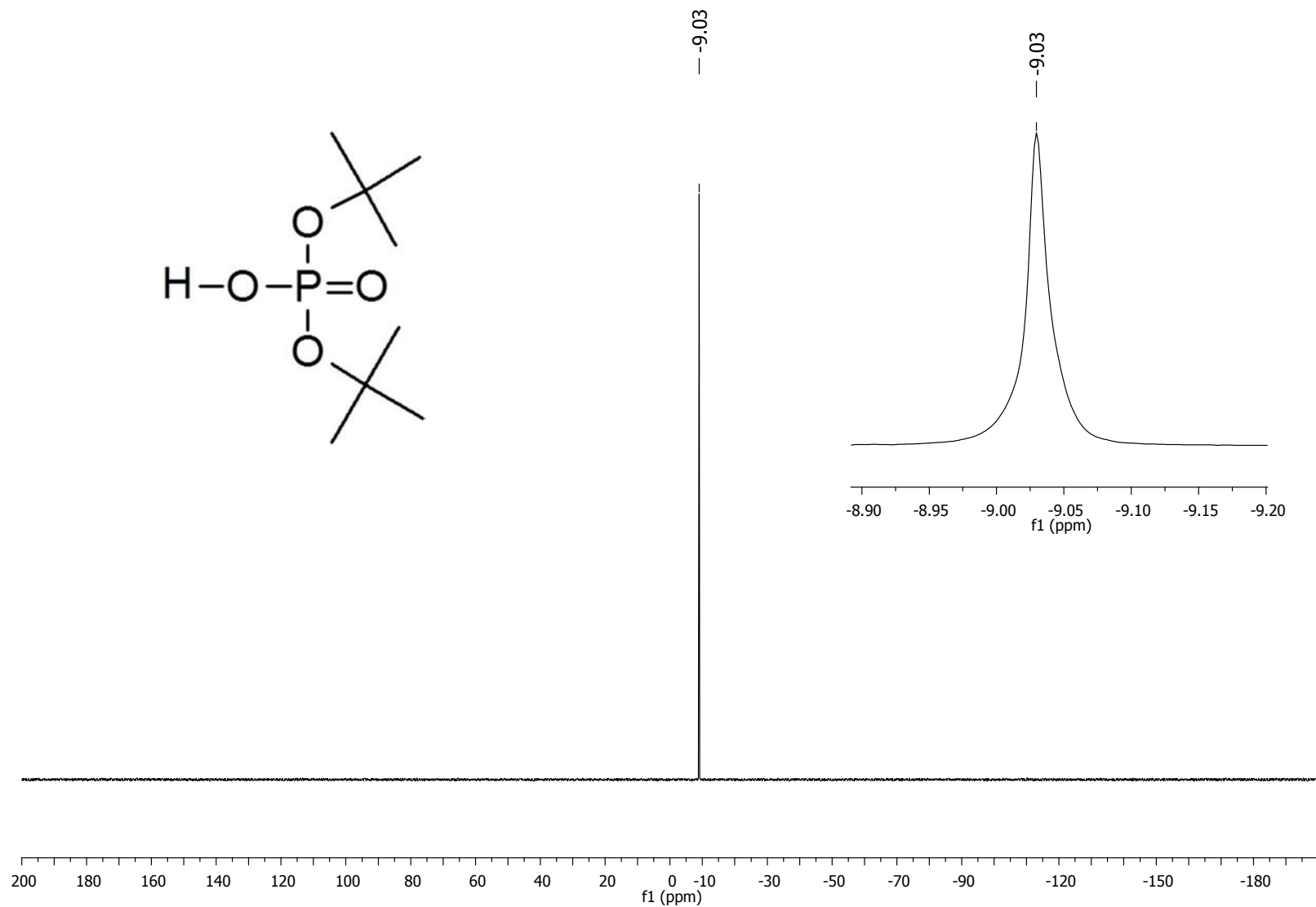
Espectro 62. EM (ID, IE) para clorosulfato de clorometilo (27).



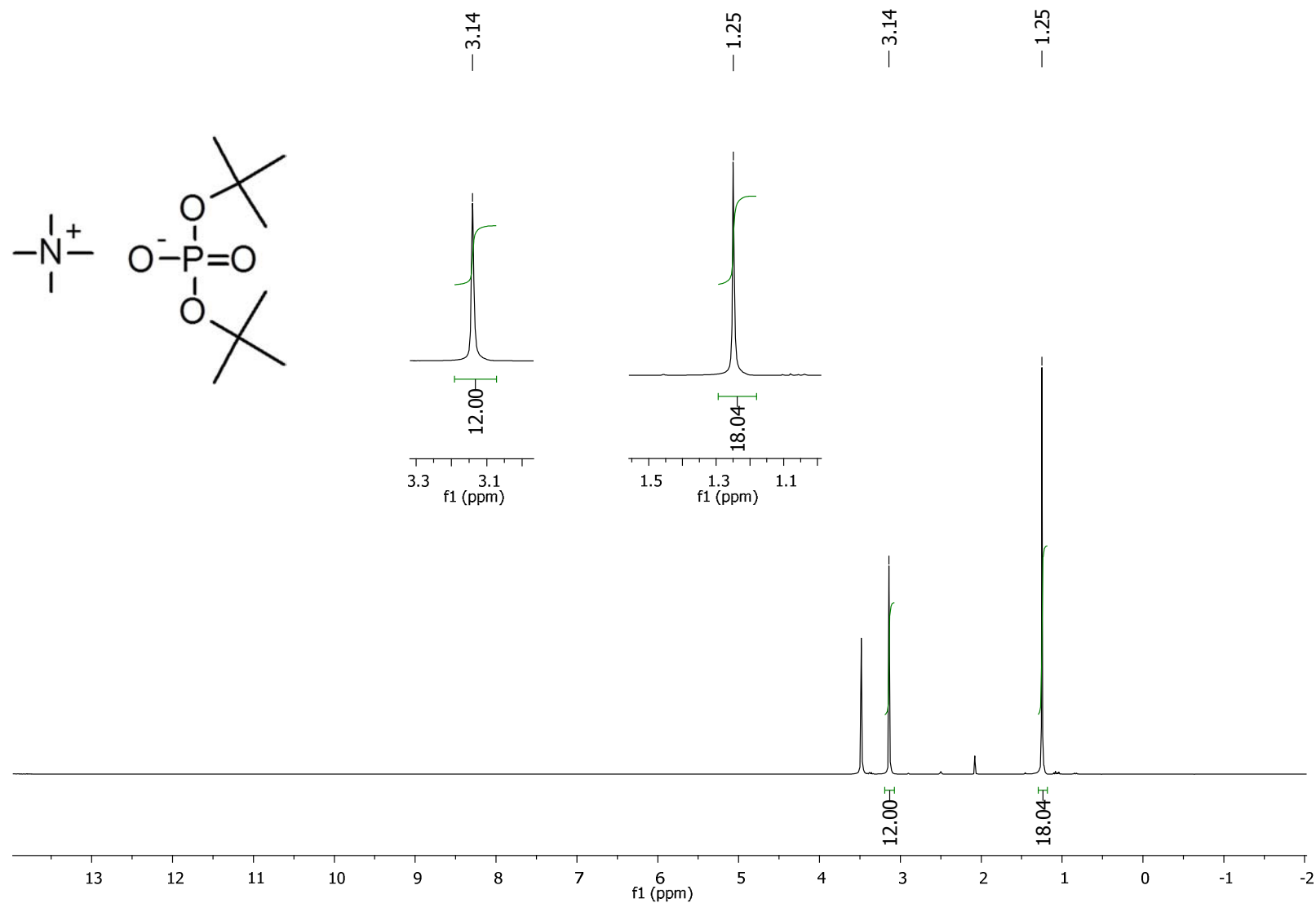
Espectro 63. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, δ en ppm) para fosfato monohidrógeno de di-*tert*-butilo (**24**).



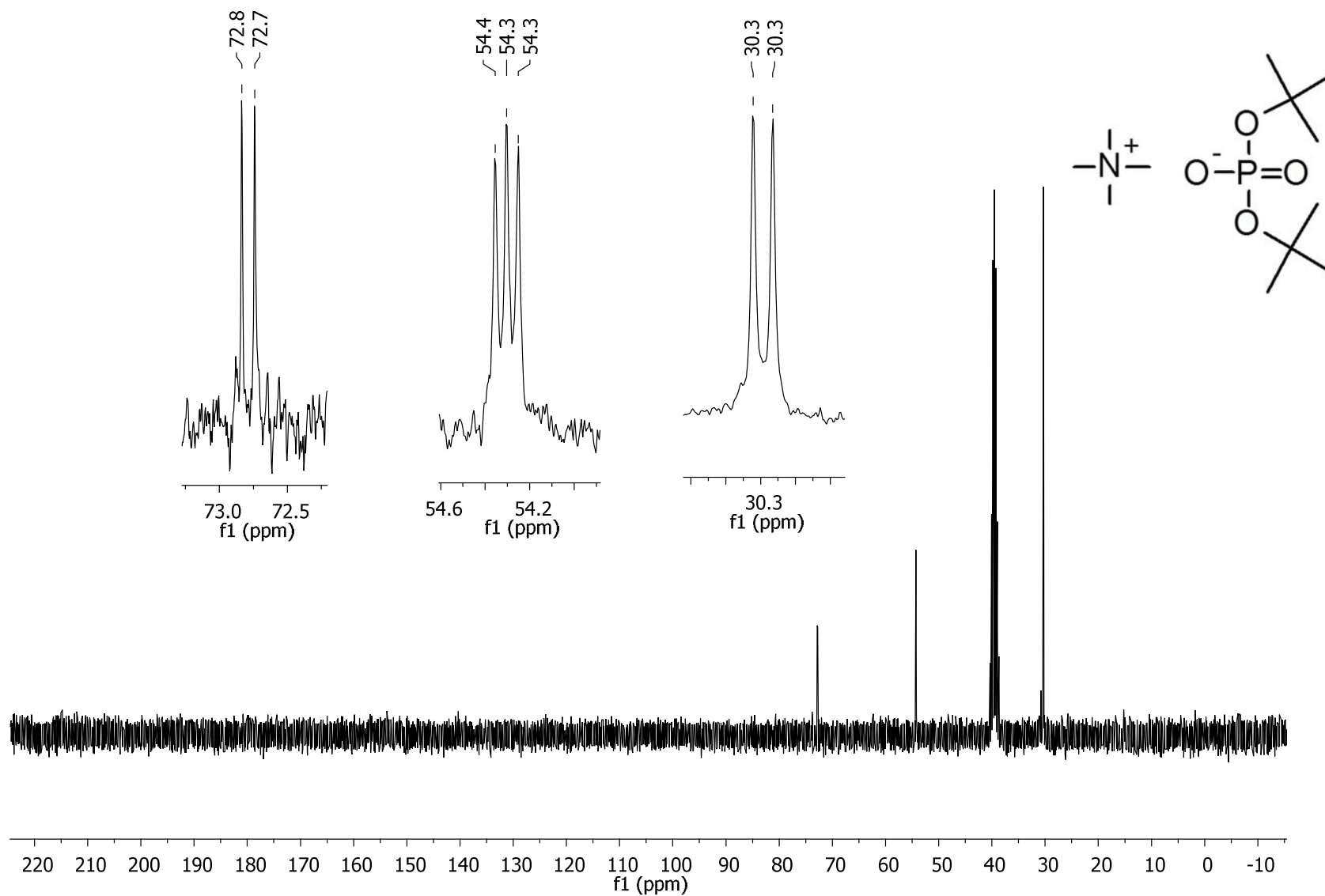
Espectro 64. RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz, δ en ppm) para fosfato monohidrógeno de di-*tert*-butilo (24).



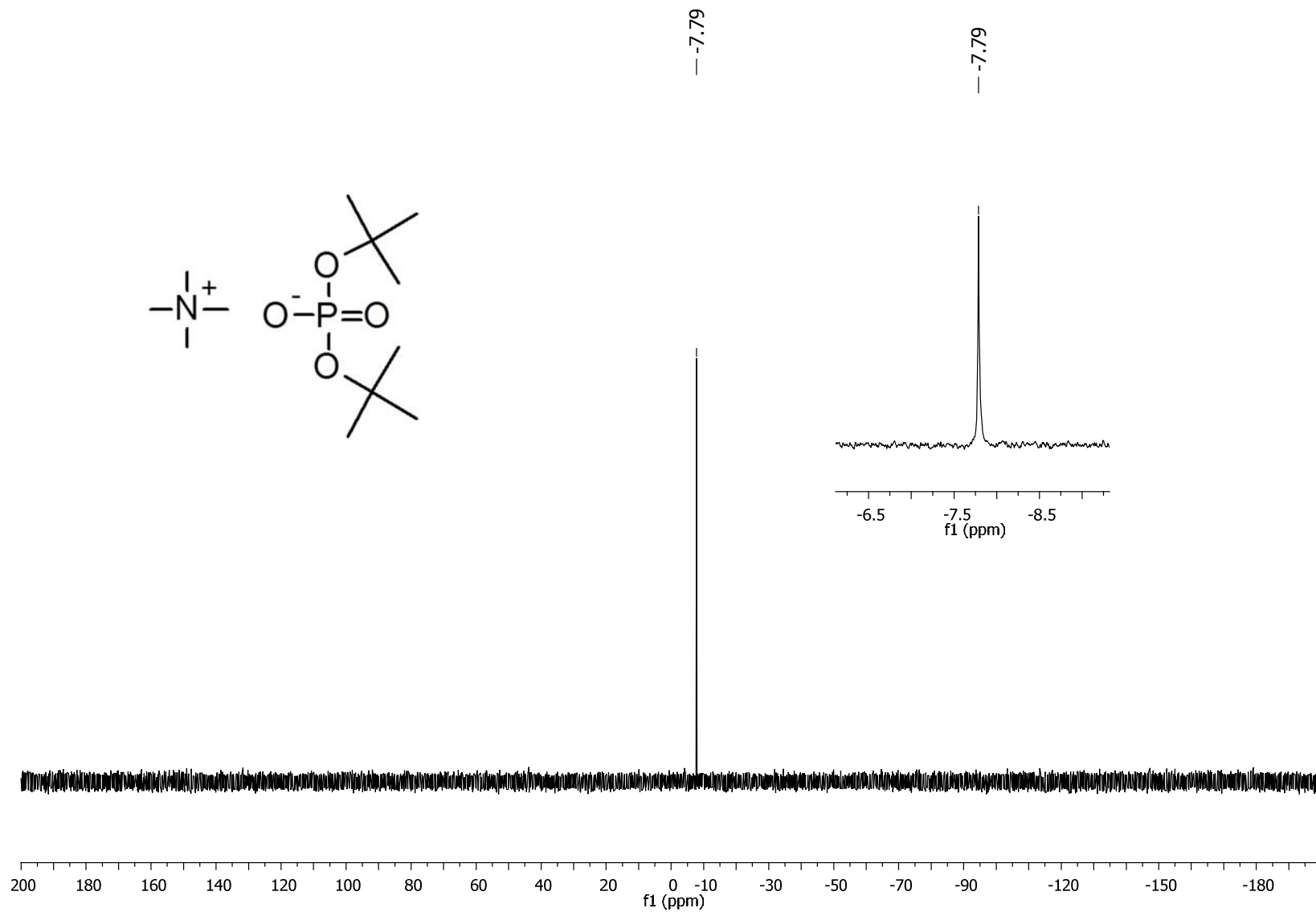
Espectro 65. RMN ^{31}P (TMS, DMSO- d_6 , 122 MHz, δ en ppm) para fosfato monohidrógeno de di-*tert*-butilo (24).



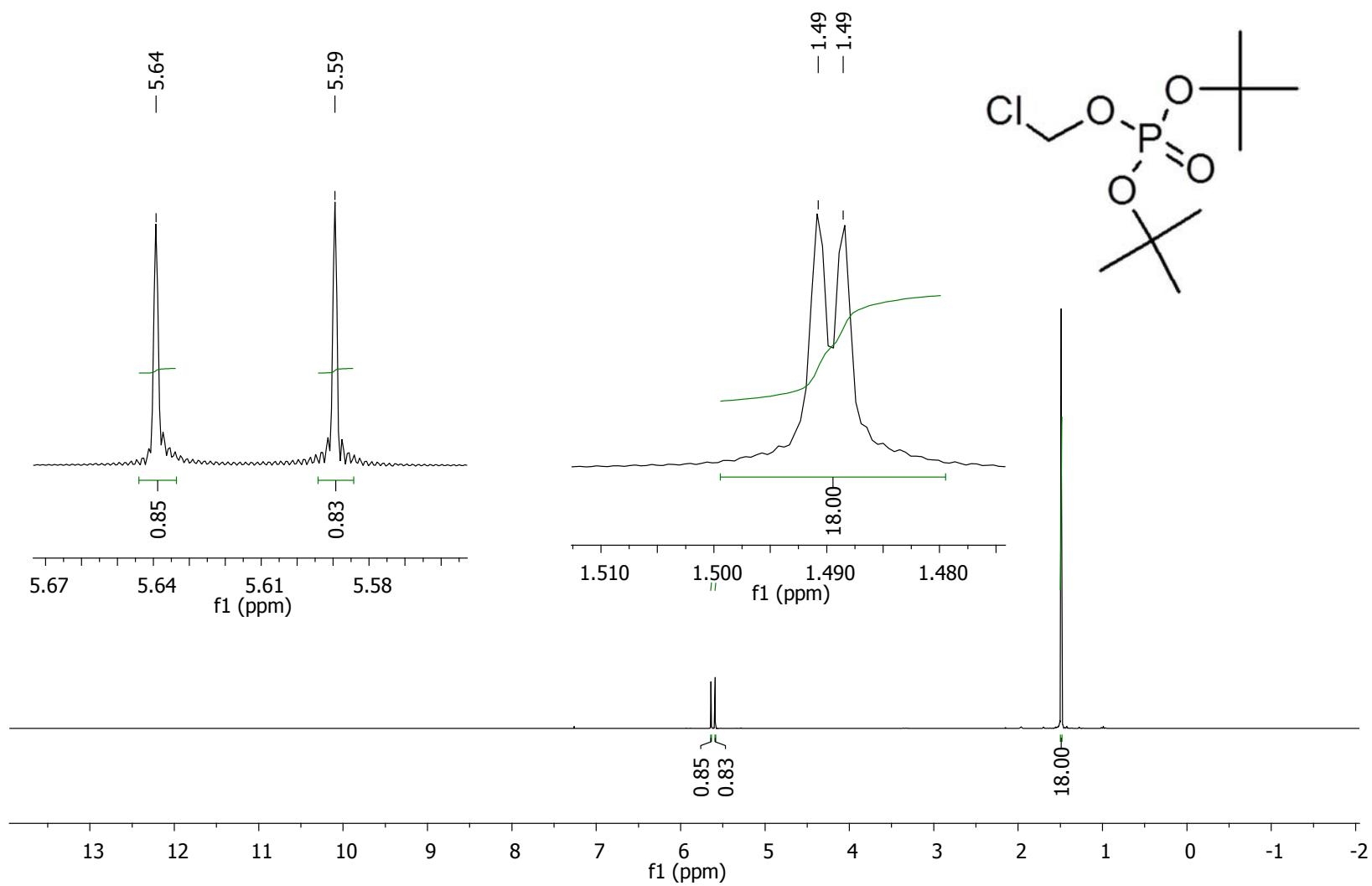
Espectro 66. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) para fosfato de di-*terc*-butiltetrametilamonio (35).



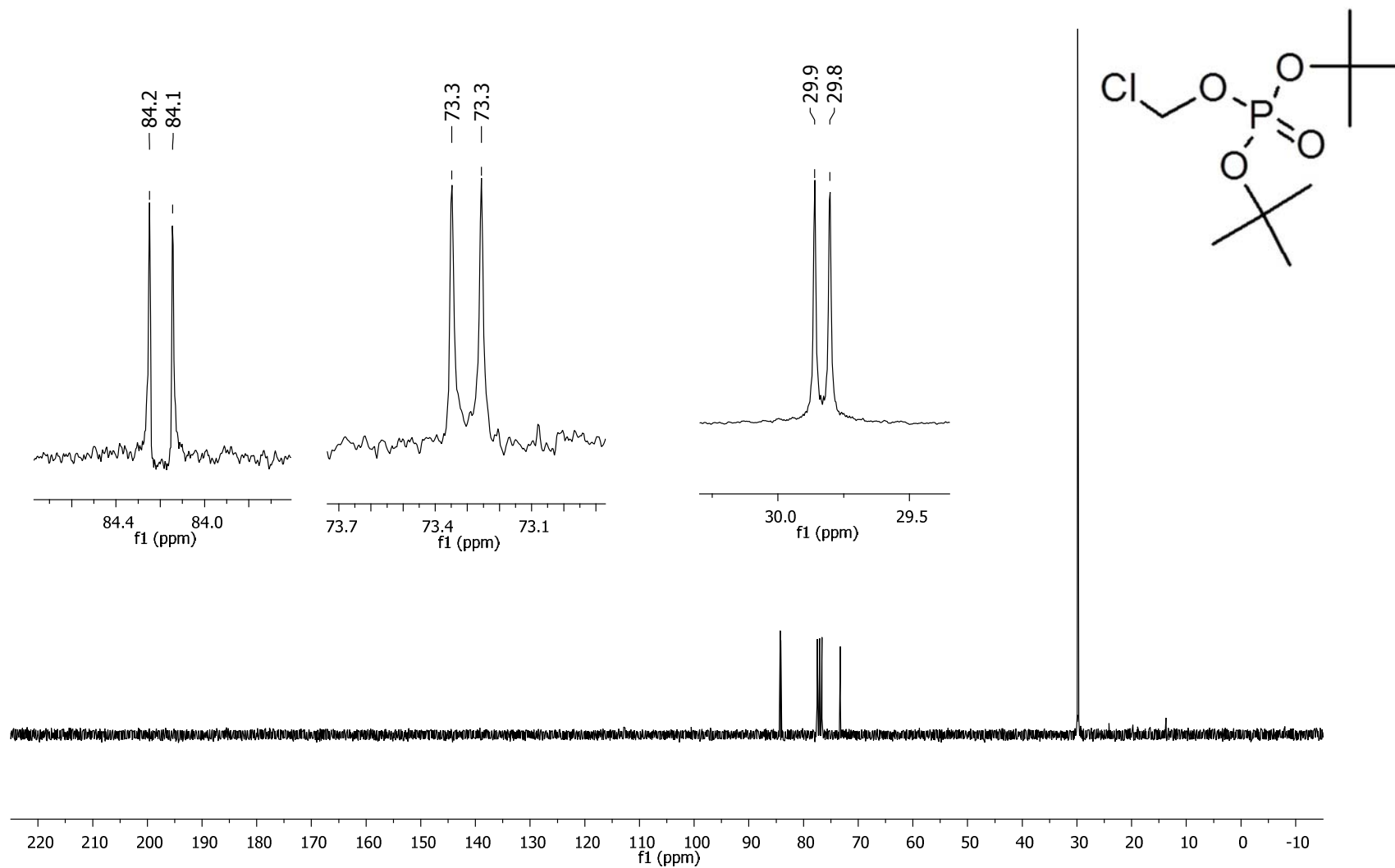
Espectro 67. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato de di-*tert*-butiltetrametilamonio (35).



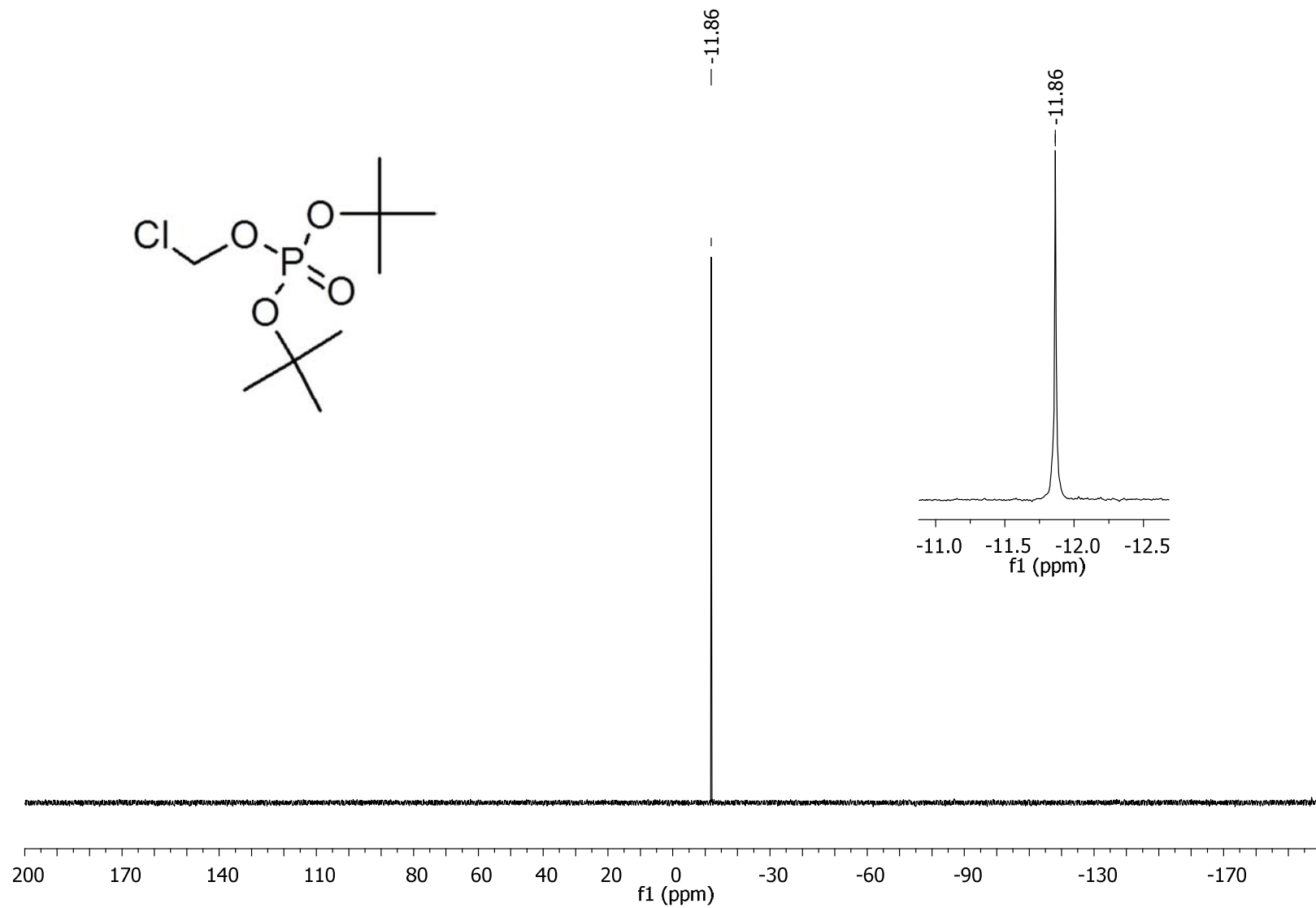
Espectro 68. RMN ^{31}P (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 122 MHz, δ en ppm) para fosfato de di-*tert*-butiltetrametilamonio (35).



Espectro 69. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 , 300 MHz, δ en ppm) para fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (28).

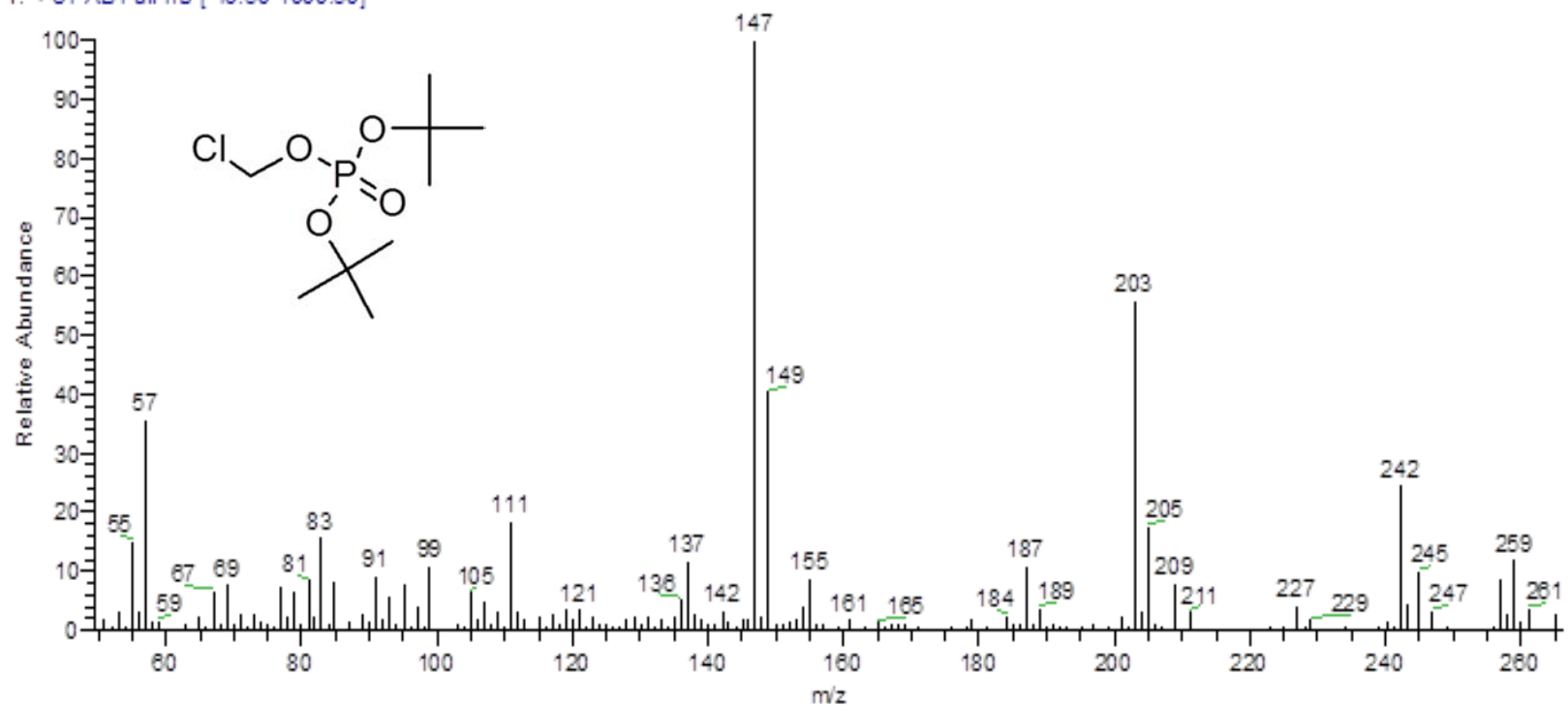


Espectro 70. RMN ^{13}C (TMS, CDCl_3 , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (28).

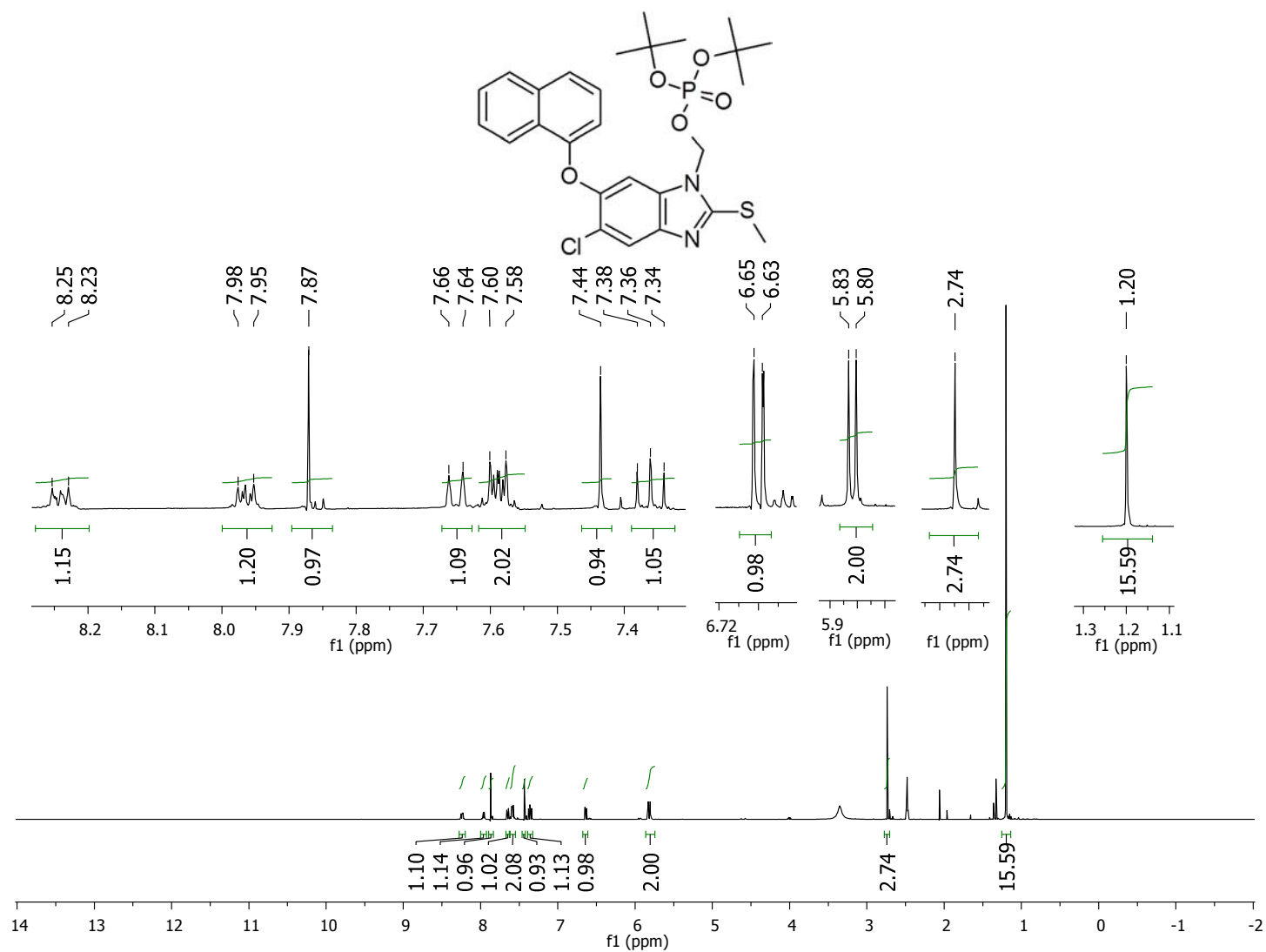


Espectro 71. RMN ^{31}P (TMS, CDCl_3 , 122 MHz, δ en ppm) para fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**28**).

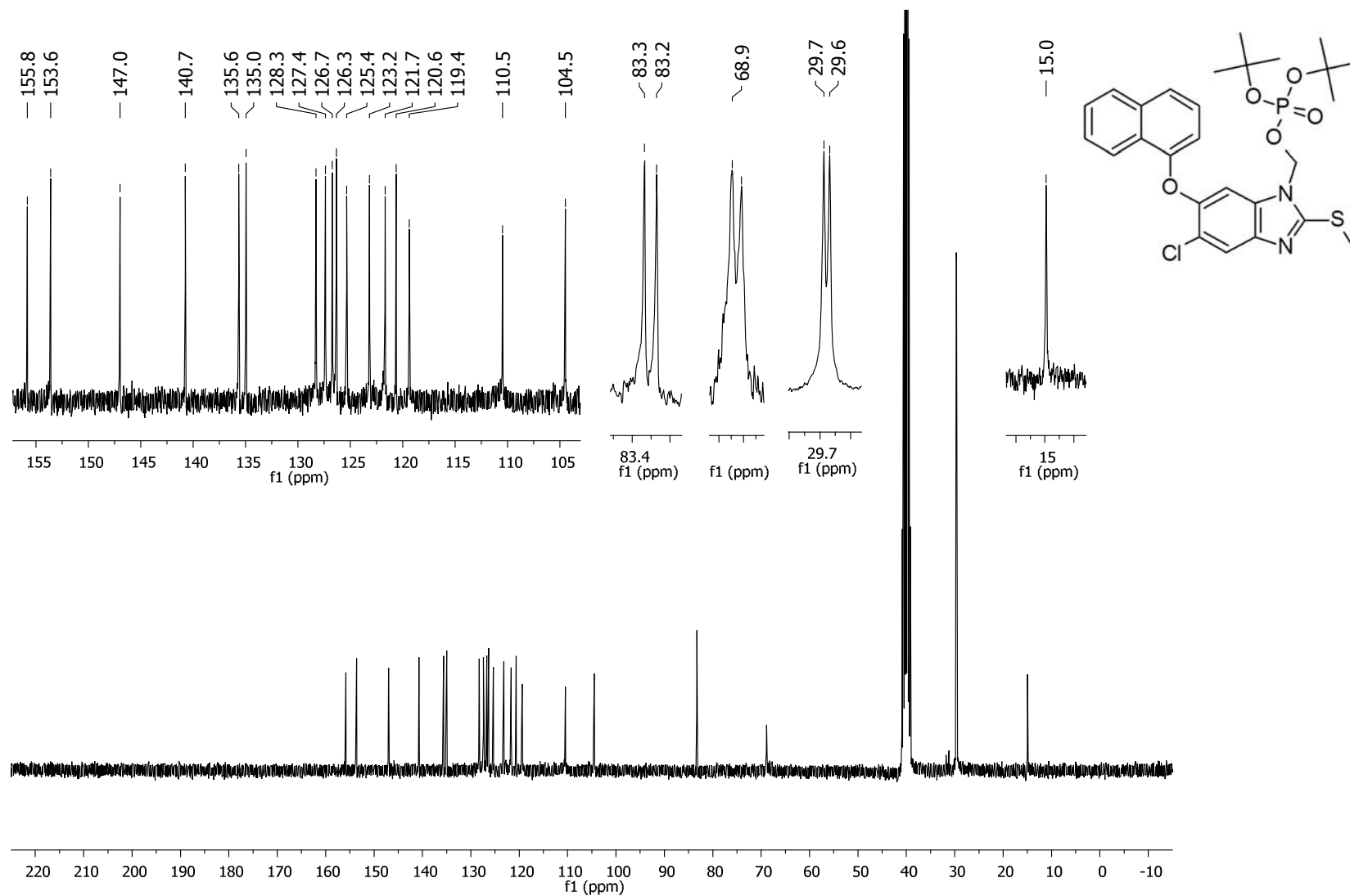
OT8752_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 9.49E7
T: +c FAB Full ms [49.50-1000.50]



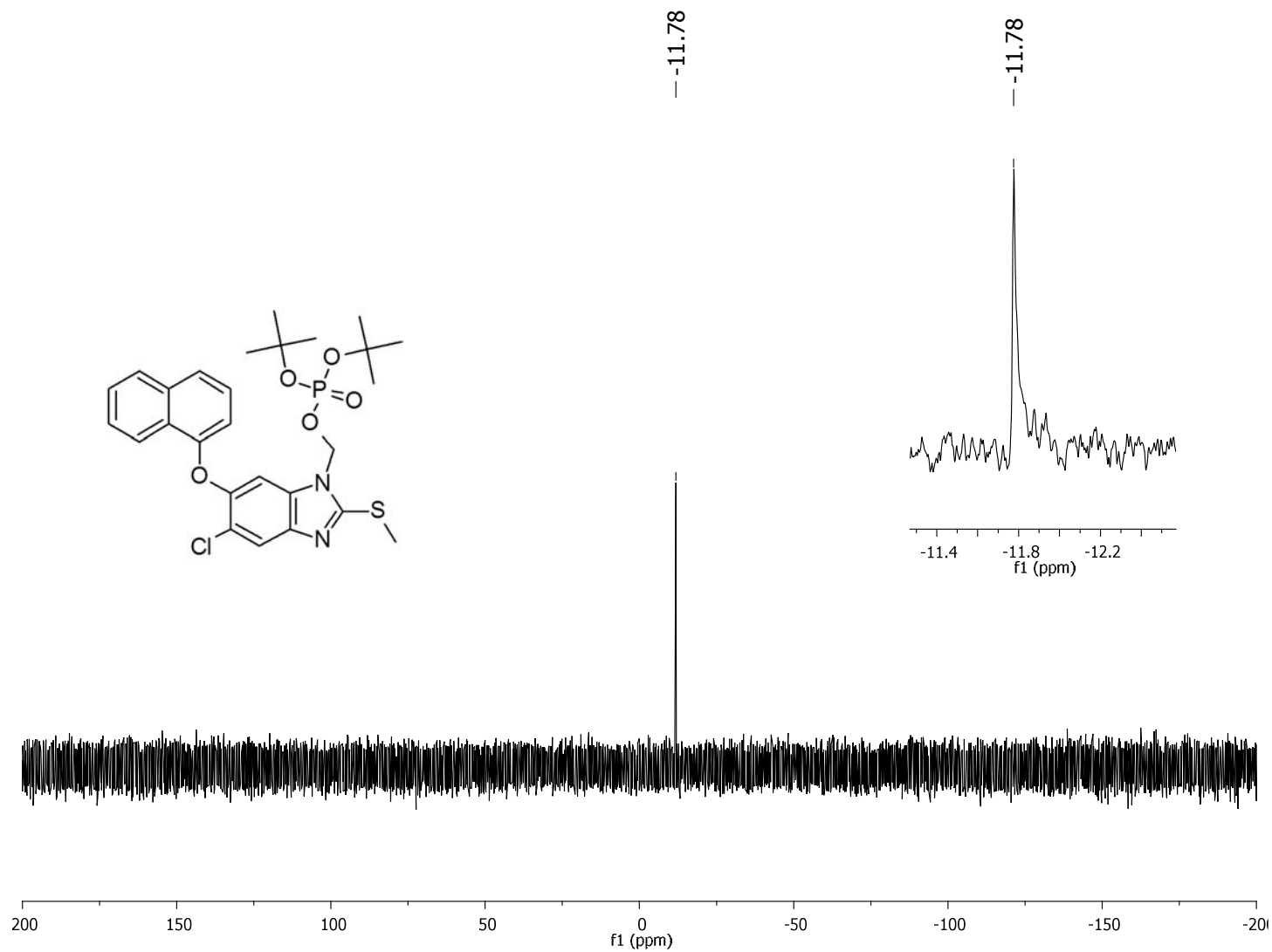
Espectro 72. EM (ID, IE) para fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**28**).



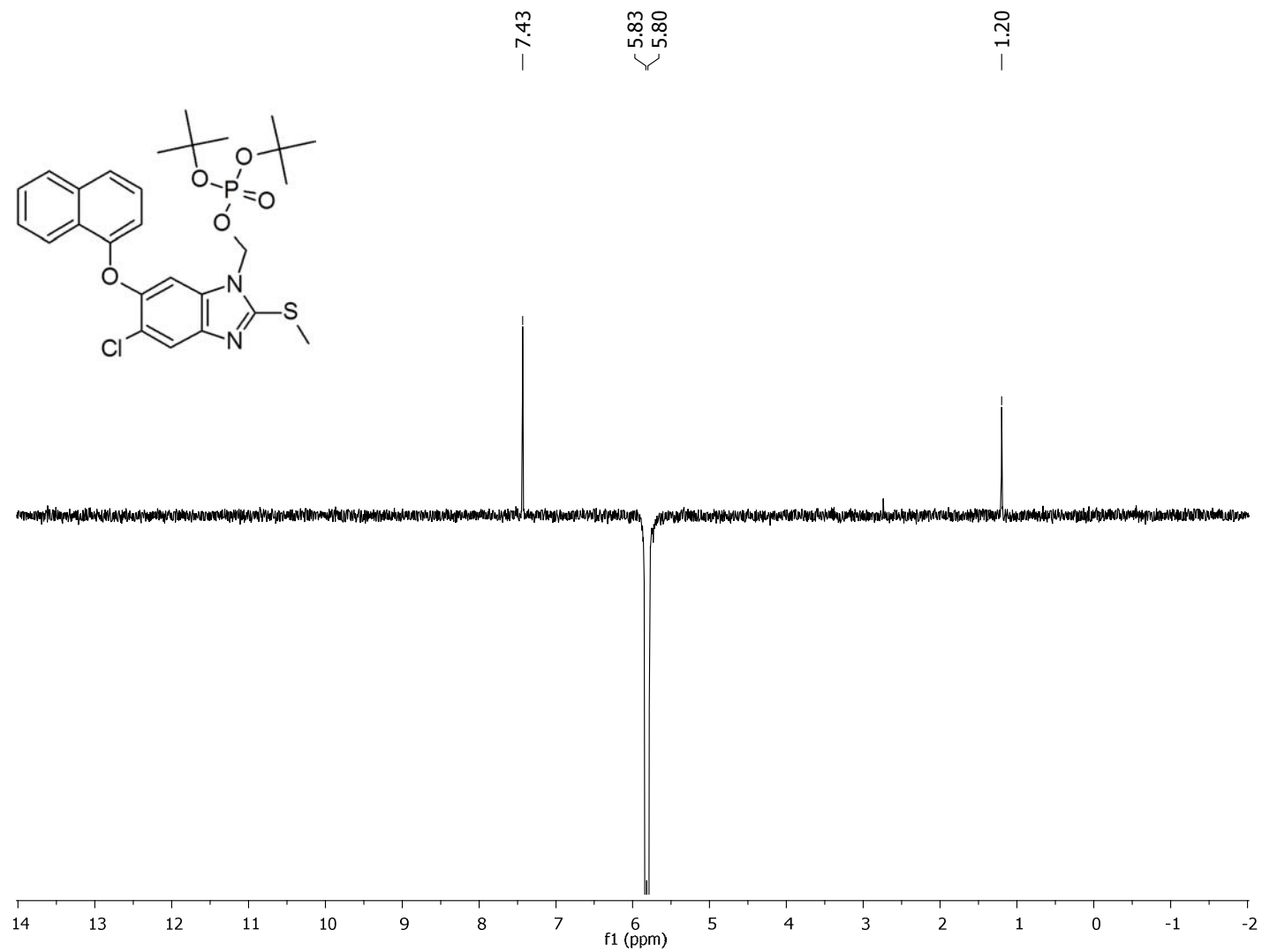
Espectro 73. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm) para fosfato de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metil di-*terc*-butilo (29b).



Espectro 74. RMN ^{13}C (TMS, DMSO-*d*₆, 75 MHz, δ en ppm) para fosfato de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metil di-*terc*-butilo (29b).



Espectro 75. RMN ^{31}P (TMS, DMSO- d_6 , 122 MHz, δ en ppm) para fosfato de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metil di-*terc*-butilo (**29b**).



Espectro 76. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ en ppm) experimento NOE-1D para fosfato de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metil di-*terc*-butilo (**29b**).

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

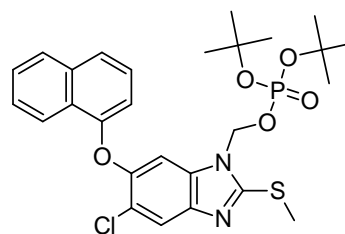
Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

7 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 25-28 H: 28-35 N: 2-3 O: 5-5 Na: 0-1 P: 1-1 S: 1-2 Cl: 0-1

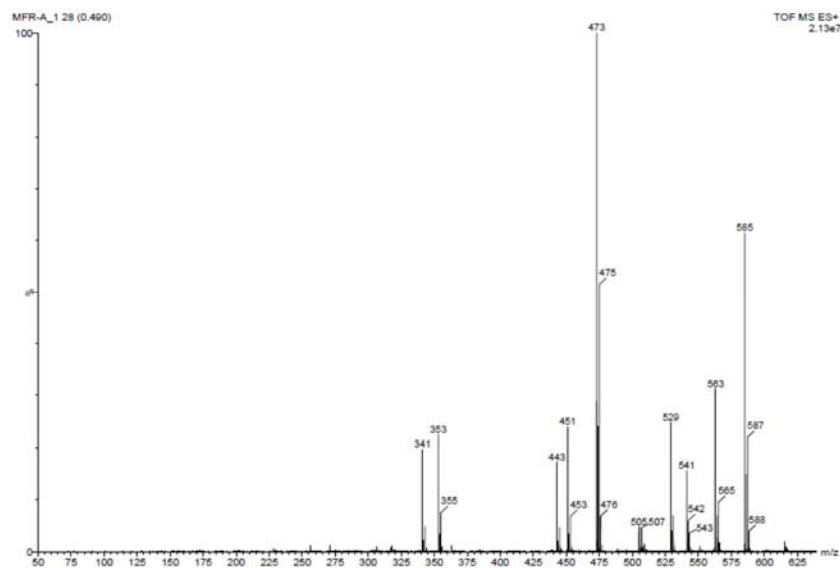


Molecular Formula = C₂₇H₃₂ClN₂O₅PS

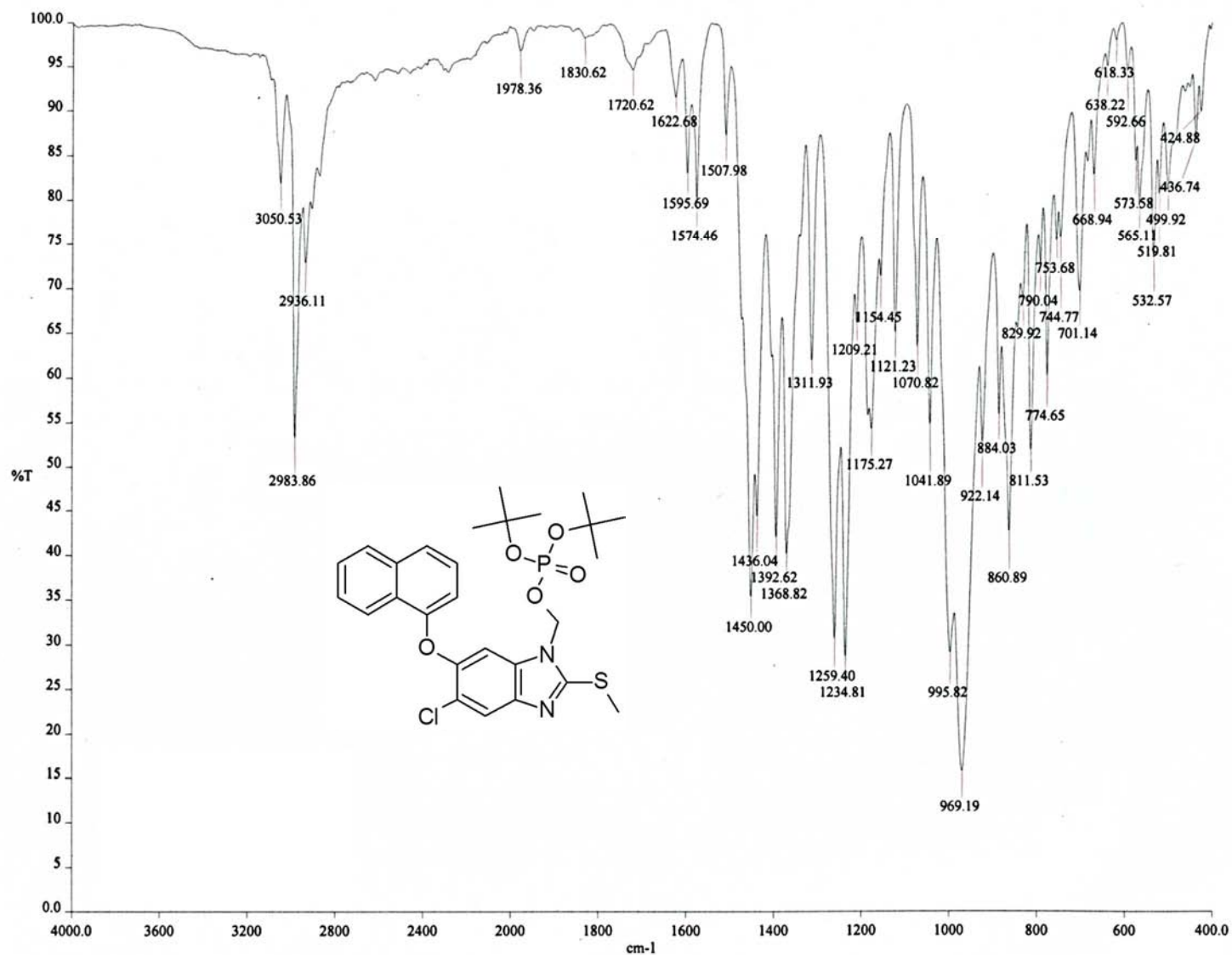
Formula Weight = 563.045142

Monoisotopic Mass = 562.145806 Da

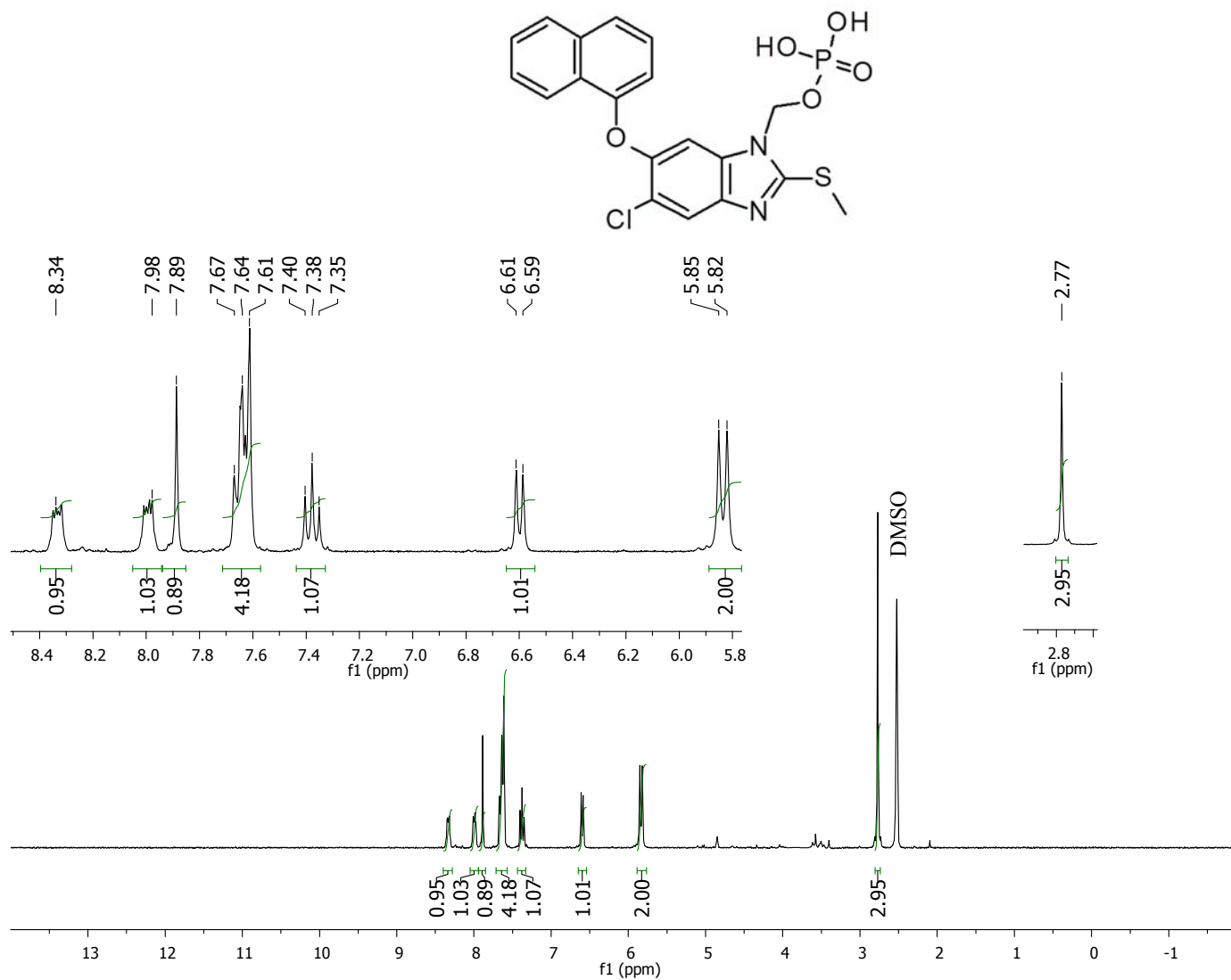
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
563.1553	563.1536	1.7	3.0	12.5	C27 H33 N2 O5 P S Cl
	563.1512	4.1	7.3	9.5	C25 H34 N2 O5 Na P S Cl
	563.1745	-19.2	-34.1	13.5	C28 H33 N2 O5 Na P S



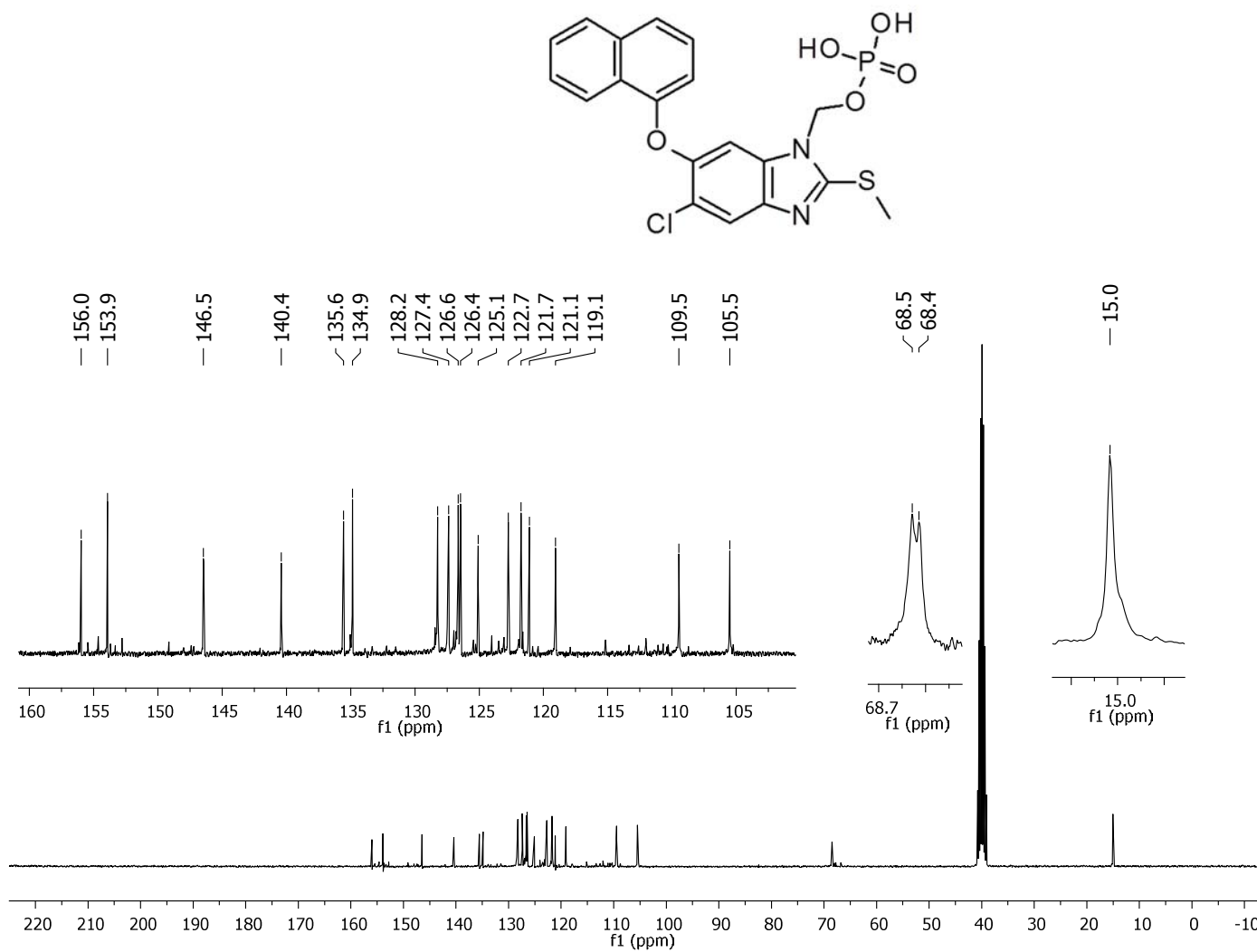
Espectro 77. EMAR-ESI para fosfato de [5-cloro-2-(metiltilio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metil di-terc-butilo.



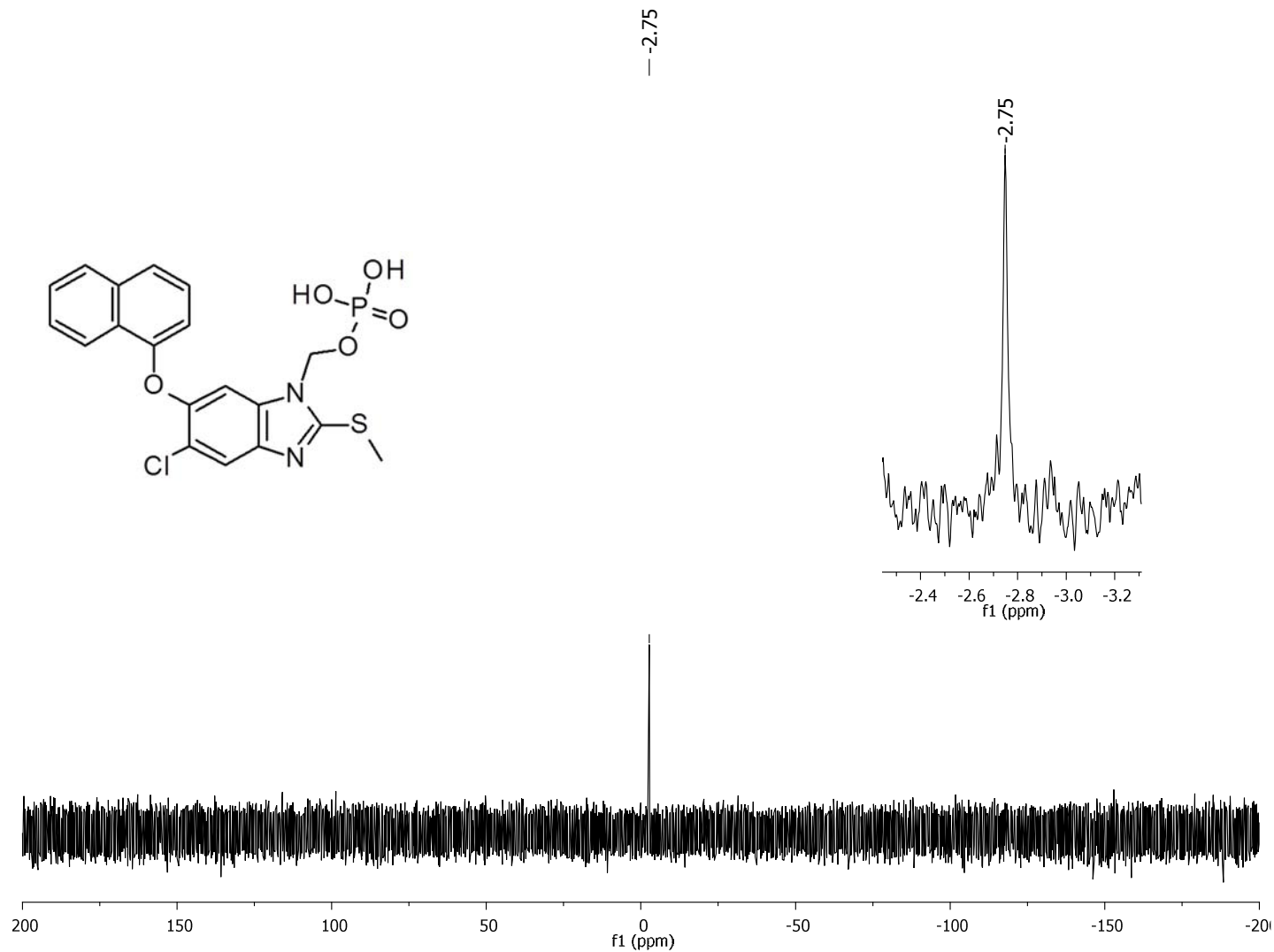
Espectro 78. IR (ATR) para fosfato de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftilo)-1H-benzimidazol-1-il]metil di-*terc*-butilo (29b).



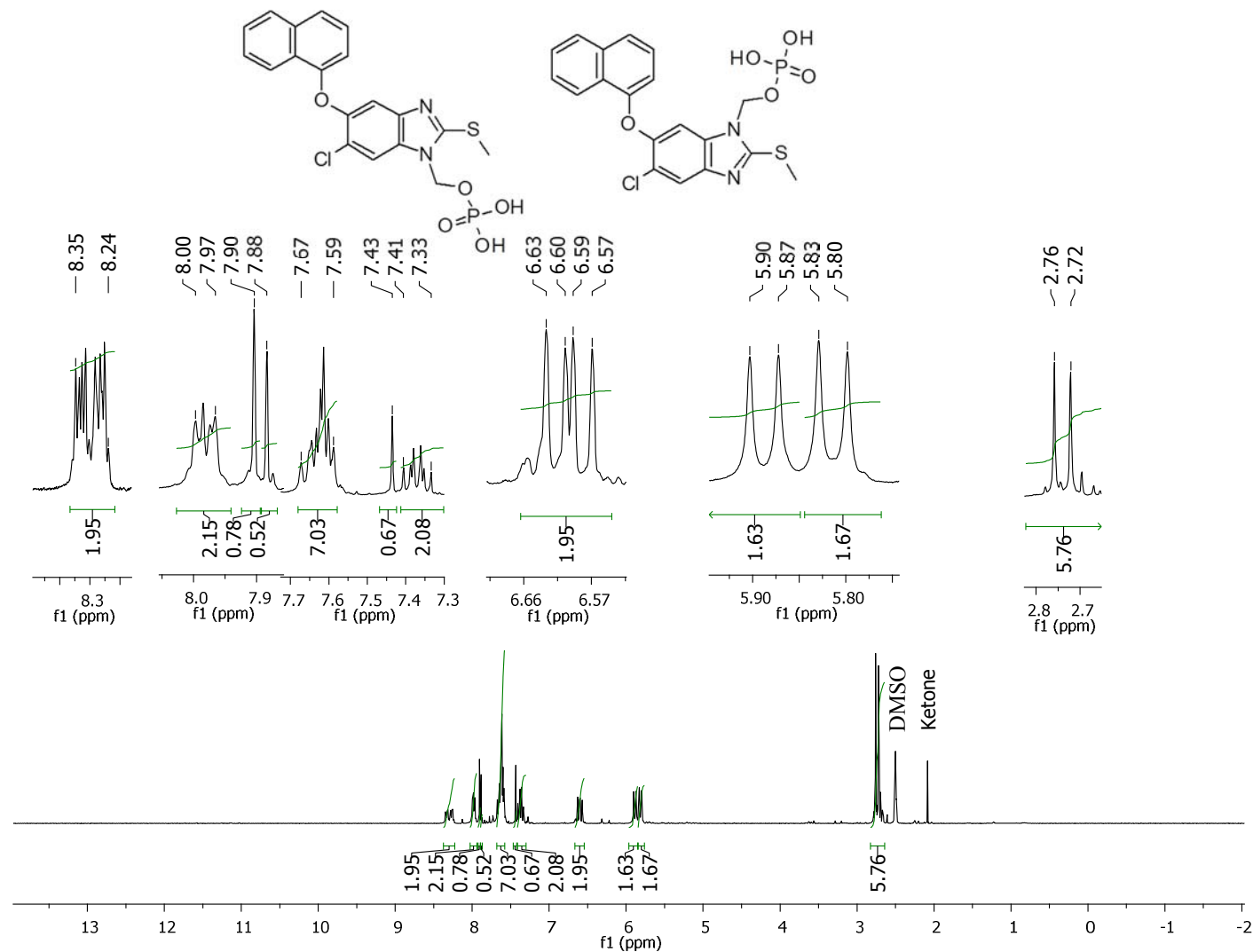
Espectro 79.RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).



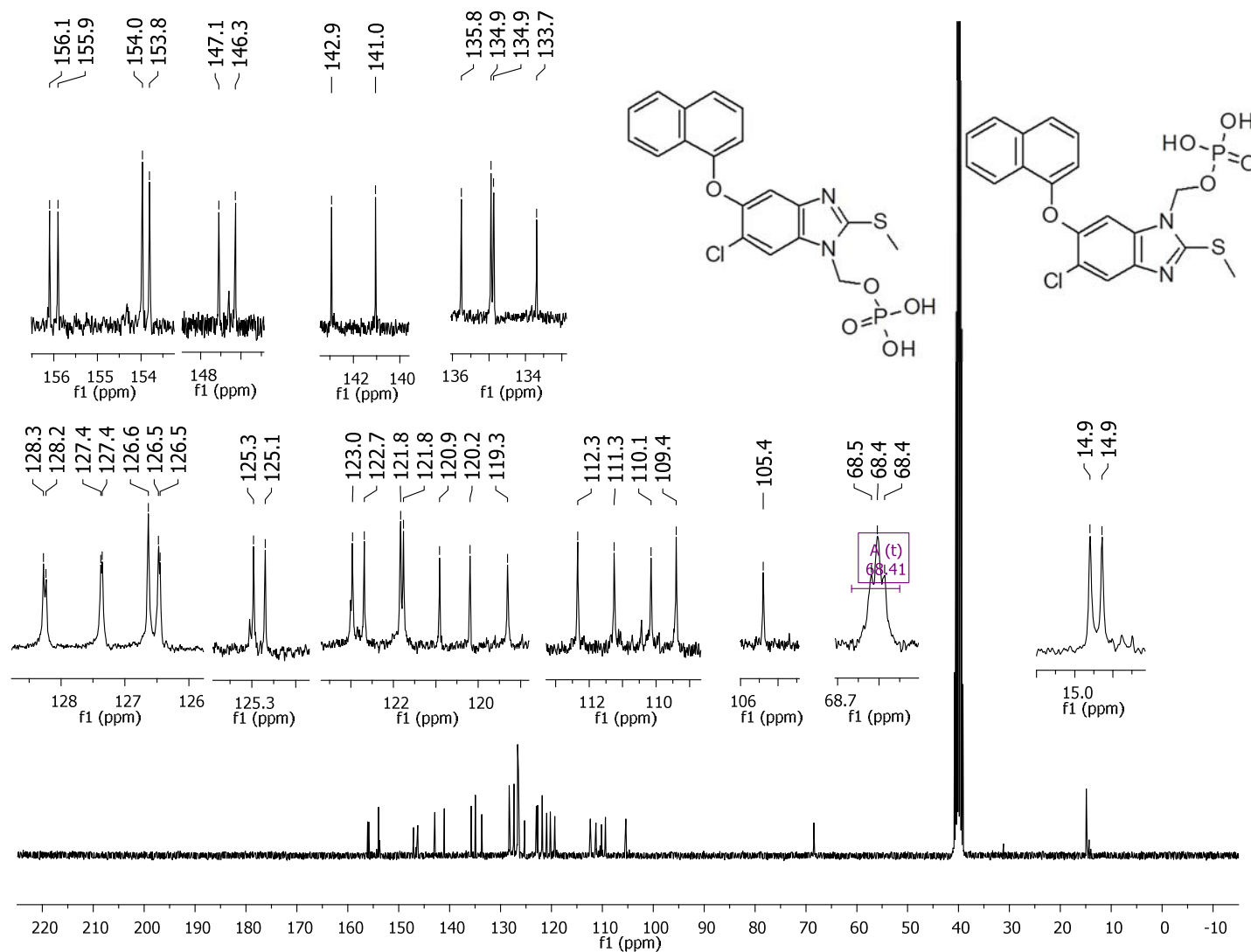
Espectro 80. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).



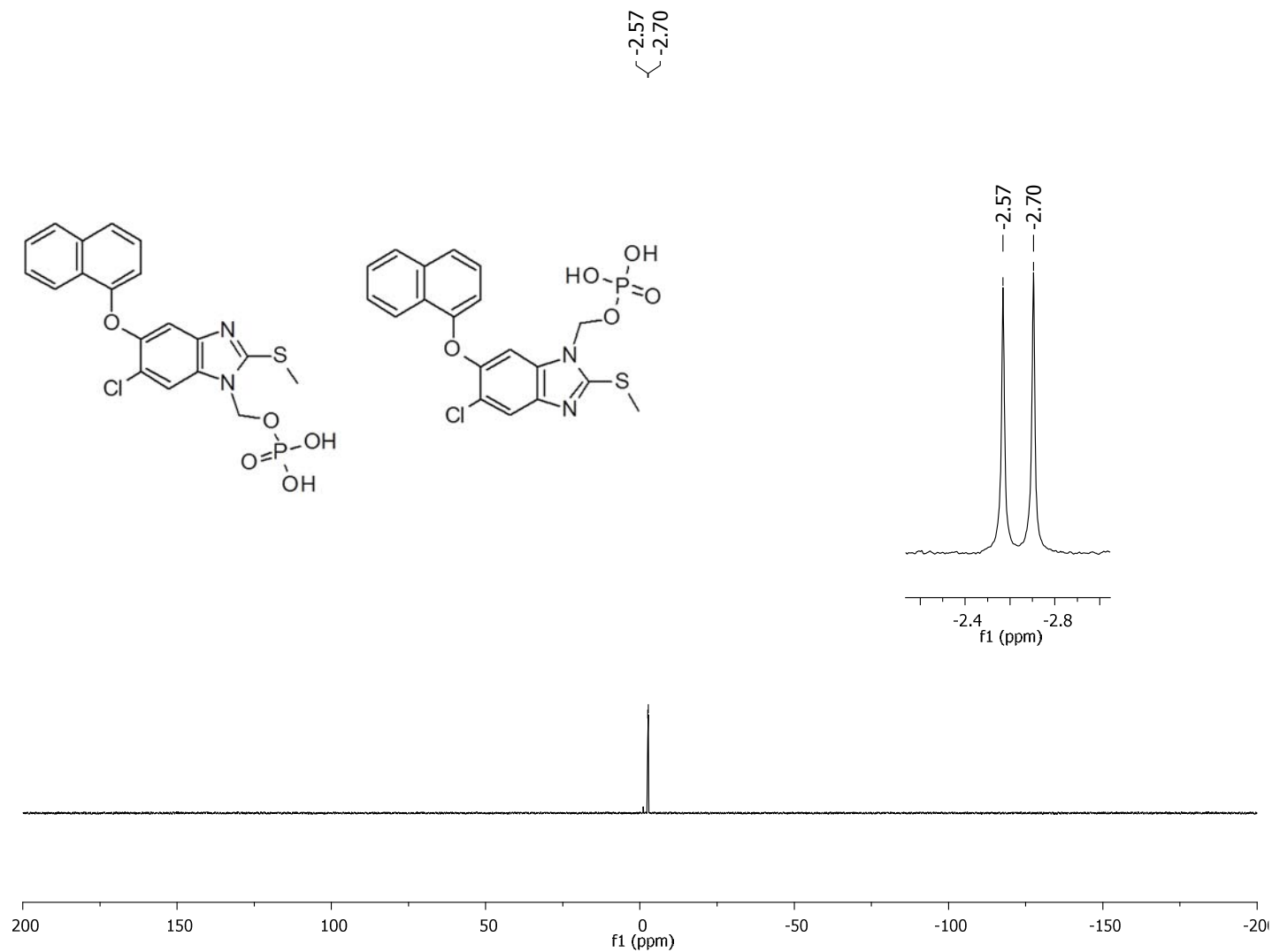
Espectro 81. RMN ^{31}P (TMS, DMSO- d_6 , 122 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).



Espectro 82. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 300 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).



Espectro 83. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).



Espectro 84. RMN ^{31}P (TMS, DMSO- d_6 , 122 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**31a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

11 formula(e) evaluated with 4 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

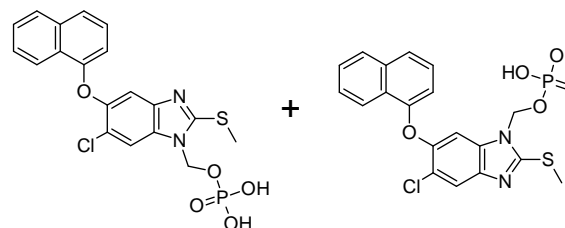
Elements Used:

C: 15-20 H: 10-20 N: 2-3 O: 5-5 Na: 0-1 S: 1-2 Cl: 0-1 P: 1-1

Minimum: -1.5

Maximum: 30.0 100.0 50.0

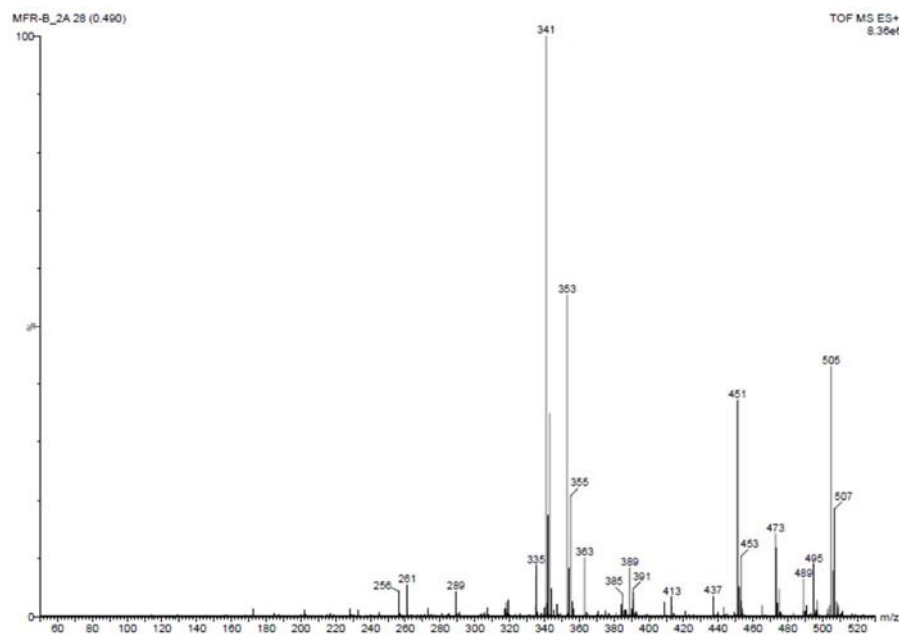
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
451.0269	451.0260	0.9	2.0	9.5	C17 H18 N2 O5 Na S Cl
	451.0284	-1.5	-3.3	12.5	C19 H17 N2 O5 S Cl P
	451.0493	-22.4	-49.7	13.5	C20 H17 N2 O5 Na S P
	451.0551	-28.2	-62.5	11.5	C19 H20 N2 O5 S2 P



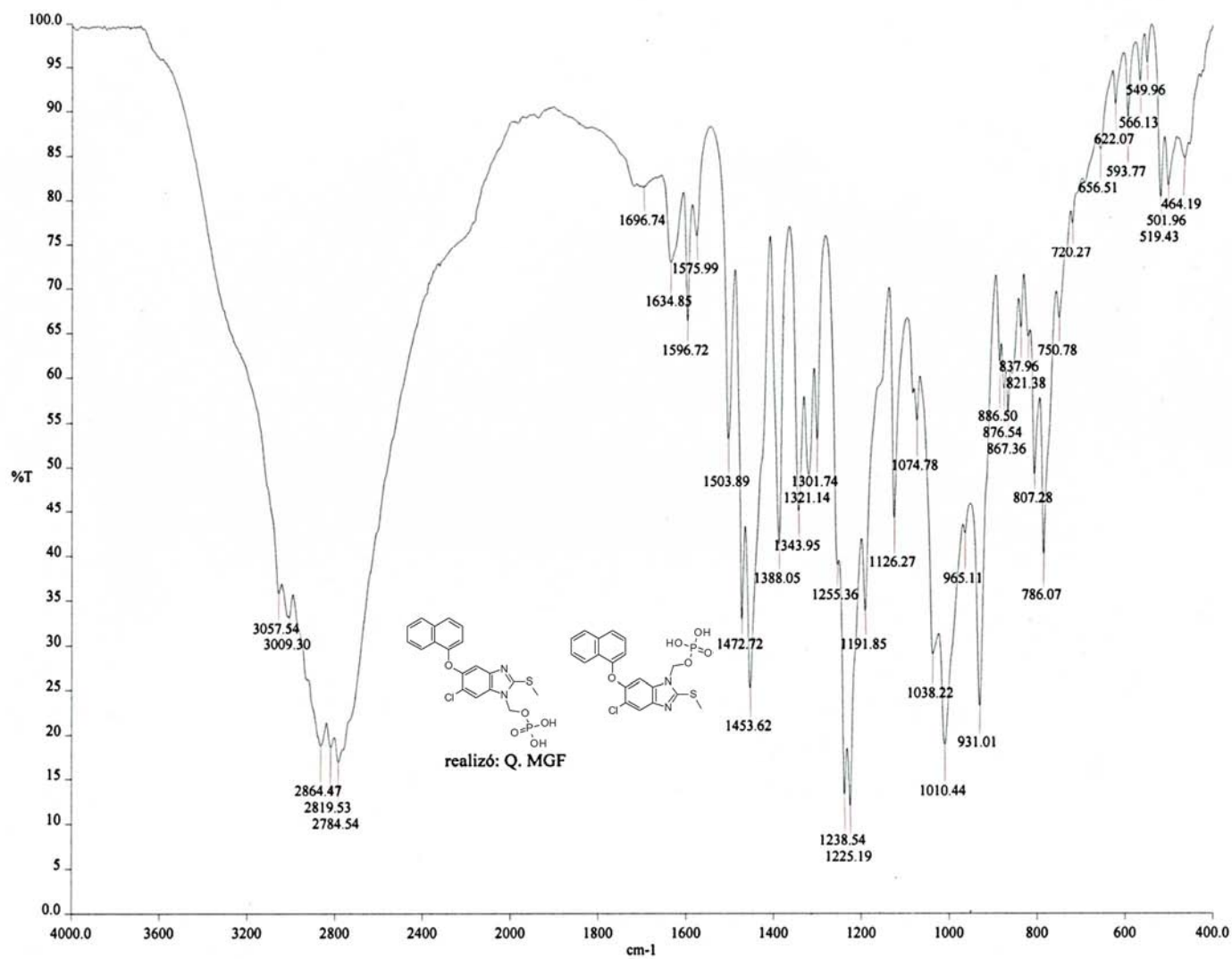
Molecular Formula = C₁₉H₁₆ClN₂O₅PS

Formula Weight = 450.832502

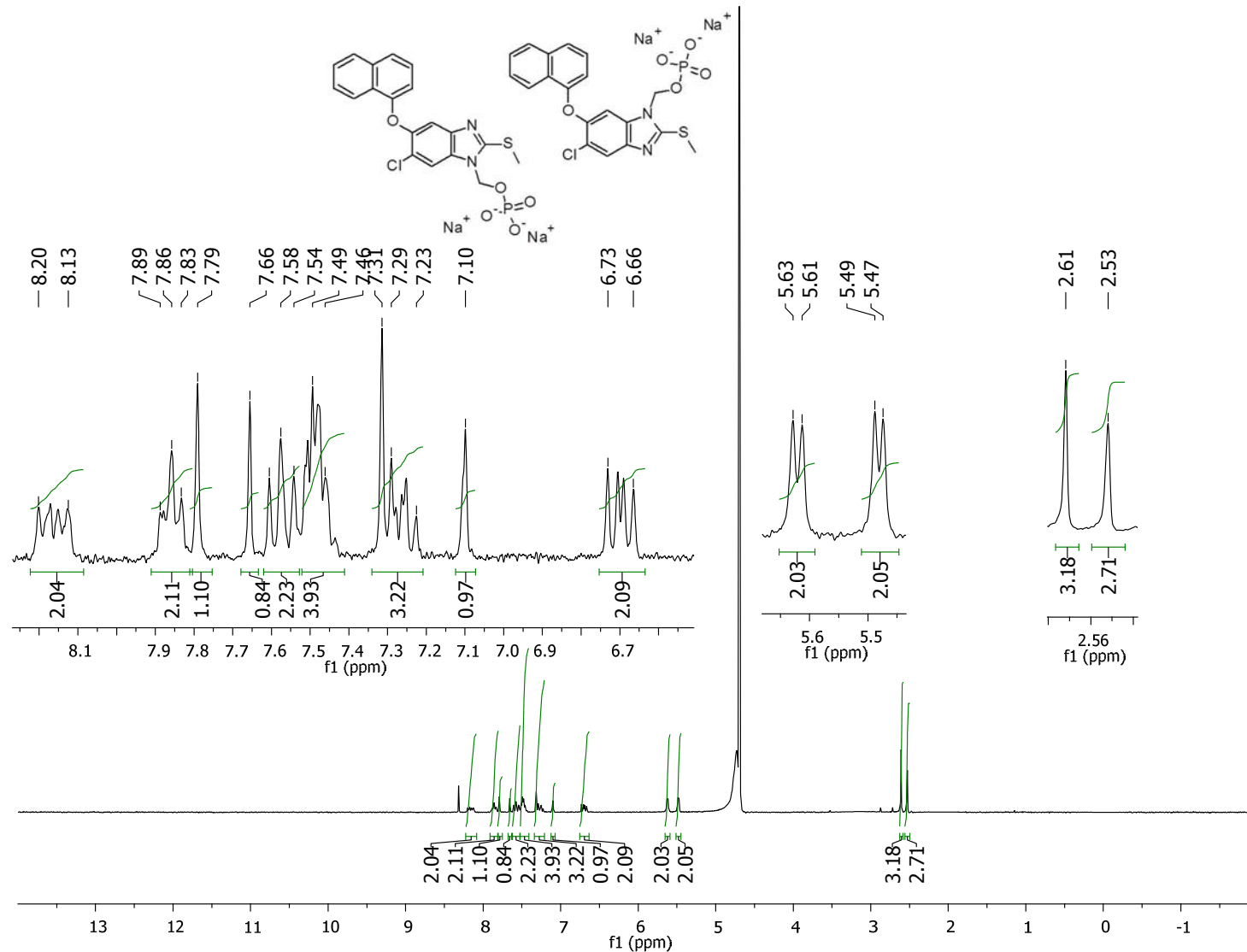
Monoisotopic Mass = 450.020605 Da



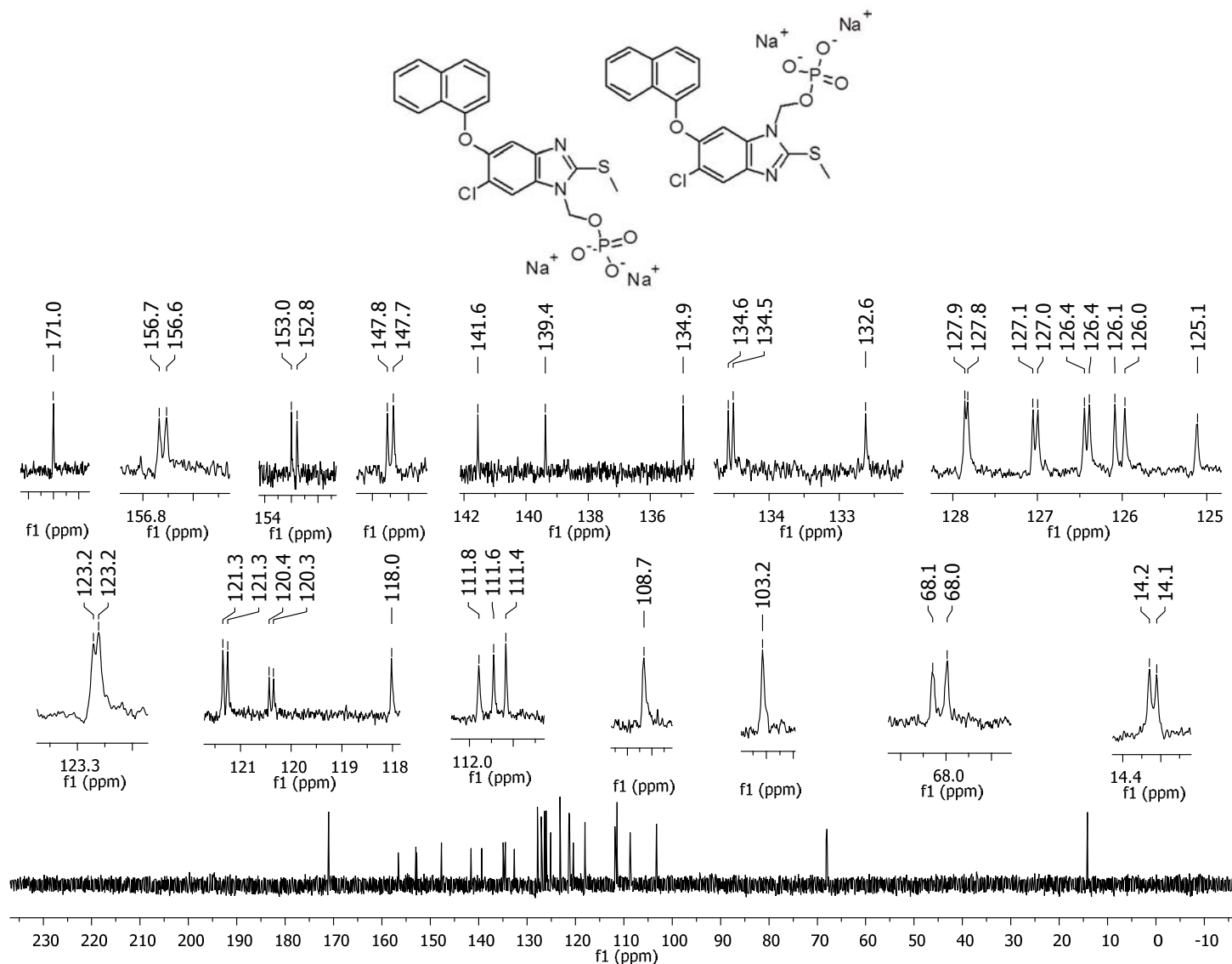
Espectro 85. EMAR-ESI para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).



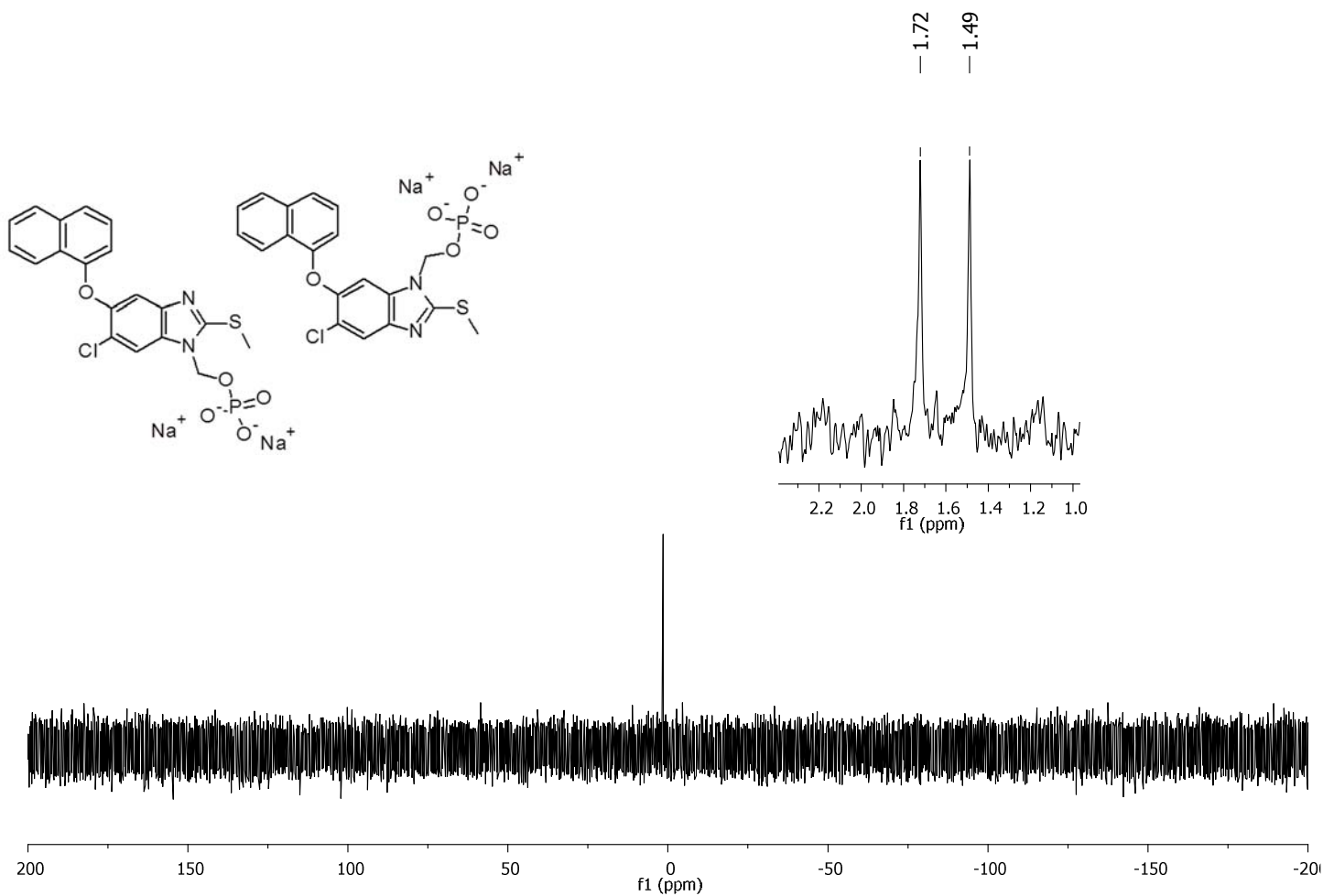
Espectro 86. IR (ATR) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**31b**).



Espectro 87. RMN ^1H (TMS, D_2O , 300 MHz, δ en ppm) para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33a**) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33b**).



Espectro 88. RMN ^{13}C (TMS, D_2O , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metilto)-5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33a**) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metilto)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33b**).



Espectro 89. RMN ^{31}P (TMS, D_2O , 122 MHz, δ en ppm) para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metilto)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33a**) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metilto)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33b**).

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

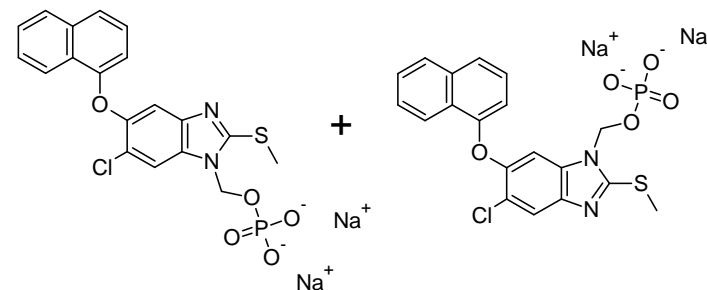
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

123 formula(e) evaluated with 21 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 18-22 H: 13-18 N: 1-3 O: 2-5 Na: 0-3 P: 1-1 S: 1-1 Cl: 0-2 Si: 0-1

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
516.9767	516.9767	0.0	0.0	15.5	C21 H13 N2 O5 Na2 P S Cl
		0.1	0.2	16.5	C22 H16 N2 O3 P S Cl2 Si
		2.4	4.6	12.5	C19 H14 N2 O5 Na3 P S Cl
		2.5	4.8	13.5	C20 H17 N2 O3 Na P S Cl2 Si
		-2.9	-5.6	16.5	C21 H13 N2 O4 Na3 P S Si
		5.0	9.7	10.5	C18 H18 N2 O3 Na2 P S Cl2 Si
		8.1	15.7	15.5	C22 H14 N2 O2 Na2 P S Cl2
		10.5	20.3	12.5	C20 H15 N2 O2 Na3 P S Cl2
		-13.0	-25.1	10.5	C19 H18 N2 O4 Na2 P S Cl2
		-15.4	-29.8	13.5	C21 H17 N2 O4 Na P S Cl2
		-16.0	-30.9	11.5	C19 H18 N2 O3 Na3 P S Cl Si
		18.0	34.8	15.5	C20 H13 N2 O4 Na2 P S Cl Si
		-18.4	-35.6	14.5	C21 H17 N2 O3 Na2 P S Cl Si
		20.4	39.5	12.5	C18 H14 N2 O4 Na3 P S Cl Si
		20.9	40.4	14.5	C20 H13 N2 O5 Na P S Cl2
		-20.9	-40.4	16.5	C22 H13 N2 O5 Na3 P S
		23.4	45.3	11.5	C18 H14 N2 O5 Na2 P S Cl2
		-34.0	-65.8	11.5	C20 H18 N2 O4 Na3 P S Cl
		-36.4	-70.4	14.5	C22 H17 N2 O4 Na2 P S Cl
		38.9	75.2	14.5	C19 H13 N2 O4 Na P S Cl2 Si
		-39.3	-76.0	15.5	C22 H17 N2 O3 Na3 P S Si

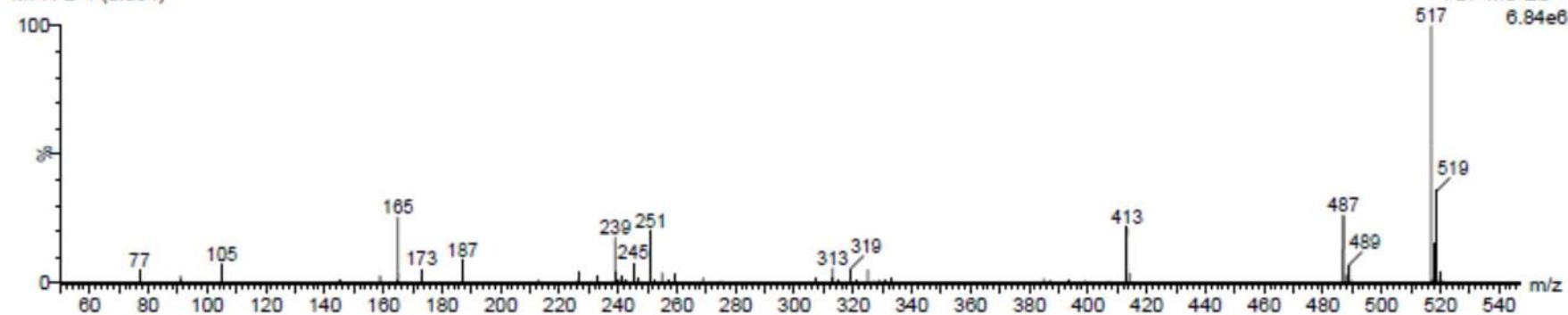


Molecular Formula = C₁₉H₁₄ClN₂Na₂O₅PS

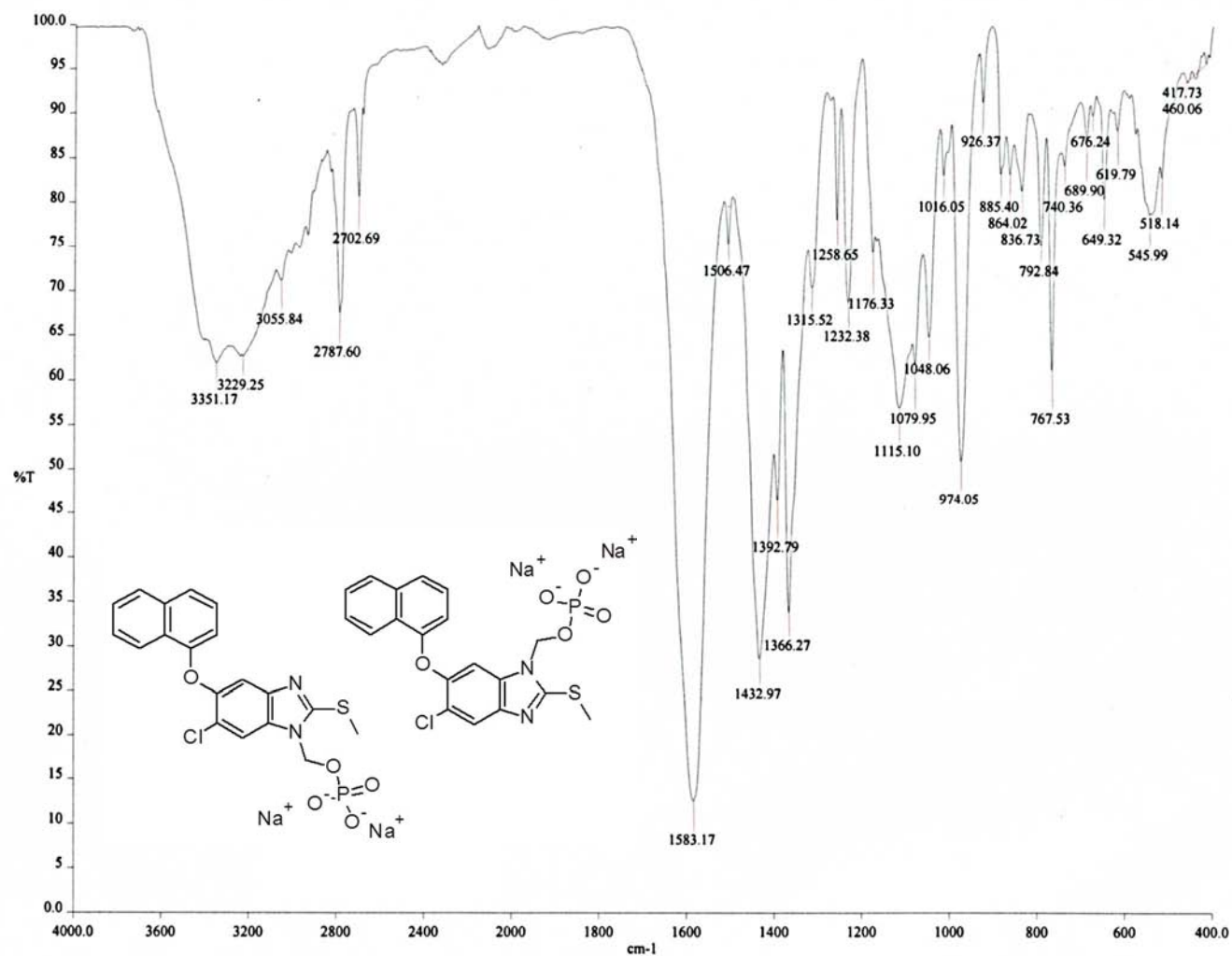
Formula Weight = 494.79616

Monoisotopic Mass = 493.984495 Da

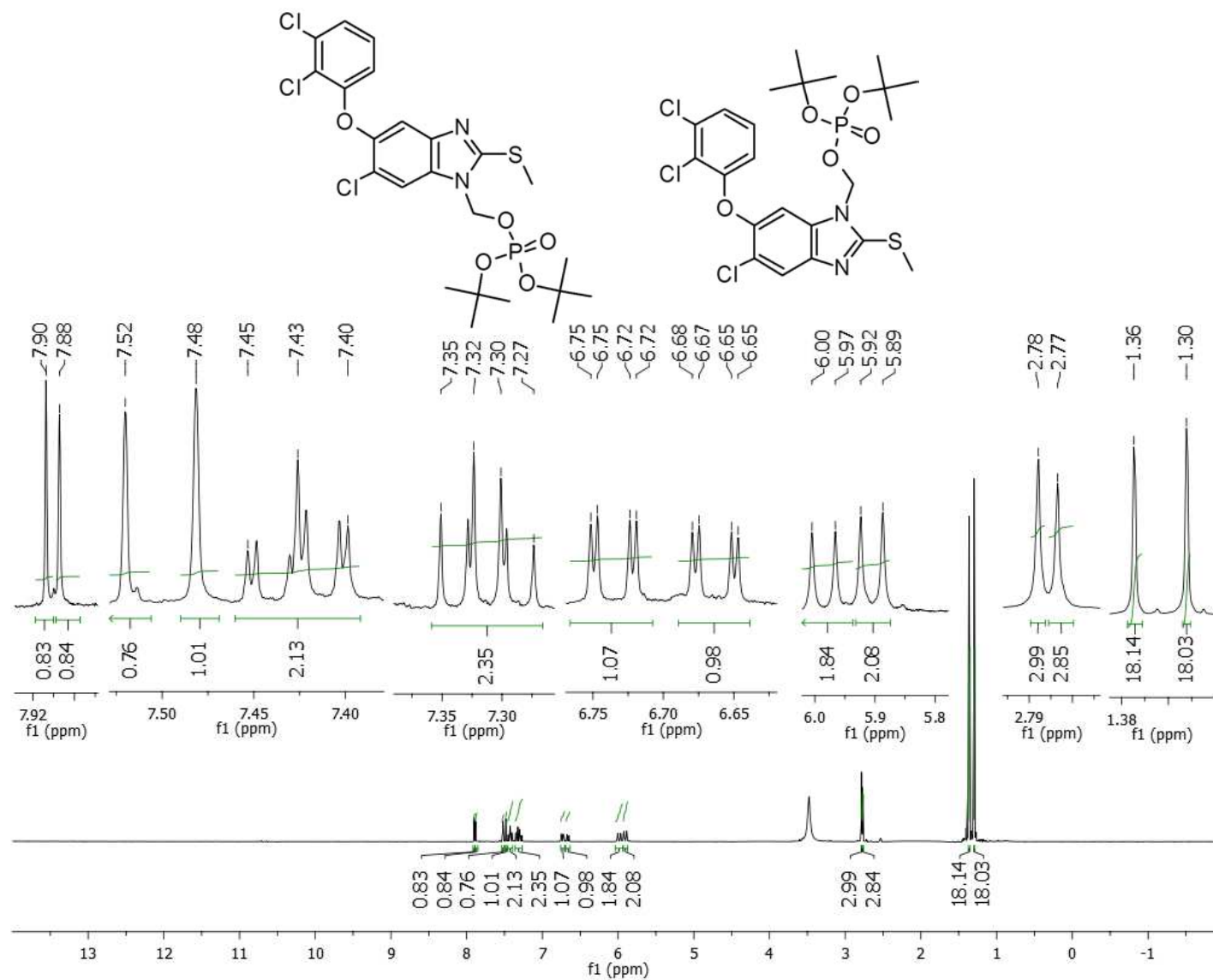
MFR-D 1 (0.034)



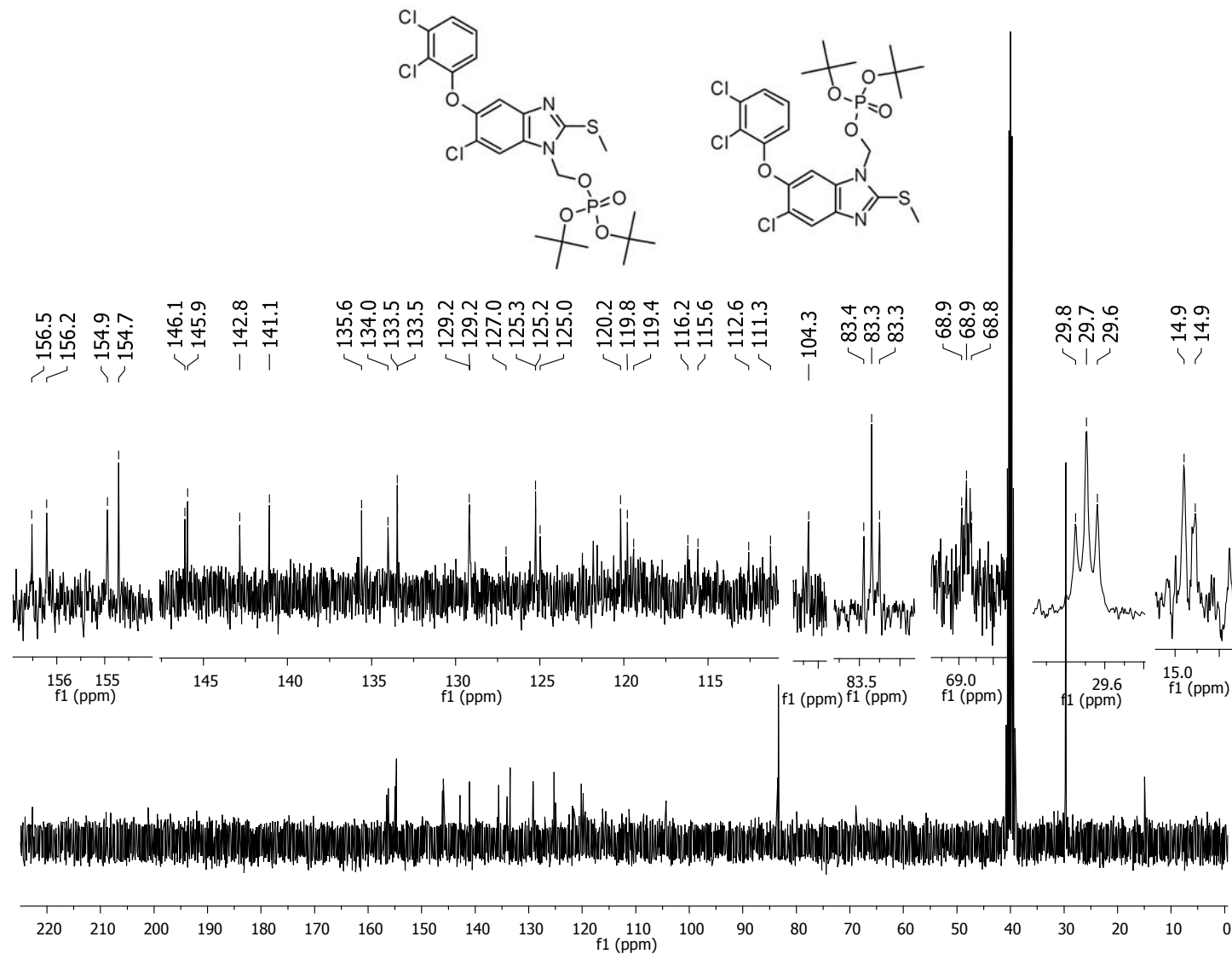
Espectro 90. EMAR-ESI para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (MFR-33a) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (MFR-33b).



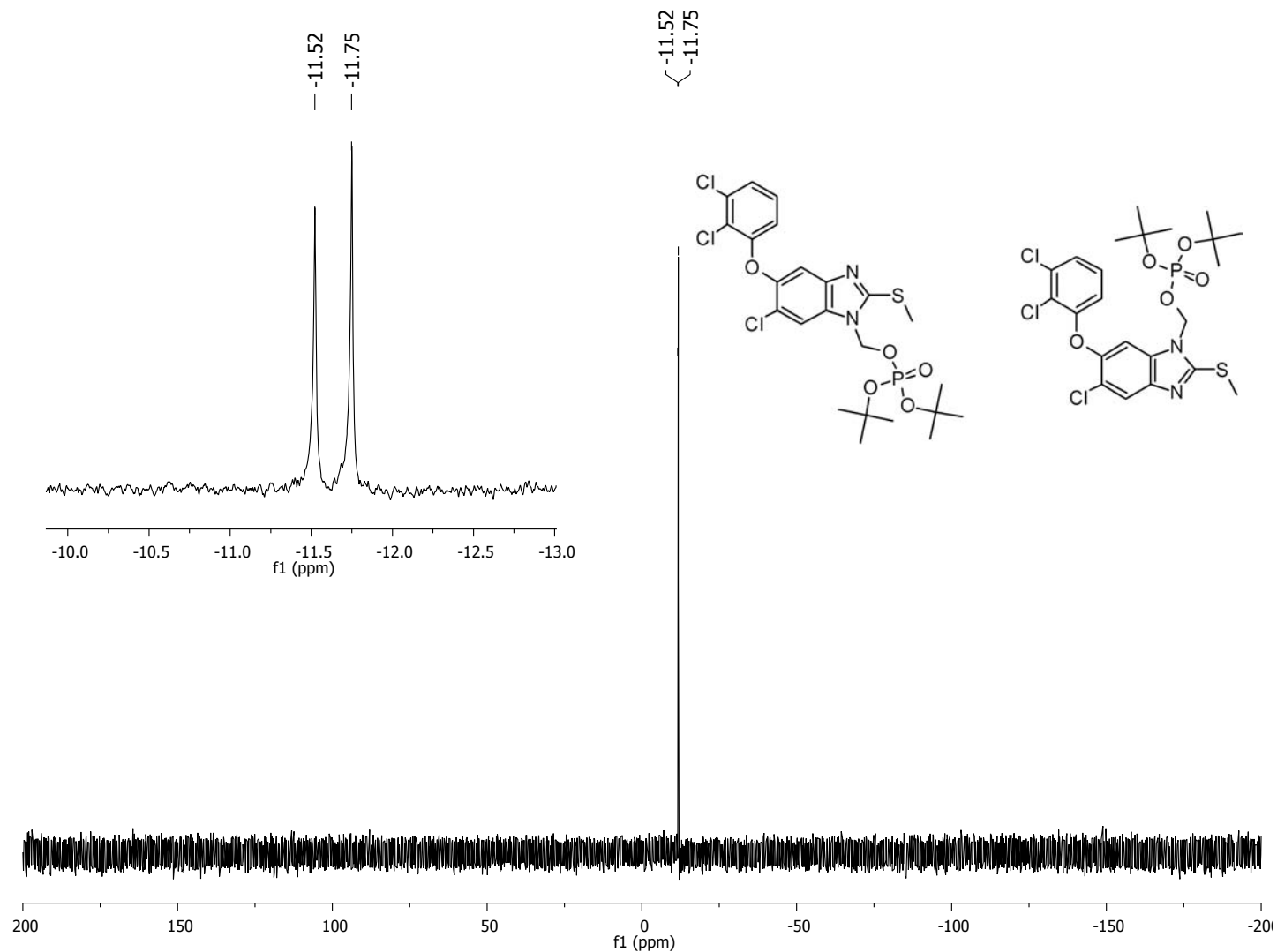
Espectro 91. IR (ATR) para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33a**) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-33b**).



Espectro 92. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 300 MHz, δ en ppm) para fosfato di-*tert*-butilico de [5-cloro-2-(metilito)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**30a**) y para fosfato di-*tert*-butilico de [6-cloro-2-(metilito)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**30b**).



Espectro 93. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato di-*tert*-butílico de [6-cloro-2-(metilitio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**30a**) y fosfato di-*tert*-butílico de [5-cloro-2-(metilitio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**30b**).



Espectro 94. RMN ^{31}P (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 122 MHz, δ en ppm) para fosfato di-*tert*-butílico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**30a**) y fosfato di-*tert*-butílico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**30b**).

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

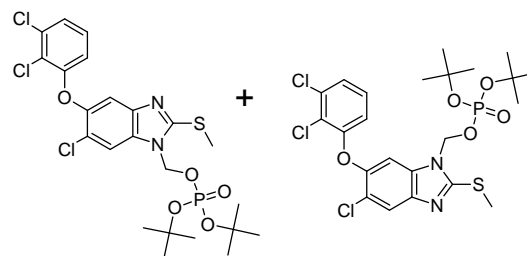
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

26 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 20-24 H: 25-30 N: 1-5 O: 2-5 P: 1-1 S: 1-1 Cl: 1-3

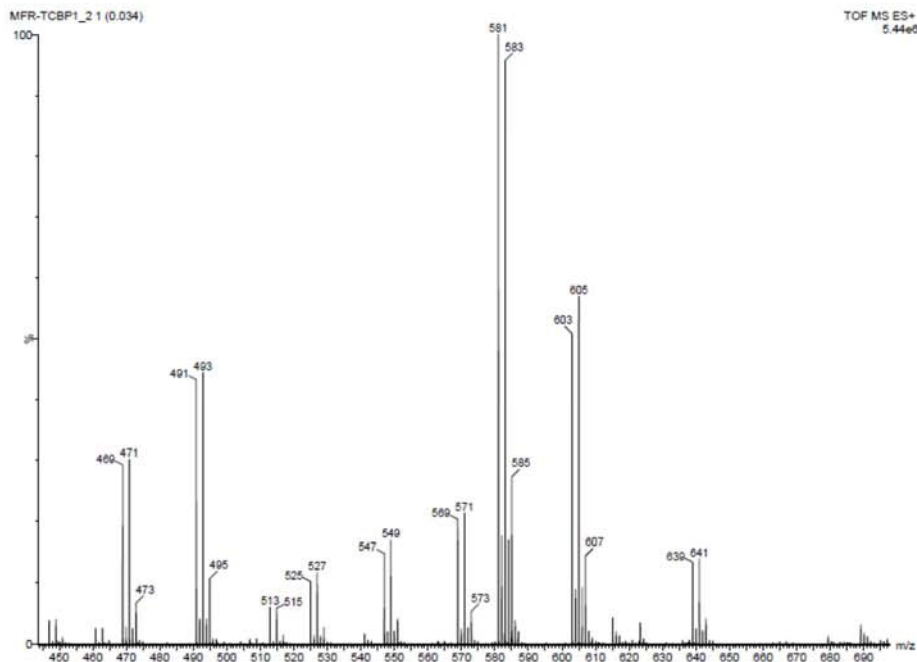
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
581.0587	581.0600	-1.3	-2.2	9.5	C23 H29 N2 O5 P S Cl3
	581.0713	-12.6	-21.7	9.5	C22 H29 N4 O4 P S Cl3
	581.0349	23.8	41.0	10.5	C21 H25 N4 O5 P S Cl3



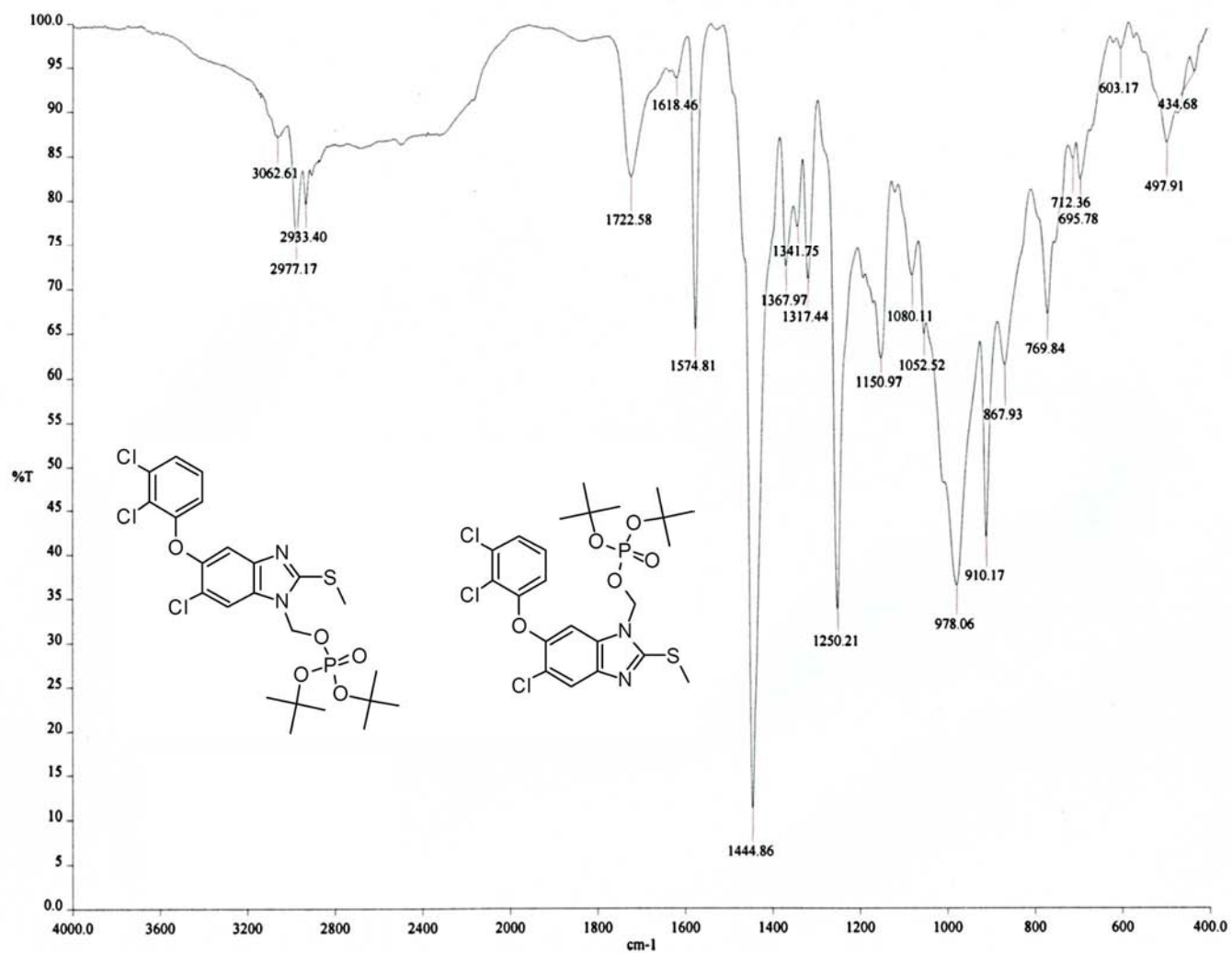
Molecular Formula = C₂₃H₂₈Cl₃N₂O₅PS

Formula Weight = 581.876582

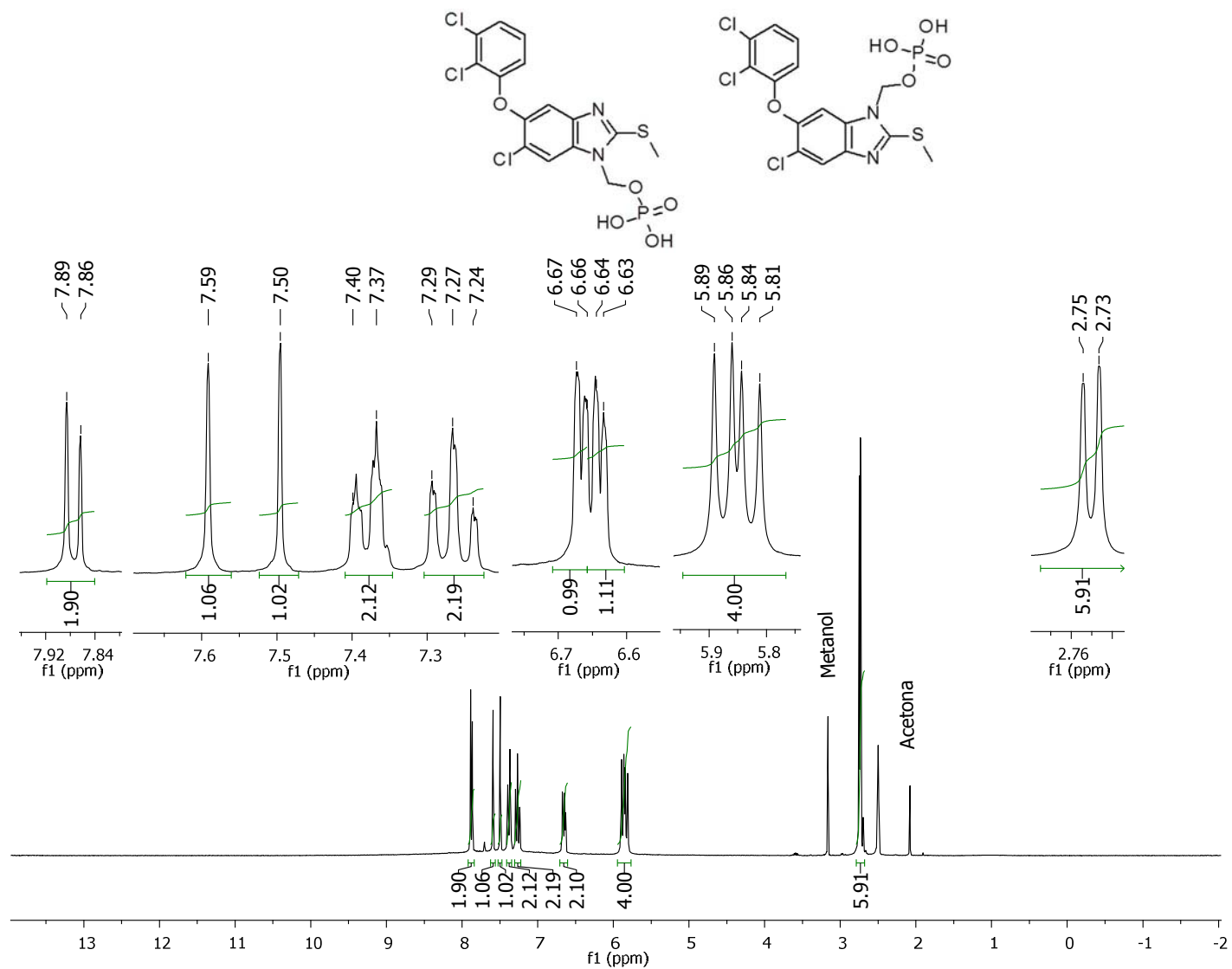
Monoisotopic Mass = 580.052211 Da



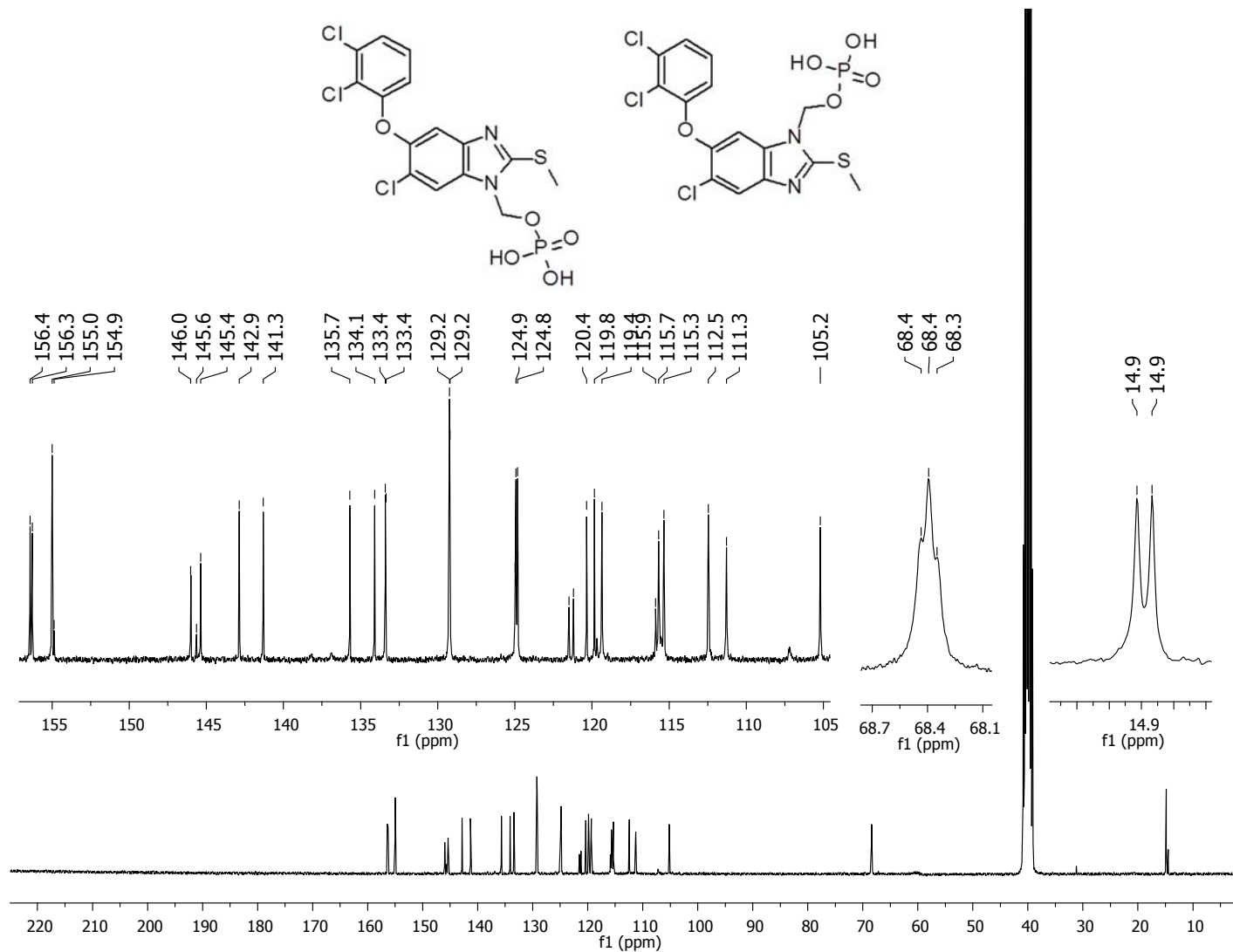
Espectro 95. EMAR-ESI para fosfato di-*terc*-butilico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**30a**) y fosfato di-*terc*-butilico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**30b**).



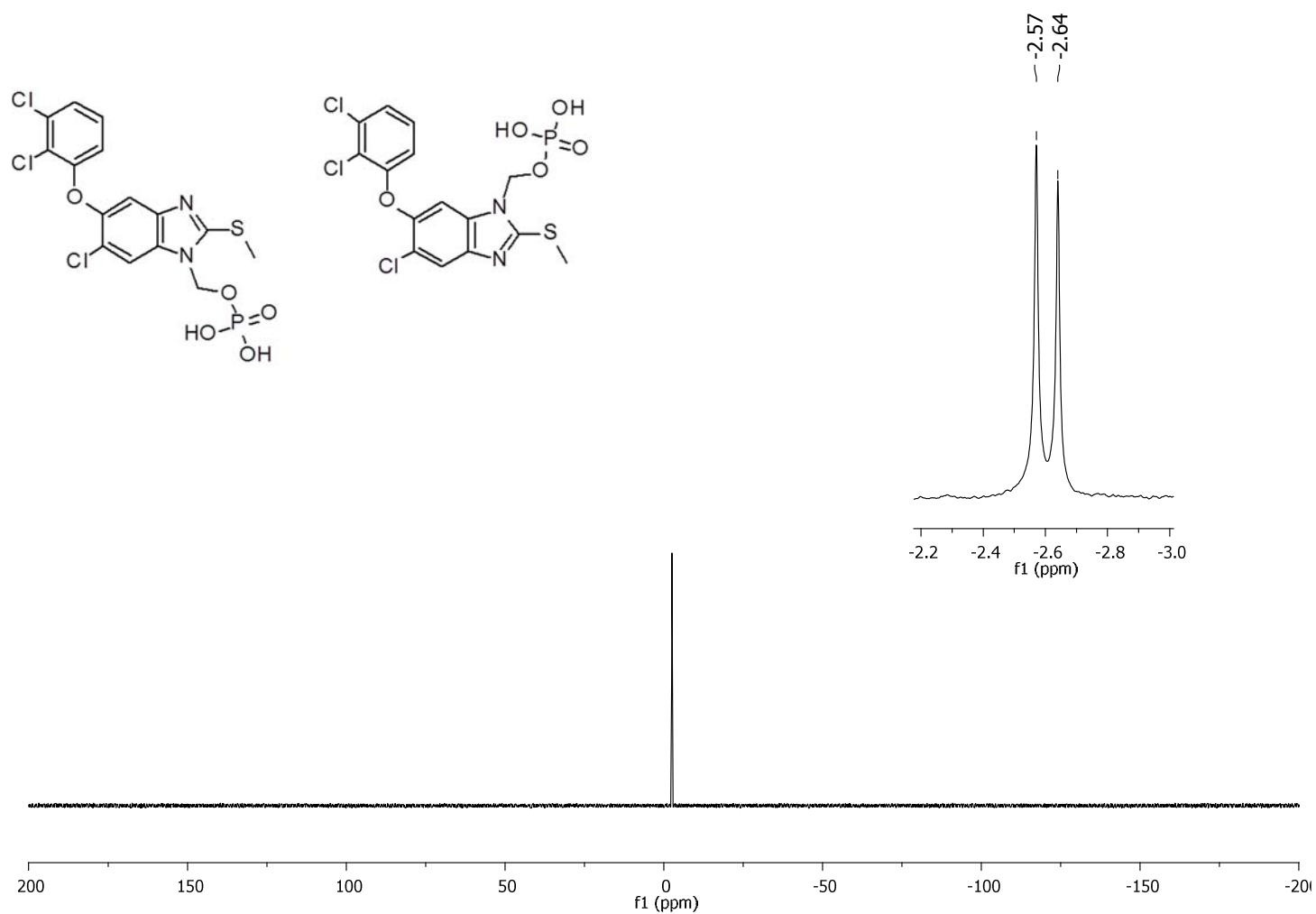
Espectro 96. IR (ATR) para fosfato di-*terc*-butílico de [6-cloro-2-(metililo)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**30a**) y fosfato di-*terc*-butílico de [5-cloro-2-(metililo)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**30b**).



Espectro 97. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metilitio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**32a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metilitio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**32b**).



Espectro 98. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**32a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**32b**).



Espectro 99. RMN ^{31}P (TMS, $\text{DMSO}-d_6$, 122 MHz, δ en ppm) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**32a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**32b**).

Elemental Composition Report

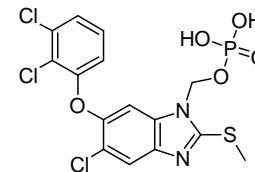
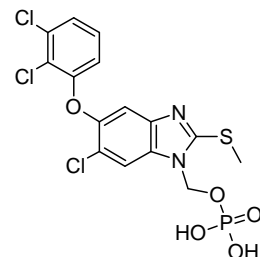
Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

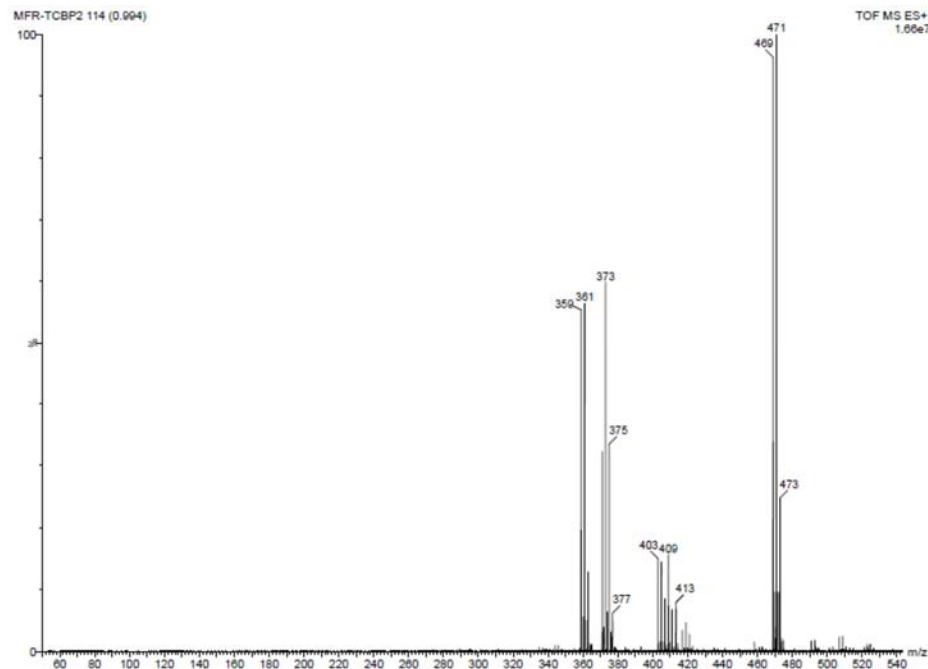
Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
 35 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:
 C: 12-15 H: 10-15 N: 1-2 O: 2-5 Na: 0-1 P: 1-1 S: 1-1 Cl: 1-3

Minimum: -1.5
 Maximum: 30.0 100.0 50.0

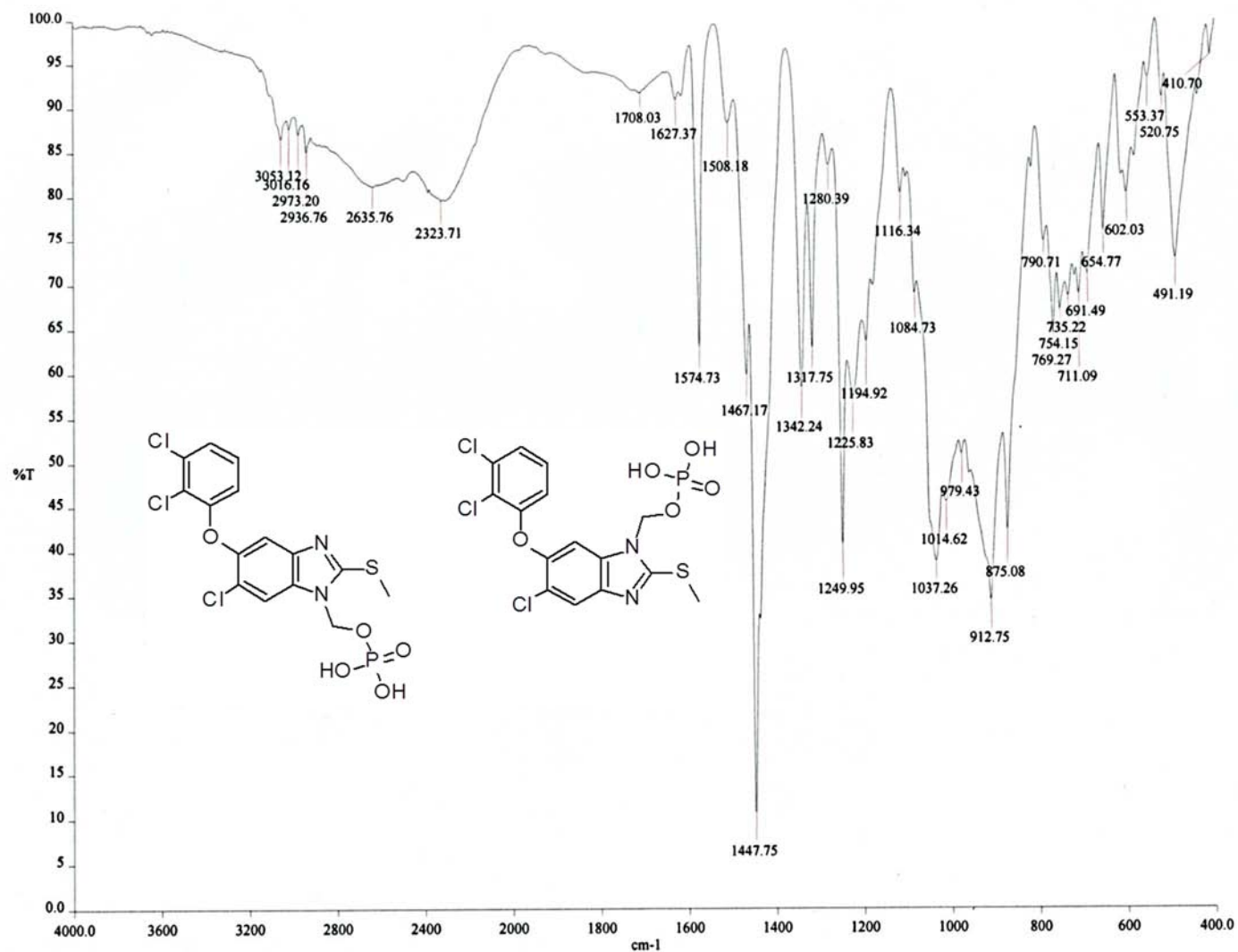
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
468.9324	468.9324	0.0	0.0	6.5	C13 H14 N2 O5 Na P S Cl3
	468.9348	-2.4	-5.1	9.5	C15 H13 N2 O5 P S Cl3



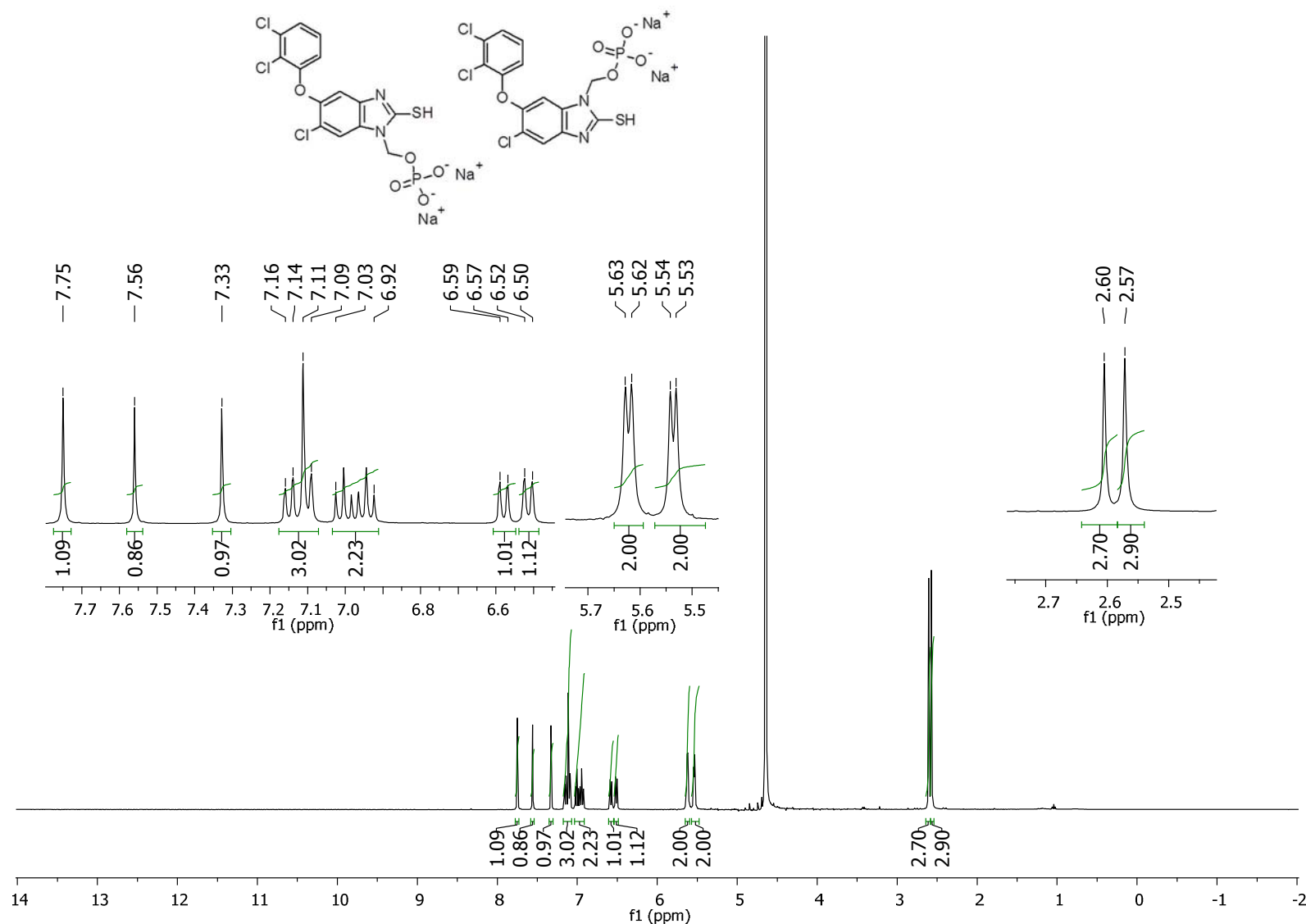
Molecular Formula = C₁₅H₁₂Cl₃N₂O₅PS
 Formula Weight = 469.663942
 Monoisotopic Mass = 467.927011 Da



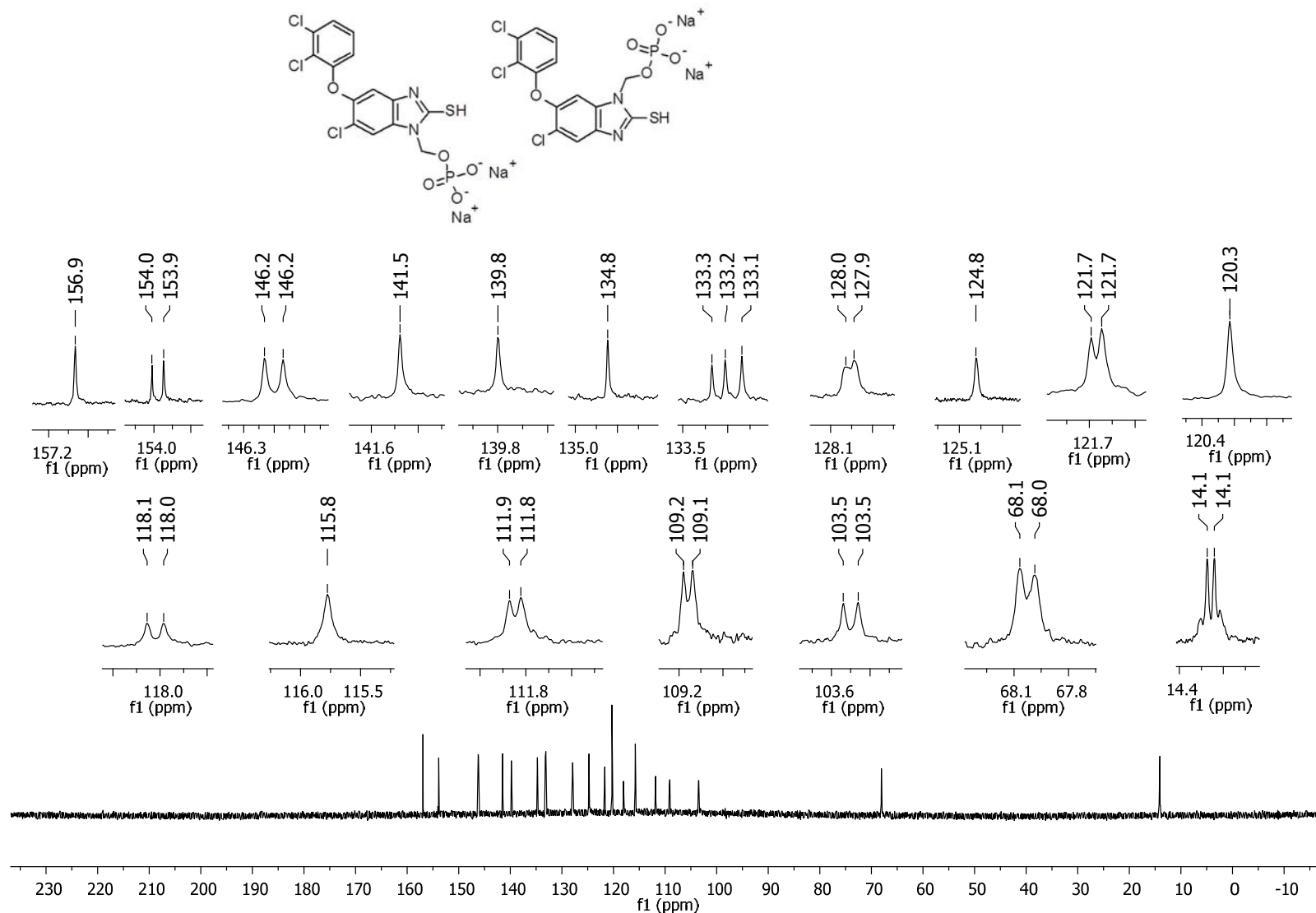
Espectro 100. EMAR-ESI para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**32a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (**32b**).



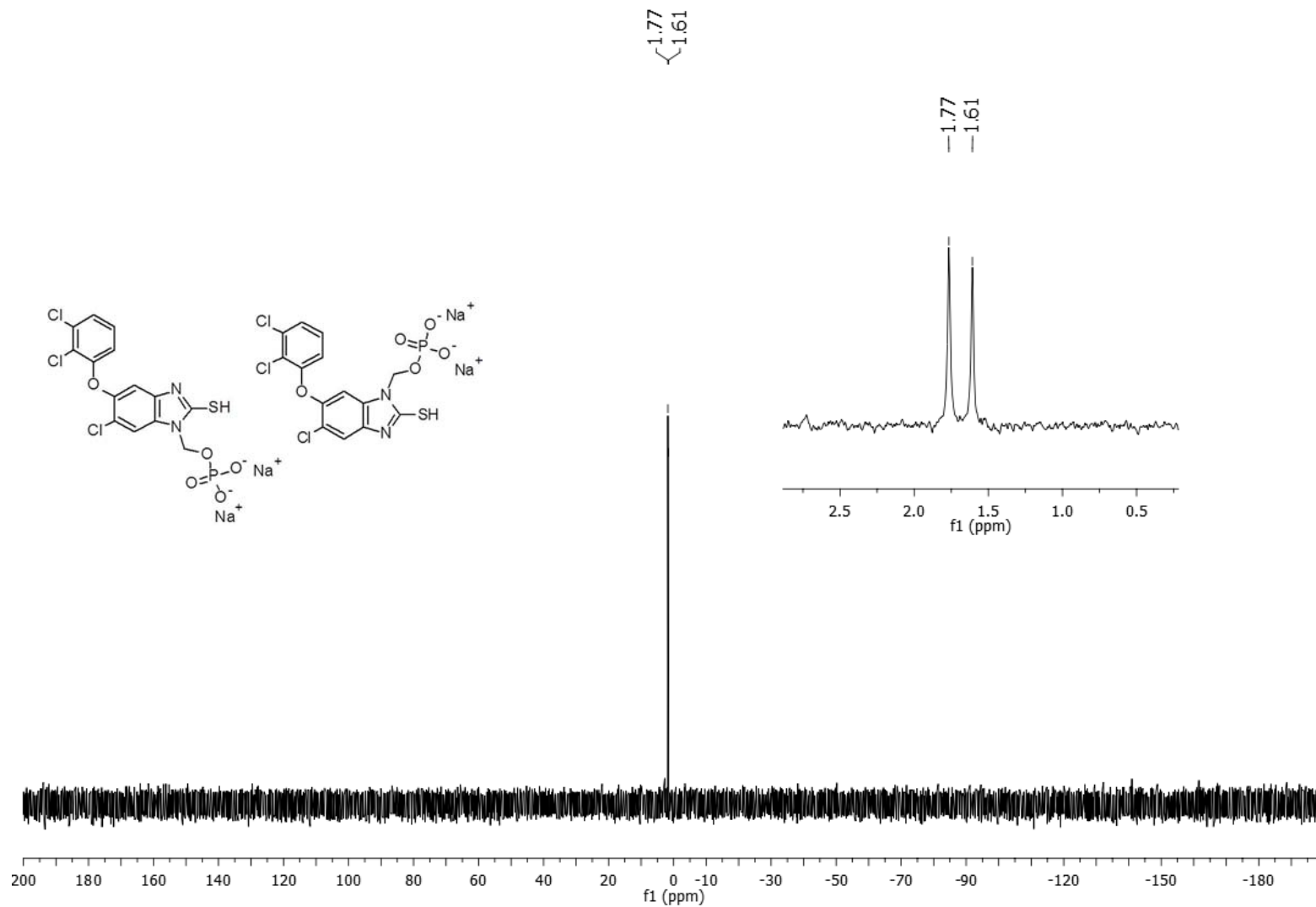
Espectro 101. IR (ATR) para fosfato dihidrógeno de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**32a**) y fosfato dihidrógeno de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**32b**).



Espectro 102. RMN ^1H (TMS, D_2O , 300 MHz, δ en ppm) para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-34a**) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-34b**).



Espectro 103. RMN ^{13}C (TMS, D_2O , 75 MHz, δ en ppm) para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-34a**) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metiltio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-34b**).



Espectro 104. RMN ^{31}P (TMS, D_2O , 122 MHz, δ en ppm) para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metilto)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-34a**) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metilto)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-1-il]metilo (**MFR-34b**).

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

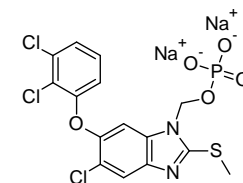
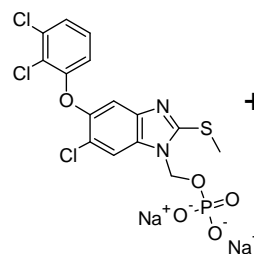
4 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

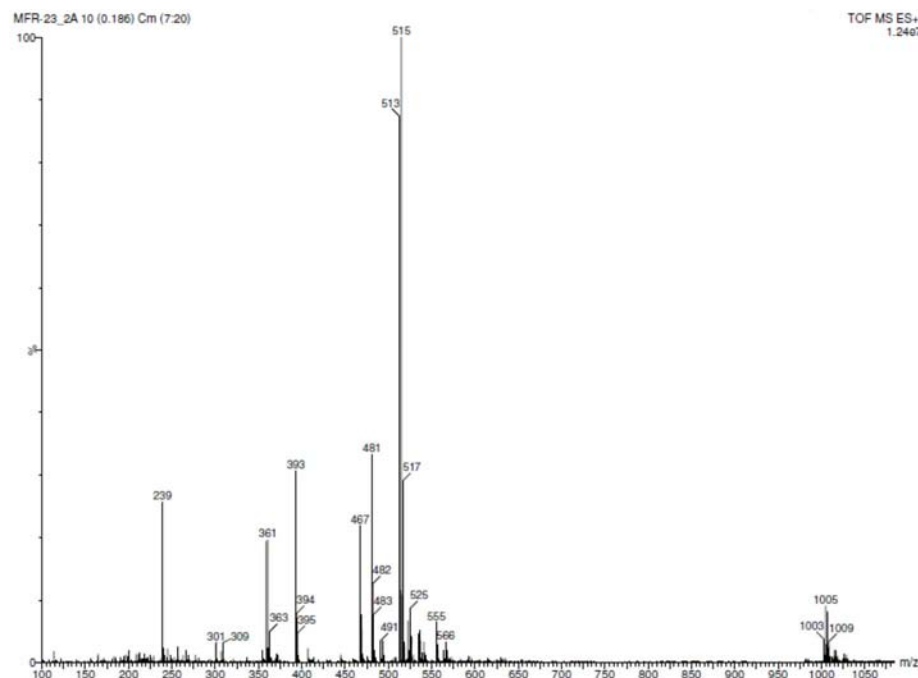
C: 12-20 H: 10-15 N: 1-2 O: 5-5 Na: 1-2 S: 1-1 Cl: 3-3 P: 1-1

Minimum: -1.5
 Maximum: 5.0 100.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
512.8986	512.8987	-0.1	-0.2	9.5	C15 H11 N2 O5 Na2 S
	512.9011	-2.5	-4.9	12.5	C17 H10 N2 O5 Na S



Molecular Formula = C₁₅H₁₀Cl₃N₂Na₂O₅PS
 Formula Weight: 513.6276
 Monoisotopic Mass: 511.890901 Da



Espectro 105. EMAR-ESI para fosfato disódico de [6-cloro-2-(metiltilio)-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (MFR-34a) y fosfato disódico de [5-cloro-2-(metiltilio)-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-1-il]metilo (MFR-34b).

Apéndice 2. Publicaciones



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis



Miguel Flores-Ramos^a, Froylán Ibarra-Velarde^b, Alicia Hernández-Campos^a, Yolanda Vera-Montenegro^b, Helgi Jung-Cook^a, Germinal J. Cantó-Alarcón^c, Lauro Misael del Rivero^a, Rafael Castillo^{a,*}

^a Facultad de Química, Departamento de Farmacia, UNAM, México DF 04510, Mexico

^b Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Parasitología, UNAM, México, DF 04510, Mexico

^c Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. CP. 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2014

Revised 1 October 2014

Accepted 2 October 2014

Available online 13 October 2014

Keywords:

Compound alpha

Fasciola hepatica

Prodrug

Benzimidazole

Phosphonoxymethyl

Fasciolicidal activity

ABSTRACT

This study describes the synthesis of compound (7), a highly hydrosoluble phosphonoxymethyl prodrug of compound alpha (4). Compound (7) improved the aqueous solubility of its precursor compound (4) by 50,000 times and it is stable at neutral pH. The prodrug showed fasciolicidal activity when evaluated in vitro against excysted *Fasciola hepatica* metacercariae. The in vivo evaluation of (7) was carried out via oral, intramuscular and subcutaneous administration in sheep artificially infected with *F. hepatica* metacercariae. At an intramuscular dose of 4 mg/kg, the activity of (7) was similar to that of compound alpha (4) at an oral dose of 15 mg/kg.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The trematode *Fasciola hepatica* is the causative agent of fasciolosis, a foodborne zoonotic disease affecting grazing animals and humans worldwide.^{1,2} In humans, fasciolosis is a re-emerging disease with estimates of 2.4–17 million people infected worldwide.² *F. hepatica* also causes economic losses of over 3 billion US dollars worldwide per annum due to livestock susceptibility to other infections, reduction in host fecundity, mortality, decrease in production of meat, milk and wool and market recall of infected livers.³ Some fasciolicides used to control these infections include halogenated phenols, salicylanilides, benzimidazoles, sulfonamides and phenoxyalkanes, but not all are active in all life stages of *F. hepatica*.⁴ Of these, triclabendazole (TCBZ, 5-chloro-2-(methylthio)-6-(2,3-dichlorophenoxy)-1*H*-benzimidazole) has been the drug of choice for the treatment of infection by *F. hepatica*.⁴ However, resistance to TCBZ in this parasite has been reported worldwide.^{5–10} Because of this evolving resistance, there have been increased efforts in recent years to identify new highly effective compounds against *F. hepatica* at all stages of development. One molecule in particular, ‘compound alpha’ [5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthyloxy)-1*H*-benzimidazole], is an experimental fasciolicidal agent that is a bioisostere of TCBZ^{11,12} (Fig. 1).

Compound alpha (4) has shown a range of activity against *F. hepatica*, similar to that of TCBZ.^{13–17} However, no resistant strains have been detected so far for compound alpha, fact that could be of advantage as compared with the drug of choice. However, despite the efficacy of TCBZ and compound alpha, these are poorly soluble in water and need to be administered orally as suspensions, pastes, powders, or as intraruminal boli.¹⁸ Compound alpha in particular is administered in suspension at a dose of 15 mg/kg in artificially infected sheep¹¹ and the reported absorption rate constant (*k*_a) and delay in absorption denote a slow appearance of the compound in plasma. This could be explained by the drug’s low solubility or an association between the compound (4) and particulate matter of the gastrointestinal tract, which retards its rate of

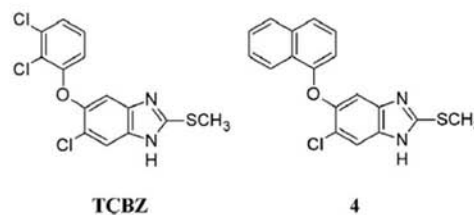


Figure 1. Structures of triclabendazole (TCBZ) and compound alpha (4).

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 52 87; fax: +52 55 56 22 53 29.
E-mail address: rafaelc@unam.mx (R. Castillo).

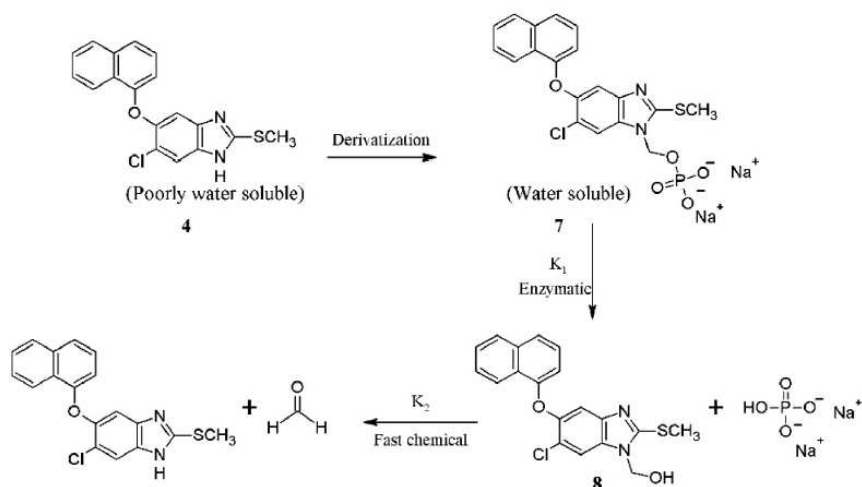


Figure 2. Illustration of the prodrug strategy utilized.

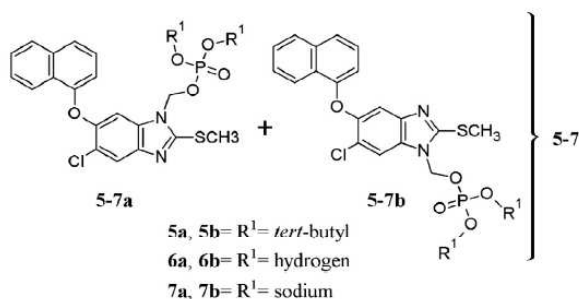


Figure 3. Mixture of regioisomers.

passage and prolongs the duration of absorption.^{19,20} No less important is the veterinary's comment about the convenience of administering compound alpha intramuscularly, rather than an oral suspension.

This poor water solubility continues to be a major obstacle in the use of other administration routes for compound alpha.²⁰ One approach to solve this issue would be to synthesize a hydro-soluble prodrug that when administered via intramuscular route would chemically or enzymatically regenerate compound alpha, also avoiding the first-pass effect and lowering the dose required and the time necessary for absorption.

The design of prodrugs is a widely used method to modify the physical and chemical properties of compounds such as the solubility.²¹ Here, the formation of a phosphate ester serves as a

Table 1
Aqueous solubility and chemical stability of prodrug 7

Compound	Aqueous solubility ^a (mg/mL) pH 7	Aqueous stability ^b (h) pH 7
7	13.0	>26
Compound alpha	2.6×10^{-4}	>26
TCBZ ^c	2.0×10^{-4}	>24

^a Determined at 25 °C.

^b >95% by UV-HPLC determined at room temperature.

^c Solubility of TCBZ reported in literature.³³

Table 2
Percentage of mortality of *F. hepatica* in vitro after treatment with compound 7

Compound and concentration (mg/L)	Efficacy (%)		
	24 h Mean ± SD	48 h Mean ± SD	72 h Mean ± SD
Compound 7 (50)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Compound 7 (10)	95.8 ± 0.1	95.8 ± 0.1	100.0 ± 0.1
TCBZ (50) ^a	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
TCBZ (10) ^a	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Control ^b	0.0	0.0	0.0

^a (TCBZ) triclabendazole (Fasinex[®]-Novartis) as a reference control.

^b Untreated control.

strategy for improving aqueous solubility of drugs intended for oral or parenteral administration.^{21–23} In the 1990s, Stella and co-workers developed a prodrug approach for derivatizing tertiary

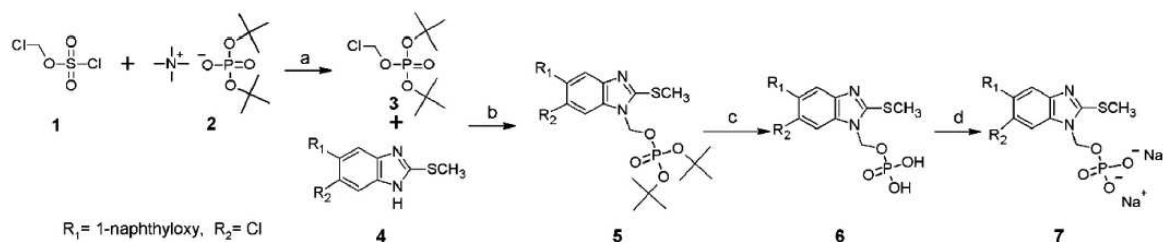
Scheme 1. General procedure for the synthesis of prodrug 7. Reagents and conditions: (a) NaHCO₃, *n*-Bu₄NHSO₄, CH₂Cl₂-H₂O, 0 °C to room temp; (b) NaH, DMF, room temp; (c) HCl 4 M in dioxane, room temp; (d) NaOH, MeOH/H₂O, room temp.

Table 3
Efficacy of compound 7 expressed as percentage of reduction of *F. hepatica* flukes and eggs in experimentally infected sheep

Group and route of administration (n = 6)	Dose ^a (mg/kg/bw)	Mean ± SD		Efficacy (%)	
		Egg reduction	Fluke reduction	Egg reduction	Fluke reduction
1 (Oral)	12	3.6 ± 1.5	12.3 ± 2.3	95.1	83.3
2 (Intramuscular)	4	35.7 ± 5.6	9.0 ± 1.2	44.9	87.8
3 (Subcutaneous)	4	23.0 ± 4.3	28.5 ± 3.4	65.8	61.4
4 (Control group)	Untreated	76.3 ± 8.9	74.0 ± 9.2	0	0

^a Body weight.

amines using a phosphonoxyethyl group as a promoiety.^{24,25} This was later extended to the derivatization of hydroxyl functions.²⁶ In this concept, the release of the parent drug involves a two-step process. Following an initial alkaline phosphatase hydrolytic dephosphorylation, the hydroxymethyl intermediate (**8**) obtained, spontaneously decomposes into the parent drug and formaldehyde (Fig. 2).^{27,28}

In the current study, we present the synthesis, water solubility, chemical stability, in vitro and in vivo evaluations of the novel prodrug (**7**), a phosphate salt present as a mixture of regioisomers **7a** and **7b** (this applies also for compounds **5** and **6** shown in Figure 3). Prodrug **7** was designed using a phosphonoxyethyl group as a moiety to increase solubility and bioavailability of the initial compound alpha, favoring a parenteral administration at a reduced dose.

Prodrug **7** was synthesized according to the synthetic pathway described in Scheme 1 from compound alpha (**4**), which was prepared by methods previously described by our research group.¹¹ The phosphate group was introduced using di-*tert*-butyl chloromethyl phosphate (**3**) prepared from chloromethyl chlorosulfate²⁸ (**1**) and tetramethylammonium di-*tert*-butyl hydrogen phosphate (**2**), an approach adapted from methods reported in the literature.²⁹ Tetramethylammonium di-*tert*-butyl hydrogen phosphate was synthesized using di-*tert*-butyl hydrogen phosphate, also an adapted method from those reported in the literature.³⁰

In the substitution reaction between **3** and **4**, a 1 to 1 mixture of regioisomers **5a** and **5b** was obtained. Compound (**4**) was treated with sodium hydride in DMF and then with **3** to give a 1 to 1 mixture of two regioisomers of **5**, resulting in the *N*-substituted product as intended. **5a** was successfully isolated and characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, H-C HSQC, H-H COSY and NOE-1D. In this step, the excess NaH was eliminated and the resinous product recovered was subjected to hydrolysis to obtain **6**. This was the limiting step in the synthesis of prodrug **7**, resulting in a 70% yield. The de-protection of the di-*tert*-butyl chloromethyl phosphate (**5**) was then accomplished under acidic conditions to afford the desired phosphates (**6**), which were finally converted into the corresponding disodium salt (**7**) by addition of sodium hydroxide.³¹ These transformations had no effect on the ratio of the two regioisomers. The structures of the new compounds were established from spectroscopic and spectrometric data.

The hydrosolubility of prodrug **7** was determined according to the procedure of Yalkowski et al.³² The aqueous solubility of compound alpha, determined as 2.6×10^{-4} mg/mL, was substantially increased in prodrug **7** with the introduction of the phosphonoxyethyl group, the latter with an observed solubility of 13.0 mg/mL at pH 7 (Table 1), demonstrating a 50,000 fold increase in the solubility of the precursor compound **4**. This result is consistent with previous reports that the prodrug design of compounds, such as **7**, is useful for increasing the aqueous solubility of non-polar drugs.^{21–26}

In formulating a prodrug, the compound should also demonstrate adequate chemical stability, especially in parenteral dosage forms. Compound **7** showed desired stability (>95% after 26 h) at

neutral pH, which is ideal for the formulation from a physiological standpoint of view.

Compound **7** was tested in vitro against recently excysted metacercariae.³⁴ It was evaluated at concentrations of 10 and 50 mg/L, see Table 2. At 50 mg/L and 24 h, compound **7** demonstrated a fasciolicidal efficacy of 100%, at a concentration of 10 mg/L this efficacy was 95.83% at 24 and 48 h, obtaining 100% efficacy until 72 hours post-treatment. These results compare with the drug of choice Triclabendazole (Fasinex[®], Novartis) as the reference control. However, the fasciolicidal activity of compound **7** in the in vitro tests at 10 mg/L suggests that the parasite does not express alkaline phosphatase that can release the active compound from the prodrug and that this is hydrolyzed chemically with time.

Compound **7** was evaluated in sheep against adult 10 week-old *F. hepatica* using three different routes of administration (Table 3). Results obtained show an efficacy of 87.8% at an intramuscular dose of 4 mg/kg (Table 3). In previous studies the fasciolicidal activity of compound alpha (**4**) was also determined, demonstrating an 86.9% efficacy against mature and juvenile fasciolas at an oral dose of 15 mg/kg.¹¹ It is evident then, that the fasciolicidal efficacy of prodrug **7**, at a lower dose via intramuscular injection, is comparable with respect to orally administered compound alpha (**4**), both demonstrating similar effects.

In summary, we have synthesized a new prodrug (**7**) as a phosphate disodium salt, which shows a 50,000 fold increase in aqueous solubility compared to its precursor compound alpha (**4**). Compound **7** was stable at neutral pH, ideal for parenteral formulation. Evaluations of compound **7** in vitro and in vivo showed fasciolicidal activity. The in vivo results prove that **7** offers a considerable reduction in dose administered compared to compound alpha (**4**) while achieving similar effects via parenteral administration.

Acknowledgments

This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) under the project IT201113. M. Flores-Ramos is very grateful to CONACyT for the fellowship granted (267703/223411). We are grateful to Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte and Margarita Guzmán for the analytical support offered. We also thank Anuar Flores-Gahona from Facultad de Química, UNAM, for the review and corrections of this paper. We acknowledge Lourdes Mayet her assistance in the solubility tests.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.017>.

References and notes

- Mas-Coma, S. J. *Helminthol.* **2005**, *79*, 207.
- Mas-Coma, S.; Valero, M. A.; Bargues, M. D. *Adv. Parasitol.* **2009**, *69*, 41.

3. Boray, J. C. *Disease of domestic animals caused by flukes*; Food and Agricultural Organization of the United Nations: Rome, 1994. 49 pp.
4. Fairweather, I.; Boray, J. C. *Vet. J.* **1999**, *158*, 81.
5. Alvarez-Sanchez, M.; Mainar-Jaime, R.; Pérez-García, J.; Rojo-Vázquez, F. *Vet. Rec.* **2006**, *159*, 424.
6. Moll, L.; Gaasenbeek, C. P.; Vellema, P.; Borgsteede, F. H. *Vet. Parasitol.* **2000**, *91*, 153.
7. Olaechea, F.; Lovera, V.; Larroza, M.; Raffo, F.; Cabrera, R. *Vet. Parasitol.* **2011**, *178*, 364.
8. Overend, D. J.; Bowen, F. L. *Aust. Vet. J.* **1995**, *72*, 275.
9. Wolstenholme, A. J.; Fairweather, I.; Prichard, R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N. C. *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 469.
10. Gordon, D.; Zadoks, R.; Skuce, P.; Sargison, N. *Vet. Rec.* **2012**, *171*, 159.
11. Hernández-Campos, A.; Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Rivera-Fernández, N.; Castillo, R. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 649.
12. Flores-Ramos, M.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Flores-Alamo, M. *Acta Crystallogr. Sect. E: Struct. Rep. Online* **2014**, *E70*, o77.
13. Ibarra Velarde, F.; Vera Montenegro, Y.; Hernández-Campos, A.; Castillo Bocanegra, R. *Vet. México* **1997**, *28*, 297.
14. Ibarra, F.; Vera, Y.; Quiroz, H.; Cantó, J.; Castillo, R.; Hernández, A.; Ochoa, P. *Vet. Parasitol.* **2004**, *120*, 65.
15. McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Parasitology* **2009**, *136*, 665.
16. McConville, M.; Hanna, R. E. B.; Brennan, G. P.; McCoy, M.; Edgar, H. W. J.; McConnell, S.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Parasitol. Res.* **2010**, *106*, 311.
17. Rivera, N.; Ibarra, F.; Zepeda, A.; Fortoul, T.; Cantó, G.; Hernández, A.; Castillo, R. *Parasitol. Res.* **2005**, *95*, 379.
18. Mckellar, Q. A.; Scott, E. W. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1990**, *13*, 223.
19. Hennessy, D. R. *Parasitol. Today* **1993**, *9*, 329.
20. Ramírez, N.; Mayet, L.; Del Rivero, L.; Ibarra-Velarde, F.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Jung-Cook, H. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, *32*, 154.
21. Krise, J. P.; Stella, V. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *19*, 287.
22. Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 677.
23. Stella, V.; Borchardt, R.; Hageman, M.; Oliyai, R.; Maag, H.; Tilley, J. *Prodrugs: Challenges and Rewards Part 1 & 2*; Springer: AAPS Press: New York, NY, 2007; p c2007. New York.
24. Krise, J. P.; Narisawa, S.; Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 922.
25. Krise, J. P.; Zygmunt, J.; Georg, G. I.; Stella, V. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3094.
26. Mäntylä, A.; Garnier, T.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Vepsäläinen, J.; Koskinen, A.; Croft, S. L.; Järvinen, T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 188.
27. Hecker, S. J.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328.
28. Chloromethyl chlorosulfate is commercially available from Sigma-Aldrich.
29. Mäntylä, A.; Vepsäläinen, J.; Järvinen, T.; Nevalainen, T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3793.
30. Zwierzak, A.; Kluba, M. *Tetrahedron* **1971**, *27*, 3163.
31. Disodium [5-chloro-2-(methylthio)-6-(naphthalen-1-yloxy)-1H-benzimidazol-1-yl]methyl phosphate (7a) and disodium [6-chloro-2-(methylthio)-5-(naphthalen-1-yloxy)-1H-benzimidazol-1-yl]methyl phosphate (7b). **6** (1 mmol), 5 mL de MeOH and 2 mL of DMF were cooled in an ice/salt/water bath and stirred vigorously for 10 min. A solution of NaOH (1 mmol) in 2 mL of deionized water was added dropwise to the resulting solution. Once the addition was complete, the reaction mixture was stirred vigorously for 45 min at room temperature. The solution was concentrated until dried under reduced pressure and the solid formed was filtered.
32. Yalkowsky, S. H.; Valvani, S. C.; Roseman, T. J. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 866.
33. Lecaillon, J. B.; Godbillon, J.; Campestrini, J.; Naquira, C.; Miranda, L.; Pacheco, R.; Mull, R.; Poltera, A. A. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *45*, 601.
34. Ibarra, O. F.; Jenkins, D. C. *Z. Parasitenkd* **1984**, *70*, 655.



Acta Crystallographica Section E

Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

5-Chloro-2-methylsulfanyl-6-(naphthalen-1-yloxy)-1*H*-benzimidazole methanol monosolvateMiguel Flores-Ramos,^a Rafael Castillo,^a Alicia Hernández-Campos^a and Marcos Flores-Alamo^{b*}^aFacultad de Química, Departamento de Farmacia, UNAM, México DF, 04510, Mexico, and ^bFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 04510, Mexico

Correspondence e-mail: mfa@unam.mx

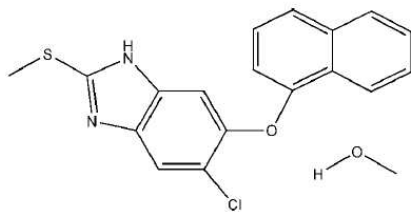
Received 6 December 2013; accepted 12 December 2013

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 298$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.004$ Å; R factor = 0.049; wR factor = 0.112; data-to-parameter ratio = 17.2.

In the title compound, $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$, the dihedral angle between the benzimidazole group and the naphthyloxy moiety [82.89 (5)°] very near to orthogonality. The H atom in the five-membered ring is disordered with equal occupancies at the two N atoms and the H atom of the methanolic hydroxy group is disordered with equal occupancies over two sites at the O atom. The methanol molecule acts as a hydrogen-bond acceptor for the amino H atom and donates a hydrogen bond to the nonprotonated ring N atom. As a result, chains are formed running along the a axis.

Related literature

For related literature on compound alpha, see: Rivera *et al.* (2004); Vera-Montenegro *et al.* (2003); Fairweather (2009); McConville *et al.* (2010). For the synthesis of compound alpha, see: Hernández *et al.* (2002).



Experimental

Crystal data

$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}\cdot\text{CH}_4\text{O}$
 $M_r = 372.85$
 Triclinic, $P\bar{1}$

$a = 7.4094$ (6) Å
 $b = 9.1941$ (8) Å
 $c = 14.4253$ (11) Å

$\alpha = 73.978$ (7)°
 $\beta = 75.315$ (7)°
 $\gamma = 75.136$ (7)°
 $V = 895.09$ (14) Å³
 $Z = 2$

Mo $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.35$ mm⁻¹
 $T = 298$ K
 $0.6 \times 0.56 \times 0.17$ mm

Data collection

Agilent Xcalibur (Atlas, Gemini) diffractometer
 Absorption correction: analytical (CrysAlis PRO; Agilent, 2012)
 $T_{\min} = 0.785$, $T_{\max} = 0.945$

6945 measured reflections
 4118 independent reflections
 2706 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{\text{int}} = 0.021$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.049$
 $wR(F^2) = 0.112$
 $S = 1.03$
 4118 reflections
 239 parameters

H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
 $\Delta\rho_{\max} = 0.22$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\min} = -0.27$ e Å⁻³

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
$\text{O2}-\text{H1O}\cdots\text{N2}$	0.94 (12)	1.87 (11)	2.768 (2)	158 (7)
$\text{O2}-\text{H2O}\cdots\text{N1}^{\text{i}}$	0.76 (11)	2.04 (11)	2.781 (3)	162 (9)
$\text{N1}-\text{H1N}\cdots\text{O2}^{\text{ii}}$	0.84 (8)	2.03 (8)	2.781 (3)	148 (7)
$\text{N2}-\text{H2N}\cdots\text{O2}$	0.80 (9)	1.99 (9)	2.768 (2)	164 (7)

Symmetry codes: (i) $x - 1, y, z$; (ii) $x + 1, y, z$.

Data collection: CrysAlis PRO (Agilent, 2012); cell refinement: CrysAlis PRO; data reduction: CrysAlis RED (Agilent, 2012); program(s) used to solve structure: SHELXS97 (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: SHELXL97 (Sheldrick, 2008); molecular graphics: Mercury (Macrae *et al.*, 2006); software used to prepare material for publication: WinGX (Farrugia, 2012).

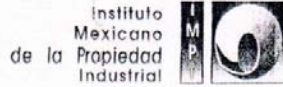
This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) with the project IT201113. MFA is indebted to Dr A. L. Maldonado-Hernández for useful comments.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: BT6948).

References

- Agilent (2012). CrysAlis PRO and CrysAlis RED. Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England.
 Fairweather, I. (2009). *J. Helminthol.* **83**, 139–150.
 Farrugia, L. J. (2012). *J. Appl. Cryst.* **45**, 849–854.
 Hernández, C. A., Ibarra, V. F., Vera, M. Y. F., Rivera, N. & Castillo, B. R. (2002). *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 649–652.
 Macrae, C. F., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Shields, G. P., Taylor, R., Towler, M. & van de Streek, J. (2006). *J. Appl. Cryst.* **39**, 453–457.
 McConville, M., Hanna, R. E. B., Brennan, G. P., McCoy, M., Edgar, H. W. J., McConell, S., Castillo, R., Hernández-Campos, A. & Fairweather, I. (2010). *Parasitol. Res.* **106**, 311–323.
 Rivera, N., Ibarra, I., Zepeda, A., Fortoul, T., Hernández, A., Castillo, R. & Cantó, G. (2004). *Parasitol. Res.* **93**, 283–286.
 Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
 Vera-Montenegro, Y., Ibarra-Velarde, F., Quiroz-Romero, H., Hernández-Campos, A. & Castillo, R. (2003). *Parasitol. Res.* **91**, 1–4.

Apéndice 3. Patente



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisiva de Patentes

Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI.

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud Expediente: MX/a/2014/014417
Fecha: 26/NOV/2014 Hora: 11:35:06
Folio: MX/E/2014/084525 310201

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

2) Nacionalidad (es): MEXICANA

3) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: 9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510.

Población, Estado y País: COYOACÁN, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO

4) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (clave): (55) 56 65 46 44

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA, MIGUEL ANGEL FLORES RAMOS, MARÍA ALICIA HERNÁNDEZ CAMPOS, OSVALDO FROYLÁN IBARRA VELARDE y REMEDIOS YOLANDA VERA MONTENEGRO.

7) Nacionalidad (es): MEXICANAS.

8) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: CALLE ETNA No. 20, COLONIA ALPES, C.P. 01010

Población, Estado y País: DELEGACIÓN ÁLVARO OBREGÓN, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO.

9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): MARTHA FIGUEROA PÉREZ 12) RGP-DDAJ-14782

13) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: 3ER. PISO DEL EDIFICIO "B", ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510

Población, Estado y País: COYOACÁN, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO. 14) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 15) Fax (clave): (55) 56 65 46 44

16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:
LIC. LAURA CORTÉS SÁNCHEZ, LIC. ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ y AL C. MIGUEL ÁNGEL NIEVES MARTÍNEZ.

17) Denominación o Título de la Invención:
"NUEVOS COMPUESTOS HIDROSOLUBLES DERIVADOS DEL BENCIMIDAZOL, ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE LA FASCIOLOSIS".

18) Fecha de divulgación previa: 10 Agosto 2014
Día Mes Año

19) Clasificación Internacional: uso exclusivo del IMPI

20) Divisiva de la solicitud: Numero Figura jurídica
Día Mes Año

21) Fecha de presentación: Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada: País Fecha de presentación No. de serie
Día Mes Año

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 5	Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 40	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
	Dibujo (s) en su caso	<input checked="" type="checkbox"/> 2	Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		50	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. A 24 DE NOVIEMBRE DE 2014
Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha