

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"SINTESIS DE UN COMPUESTO FILARICIDA DEL  
TIPO BENCIMIDAZOL-2-CARBAMATO DE METILO, UN  
PROFARMACO DEL MISMO Y LA DETERMINACION  
DE SUS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS  
DE INTERES FARMACEUTICO"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
**P R E S E N T A**  
**EDUARDO ALCANTARA PRIEGO**



MEXICO, D. F.,

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Dra. OFELIA ESPEJO GONZALEZ

**VOCAL:** Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

**SECRETARIO:** M. en C. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

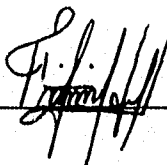
**1er SUPLENTE:** M. en C. SOFIA MARGARITA RODRIGUEZ ALVARADO

**2do. SUPLENTE:** Q. F. B. LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMIREZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:** LABORATORIO No. 122 y 113;  
CONJUNTO "E" DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA. FACULTAD DE  
QUIMICA, UNAM.

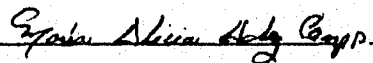
**ASESOR DE TESIS:**

M. en C. Francisco Hernández Luis



**SUPERVISOR TECNICO:**

M. en C. Maria Alicia Hernández Campos



**SUSTENTANTE:**

Eduardo Alcántara Priego



**"Gracias Dios por haber estado a mi lado desde el principio hasta el final de esta meta; no fue fácil, las dudas siempre se presentaron pero, gracias a usted Señor, por fin puedo decir ahora que: las vendas cayeron de mis ojos, las dudas se desvanecieron y una sensación de tranquila certidumbre ocupó su lugar"**.

**"En el ir y venir de las cosas he comprendido por fin porque Dios no juega a los dados, pero sin embargo, también aprendí que el destino mezcla las cartas y nosotros sólo jugamos"**.

**"La Ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso"**

## !EL RECONOCIMIENTO!

Si alguien me preguntase, ¿a quien le dedicas el máximo reconocimiento de los logros de tu vida?, yo le contesto sin pensarlo dos veces: a mis PADRES: Thelma Priego de Alcántara y G. René Alcántara Cárdenas, ya que a ellos les debo todo lo que soy. Papas: muchas gracias por su amor, comprensión, dedicación y el apoyo que me han brindado siempre durante toda mi vida; ahora, recibo de ustedes la herencia máxima que un hijo puede esperar; contar con una profesión. Los quiero mucho.

Dedico este trabajo a mis hermanos René y Fernando, para que pronto al igual que yo, puedan sentir la felicidad que implica el culminar todos los estudios de una vida en un examen profesional.

**"Estar preparado es importante, saber esperar  
lo es aún más, pero aprovechar el momento  
adecuado es la clave de la vida".**

### AGRADECIMIENTOS:

\* Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al M.en C. Francisco Hernández Luis quien confió en mí, desde un principio, para la realización de este proyecto, así como también por su paciencia y gran dedicación que ha mostrado siempre en la enseñanza de sus alumnos; profesor ¡muchas gracias!.

\* Agradesco también, en forma muy especial, al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por el apoyo académico, la orientación y la motivación que me brindó, ya que para mí fueron muy importantes en la culminación de este proyecto.

\* Agradesco también, a la M.en C Inés Fuentes Noriega por su asesoría académica y el haberme proporcionado las instalaciones, material y equipo necesarios para la realización de toda la parte analítica de este proyecto.

\* Gracias a los M.en C. María Alicia Hernández Campos, Alfonso Lira Rocha, y Daniel Chavez Velásco por su ayuda, sus consejos y sugerencias que me aportaron durante la realización de este proyecto.

**\* Es importante resaltar lo mucho que le agradezco a la FAMILIA Q. F.B. 90 :**

A Marisa, por todo el cariño tan sincero que me ha brindado; Lino y Saúl, por la amistad que nos mantiene juntos; Sergio, por su amistad y valiosa ayuda que siempre me ha proporcionado; Aída, Elizabeth, Olga y Fa por seguir siendo mis grandes amigas; Adrián, Alfredo, Samuel, Zenón, J.Luis, Alejandro, Francisco, Lidia, Tere, Nancy, Nelly, Ana, Cinthia y Verónica, porque en cualquier lugar siempre aprecio de su gran compañía.

**\* A mis primos Horacio Camargo Priego y Alejandro Mercado Priego a los cuales estimo mucho.**

**\* A mis amigos de la infancia: Felipe, Benjamín, Ricardo y Alejandro.**

....Y a todos mis amigos y compañeros del Edificio "E" que día a día me hicieron muy agradable mi estancia en el Laboratorio No.122.

**IA TODOS SINCERAMENTE, MUCHAS GRACIAS!  
SU AMIGO DE SIEMPRE :**

**EDUARDO ALCANTARA PRIEGO.**

## INDICE

RESUMEN.....	i
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. GENERALIDADES.....	6
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	16
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSION DE RESULTADOS.....	30
7. CONCLUSIONES.....	34
8. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
8.1 Instrumentación.....	37
8.2 Cromatografía en capa fina.....	38
8.3 Sistemas de elución.....	38
8.4 Acido 4-acetamidobenzoico (I).....	38
8.5 Acido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (II).....	39
8.6 Acido 4-amino-3-nitrobenzoico (III).....	40
8.7 Acido 3,4-diaminobenzoico (IV).....	41
8.8 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (V).....	42
8.9 Sal sódica del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VI).....	43
8.10 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1-H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VII).....	44
8.11 Técnica para determinar los valores de pKa de (V).....	45
8.12 Técnica seguida para obtener la curva de solubilidad de (V).....	47
8.13 Técnica seguida para la determinación del coeficiente de partición de (V).....	49



<b>8.14 Técnica seguida para la determinación del coeficiente de partición de (VII).....</b>	<b>52</b>
<b>8.15 Técnica seguida para la determinación de la solubilidad acuosa a pH=2 de (VII).....</b>	<b>55</b>
<b>9. ESPECTROS.....</b>	<b>58</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>74</b>
<b>I. APENDICE.....</b>	<b>77</b>

## RESUMEN

En esta tesis se describe la síntesis de un compuesto filaricida, el 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V), la determinación de sus propiedades fisicoquímicas de interés farmacéutico, así como el diseño y la síntesis de un profármaco potencial del mismo, el 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VII). El diseño del profármaco consideró dos posibles formas de bioactivación, para la liberación del principio activo (V): la primera sería por la acción de las esterasas no específicas y la segunda podría llevarse a cabo por la acción de nitro reductasas. Los compuestos preparados (I-V y VII) se identificaron por sus datos espectroscópicos de IR y RMN, los cuales fueron concordantes con las estructuras esperadas y las propiedades fisicoquímicas fueron determinadas por métodos espectrofotométricos.

## ABSTRACT

In this thesis is described the synthesis of an antifilarial compound, methyl 5-carboxy-1H-benzimidazole-2-carbamate (V), the determination of its physicochemical properties of pharmaceutical interest, as well as the design and synthesis of the potential prodrug methyl 5-(4-nitrobenzyloxycarbonyl)-1H-benzimidazole-2-carbamate (VII). The desing of this prodrug considered two possible forms of bioactivation, for the drug liberation (V): the first would be by the action of a non specific esterases and the second could take place by the action of nitroreductases. The compounds synthesized (I-V and VII) were identified by IR and NMR spectroscopy and all structures are in agreement with the spectroscopic data. The physicochemical properties were estimated by spectrophotometric techniques.

## 1. INTRODUCCION

De las seis enfermedades tropicales más importantes que padece el mundo entero (filariasis, schistosomiasis, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis y lepra) reconocidas por la Organización Mundial de la Salud como las principales causas de morbilidad y mortalidad ( y un pobre crecimiento socio-económico en el trópico) la filariasis es sin duda alguna, el padecimiento más debilitante y diseminado que aqueja al ser humano, encontrándose que las enfermedades provocadas por las filarias representan un gran problema de salud mundial que afecta a más de 250 millones de personas en el mundo.<sup>5</sup>

Entre las filarias que afectan seriamente al hombre se encuentran: *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Loa loa*, las cuales son responsables de una serie de padecimientos y manifestaciones clínicas como son: prurito, endurecimiento y fibrosis nodulares en la piel, linfangitis, linfadenitis, elefantiasis y ceguera, por lo que las consecuencias de la infección por cualquiera de estos parásitos pueden resultar física y económicamente devastadores.<sup>6</sup>

La filariasis es transmitida al hombre por una gran variedad de artrópodos hematófagos, principalmente por mosquitos y moscas del género *Simulium* y *Chrysops*, los cuales introducen gran cantidad de larvas infectantes en la circulación sistémica mientras se alimentan de la sangre humana. El ciclo vital de estos parásitos se lleva a cabo en dos huéspedes: en el hombre (huésped definitivo) y en los artrópodos vectores (huéspedes intermedios).<sup>6</sup>

En el caso de las infecciones por *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*, éstas se localizan principalmente en Asia, Africa y Sudamérica. *Loa loa* se distribuye a través de las zonas selváticas del oeste y centro de Africa.<sup>1</sup>

Por lo que respecta a la oncocercosis, este es un padecimiento inicialmente encontrado en Africa, de donde pasó a otros países, como México y Guatemala,

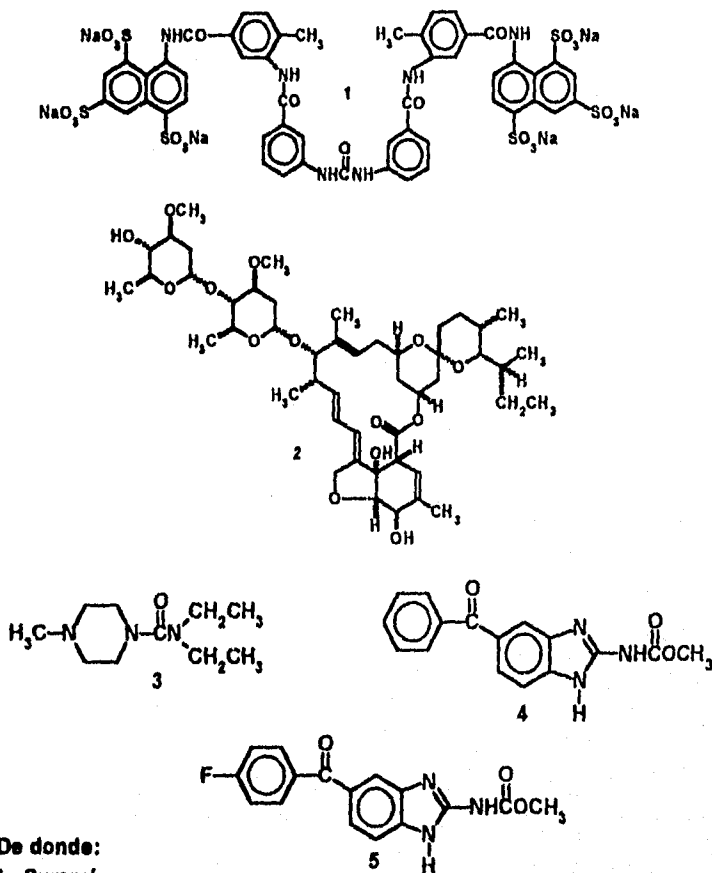
entre otros, lograndose establecer endémicamente en algunas regiones cuyas condiciones ecológicas y de sanidad así lo favorecieron.

En la República Mexicana, los dos estados oncocercosos son: Oaxaca y Chiapas, siendo las zonas más endémicas la región Chamula, el Soconusco y la sierra de Iztlán.<sup>1</sup>

Hasta ahora, el tratamiento contra la filariasis ha sido difícil, ya que los recursos farmacológicos con los que se cuentan para combatir estas infecciones son muy limitados y varios de los fármacos que han sido eficaces contra estos nemátodos, ocasionan serios efectos secundarios en el paciente tratado, por lo que se ha optado por discontinuar su uso. Tal es el caso de los organoantimoniales, los organoarsenicales y los organofosforados, que aunque resultaron ser efectivos contra las microfilarias (fase larvaria) y algunas macrofilarias (filarias adultas), sus efectos colaterales como, disturbios gastrointestinales, fiebre, encefalopatías, erupciones en la piel y hepatotoxicidad, dieron lugar a su abandono como agentes filaricidas. Entre los fármacos filaricidas que hasta la fecha se utilizan, tenemos al suramin, la dietilcarbamazina, la ivermectina y los bencimidazoles-2 carbamatos de metilo<sup>6</sup> (figura 1).

El primero de estos, aunque muestra actividad contra los nemátodos hembra de *Onchocerca volvulus* y en algunos casos ha mostrado actividad macrofilaricida, sus efectos secundarios (fiebre, neuropatías, fotofobia entre otras) y la necesidad de dosificarlo por vía intravenosa bajo supervisión médica, por largos periodos, ha limitado su uso en el presente.<sup>6,8</sup> La dietilcarbamazina se convirtió, después de su descubrimiento en 1947, en uno de los fármacos de uso común para el tratamiento de las filariasis humanas debido a su actividad principalmente microfilaricida (actividad letal sobre microfilarias), contra filariasis linfáticas y la loasis. Sin embargo, produce irritación intestinal, náusea, vómito, y en el caso de ser utilizado para el tratamiento de la oncocercosis, ha dado lugar a violentas "reacciones de Mazzotti" (reacción alérgica intensa ocasionada por la destrucción de las microfilarias al utilizar un agente microfilaricida) en las

primeras horas después de su primera administración.<sup>6,8</sup> Por otro lado, la ivermectina se ha convertido en el fármaco de elección en los últimos tiempos, es muy segura en el tratamiento de las filarías linfáticas en humanos, y principalmente en oncocercosis.<sup>6</sup>



- De donde:  
 1.- Suramin  
 2.- Ivermectina  
 3.- Diethylcarbamazina  
 4.- Mebendazol  
 5.- Flubendazol

FIGURA (1) FARMACOS MAS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS FILARIASIS

Esta lactona macrocíclica se puede utilizar en tratamientos más largos en donde la "reacción de Mazzotti" se presentará con menor intensidad; y es más segura y activa que la dietilcarbamazina. Pero, aunque la Ivermectina se ha utilizado satisfactoriamente como fármaco microfilaricida, muy pocos fármacos han mostrado una efectividad real contra los nematodos adultos (efecto macrofilaricida). Es por esto, que la necesidad de encontrar nuevos fármacos poco tóxicos y con actividad macrofilaricida es de carácter urgente.<sup>5</sup>

Recientemente se encontró que nuevos compuestos del tipo bencimidazol-2-carbamato de metilo demostraron ser macrofilaricidas efectivos cuando se administraron por vía subcutánea en animales de laboratorio; tal es el caso del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (V) y algunos 5-(alquil-oxi-carbonil)-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo.<sup>4</sup> Por lo que respecta al primero, presenta el inconveniente de que cuando se administra por vía oral, la actividad filaricida es nula,<sup>4</sup> y en el caso de los segundos, sus estudios sobre actividad oral no se han reportado. Es por esto que resulta interesante, desde el punto de vista químico farmacéutico, solucionar el problema de la escasa actividad oral que presenta el 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (V), con el propósito de incrementar su eficiencia<sup>22</sup> como fármaco filaricida.

Se sabe que la principal actividad filaricida de esta clase de compuestos se ve relacionada por su acción antimitótica selectiva, ya que interfieren en la embriogénesis de *Onchocerca volvulus* y además, probablemente no causarían una "reacción de Mazzotti" inmediata. Estos compuestos se unen preferentemente a la tubulina del parásito que a la de los mamíferos, interfiriendo en la polimerización de los microtúbulos durante la mitosis celular. La especificidad de los bencimidazoles-2-carbamatos por las diferentes filarias depende de su unión pseudo-irreversible, probablemente a un tipo particular de  $\beta$  tubulina.<sup>5,9</sup>

## 2. OBJETIVOS

### Objetivos Generales:

1. Sintetizar el compuesto filaricida 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (V).
2. Obtener la sal sódica del compuesto anterior (VI), con el fin de determinar sus propiedades fisicoquímicas de interés farmacéutico.
3. Sintetizar un profármaco del compuesto anterior, el 5-(4-nitrobencil-oxi-carbonil)-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VII), con el fin de modificar temporalmente su lipofilicidad de este principio activo tendientes a convertirlo en un nuevo filaricida potencial.

### Objetivos Particulares:

1. Sintetizar las materias primas precursoras del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (V).
2. Estimar la pureza de las materias primas y los productos finales por cromatografía en capa fina y puntos de fusión.
3. Realizar la elucidación estructural de los compuestos sintetizados por métodos espectroscópicos de IR y de RMN.
4. Determinar los valores de pKa, coeficiente de partición octanol/agua y obtener la curva de solubilidad del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (V) vs pH.
5. Determinar el coeficiente de partición octanol/agua y la solubilidad acuosa del profármaco (VII).

### 3. GENERALIDADES

#### 3.1- LA FILARIASIS

La filariasis es una infección helmíntica causada por una variedad de nemátodos delgados y filamentosos los cuales invaden la circulación sistémica, vasos linfáticos, nódulos linfáticos, tejido conectivo y subcutáneo, cavidad peritoneal y otras partes del cuerpo humano y de animales vertebrados.<sup>4,5</sup>

Las filarias (superfamilia Filarioidea) viven en su etapa adulta en los tejidos y las cavidades del cuerpo de huéspedes vertebrados. Las hembras producen huevos parcialmente embrionados, los cuales un poco antes o al momento de la oviposición contienen embriones que se estiran y se transforman en organismos delicados con apariencia de serpientes, y son denominados microfilarias. Si la membrana del huevo se alarga para acomodarse al embrión estirado, se dice que éste está "envainado"; en el caso de que la cápsula se rompa y deje en libertad a un embrión desnudo, se dice que éste es del tipo "sin vaina". Cuando las microfilarias circulan en la sangre periférica o en los tejidos cutáneos, son ingeridas por artrópodos hematófagos. En los artrópodos infectados las microfilarias abandonan el aparato digestivo y se depositan en el hemocele, para posteriormente sufrir metamorfosis, transformándose en larvas del primer estadio y más tarde en estadios larvarios más avanzados. Las larvas maduras migran del hemocele hasta el labio, de donde escapan hacia la piel del huésped vertebrado cuando el artrópodo se alimenta de su sangre, dando lugar a la incorporación de las larvas infectantes en la circulación sistémica y luego en los tejidos, lo que trae como consecuencia el desarrollo de la enfermedad.<sup>2</sup>



### 3.1.1-. Descripción de las especies más patógenas en el ser humano.

- Onchocerca volvulus: La oncocercosis es una enfermedad que se observa principalmente en África y en la parte central de América. Esta filariasis es causada por un nemátodo con cuerpo cilíndrico, blanco opalescente muy delgado; la hembra mide de 50 a 60 cm, el macho mide menos de 4 cm, la fase primaria de desarrollo es la microfilaria, la cual se encuentra circulando en los líquidos tisulares y en la sangre. El artrópodo transmisor pertenece al género Simulium, el cual al picar y succionar sangre ingiere microfilarias y una vez dentro de estos moscos, evolucionan convirtiéndose en larvas infectantes las cuales migran hacia la cabeza, y una vez ahí, cuando el mosquito pica nuevamente, inocular la forma infectante, la cual se deposita en el tejido celular subcutáneo en donde evoluciona a adultos.<sup>1</sup>

El primer mecanismo de daño de la oncocercosis, se debe a una inflamación alrededor de los tejidos donde se encuentran los adultos dando lugar a un proceso fibrótico a todo su alrededor, quedando aislados, a esto se denomina oncocercoma porque puede apreciarse como una nodulación que sobresale en la superficie de la piel; el daño fundamental con algunas situaciones dramáticas son producidas por las microfilarias, al migrar por todos los tejidos, en donde producen una estimulación del sistema de defensa con una respuesta de tipo inflamatorio, además de que se pueden observar en el ojo donde producen el daño más severo a nivel corneal denominado "queratitis puntata", en la que se opacifican zonas completas de la córnea obstaculizándose el paso de la luz, quedando el individuo ciego. Clínicamente se presentan cuadros como erisipela de la costa, mal morado, etapa de facies leonina y daño ocular con ceguera. Existe un fenómeno alérgico en los individuos con oncocercosis ocasionado por la destrucción de las microfilarias cuando se utiliza un agente microfilaricida como la dietilcarbamazina, en donde el paciente tratado puede presentar cefalea, edema de párpados y miembros, así como una erupción pruriginosa que incluso puede obligar a la suspensión

transitoria del tratamiento, pero puede controlarse con analgésicos (aspirina), antihistamínicos o corticosteroides. Esta reacción alérgica intensa recibe el nombre de "reacción de Mazzotti". El tratamiento tiene dos aspectos: uno quirúrgico y uno quimioterapéutico. El quirúrgico consiste en quitar todos los nódulos, ya que ahí es donde están los adultos los cuales producen microfilarias que se liberan a la circulación sistémica. El tratamiento quimioterapéutico es a base de microfilaricidas, como la dietilcarbamazine (a dosis bajas que se incrementan poco a poco), la Ivermectina y el suramin.<sup>1,2</sup>

- Wuchereria bancrofti: Este parásito es transmitido por diferentes mosquitos entre los que figuran: *Culex quinquefascians* y *Aedes polynesiensis*, el primero es un mosquito de hábitos nocturnos domésticos y de predominio urbano, en cambio el segundo es diurno, silvestre y no doméstico. De las filerías adultas, la hembra mide de 80 a 100 mm de longitud por 0.2 a 0.3 mm de grosor, el macho es mucho menor y mide 40 mm por 0.1 mm. Los adultos se localizan en los vasos linfáticos, con mayor frecuencia en las extremidades inferiores, a nivel inguinal, del epidídimo y genitales externos femeninos. La presencia de los adultos en los vasos linfáticos ocasiona obstrucción que se agrava con la respuesta inflamatoria intensa, de tipo granulomatosa; todo esto genera linfangitis y cuando el fenómeno se repite en varias ocasiones, aparecen áreas de fibrosis y finalmente obstrucción definitiva del vaso linfático afectado, dando lugar a un aumento de volumen, cambios en la piel y endurecimiento del tejido celular subcutáneo, padecimiento que se conoce como elefantiasis, y afecta con mayor frecuencia las extremidades inferiores y los genitales, con lesiones deformantes que además del cambio estético repercuten en su funcionalidad. El tratamiento se ha establecido a base de suramin y de dietilcarbamazina.<sup>1,2</sup>
- Brugia malayi: Esta fileriosis se encuentra en el subcontinente Asiático, es transmitido por mosquitos del género *Anopheles* y *Mansonia*, se produce un

mayor número de casos en las áreas rurales. Las filarias adultas miden 50 mm por 150 micras en el caso de las hembras y 15 a 20 mm por 60 a 80 micras los machos. Clínicamente la bruyiasis ocasiona un síndrome de eosinofilia tropical, también aparecen datos de tipo alérgico como asma bronquial y adenopatías inespecíficas, que son ocasionados por sensibilización en infecciones previas con migración de filarias, excepcionalmente se presenta lesión en el linfático y con ello linfadenopatía, linfadenitis y elefantiasis. El tratamiento se basa únicamente en la administración de dietilcarbamazina.<sup>1,2</sup>

- **Loa loa**: La loasis o hinchazón de Calabar, se localiza en la parte central de Africa y es transmitida por *Chrysops*, moscas que evitan la luz brillante y se encuentran en áreas selváticas y pantanosas. Los adultos tienen una longitud de 7 cms para la hembra y de 3 cms para el macho. Una vez infectado, el hombre cursa un largo periodo de incubación, en el que las filarias viven en el tejido conectivo o en tejido celular subcutáneo y mucosas; las manifestaciones clínicas se caracterizan por la aparición de pápulas en la piel, edemas, zonas dolorosas, hiperémicas e hipertérmicas en la piel y los clásicos edemas faciales y del cuero cabelludo, conocidos como edemas de Calabar. El tratamiento se basa en la administración de suramín y de dietilcarbamazina.<sup>1,2</sup>

### **3.1.2.- Mecanismo de acción y relación estructura-actividad de los bencimidazoles como compuestos antiparasitarios.**

Los bencimidazoles se han caracterizado por ser alternativas quimioterapéuticas para tratar las helmintiasis en general.<sup>8</sup> Aunque su acción antiparasitaria puede ser asociada por el agotamiento del glucógeno y reducción en el transporte de glucosa, hay evidencias suficientes que indican que el principal mecanismo de acción antiparasitaria radica en la interferencia de la formación de los microtúbulos ya que alteran la estructura y velocidad de

síntesis de la tubulina.<sup>8</sup> La tubulina es una proteína globular presente en el citoesqueleto de todas las células vivientes, son importantes en la formación de los microtúbulos, los cuales controlan varias funciones celulares como: movimiento citoplasmático, división celular y transporte exoplásmico. Un deterioro selectivo en la integridad microtubular causa varias anomalías en la función celular incluyendo la muerte del parásito. Algunos bencimidazoles -2-carbamato, deben su acción antihelmíntica a la unión selectiva con la tubulina del parásito interfiriendo en la polimerización de los microtúbulos.<sup>6,9</sup>

En lo que se refiere a la relación estructura-actividad de los bencimidazoles, existen 4 sitios susceptibles de modificación de estos compuestos<sup>5</sup> (figura 2).

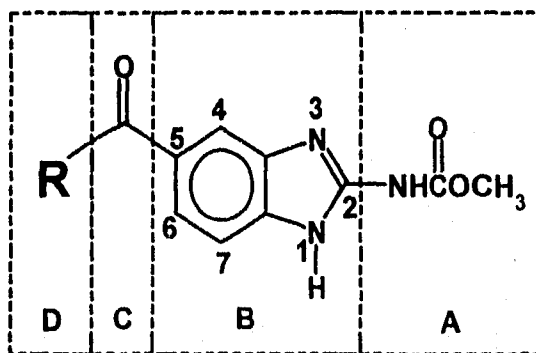


FIGURA (2) SITIOS DE POSIBLES MODIFICACIONES MOLECULARES EN LOS BENCIMIDAZOLES

- Sitio A: Estudios realizados en los cuales se llevaron a cabo modificaciones sobre este grupo demostraron que la presencia de una función carbamato de metilo en la posición 2 es esencial para la actividad filaricida. Esto se hace evidente cuando se reemplaza este grupo por otros como el acetilamino ó grupos alcoxi-carbonil-ilo, que dan como consecuencia la disminución de la actividad filaricida.<sup>4,5</sup>
- Sitio B: Científicos de Ciba-Geigy encontraron que es necesaria la presencia de un anillo de cinco miembros fusionado al anillo de benceno para retener

la actividad antihelmíntica, esto lo comprobaron al sustituir el anillo imidazol por otros grupos como N-carboximetoxiguanidina ó N-butiltioamida teniendo como resultado la retención de la actividad antiparasitaria, pero se dieron cuenta, que la inserción de un heteroátomo como nitrógeno en al anillo de benceno trae como consecuencia la pérdida de la actividad filaricida.<sup>4,6</sup>

- Sitio C: Estudios realizados sobre este sitio indican que la introducción de varios sustituyentes en la posición 5, no necesariamente incrementan el potencial antihelmíntico. Cuando el sustituyente aquí, es un grupo que evita la inactivación metabólica, como la hidroxilación enzimática, el compuesto presenta gran actividad antihelmíntica. Se ha encontrado que la reducción completa del grupo ceto en la posición 5 (hasta metileno), disminuye la actividad filaricida en estos compuestos y la reducción a la función alcohol no afecta significativamente su actividad.<sup>4,5,11</sup>
- Sitio D: Estudios realizados por Janssen Farmacéutica establecieron que la inserción de grupos como alquil, cicloalquil, fenil, fenil sustituido o heteroaril (piridil, tienil, furanil, etc.) en la posición 5 de los bencimidazoles-2-carbamatos a través de un puente carbonilo, generalmente retiene la actividad antihelmíntica, y que la sustitución de un grupo alquilo por un alcoxi en esta posición, tiende a incrementar su actividad; además descubrieron que la incorporación de grupos que le confieren rigidez a este sitio tienden a abatir la actividad filaricida. Esto indica que la actividad antihelmíntica requiere que el sustituyente unido en la posición 5 a través de un puente carbonilo tenga facilidad de rotación, porque se creó que la libertad de movimiento a través de esta posición ayuda a la molécula a asumir la conformación más favorable a medida que se aproxima al sitio receptor.<sup>4,5</sup>

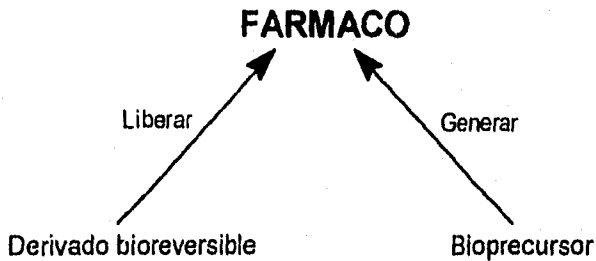
**3.2.- LOS PROFARMACOS:**

Un profármaco es un derivado farmacológicamente inactivo de un principio activo que requiere de una transformación espontánea o enzimática, dentro del organismo, para poder liberar al fármaco, y que sea este último quien ejerza la acción terapéutica. Se han usado otras denominaciones para este mismo concepto, como son: fármacos latenciados, derivados bioreversibles,<sup>18-20</sup> congéneres y "caballos de troya moleculares",<sup>11</sup> aunque el término profármaco es el más utilizado en la bibliografía.<sup>18-20</sup>

Por la forma en como están estructuralmente constituidos, los profármacos se han dividido en derivados bioreversibles y bioprecusores.<sup>18</sup>

**Tabla 1. Diferencias entre un derivado bioreversible y un bioprecursor.**

Característica	Derivado bioreversible	Bioprecursor
Constitución	Principio activo + progrupo	No tiene progrupo
Lipofilia	Fuertemente modificada	Ligéramente modificada
Bioactivación	Hidrolítica, reductiva y oxidativa	Oxidativa o reductiva
Catálisis	Química ó enzimática	Solamente enzimática



- **Bioprecusores:** Son aquellos compuestos que formalmente no presentan la estructura del principio activo pero una vez dentro del organismo, lo generan mediante reacciones de reducción u oxidación.
- **Derivados bioreversibles:** Son aquellos compuestos que presentan la estructura del principio activo, al cual se le ha adicionado una porción estructural, denominada progrupo, que modificará temporalmente las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Este tipo de compuestos liberaran al principio activo mediante reacciones de hidrólisis, oxidaciones o reducciones.

### 3.2.1-. Estrategias en el diseño de profármacos.

El diseño de profármacos está ubicado en el área de investigación relacionada con los procesos de optimización para la liberación de fármacos.<sup>17</sup>

Los criterios operativos que deben de tomarse en cuenta en la elaboración de profármacos son:<sup>17</sup>

- a) Identificar el problema de liberación del fármaco
- b) Identificar las propiedades fisicoquímicas requeridas para la eficiencia y liberación óptima del fármaco.
- c) Planear las modificaciones estructurales del fármaco que sean necesarias para reducir o eliminar el efecto indeseable en particular. El cambio químico propuesto modificará las propiedades fisicoquímicas del fármaco con lo cual se afectará su absorción, distribución y metabolismo enzimático.
- d) Ponderar las condiciones que son disponibles "in vivo" (enzimas, pH, etc.) para generar o liberar al fármaco del profármaco después de que este último ha sido administrado. Esta bioconversión del profármaco se lleva a cabo mediante la intervención de enzimas hidrolíticas, reductasas u oxidasas, o por reacciones intramoleculares de ciclación.

## GENERALIDADES

e) Proponer estructuras de profármacos en los cuales se espere que el compuesto diseñado será inactivo o menos activo biológicamente que el fármaco de origen.

f) Seleccionar el o los derivados propuestos que tengan las propiedades físicas y químicas adecuadas y que puedan ser potencialmente biotransformados en el compartimento biológico deseado para llevar a cabo su síntesis química, la cual es deseable que se lleve a cabo en pocos pasos.

- Derivados bioreversibles.

Para la elaboración de los derivados bioreversibles se deben de tomar en cuenta los siguientes lineamientos adicionales:<sup>11,17</sup>

a) La unión entre el fármaco y el progrupo es generalmente un enlace covalente.

b) La unión entre el fármaco y el progrupo debe ser rota "in vivo".

c) La liberación del fármaco debe ser cinéticamente rápida para asegurar niveles efectivos del principio activo en los sitios de acción, y/o minimizar el metabolismo del profármaco como tal, o la gradual inactivación del fármaco mismo.

d) Evitar el uso de progrupos que presenten alto riesgo de toxicidad para el organismo expuesto.

- Bioprecusores.

Para la elaboración de bioprecusores se tendrá en cuenta, adicionalmente a los lineamientos generales, lo siguiente:

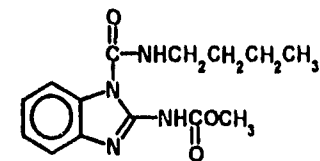
a) La generación del fármaco debe llevarse a cabo mediante una reacción de reducción u oxidación.

b) El bioprecursor diseñado debe presentar mejores características de solubilidad en agua y en disolventes orgánicos polares que el principio activo.

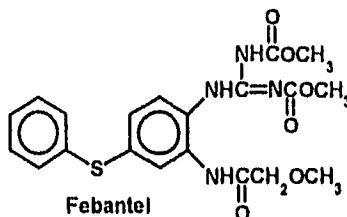


c) Debe existir en el bioprecursor algún grupo funcional susceptible a sufrir la reacción de reducción u oxidación de forma favorable en condiciones biológicas.

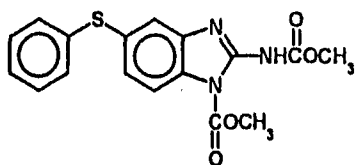
En el campo de la investigación de los bencimidazoles antiparasitarios, se ha utilizado el diseño de los profármacos para tratar de incrementar la solubilidad acuosa de estos principios activos. Los profármacos reportados y actualmente investigados en medicina veterinaria son<sup>21</sup>:



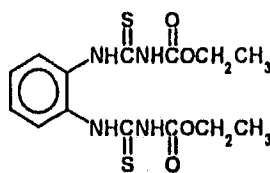
**Benomyl**  
(derivado bioreversible)



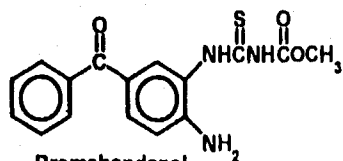
**Febantel**  
(bioprecursor)



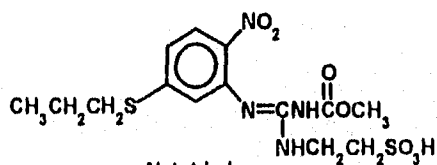
**Metoxicarbonil fenbendazol**  
(derivado bioreversible)



**Tiofanato**  
(bioprecursor)



**Promebendazol**  
(bioprecursor)



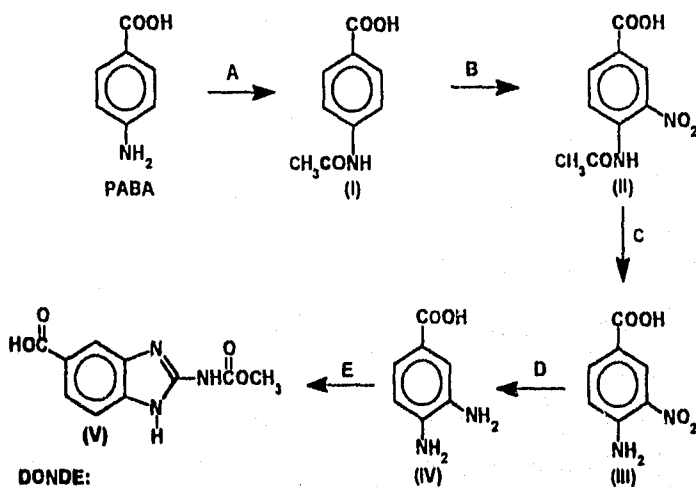
**Netobimín**  
(bioprecursor)

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Para obtener los compuestos propuestos en esta tesis, se llevaron a cabo varias reacciones que se describen a continuación:

#### 4.1. Síntesis del compuesto filaricida 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-Il carbamato de metilo (V).

Con el fin de obtener el compuesto filaricida (V) se siguieron los pasos mostrados en el esquema No. 1. La síntesis se llevó a cabo partiendo del ácido p-amino benzoico (PABA Sigma), como materia prima.



DONDE:

A =  $\text{CH}_3\text{COCCH}_3 / \text{CH}_3\text{COCH}_3$

B =  $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$ , 0 a 10°C

C =  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 70°C, 6Hrs.

D =  $\text{H}_2$ : C/Pd al 5%

E =  $(\text{CH}_3\text{C}(\text{NH})_2\text{SO}_2, \text{ClCOOCH}_3$ , pH= 7 a 8, 92°C, 4Hrs.

ESQUEMA NO. 1.

4.1.1. Preparación del ácido 4-acetamidobenzoico (I).

Se partió del ácido p-aminobenzoico (Sigma), el cual se hizo reaccionar con anhídrido acético (Mallinckrodt) en acetona anhidra (Merck) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno, produciéndose el ácido 4-acetamidobenzoico (I) con un 84.2% de rendimiento. El producto presentó un punto de fusión de 260 °C (Lit.<sup>16</sup> 259-262 °C).

4.1.2. Preparación del ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (II).

Se hizo reaccionar el ácido 4-acetamidobenzoico (I) con una mezcla sulfonítrica compuesta de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados, a una temperatura de 3 a 10 °C bajo agitación constante. Se produjo un sólido amarillo mostaza en un 60.55% de rendimiento, el cual correspondió al ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (II). El punto de fusión, para este compuesto fue de 214-218°C.

4.1.3. Preparación del ácido 4-amino-3-nitrobenzoico (III).

Se procedió a hidrolizar el ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (II) con ácido sulfúrico concentrado a 70 °C y agitación constante durante 6 hr. Se obtuvo un polvo amarillo claro correspondiente al ácido 4-amino-3-nitrobenzoico (III) con un rendimiento del 89.51%, el cual presentó un punto de fusión de 237-240 °C.

4.1.4. Preparación del ácido 3,4-diaminobenzoico (IV).

Se sometieron a hidrogenación catalítica el ácido 4-amino-3-nitrobenzoico (III) con polvo de carbón activado-paladio al 5% en metanol anhidro y ácido clorhídrico concentrado, en un frasco reactor el cual se colocó en un equipo hidrogenador Parr y se llenó 6 veces a 60 lbs/plg<sup>2</sup> de presión con hidrógeno. Se

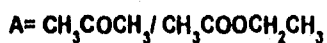
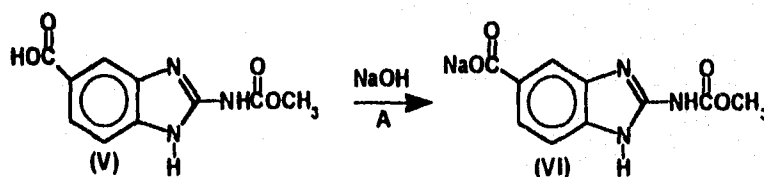
obtuvo un polvo rosa fuerte que corresponde al clorhidrato del ácido 3,4-diamino benzoico (IV) con un rendimiento del 91.58%. La inestabilidad de esta sal diaminada no permitió la determinación de su punto de fusión ni de su R.f.

#### 4.1.5. Preparación del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V).

Una solución acuosa de sulfato de 2-metil-2-tiopseudourea se hizo reaccionar con cloroformiato de metilo bajo agitación constante, manteniendo la temperatura por debajo de los 15 °C y el pH entre 7-8 (adicionando NaOH al 25% a través de un embudo de adición) de donde se obtuvo un sólido blanco esponjoso, el cual en la misma mezcla de reacción, se hizo reaccionar con el clorhidrato del ácido 3,4-diaminobenzoico (IV) y agua. Luego, se llevó la mezcla de reacción a pH de 5 y se mantuvo a reflujo en baño de aceite a 92 °C, bajo agitación constante y en atmósfera de nitrógeno durante 4 hrs. Se obtuvo un polvo café-crema, que se agitó con metanol por una hora, obteniéndose finalmente el 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V) con un rendimiento del 85.1%, el cual presentó un punto de fusión de 305 °C.

#### 4.2. Preparación de la sal sódica del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VI).

Con el fin de obtener la sal sódica de (V), se siguió el procedimiento que se muestra en el esquema No. 2.



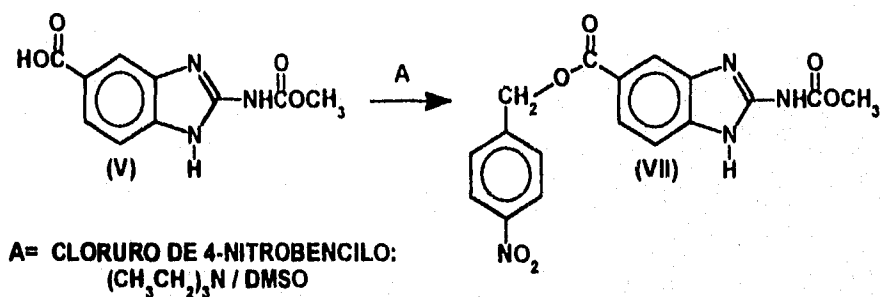
ESQUEMA No. 2

#### 4.2.1. Preparación de la sal sódica del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VI).

Se disolvió hidróxido de sodio en agua, y luego se adicionó el 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo agitando la mezcla hasta que el polvo se disolvió completamente. A dicha solución se le adicionó una mezcla fría de acetona y acetato de etilo, observándose la formación de una suspensión, la cual se agitó y se dejó reposar precipitándose un polvo que posteriormente fue separado por filtración. Este sólido color beige claro, fue la sal sódica del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VI), el cual que presentó un rendimiento del 91.55%.

#### 4.3. Síntesis del profármaco 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VII).

Con el fin de obtener el profármaco (VII), se siguió el procedimiento que se muestra en el esquema No. 3.



ESQUEMA No. 3

**4.3.1. Preparación del 5-(4-nitrobencil-oxi-carbonil)-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VII).**

Se disolvió el 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (V) en DMSO caliente, y luego se le adicionó trietilamina anhidra, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente y bajo agitación por 40 min. Posteriormente, se le adicionó a dicha mezcla, el cloruro de 4-nitrobencilo e inmediatamente se inició el calentamiento a 40 °C, manteniendo la mezcla de reacción al resguardo de la luz, bajo agitación moderada y en atmósfera de nitrógeno durante 48 hr. La suspensión obtenida se precipitó con agua acidulada a pH=4. Se obtuvo un sólido crema amarillento que se separó por filtración y se lavó varias veces con agua, y finalmente con buffer a pH=9. El polvo obtenido se purificó en acetona caliente y se obtuvo el 5-(4-nitrobencil-oxi-carbonil)-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VII) con un rendimiento del 44.40%, el cual fundió con descomposición a 320 °C.

**4.4. Determinación de los valores de pKa del compuesto filaricida (V).**

Se realizaron 20 diluciones de la sal sódica (VI) a una concentración de 20µg/ml c/u, a diferentes valores de pH utilizando diferentes buffers,<sup>14</sup> y con fuerza ionica constante, a las cuales se les determinó su absorbancia a 306 nm (longitud de onda de máxima diferencia entre pH ácido y alcalino), utilizandose un blanco diferente para cada dilución. Se elaboró una tabla y la gráfica de absorbancia vs. pH con las que se determinaron los valores de pKa del compuesto filaricida (V). Los resultados de estos estudios se reportan en la Tabla 5.3 y en la gráfica 5.4 de resultados.

#### **4.5. Determinación del coeficiente de partición octanol/agua del compuesto filaricida (V).**

A un embudo de separación, con una solución de sal sódica (VI) a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ , y a otro con solución buffer de fosfatos, se les añadieron 10 ml de octanol saturado con agua. Se agitaron ambos embudos por 5 min y se dejaron reposar. Las fases orgánicas se recolectaron en diferentes matraces, y a las fases acuosas, se les añadieron otros 10 ml de octanol saturado, y luego se agitaron ambos embudos por 5 min y se dejaron reposar. Las fases orgánicas se juntaron con las anteriores y, a las fases acuosas se le añadieron otros 10 ml de octanol saturado repitiéndose el proceso anterior otras 6 veces realizándose un total de 8 extracciones. Posteriormente se determinó la absorbancia a 234 nm de la fase acuosa utilizándose como blanco la solución buffer de fosfatos. Mediante una curva patrón realizada a diferentes concentraciones de la sal sódica (VI), se obtuvo la concentración de la fase acuosa con la cual se determinó el coeficiente de partición octanol/agua para el compuesto filaricida (V) a  $\text{pH}=7$ . La técnica anterior se realizó por duplicado. El resultado de este estudio se reporta en la Tabla 5.8 de resultados.

#### **4.6. Determinación de la curva de solubilidad acuosa del compuesto filaricida (V) a diferentes valores de pH.**

Se mantuvieron bajo agitación, en un baño de agua a 37 °C por 24hr; 8 matraces que contenían 10 mg del compuesto filaricida (V) con 7 ml de solución buffer a diferentes valores de pH para cada matraz. Las soluciones saturadas que se obtuvieron, se diluyeron y posteriormente se les determinó su absorbancia a 234 nm (longitud de onda de máxima absorbancia), utilizándose como blanco la solución buffer que fué añadida a cada matraz. Mediante una curva patrón de absorbancia vs. diferentes concentraciones de la sal (VI), se determinaron los valores de solubilidad para cada valor de pH. Con los datos

obtenidos se realizó la curva de solubilidad para el compuesto filaricida (V). Los resultados de estos estudios se reportan en las Tablas 5.5, 5.6 y en la gráfica 5.7 de resultados.

#### **4.7. Determinación del coeficiente de partición octanol/agua del profármaco (VII).**

A un embudo de separación con una solución del profármaco (VII) en octanol, a una concentración de 10 µg/ml, y a otro embudo con octanol, se les adicionaron 10 ml de solución buffer de fosfatos saturado. Se procedió a agitar ambos embudos por 5 min, y se dejaron reposar. Las fases acuosas se vertieron en matraces diferentes y a las fases orgánicas se les adicionaron otros 10 ml de la solución de buffer de fosfatos saturado, y se procedió a agitar ambos embudos por 5 min, y se dejaron reposar. Las fases acuosas se juntaron con las anteriores en sus respectivos matraces y a las fases orgánicas se les adicionaron otros 10 ml de la solución de buffer de fosfatos saturado, y se realizó el mismo procedimiento 8 veces más, realizándose un total de 10 extracciones en ambos embudos. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 234 nm de la fase orgánica, utilizándose como blanco, la fase orgánica de octanol. Mediante una curva patrón realizada a diferentes concentraciones del profármaco (VII) en octanol, se obtuvo la concentración de la fase orgánica con la cual se determinó el coeficiente de partición octanol/agua para el profármaco (VII) a pH=7. La técnica anterior se realizó por duplicado. El resultado de este estudio se reporta en la Tabla 5.9 de resultados.

#### **4.8. Determinación de la solubilidad acuosa del profármaco (VII) a pH=2.**

Se mantuvieron en agitación en baño de agua a 37 °C por 24 hr, 2 matraces con 5 mg del profármaco (VII) en 7 ml de solución de ácido clorhídrico 0.01N. A las soluciones saturadas obtenidas, se les determinó su absorbancia a 234 nm,



---

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

utilizándose como blanco la solución de ácido clorhídrico 0.01N. Mediante una curva patrón de absorbancia vs. diferentes concentraciones de (VII), se determinó la solubilidad acuosa del profármaco (VII) a pH=2. El resultado de este estudio se reporta en la Tabla 5.9 de resultados.

### 5. RESULTADOS.

Los compuestos del I al V fueron sintetizados y se les determinaron sus propiedades físicas tales como R.f, punto de fusión. La elucidación estructural se logró por métodos espectroscópicos de IR y RMN de 90 ó 300 MHz. Una vez obtenido el compuesto V, se utilizó para la preparación de VI, y con éste último se llevó a cabo la parte analítica que dió pie a la determinación de los 2 valores de pKa más importantes, el coeficiente de partición octanol/agua y la obtención de la curva de solubilidad vs. pH para el compuesto filaricida V. Después, se llevó a cabo la síntesis de VII, su caracterización física junto con el R.f, y la elucidación estructural por métodos espectroscópicos de IR, RMN protónica de 300 MHz y EM por FAB<sup>+</sup>. Luego se realizó la parte analítica que dió pie a la determinación del coeficiente de partición octanol/agua y la solubilidad acuosa para este profármaco. En la tabla 5.1 se presentan las propiedades físicas y los rendimientos obtenidos.

• **5.1. TABLA DE CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS:**

NOMBRE DEL COMPUESTO	PUNTO DE FUSION (°C)	RENDIMIENTO SINTETICO	R.f.	PROPIEDADES FISICAS
Acido 4-Acetamidobenzoico (I)	258-260	84.2%	0.12 <sup>a</sup>	Polvo fino de color blanco opaco, no cristalino
Acido 4-acetamido-3-nitro benzoico (II)	214-218	60.55%	0.56 <sup>b</sup>	Agujas de color amarillo mostaza
Acido 4-amino-3-nitro benzoico (III)	237-240	89.51%	0.32 <sup>c</sup>	Polvo fino de color amarillo claro, no cristalino
Acido 3,4-diamino benzoico (IV)	----- *	91.55%	----- *	Polvo cristalino de color rosa fuerte
5-Carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V)	300-305	85.1%	0.26 <sup>d</sup>	Polvo fino, opaco de color café-crema
(5-Carboxilato-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo) sódico (VI)	----- *	91.55%	----- *	Polvo de aspecto arcilloso de color beige-claro
5(4-Nitro bencil-oxo-carbonil)-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VII)	320	44.40%	0.50 <sup>b</sup>	Polvo fino de color crema, ligeramente amarillento

a= Sistema 1, b= Sistema 2, c= Sistema 3, d= Sistema 4.

\*NOTA: Estos compuestos se obtuvieron en forma de sales por lo que no se le realizaron estas determinaciones.

• 5.2. TABLA DE DATOS ESPECTROSCOPICOS DE LOS  
COMPUESTOS SINTETIZADOS:

NOMBRE DEL COMPUESTO	DATOS ESPECTROSCOPICOS
Acido 4-Acetamidobenzolico (I)	IR <sup>a</sup> : 3304 cm <sup>-1</sup> (NH), 3004-2370 cm <sup>-1</sup> (COOH), 1672 cm <sup>-1</sup> (C=O). RMN <sup>b</sup> : 7.7 ppm Protones aromáticos y 2.2 ppm (CH <sub>3</sub> CO).
Acido 4-acetamido-3-nitro benzolico (II)	IR <sup>a</sup> : 3326 cm <sup>-1</sup> (NH), 3200-2350 cm <sup>-1</sup> (COOH), 1718 cm <sup>-1</sup> (C=O), 1514 cm <sup>-1</sup> . RMN <sup>b</sup> : 7.8, 8.2, 8.3 ppm protones aromáticos 5,6 y 2, 2.1 ppm (CH <sub>3</sub> CO), arriba de 13 ppm (COOH).
Acido 4-amino-3-nitro benzolico (III)	IR <sup>a</sup> : 3480 y 3356 cm <sup>-1</sup> (NH <sub>2</sub> ), 2808-2538 cm <sup>-1</sup> (COOH), 1686 cm <sup>-1</sup> (C=O), 1252 cm <sup>-1</sup> (CO) 830 cm <sup>-1</sup> (NO <sub>2</sub> ). RMN <sup>b</sup> : 8.5, 7.8, 7.1 ppm protones aromáticos 2, 6 y 5.
Acido 3,4-diamino benzolico (IV)	IR <sup>a</sup> : 3426 y 3342 cm <sup>-1</sup> (NH <sub>2</sub> ), 2926 cm <sup>-1</sup> (COOH), 1688 cm <sup>-1</sup> (C=O), 1316 y 1278 cm <sup>-1</sup> (CO). RMN <sup>b</sup> : 6.8, 7.5, 7.7 ppm protones aromáticos 5, 6 y 2, señal ancha de 6.6- 8.3 ppm (NH <sub>2</sub> ).
5-Carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V)	IR <sup>a</sup> : 3398 cm <sup>-1</sup> (NH), 2958 cm <sup>-1</sup> (COOH), 1722 y 1648 cm <sup>-1</sup> (C=O carboxilo y carbamato), 1286 cm <sup>-1</sup> (CO), 1378 (CH <sub>3</sub> ). RMN <sup>b</sup> : 8, 7.7, 7.45 ppm protones aromáticos 4, 6, 7 y 3.784 ppm (CH <sub>3</sub> ).
5-(4-Nitro bencil-oxo-carbonil)-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VII)	IR <sup>a</sup> : 3382 cm <sup>-1</sup> (NH), 1708 y 1652 cm <sup>-1</sup> (C=O carboxilato y carbamato), 1272 y 1186 cm <sup>-1</sup> (CO carboxilato y carbamato), 852 cm <sup>-1</sup> (NO <sub>2</sub> ), 1378 (CH <sub>3</sub> ). RMN <sup>b</sup> : 8.29- 7.47 ppm protones aromáticos, 5.49 ppm (CH <sub>2</sub> ), 3.77 ppm (CH <sub>3</sub> ). E.M (FAB): 79m/z pb, 523m/z complejo [M-Matriz] <sup>+</sup> , 235m/z fragmento compuesto 5, 154m/z fragmento alcohol nitrobencilico protonado.

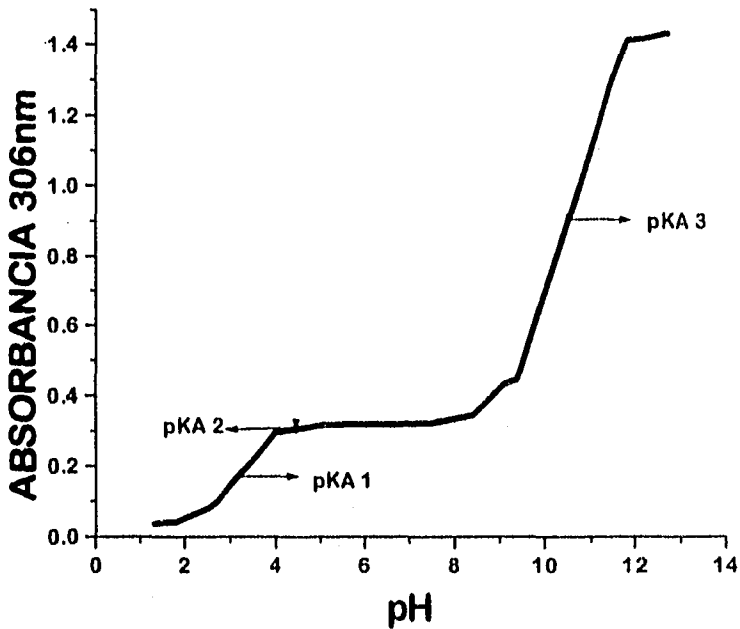
<sup>a</sup>IR en pastilla de KBr RMN<sup>a</sup>: Protónica de 90 MHz RMN<sup>b</sup>: Protónica de 300 MHz

**5.3. TABLA DE ABSORBANCIA VS. pH PARA LA DETERMINACION DE LOS VALORES DE pKa DEL COMPUESTO (V).**

Dif No.	Absorbancia a 306nm	pH
1	0.037	1.31
2	0.042	1.8
3	0.083	2.52
4	0.101	2.71
5	0.153	3.04
6	0.226	3.62
7	0.295	3.97
8	0.309	4.65
9	0.317	5.08
10	0.319	5.52
11	0.319	6.73
12	0.323	7.61
13	0.345	8.41
14	0.363	8.56
15	0.433	9.11
16	0.447	9.38
17	1.276	11.42
18	1.410	11.83
19	1.413	12.18
20	1.429	12.70

- 5.4. GRAFICA PARA ESTIMACION DE VALORES DE pKa PARA EL COMPUESTO FILARICIDA (V).

ABSORBANCIA A 306 nm Vs. pH



- 5.5. TABLA DE ABSORBANCIA A 234 nm VS. pH DEL COMPUESTO FILARICIDA (V) PARA LA DETERMINACION DE SOLUBILIDAD ACUOSA A DIFERENTES VALORES DE pH A 37°C

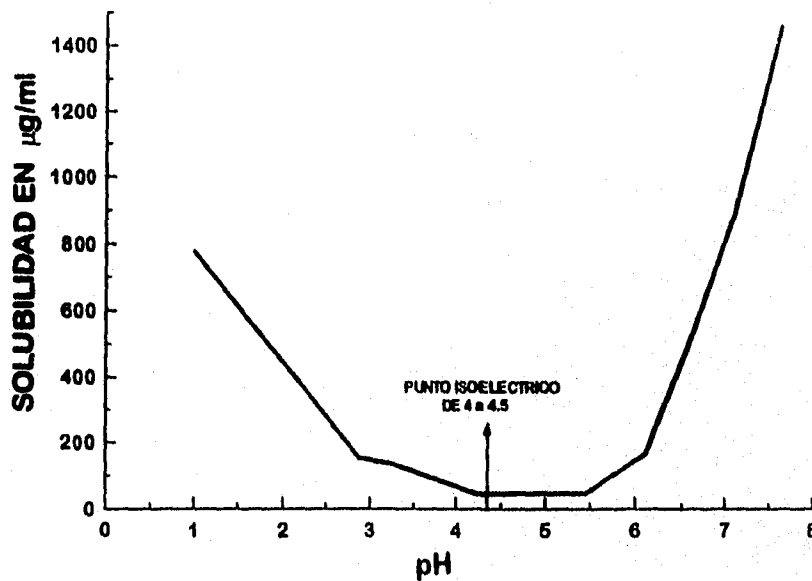
Sol No.	Absorbancia a 234 nm	Factor de dilucion	pH
1	0.663	100	1
2	0.109	100	2.88
3	0.095	100	3.26
4	0.032	100	4.25
5	0.070	50	5.46
6	0.118	100	6.12
7	0.643	100	7.10
8	1.059	100	7.62

• 5.6. TABLA DE SOLUBILIDAD DEL COMPUESTO FILARICIDA (V) A DIFERENTES VALORES DE pH A 37°C.

Sol.No.	Solubilidad en $\mu\text{g/ml}$	pH
1	776	1
2	152.52	2.88
3	133.30	3.26
4	48.78	4.25
5	49.48	5.46
6	166.25	6.12
7	885.84	7.10
8	1457.12	7.64

• 5.7. GRAFICA DE SOLUBILIDAD VS. pH PARA EL COMPUESTO FILARICIDA (V).

GRAFICA DE SOLUBILIDAD VS. pH



• 5.8. TABLA DE PROPIEDADES FISICOQUIMICAS ENCONTRADAS AL COMPUESTO FILARICIDA (V).

PROPIEDAD FISICOQUIMICA	VALOR ENCONTRADO
pKa <sub>1</sub>	3.2
pKa <sub>2</sub>	4.5
pKa <sub>3</sub>	10.35
PUNTO ISOELECTRICO	4- 4,5
COEFICIENTE DE PARTICION OCTANOL/AGUA A pH= 7.05*	0.05135

\* Valor promedio

• 5.9. TABLA DE PROPIEDADES FISICOQUIMICAS ENCONTRADAS AL PROFARMACO (VII).

PROPIEDAD FISICOQUIMICA	VALOR ENCONTRADO
COEFICIENTE DE PARTICION OCTANOL/AGUA A pH= 6.7*	5.75
SOLUBILIDAD ACUOSA A pH= 2*	11.69 µg/ml

\* Valor promedio

## 6. DISCUSION DE RESULTADOS

La parte sintética realizada en esta tesis muestra que los rendimientos de los compuestos que fueron preparados se consideran aceptables salvo los obtenidos para los compuestos II y VII los cuales resultaron ser bajos (60.55 y 44.40% respectivamente).

La síntesis del compuesto I no resultó problemática, ya que la reacción entre el ácido p-aminobenzoico y el anhídrido acético es rápida a temperatura ambiente, pero es muy importante mantener condiciones anhidras durante el curso de la reacción. Por lo que respecta a la síntesis del compuesto II apartir de I, el éxito de la nitración depende de la pureza de los ácidos nítrico y sulfúrico; el utilizar ácido nítrico fumante en vez del grado reactivo, el control de la temperatura y la proporción de la mezcla sulfonítrica que en este caso fué de 1:1.33. Para esta síntesis, no se utilizó ácido nítrico fumante por lo que el rendimiento fué bajo. Para nitrar el compuesto I en la posición 3, fué necesario mantener la mezcla de reacción entre 0-10°C, ya que así se puede asegurar la mononitración en la posición orto con respecto al grupo 4-acetamido (orto y para director), evitándose de esta manera la dinitración. Para llevar a cabo la hidrólisis del compuesto II y obtener el III; fué necesario trabajar con ácido sulfúrico concentrado y calentamiento por 6 hrs, ya que así se asegura la hidrólisis completa del 4-acetamido. Después de ese tiempo, para precipitar la mayor cantidad del compuesto III, fué necesario neutralizar la solución ácida de hidrólisis con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hasta pH de 3.5 porque de esta manera se mantiene protonado el grupo carboxilo y mayoritariamente desprotonado el grupo amino, obteniéndose la molécula en forma neutra e insoluble en agua. Para el lavado del compuesto III fué necesario realizarlo en una solución acuosa medianamente ácida, de ahí que se utilizó ácido clorhídrico al 20% en frío para evitar que en el lavado se perdiera producto por disolución.



La obtención del compuesto IV por medio de la hidrogenación catalítica de III, requirió de una manipulación rápida y cuidadosa de la solución metanólica concentrada del compuesto IV que se obtiene después de hidrogenar, ya que dicha solución es muy susceptible de oxidarse y descomponerse a temperatura ambiente, por lo que la filtración y la concentración en rotavapor para obtener el polvo clorhidrato de IV, debe efectuarse lo más rápido posible.

El éxito de la ciclación del compuesto IV para obtener V, requirió de un control exacto del pH en 2 etapas. En la primera, al hacer reaccionar la solución acuosa de sulfato de 2-metil-2-tiopseudourea con cloroformiato de metilo se crea un ambiente ácido en la mezcla de reacción, el cual es importante neutralizar constantemente manteniendo el pH entre 7 y 8 ya que a ese pH se favorece la formación de un sólido blanco esponjoso, el 2-metil-N-metoxycarbonil-2-tiopseudourea el cual es el responsable de la formación del grupo carbamato de metilo en la posición 2 del núcleo bencimidazol. En la segunda etapa, este precursor anterior debe de hacerse reaccionar inmediatamente, con el compuesto IV pero ahora a pH de 5, con el fin de mantener el grupo carboxilo protonado y las aminas de las posiciones 3 y 4 libres (en el compuesto IV), las cuales son las responsables del ataque nucleofílico sobre el precursor de la primera etapa, que después conducirá a la formación del anillo de imidazol en el compuesto V.

La obtención de la sal sódica VI no resultó problemática, pero para asegurar el éxito completo en su obtención, es necesario disolver un equivalente del compuesto V con un equivalente de NaOH disuelto en la mínima cantidad de agua, a la cual se le debe de adicionar inmediatamente una solución fría de acetona-acetato de etilo (10:1) con el fin de asegurar un brusco descenso en la polaridad de la solución que conduzca a la precipitación de la mayor cantidad de la sal sódica VI.

La síntesis del profármaco VII representó la parte más difícil de llevar a cabo; porque el éxito de esta síntesis depende de más variables como son: la pureza del compuesto V y del cloruro de 4-nitrobencilo, el disolvente empleado,

la temperatura, el resguardo de la luz y las condiciones experimentales de trabajo (atmósfera de nitrógeno y condiciones anhidras). Entre las dificultades de esta síntesis se tienen que: el compuesto V ya purificado, es soluble sólo en muy pocos de los disolventes comunes entre los cuales figuran el DMSO. El cloruro de 4-nitrobencilo es muy inestable y se descompone en el alcohol 4-nitrobencílico con la humedad y a temperatura ambiente. El rendimiento tan bajo de esta reacción (44.40%) se pudo deber a que en las condiciones experimentales se presentan reacciones competitivas que traen como consecuencia la formación de muchas impurezas junto con el producto principal; además, en los procesos de purificación se pierde también producto. Se eligió llevar a cabo una reacción del tipo  $SN_2$  con el fin de obtener el profármaco VII y para esta reacción se utilizó DMSO, el cual es un disolvente que por ser aprótico no solvata aniones. Se utilizó trietilamina la que se caracteriza por ser una base poco nucleofílica, que al hacerse reaccionar primero con el compuesto V disuelto en DMSO, genera "in situ" el anión carboxilato que actúa como nucleófilo al adicionarse el cloruro de 4-nitrobencilo dando lugar a la formación del grupo funcional éster por medio de una reacción de  $SN_2$ . Para llevar a cabo esta reacción fué muy importante trabajar en condiciones anhidras, al resguardo de la luz y a temperatura no mayor a 40°C con el fin de evitar en lo más posible, a las reacciones competitivas.

En lo que respecta a la determinación de los valores de pKa del compuesto V, el método utilizado mostró la presencia de 4 valores de pKa, de los cuales sólo dos de ellos, por ser los involucrados en el comportamiento zwitterion, fueron preferencialmente considerados y determinados (gráficamente en papel milimétrico) con mayor exactitud. Cabe señalar que la determinación de valores de pKa se realiza en forma mucho más exacta por el método potenciométrico, pero para nuestros fines la exactitud (por su rango de error) del método espectrofotométrico es suficiente.

Al realizar la curva de solubilidad a diferentes valores de pH del compuesto V, se obtuvo información que fue muy útil en este trabajo ya que con este

experimento se pudo observar y comprobar por vez primera que esta molécula se comporta como zwitterion al observarse un mínimo de solubilidad a un valor de pH, que se presentó gráficamente. Cabe señalar que la solubilidad acuosa del compuesto V no es lo suficiente para llevar a cabo las diluciones de la parte analítica en forma práctica, por lo que se tuvo que realizar la preparación de la sal sódica VI con la cual se realizaron todas las determinaciones espectrofotométricas del compuesto V.

El valor tan bajo del coeficiente de partición octanol/agua del compuesto filaricida V, hacen suponer que lo que se disuelve de éste en un medio acuoso a pH=7, se encuentra en mayor parte ionizado en forma de su base conjugada (como ion carboxilato), lo que ocasiona que su afinidad por alguna fase lipídica sea baja.

La determinación del coeficiente de partición octanol/agua y la solubilidad acuosa del profármaco VII hacen suponer que lo poco que se disuelve en solución acuosa, ya no se encuentra mayoritariamente en forma ionizada por lo que su afinidad por la fase lipídica resultará ser mayor al compararse con el compuesto filaricida V, lo cual se deduce por su incremento en su coeficiente de partición. El hecho de haber realizado la solución del profármaco VII en octanol, para después extraerla con la solución de buffer de fosfatos en la determinación de su coeficiente de partición, y el haber realizado una solución acuosa en cosolvente con DMSO para determinar su solubilidad acuosa a pH=2, se debió a la dificultad de obtener una sal soluble en agua del profármaco VII.

Toda la parte analítica se llevó a cabo por métodos espectrofotométricos los cuales proporcionaron datos confiables.

## 7. CONCLUSIONES.

Con base en los datos espectroscópicos de IR y RMN obtenidos, caracterización física, cromatografía en capa fina y puntos de fusión; tanto de los precursores I, II y III (IV sólo se identificó por datos espectroscópicos) como de los compuestos V y VII, se puede decir que se cumplió con la síntesis y la purificación del compuesto filaricida 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V) y de su profármaco potencial, el 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VII), al cual se le determinó su coeficiente de partición y su solubilidad acuosa. Se obtuvo la sal sódica del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VI) con la cual se determinaron los valores de pKa, coeficiente de partición y se obtuvo la curva de solubilidad acuosa vs pH, cumpliéndose así, con la determinación de las propiedades fisicoquímicas del compuesto filaricida (V).

Basándonos en un estudio anterior,<sup>4</sup> en donde se evaluó la actividad, por vía subcutánea, del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V) y análogos esterificados, contra la filaria *Brugia pahangi* se logró establecer que la porción estructural responsable de la actividad fue el compuesto (V), aunque por vía oral fue prácticamente inactivo. Con este antecedente y tomando en cuenta la naturaleza estructural de (V), podría pensarse que la nula actividad oral de este compuesto, se debe a la presencia del grupo carboxilo y grupos aminos (anillo imidazol), los cuales darían a la molécula un comportamiento de zwitterion con punto isoeléctrico de 4 a 4.5, por lo que no tendría buenas perspectivas de absorción, cuando el compuesto (V) se administre por vía oral. Por otro lado, el grupo carboxilo podría provocar una alta solubilidad acuosa del compuesto (V), con lo cual sus propiedades lipofílicas quedarían prácticamente anuladas y en consecuencia la molécula no podría transportarse a través de las membranas biológicas.

## CONCLUSIONES

En base a este problema, fue así como se propuso el diseño y la síntesis del compuesto profármaco (VII) el cual presenta las siguientes ventajas:

1. Es un profármaco que preserva en su estructura molecular al principio activo (derivado bioreversible).
2. Se esterificó el grupo 5-carboxi, suprimiendo así el comportamiento de zwitterion, obteniéndose un profármaco potencial con carácter de base débil que al presentar un coeficiente de partición mayor, lo hace potencialmente más absorbible.
3. Basándonos en un estudio histoquímico realizado en la Universidad del Colegio de Medicina de Arabia Saudita, en el que se demostró que las filarias presentan a nivel de músculo somático una variedad de enzimas, entre las que destacan las "esterasas no específicas", y otras enzimas diversas;<sup>6,7</sup> se propone que una vez que el profármaco alcance la circulación sistémica y entre en contacto con las filarias, éste presentará dos formas de bioactivación: la primera sería por medio de la hidrólisis del enlace éster catalizada por una "esterasa no específica" y la segunda podría ser por una bio-reducción del grupo nitro catalizada por alguna reductasa, que originando un movimiento electrónico molecular escinda al enlace éster, ocasionando en ambos casos, la liberación del principio activo el cual ya puede ejercer su efecto filaricida dentro del parásito.

## CONCLUSIONES

En base en las propiedades fisicoquímicas determinadas al profármaco (VII), el único inconveniente que presenta es su solubilidad acuosa, porque aunque se ganó en el incremento del coeficiente de partición, la solubilidad acuosa se abatió con respecto al compuesto (V).

Por último informo que el profármaco (VII) se encuentra en nuestro laboratorio a disposición para efectuarse con él, las pruebas biológicas pertinentes para demostrar su comportamiento bioreversible, el cual será objeto de otro trabajo posterior.

## 8. PARTE EXPERIMENTAL.

### 8.1. Instrumentación.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer con transformada de Fourier Modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio, las señales se dan en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de resonancia magnética protónica (RMN) se determinaron en un equipo Varian EM-390 usando dimetilsulfóxido o cloroformo deuterados como disolventes y tetrametil silano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se dan en ppm ( $\delta$ ).

El espectro de masas FAB<sup>+</sup> se determinó en un equipo Jeol JMS-SX 102A, utilizándose como matriz el alcohol m-nitrobenílico, los picos se reportan en m/z.

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos fueron determinadas en un espectrofotómetro Beckman DU-68 UV/VIS utilizándose celdas de cuarzo de un centímetro de paso de luz.

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro portátil Orion modelo 290 A utilizándose electrodo con membrana porosa de vidrio.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Buchi Mod. 530 utilizándose capilares de vidrio.

Para concentrar se empleó un evaporador rotatorio marca Buchi RE 111, con vacío generado por una bomba Felisa Mod. 1600 ajustada a 55cm de Hg y condensador de hielo seco.

Para realizar la hidrogenación catalítica se utilizó un hidrogenador marca Parr Mod. 391EG con 60 lb/plg<sup>2</sup>, utilizando hidrógeno de tanque de la marca INFRA y como catalizador carbón con paladio al 5% de Aldrich.

### 8.2 Cromatografía en capa fina.

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice GF<sub>254</sub> (Merck) y placas de plástico recubiertas de gel de sílice con indicador fluorescente (Kodak). Los compuestos orgánicos se revelaron con luz UV y por exposición a vapores de yodo.

### 8.3. Composición de los sistemas de elución utilizados.

SISTEMA	COMPOSICION	PROPORCION
1	CLOROFORMO-METANOL	90:10
2	CLOROFORMO-METANOL	80:20
3	CLOROFORMO-METANOL	95:5
4	CLOROFORMO-METANOL	98:2

### 8.4. Acido 4-acetamidobenzoico (I).

En un matraz de bola de un litro de capacidad, se depositaron 50 g (0.365 moles) de ácido 4-aminobenzoico y 500 ml de acetona anhidra. El matraz se tapó con trampa anhidra y por medio de agitación magnética se disolvió completamente el polvo. Enseguida se adicionaron 70ml (0.735 moles) de anhídrido acético y se mantuvo la agitación a velocidad media, con trampa anhidra y temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados con hielo picado y se agitó vigorosamente, se precipitó un sólido blanco el cual se separó por filtración al vacío en buchner, lavó con agua fría hasta pH neutro y secó a temperatura ambiente. Se obtuvieron 55 g de un polvo blanco que corresponde al ácido 4-acetamidobenzoico, con un rendimiento del 84.2%. El producto crudo se



recristalizó de acetato de etilo, filtró y dejó secar. Se determinó el punto de fusión del producto, siendo este de 260 °C (Lit<sup>16</sup> 259-262 °C) y un R.f.=0.123 en el sistema 1.

El espectro (No. 1) de IR (KBr) muestra bandas a 3304 cm<sup>-1</sup> (NH), 3004-2370 cm<sup>-1</sup> (COOH), 1672cm<sup>-1</sup> (C=O). El espectro (No. 2) de RMN protónica de 90 MHz muestra señales a 7.7 ppm para los protones aromáticos, 2.2 para los protones (CH<sub>3</sub>CO) y 9.7 para el protón (COOH).

#### 8.5. Acido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (II).

En un matraz de bola con 2 bocas de 500 ml de capacidad, se depositaron 67 ml (1.085 moles) de ácido nítrico concentrado. En una boca se colocó el termómetro asegurándolo con un séptum y en la otra boca se colocó un embudo de adición con 80 ml (1.44 moles) de ácido sulfúrico concentrado. El matraz se colocó en un baño de hielo, bajo agitación mecánica a velocidad media. Cuando la temperatura descendió a 3 °C se adicionaron gota a gota 10 ml de ácido sulfúrico frío con agitación constante, cuidando que la temperatura no subiera más allá de 10°C, el procedimiento se repitió 7 veces más, adicionando un total de 80 ml de ácido sulfúrico frío. En seguida, se adicionaron 30 g (0.167 moles) del ácido 4-acetamidobenzoico manteniendo el matraz bajo agitación constante en baño de hielo, y posteriormente a temperatura ambiente durante 8 horas.

Después de ese tiempo, la mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados que tenía hielo picado, bajo agitación mecánica vigorosa. El precipitado obtenido se separó por filtración al vacío lavando con agua fría hasta un pH neutro. Se secó al aire, obteniéndose 22.65 g de un polvo amarillo mostaza que corresponde al ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico, con un rendimiento del 60.55%. El producto crudo se purificó por recristalización de metanol-agua 1:1 dando unas agujas amarillas a las cuales se les determinó el punto de fusión de 214-218 °C y un R.f.=0.56 en el sistema 2.

El espectro (No. 3) de IR (KBr) muestra bandas a  $3326\text{ cm}^{-1}$  (NH),  $3200\text{-}2350\text{ cm}^{-1}$  (COOH),  $1718\text{ cm}^{-1}$  (C=O de COOH) y  $856\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NO}_2$ ). El espectro (No. 4) de RMN protónica de 90 MHz muestra señales de 2.1 ppm ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 7.8, 8.2 y 8.33 para los protones aromáticos 5,6 y 2 respectivamente y arriba de 13 ppm para (COOH).

#### 8.6. Acido 4-amino-3-nitrobenzoico (III).

En un vaso de precipitados de 400 ml de capacidad se depositaron 20 g (0.089 moles) del ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico con 50 ml (0.9 moles) de ácido sulfúrico concentrado. Se colocó el vaso en una parrilla eléctrica con agitación mecánica a velocidad media y se mantuvo la mezcla de reacción a  $70^\circ\text{C}$  durante 6 horas. Después de ese tiempo, se suspendió el calentamiento y dejó agitándose hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Luego, a dicha mezcla de reacción se le vertió poco a poco hielo picado. Después, se le adicionó carbonato de sodio hasta obtener un  $\text{pH}=3.5$ , medido con potenciómetro, observándose una suspensión en la mezcla de reacción, la cual se dejó precipitar y luego se filtró al vacío, lavando el polvo retenido varias veces con ácido clorhídrico al 20% frío, dejando secar el polvo al aire en vacío. Se obtuvieron 14.5 g de un polvo amarillo claro en forma de granulado que corresponde al ácido 4-amino-3-nitrobenzoico, con un rendimiento del 89.51%, el cual presentó un punto de fusión de  $237\text{ }^\circ\text{C}\text{-}240\text{ }^\circ\text{C}$  con un R.f.= 0.322 en el sistema 3.

El espectro (No. 5) de IR (KBr) muestra bandas de  $3480$  y  $3366\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ),  $2808\text{-}2538\text{ cm}^{-1}$  (COOH),  $1686\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $830\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NO}_2$ ). El espectro (No. 6) de RMN protónica de 90 MHz muestra señales a 7.1 ppm para el protón aromático 5, 7.8 ppm para protón aromático 6, 8.5 ppm para el protón aromático 2.

### 8.7. Acido 3,4 diaminobenzoico (IV).

En un vaso de precipitados de 600 ml, se depositaron 6 g (0.033 moles) del ácido 4-amino, 3-nitrobenzoico y luego se adicionaron 350 ml de metanol anhidro. El vaso se calentó en parrilla eléctrica con agitación constante hasta que el polvo se logró disolver. Después, la solución metanólica homogénea se vertió sobre un frasco reactor, se le adicionaron 0.6 g de carbón activado con paladio al 5% y 4 ml (0.048 moles) de ácido clorhídrico concentrado. El frasco reactor se tapó, se selló y se colocó en el aparato hidrogenador "PARR". Luego se llenó a 60 lbs de presión con hidrógeno y se encendió el agitador del aparato, el cual lo mantuvo agitando hasta que la presión interna del frasco reactor descendió hasta 15 lbs de presión de hidrógeno. Se apagó el agitador y se volvió a llenar el frasco reactor hasta 60 lbs de presión con hidrógeno y se procedió a encender el agitador, manteniendo la agitación del frasco reactor hasta que nuevamente la presión interna descendió hasta 15 lbs. Se apagó el agitador y se volvió a llenar el frasco reactor hasta 60 lbs de presión con hidrógeno y se continuó la agitación nuevamente, realizando la misma operación ya descrita 4 veces más hasta que después de 30 minutos de agitación, ya no hubo consumo de hidrógeno. Se succionó con vacío todo el hidrógeno no reaccionante del frasco reactor y se retiró del aparato hidrogenador. La solución del frasco reactor inmediatamente se filtró al vacío para eliminar el carbón. Se obtuvieron 350 ml de una solución rosa fuerte, la cual inmediatamente se vertió sobre un matraz de bola de 500 ml y evaporó a sequedad con el aparato de rotavapor. Se raspó el polvo del matraz y se pesó; obteniéndose 6.8 g de un polvo cristalino color rosa fuerte, que corresponde al clorhidrato del ácido 3,4-diamino benzoico; con un rendimiento del 91.58%, el cual se almacenó en atmósfera inerte de  $N_2$  debido a que éste polvo se oxida muy rápido.

No se le determinó punto de fusión ni R.f., por ser una sal inestable al medio ambiente, realizando sólo su caracterización espectroscopia de IR y RMN.

El espectro (No. 7) de IR (KBr) muestra bandas de 3426 y 3342  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ), 2926  $\text{cm}^{-1}$  (COOH), 1688  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1316 y 1278  $\text{cm}^{-1}$  (CO). El espectro (No. 8) de RMN protónica de 90 MHz muestra señales de 6.8, 7.5 y 7.7 ppm que corresponden a los protones aromáticos 5, 6 y 2 respectivamente, y de 6.6 a 8.3 ppm corresponde banda ancha de ( $\text{NH}_2$ ).

#### 8.8 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V).

En un vaso de precipitados de 100ml se disolvieron 22.72 g (0.0816 moles) de sulfato de 2-metil-2-tiopseudourea con 30 ml de agua. Una vez disueltos, se vertió la solución a un matraz de 3 bocas de 250 ml y se mantuvo en agitación magnética, enfriando el matraz en baño de hielo y sal, hasta que la temperatura de la solución descendió menos de 10 °C. Posteriormente, se adicionaron 12.4 ml (0.159 moles) de cloroformiato de metilo y con ayuda de un potenciómetro, controlando la temperatura, se adicionó gota a gota NaOH al 25% através de un embudo de adición, para mantener la mezcla de reacción entre un pH de 7 a 8 sin que la temperatura rebasara los 15 °C. La neutralización se logró después de 4 horas, cuando se obtuvo un sólido blanco esponjoso. Después, el matraz se retiró del baño de hielo y se colocó en un baño de aceite sobre una parrilla eléctrica, y se adicionaron 18 g (0.08 moles) de la sal clorhidrato del ácido 3,4-diaminobenzoico con 100 ml de agua fría, se llevó la mezcla de reacción a un pH=5 con HCl diluido y se llevó a reflujo a 92°C con agitación magnética durante 4 horas, con atmósfera de nitrógeno. Después de ese tiempo, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se le adicionaron 150 ml de agua fría, y el contenido del matraz se filtró al vacío y lavó varias veces con agua fría y dejó secar el polvo al vacío con aire. El polvo obtenido se depositó en un matraz de bola de 250 ml y se agitó con 100 ml de

metanol por una hora. Luego se filtró el contenido del matraz al vacío y se dejó secar al aire.

Se obtuvieron 16 g de un polvo fino de color café-crema claro que corresponde al 5-carboxi-1H-Bencimidazol-2-il carbamato de metilo, con un rendimiento del 85.1%, un punto de fusión de 305 °C y un R.f.=0.26 en el sistema 4.

El espectro (No. 9) de IR (KBr) muestra bandas de 3398  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 2958  $\text{cm}^{-1}$  (COOH), dos bandas juntas a 1722 y 1648  $\text{cm}^{-1}$  (C=O del carboxilo y carbamato), 1266  $\text{cm}^{-1}$  (CO), 1378  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ). El espectro (No. 10) de RMN protónica de 300 MHz muestra señales de 3.784 ppm ( $\text{CH}_3$ ), señales de los protones aromáticos: 7.45, 7.7 y 8.05 ppm protones aromáticos 7, 6 y 4 respectivamente.

#### **8.9 Sal sódica del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VI).**

En un vaso de precipitados de 150 ml se depositaron 0.34 g (0.0085 moles) de NaOH en escamas y se adicionaron 5 ml de agua destilada agitando la mezcla hasta que la sosa se disolvió completamente, con ayuda de calentamiento ligero en parrilla eléctrica. Después se adicionaron 2 g (0.0085 moles) del 5-carboxi-1H-Bencimidazol-2-il carbamato de metilo agitando rápidamente, la mezcla, con varilla de vidrio y calentamiento suave, hasta que se logró disolver completamente el polvo en la solución de sosa. Luego, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente, y después, con agitación rápida, se vertieron 50 ml de acetona fría y 5 ml de acetato de etilo frío observándose la formación de una suspensión, la cual se filtró al vacío, lavando el polvo retenido con acetona fría varias veces. Se dejó secar el polvo en vacío al aire, obteniéndose 2 g de un polvo arcilloso de color beige claro, el cual resultó ser soluble en agua e insoluble en disolventes orgánicos, registrándose un rendimiento del 91.55% de la sal sódica del 5-carboxi-1H-Bencimidazol-2-il carbamato de metilo.

8.10. 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1H-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (VII).

En un matraz de bola de 100 ml se depositaron 500 mg (0.0021 moles) del 5-carboxi-1H-Bencimidazol-2-il carbamato de metilo (purificado con DMSO), el matraz se colocó en una canastilla de calentamiento y se le adicionaron 4 ml de DMSO anhidro. Se colocó la trampa anhidra y, con agitación magnética y calentamiento suave se disolvió completamente el polvo. Después, se suspendió el calentamiento y se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente. Luego, con agitación a velocidad media se adicionaron 0.3 ml (0.0021 moles) de trietilamina anhidra y se dejó la mezcla agitándose por 40 minutos a temperatura ambiente con trampa anhidra. Después de ese tiempo, se adicionaron 365 mg (0.0021 moles) de cloruro de 4-nitrobenzilo (purificado en etanol y cuyos espectros de IR No. 14 y RMN protónica de 90 MHz No. 15 se muestran en la parte de espectros), e inmediatamente se inició el calentamiento a 40 °C, con agitación moderada, cubriendo el matraz con papel aluminio y manteniendo la mezcla en atmósfera de nitrógeno, durante 48 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se apagó la agitación y el calentamiento, observándose en el matraz una suspensión, la cual se vertió en un vaso de precipitados con 100 ml de agua acidificada a pH=4. Se procedió a agitar manualmente la suspensión y luego se dejó precipitar la mezcla. El precipitado obtenido se filtró al vacío y el sólido retenido se lavó varias veces con agua. El polvo se resuspendió en solución de buffer de boratos pH=9, y se filtró de nuevo al vacío, dejando secar el polvo al aire. Después, se resuspendió el polvo en acetona caliente manteniéndolo en agitación por 10 minutos e inmediatamente se filtró al vacío y se dejó secar el polvo al aire y luego en desecador.

Se obtuvieron 345 mg de un polvo fino de color crema-amarillento que corresponde al 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1-H bencimidazol-2-il carbamato de metilo, con un rendimiento del 44.40% de rendimiento, que funde con descomposición a 320 °C y que presentó un R.f.=0.5 en el sistema 2.

El espectro (No. 11) de IR (KBr) muestra bandas a  $3382\text{ cm}^{-1}$  (NH),  $1708$  y  $1652\text{ cm}^{-1}$  (C=O carboxilato y carbamato),  $1272$  y  $1186\text{ cm}^{-1}$  (C-O),  $852\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NO}_2$ ),  $1378\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ). El espectro (No. 12) de RMN protónica de 300 MHz muestra señales a 3.77 ppm ( $\text{CH}_3$ ), 5.49 ppm ( $\text{CH}_2$ ) y de 7.47 a 8.29 ppm que corresponde a todos los protones aromáticos. El espectro (No. 13) de masas FAB<sup>+</sup> (alcohol m-nitrobenílico) muestra un pico base de 79 m/z, complejo [M-Matriz]<sup>+</sup>=523 m/z, pico de 235 m/z que corresponde al fragmento del compuesto 5 y un pico de 154 m/z que corresponde al alcohol nitrobenílico protonado.

**8.11. Técnica para determinar los valores de pKa del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V).**

A) Determinación de la longitud de onda de máxima diferencia de absorbancia entre pH ácido y alcalino del compuesto (V).

Se realizaron dos barridos en ultravioleta-visible de  $\lambda= 200$  hasta  $400\text{ nm}$  a 2 soluciones de la sal sódica (VI) a una concentración de  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  c/u, pero a diferentes valores de pH, ya que se llevaron a volumen las dos diluciones en HCl 0.01N, NaOH 0.01N, y uno de  $\lambda=220$  hasta  $320\text{ nm}$  a una solución de la sal sódica (VI) a una concentración de  $15\text{ }\mu\text{g/ml}$  en solución neutra (agua destilada). Del análisis de los 3 espectros (ver apéndice) se dedujo que la longitud de onda de máxima diferencia entre pH ácido y alcalino es de  $306\text{ nm}$  para el compuesto filaricida (V).

B) Técnica experimental seguida para la determinación de los valores de pKa.

Se realizaron las siguientes 20 diluciones a concentración y fuerza iónica constante de  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  (con KCl 2M) cada una y se determinaron sus absorbancias a una longitud de onda de  $306\text{ nm}$  en el espectrofotómetro BECKMAN DU-68, utilizándose un blanco diferente para cada dilución, los

## PARTE EXPERIMENTAL

cuales se prepararon adicionando las mismas soluciones para cada dilución excepto la solución stock la cual fue reemplazada por 5 ml de agua destilada. Finalmente se midió su pH exacto de cada dilución con potenciómetro. El procedimiento seguido para realizar las diluciones es el siguiente:

-Dilución No.1 : 5 ml de solución stock + 20 ml de HCl 0.1N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.2 : 5 ml de solución stock + 5 ml de HCl 0.1N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada

-Dilución No.3 : 5 ml de solución stock + 1 ml de HCl 0.1N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada

-Dilución No.4 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer pH=3 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50ml con agua destilada.

-Dilución No.5 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=3.5 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.6 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=4 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.7 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=4.5 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada

-Dilución No.8 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=5 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada

-Dilución No.9 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=5.6 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.10 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=6 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.11 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=7 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.12 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=8 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada

-Dilución No.13 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=8.6 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada



-Dilución No.14 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=8.8 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.15 : 5 ml de solución stock + 1 ml de NaOH 0.1N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.16 : 5 ml de solución stock + 5 ml de buffer a pH=9 + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.17 : 5 ml de solución stock + 2 ml de NaOH 0.1N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada

-Dilución No.18 : 5 ml de solución stock + 5 ml de NaOH 0.1N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada

-Dilución No.19 : 5 ml de solución stock + 5 ml de NaOH 0.2N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

-Dilución No.20 : 5 ml de solución stock + 10 ml de NaOH 0.2N + 25 ml de KCl 2M y se llevó a 50 ml con agua destilada.

La solución stock se preparó disolviendo 20 mg de la sal sódica (VI) en un matraz volumétrico de 100 ml y se llevó a volumen con agua destilada.

Las soluciones buffer pH=3, 3.5, 4, 4.5 se prepararon utilizando ácido cítrico<sup>14</sup>, el buffer de pH=9 fué de boratos y el resto de ellos son de la marca comercial PARSTAINS preparados según indica el fabricante.

#### **8.12. Técnica seguida para obtener la curva de solubilidad del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V) a diferentes valores de pH.**

A) Determinación de la longitud de onda de máxima absorción en solución acuosa.

Se realizó el barrido en ultravioleta-visible de  $\lambda = 210$  hasta 320 nm en un espectrofotómetro, a una solución acuosa de la sal sódica (VI) de 30  $\mu\text{g/ml}$ . Del análisis del espectro obtenido, se dedujo que la longitud de onda de máxima absorción para el compuesto filaricida (V) resultó ser de 234 nm (ver apéndice).

B) Elaboración de la curva patrón de la sal sódica (VI) en agua destilada.

Se elaboró una curva patrón con la sal sódica (VI), realizando 6 diluciones a diferentes concentraciones de este compuesto, llevando a volumen final con agua destilada, y luego se determinó su absorbancia a 234 nm (longitud de onda de máxima absorción) en el espectrofotómetro BECKMAN DU-68 obteniéndose los siguientes datos:

**TABLA DE CURVA PATRON DE LA SAL SODICA (VI).**

ABSORBANCIA A 234 nm	CONCENTRACION EN $\mu\text{g/ml}$
0.0750	1
0.1420	2
0.2880	4
0.4330	6
0.5750	8
0.7320	10

Las diferentes concentraciones se prepararon a partir de una solución stock de 50  $\mu\text{g/ml}$  de la cual se tomaron alícuotas diferentes y se llevaban a volumen con agua destilada en matraces volumétricos de 50 ml (ver gráfica en apéndice).

C) Procedimiento experimental

Se realizaron 8 experimentos en matraces erlenmeyer de 10 ml, en los cuales, a cada uno se le pusieron 10 mg del compuesto (V) con 7 ml de solución de buffer a diferentes valores de pH, se sellaron perfectamente y se mantuvieron en agitación magnética a 37 °C en un baño de agua bien tapado durante 24 horas. Después de ese tiempo, cada matraz se filtró por separado, al vacío de tal forma que se obtuvieron soluciones cristalinas y saturadas. De cada matraz se tomó una alícuota de 1ml y se llevó a volumen con agua destilada, en matraces volumétricos de 50 ml ó de 100 ml y posteriormente, se le determinó su absorbancia a 234 nm a cada solución en el espectrofotómetro BECKMAN DU-68, con un blanco diferente para cada muestra, las cuales tenían solución buffer utilizada en cada experimento. Finalmente se determinó el pH exacto de cada solución con potenciómetro.

**8.13. Técnica seguida para la determinación del coeficiente de partición octanol/agua del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (V).**

A) Elaboración de la curva patrón de la sal sódica (VI) en buffer de fosfatos, pH=7.

Se elaboró la curva patrón siguiendo la misma metodología de la técnica de curva de solubilidad, pero ahora se llevó a volúmen final con solución de buffer de fosfatos, 0.2M, pH=7.05, utilizándose esta misma solución buffer como blanco y se obtuvieron los siguientes datos:

**TABLA DE CURVA PATRON DE LA SAL SODICA (VI).**

ABSORBANCIA A 234 nm	CONCENTRACION EN $\mu\text{g/ml}$
0.0680	1
0.1380	2
0.2770	4
0.4340	6
0.5690	8
0.7140	10

Las diferentes concentraciones se prepararon a partir de una solución stock de 50  $\mu\text{g/ml}$  de la cual se tomaron alícuotas diferentes y se llevaban a volúmen con buffer de fosfatos, pH=7 en matraces volumétricos de 50 ml (ver gráfica en apéndice).

B) Procedimiento experimental.

1-. Saturación del octanol empleado como disolvente de extracción:

En un embudo de separación de 250 ml con 20 ml de octanol, se adicionaron 20 ml de buffer de fosfatos, pH=7, y la mezcla se agitó por 5 minutos, se dejó reposar para que se separaran las fases. La fase acuosa se vertió en otro embudo de separación y la fase orgánica se guardó en un matraz de 125 ml. A la fase acuosa se le añadieron otros 20 ml de octanol y la mezcla se agitó por 5 minutos y se dejó reposar para que se separaran las fases. La fase acuosa se vació en otro embudo de separación y la fase orgánica se juntó con la anterior. A la fase acuosa se le añadieron otros 20 ml de octanol y se repitió el mismo procedimiento 7 veces más con el fin de reunir 180 ml de octanol saturado.

2-. Procedimiento de extracción:

Se vertieron 50 ml de una solución acuosa de la sal sódica (VI) en buffer de fosfatos 0.2 M, pH=7, a una concentración de 10 µg/ml en un embudo de separación de 250 ml. En otro embudo de separación igual se vertieron 50 ml de solución buffer de fosfatos 0.2 M, pH=7, y a ambos embudos se les adicionaron 10 ml de octanol saturado, y luego se procedió a agitar los embudos durante 5 minutos y se dejaron reposar para que las fases se separaran. Las fases acuosas se vaciaron en otros 2 embudos de separación y las fases orgánicas se colectaron en diferentes matraces de 125 ml. A las fases acuosas se les adicionaron otros 10 ml de octanol saturado, y luego se procedió a agitarlos nuevamente durante 5 minutos y se dejaron reposar para que se separaran las fases. Las fases acuosas se vaciaron en otros 2 embudos de separación y las fases orgánicas se juntaron con las anteriores en sus respectivos matraces (con el fin de medir el volumen final). A las fases acuosas se les añadieron otros 10 ml de octanol saturado y se repitió el mismo procedimiento 6 veces más

realizándose un total de 8 extracciones con octanol de cada fase acuosa. La técnica anterior se volvió a repetir en forma idéntica, de tal forma que se trabajó por duplicado.

Se determinó la absorbancia a 234 nm de la fase acuosa de la solución de (VI), utilizándose como blanco la fase acuosa de buffer de fosfatos.

En base a la curva patrón del compuesto (VI), se obtuvo la concentración promedio (apartir del promedio de las absorbancias) de la fase acuosa la cual fué de 9.2507  $\mu\text{g/ml}$  y midiendo el volumen recolectado de la fase orgánica de extracción (utilizada para extraer la fase acuosa de la solución problema) se determinó la concentración de la fase orgánica, según los siguientes cálculos:

**1.- Absorbancia a 234 nm del la fase acuosa = 0.657**

**2.- Absorbancia a 234 nm de la fases acuosa = 0.663**

**Absorbancia promedio = 0.660**

Condiciones anteriores al  
proceso de extracción:

Condiciones posteriores al  
proceso de extracción:

$C_i = 10 \mu\text{g/ml}$        $V_i = 50 \text{ ml}$

$M_a = (9.2407 \mu\text{g/ml}) (50 \text{ ml}) = 462.035 \mu\text{g}$

$M_i = (10 \mu\text{g/ml}) (50 \text{ ml}) = 500 \mu\text{g}$

$M_o = 500 \mu\text{g} - 462.035 \mu\text{g} = 37.965 \mu\text{g}$

Volumen de la fase orgánica = 80 ml

$C_a = 9.2407 \mu\text{g/ml} \Rightarrow$  Curva patrón

$C_o = 37.965 \mu\text{g} / 80 \text{ ml} = 0.4745 \mu\text{g/ml}$

Realizando la razón  $C_o/C_a$  :  $0.4745 \mu\text{g/ml} / 9.2407 \mu\text{g/ml} = 0.05135$ .

Es entonces, 0.05135 es el coeficiente de partición octanol/agua a  $\text{pH}=7$  del compuesto filaricida (V).

De donde:

Ci= Concentración inicial de la solución del compuesto VI.

Vi= Volumen de la solución inicial del compuesto VI.

Mi= Masa inicial de compuesto VI.

Ma= Cantidad del compuesto VI retenido en la fase acuosa.

Mo= Cantidad del compuesto VI retenido en la fase orgánica.

Ca= Concentración de la fase acuosa después del proceso de extracción.

Co= Concentración de la fase orgánica después del proceso de extracción.

#### **8.14. Técnica seguida para la determinación del coeficiente de partición octanol/agua del 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VII).**

##### **A) Determinación de la longitud de onda de máxima absorción**

Se realizó el barrido en ultravioleta-visible de  $\lambda = 200$  hasta 400 nm en un espectrofotómetro, a una solución del profármaco (VII) en octanol de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Del análisis del espectro obtenido, se dedujo que la longitud de onda de máxima absorción para el compuesto profármaco (VII) resultó ser de 234 nm (ver apéndice).

##### **B) Elaboración de la curva patrón del profármaco (VII) en octanol.**

Se elaboró una curva patrón con el profármaco (VII) realizando 7 diluciones a diferentes concentraciones de este compuesto, llevando a volumen final con octanol, y luego se determinó su absorbancia a 234 nm (longitud de onda de máxima absorción) en el espectrofotómetro BECKMAN DU-68, utilizándose un blanco de octanol y así se obtuvieron los siguientes datos:

TABLA DE CURVA PATRON DEL COMPUESTO (VII).

ABSORBANCIA A 234 nm	CONCENTRACION EN $\mu\text{g/ml}$
0.186	2
0.354	4
0.567	6
0.805	8
1.011	10
1.210	12

Las diferentes concentraciones se prepararon a partir de una solución stock de 100  $\mu\text{g/ml}$  en octanol, de la cual se tomaron alícuotas diferentes y se llevaron a volúmen con octanol en matraces volumétricos de 50 ml (ver gráfica en apéndice).

#### B) Procedimiento experimental.

1-. Saturación del buffer de fosfatos 0.1M, pH=7, empleado como disolvente de extracción.

A un embudo de separación de 250 ml con 40 ml de octanol se le añadieron 40 ml de buffer de fosfatos 0.2 M, pH=7, se procedió a agitar por 5 minutos, y se dejó reposar para que se separaran las fases. La fase acuosa se vació en un matraz de 500 ml y al embudo con la fase orgánica se le adicionaron otros 40 ml de la misma solución buffer y se procedió a agitar nuevamente por 5 minutos, y se dejó reposar para que se separaran las fases. La fase acuosa se juntó en el mismo matraz donde se había vaciado la anterior, y al embudo con la fase orgánica se le añadieron otros 40 ml de la misma solución buffer, repitiéndose el mismo procedimiento 4 veces más con el fin de reunir 240 ml de solución de buffer saturada con octanol.

2.- Procedimiento de extracción.

A un embudo de separación de 250 ml con 50 ml de una solución del profármaco (VII) en octanol a una concentración de 10 µg/ml y a otro embudo de separación igual con 50 ml de octanol, se les adicionaron a ambos 10 ml de solución buffer de fosfatos 0.2 M, pH=7 y posteriormente se agitaron durante 5 minutos, dejándolos reposar para que se separaran las fases. Las fases acuosas se vaciaron en diferentes matraces de 125 ml y a los embudos con las fases orgánicas se les añadieron otros 10 ml de la solución buffer anterior, posteriormente se agitaron durante 5 minutos, y se dejaron reposar para que las fases se separaran. Las fases acuosas se juntaron con las anteriores en sus respectivos matraces (con el fin de medir el volumen final) y a los embudos con las fases orgánicas se les añadieron otros 10 ml de solución buffer anterior, repitiéndose el procedimiento anterior 8 veces más con el fin de haber realizado 10 extracciones totales con 10 ml de solución buffer de fosfatos a cada embudo de separación. La técnica anterior se volvió a repetir en forma idéntica, de tal forma que se trabajó por duplicado.

Se determinó la absorbancia a 234 nm (longitud de onda de máxima absorción en octanol para el profármaco VII) de la solución de octanol del profármaco, utilizándose como blanco, los otros 50 ml de octanol del otro embudo.

En base a la curva patrón del compuesto (VII), se obtuvo la concentración promedio (a partir del promedio de las absorbancias) de la fase orgánica la cual fué de 7.42 µg/ml y midiendo el volumen recolectado de la fase acuosa de extracción (utilizada para extraer la fase orgánica de la solución problema) se determinó la concentración de la fase acuosa, según los siguientes cálculos:

**1.- Absorbancia a 234 nm del la fase orgánica = 0.730**

**2.- Absorbancia a 234 nm de la fase orgánica = 0.738**

**Absorbancia promedio = 0.734**



Condiciones anteriores al  
proceso de extracción:

$C_i = 10 \mu\text{g/ml}$   $V_i = 50 \text{ ml}$   
 $M_i = (10 \mu\text{g/ml}) (50 \text{ ml}) = 500 \mu\text{g}$

Condiciones posteriores al  
proceso de extracción:

$M_o = (7.42 \mu\text{g/ml}) (50 \text{ ml}) = 371 \mu\text{g}$   
 $M_a = 500 \mu\text{g} - 371 \mu\text{g} = 129 \mu\text{g}$   
Volumen de la fase acuosa = 100 ml  
 $C_o = 7.42 \mu\text{g/ml} \Rightarrow$  Curva patrón

$$C_a = 129 \mu\text{g} / 100 \text{ ml} = 1.29 \mu\text{g}$$

Realizando la razón  $C_o/C_a : 7.42 \mu\text{g/ml} / 1.29 \mu\text{g/ml} = 5.75$

Es entonces, 5.75 es el coeficiente de partición octanol/agua a  $\text{pH}=6.75$  del compuesto profármaco (VII).

De donde:

$C_i$ = Concentración inicial de la solución de octanol del profármaco VII.

$V_i$ = Volumen de la solución de octanol inicial del profármaco VII.

$M_i$ = Masa inicial del profármaco VII.

$M_a$ = Cantidad de profármaco retenido en la fase acuosa.

$M_o$ = Cantidad de profármaco retenido en la fase orgánica.

$C_a$ = Concentración de la fase acuosa después del proceso de extracción.

$C_o$ = Concentración de la fase orgánica después del proceso de extracción.

### 8.15. Técnica seguida para la determinación de la solubilidad acuosa a $\text{pH}=2$ del 5-(4-nitrobenzil-oxi-carbonil)-1H-benzimidazol-2-il carbamato de metilo (VII).

A) Determinación de la longitud de onda de máxima absorción del profármaco (VII) en solución acuosa (cosolencia con DMSO).

Se realizó el barrido en ultravioleta-visible de  $\lambda = 200$  hasta 400 nm en un espectrofotómetro, a una solución acuosa (cosolencia con DMSO) del profármaco (VII) de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Del análisis del espectro obtenido, se dedujo que

la longitud de onda de máxima absorción para el compuesto profármaco (VII) resultó ser de 234 nm (ver apéndice).

B) Elaboración de la curva patrón del profármaco (VII) en solución acuosa (cosolventancia con DMSO).

Se elaboró una curva patrón con el profármaco (VII) realizando 7 diluciones a diferentes concentraciones de este compuesto, llevando a volumen final con solución acuosa pH=2, y luego se determinó su absorbancia a 234 nm (longitud de onda de máxima absorción) en el espectrofotómetro BECKMAN DU-68, utilizándose como blanco la solución acuosa a pH=2, obteniéndose los siguientes datos:

**TABLA DE CURVA PATRON DEL PROFARMACO (VII).**

<b>ABSORBANCIA A 234 nm</b>	<b>CONCENTRACION EN <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
0.046	1
0.107	2
0.212	4
0.271	5
0.328	6
0.422	8
0.544	10

Las diferentes concentraciones se prepararon a partir de una solución stock de 50  $\mu\text{g/ml}$  en solución acuosa, pH=2 (cosolventancia con DMSO), de la cual se tomaron alícuotas diferentes y se llevaron a volumen con solución acuosa pH=2 en matraces volumétricos de 50 ml (ver gráfica en apéndice).

C) Procedimiento experimental.

En dos matraces erlenmeyer de 10 ml con 5 mg del profármaco (VII), se les adicionaron 7 ml de ácido clorhídrico 0.01N, y se mantuvieron en agitación en baño de agua a 37°C durante 24 hr. Luego, el contenido de los matraces fueron filtrados a través de un vidrio poroso (Pyrex 36060), las soluciones saturadas que se obtuvieron se les determinó su absorbancia a 234 nm utilizándose como blanco la solución de ácido clorhídrico 0.01N. El pH final de ambas soluciones se midió con potenciómetro resultando ser en promedio de 2.08. El valor de las absorbancias se muestra a continuación:

**Absorbancia a 234 nm del matraz No.1= 0.646**

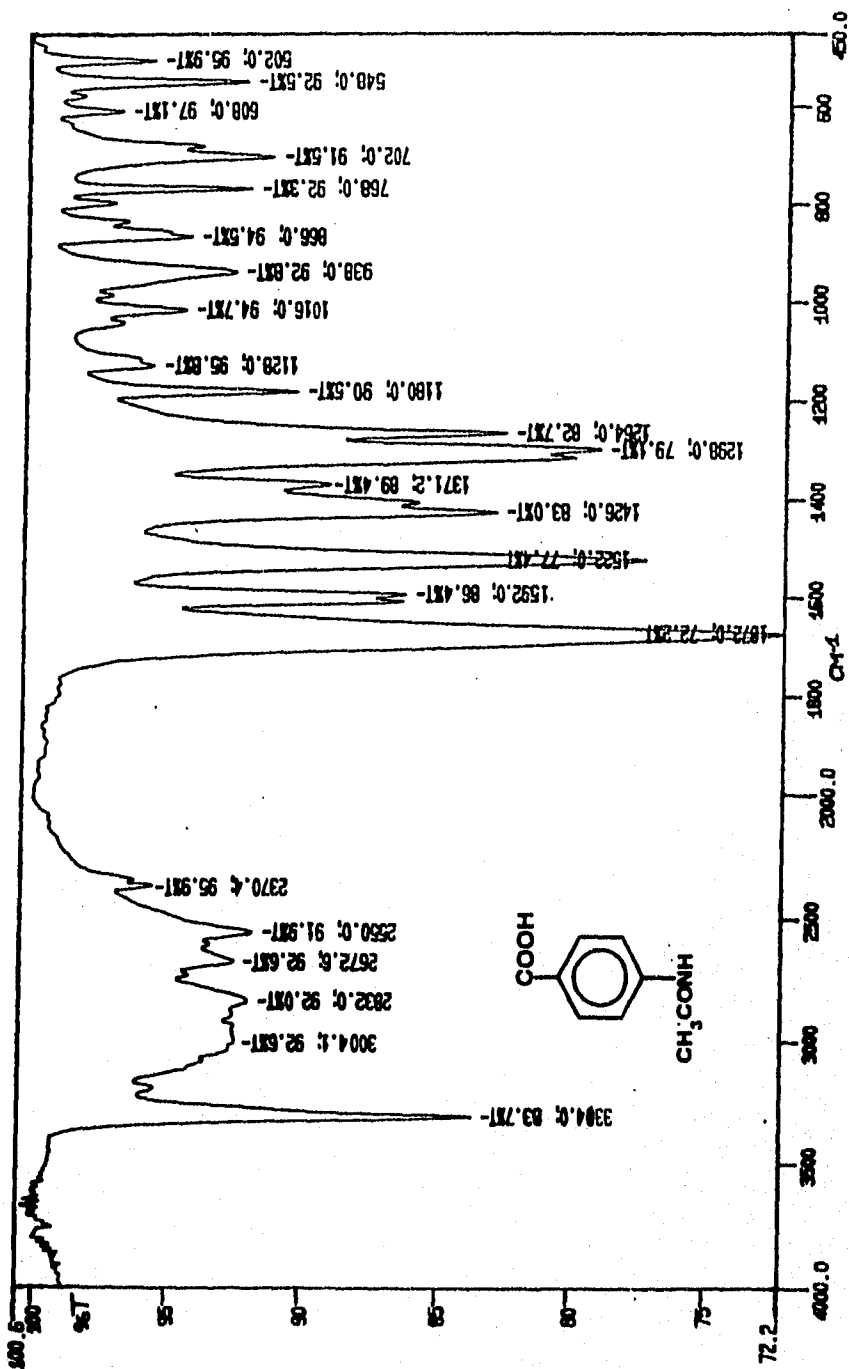
**Absorbancia a 234nm del matraz No.2= 0.620**

**Absorbancia promedio= 0.633**

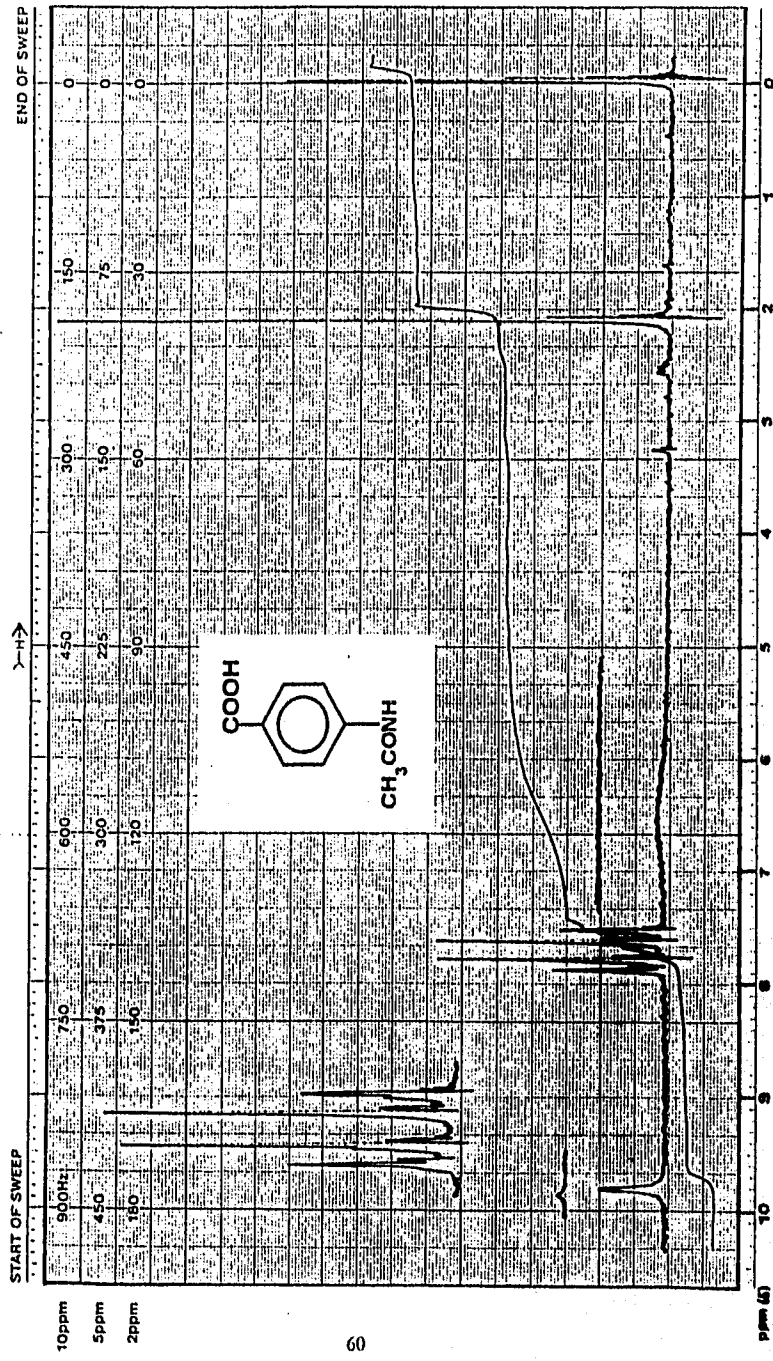
Por medio de la curva patrón, se determinó la solubilidad acuosa del profármaco (VII) a pH=2, que resultó ser de 11.69 µg.

## 9. ESPECTROS

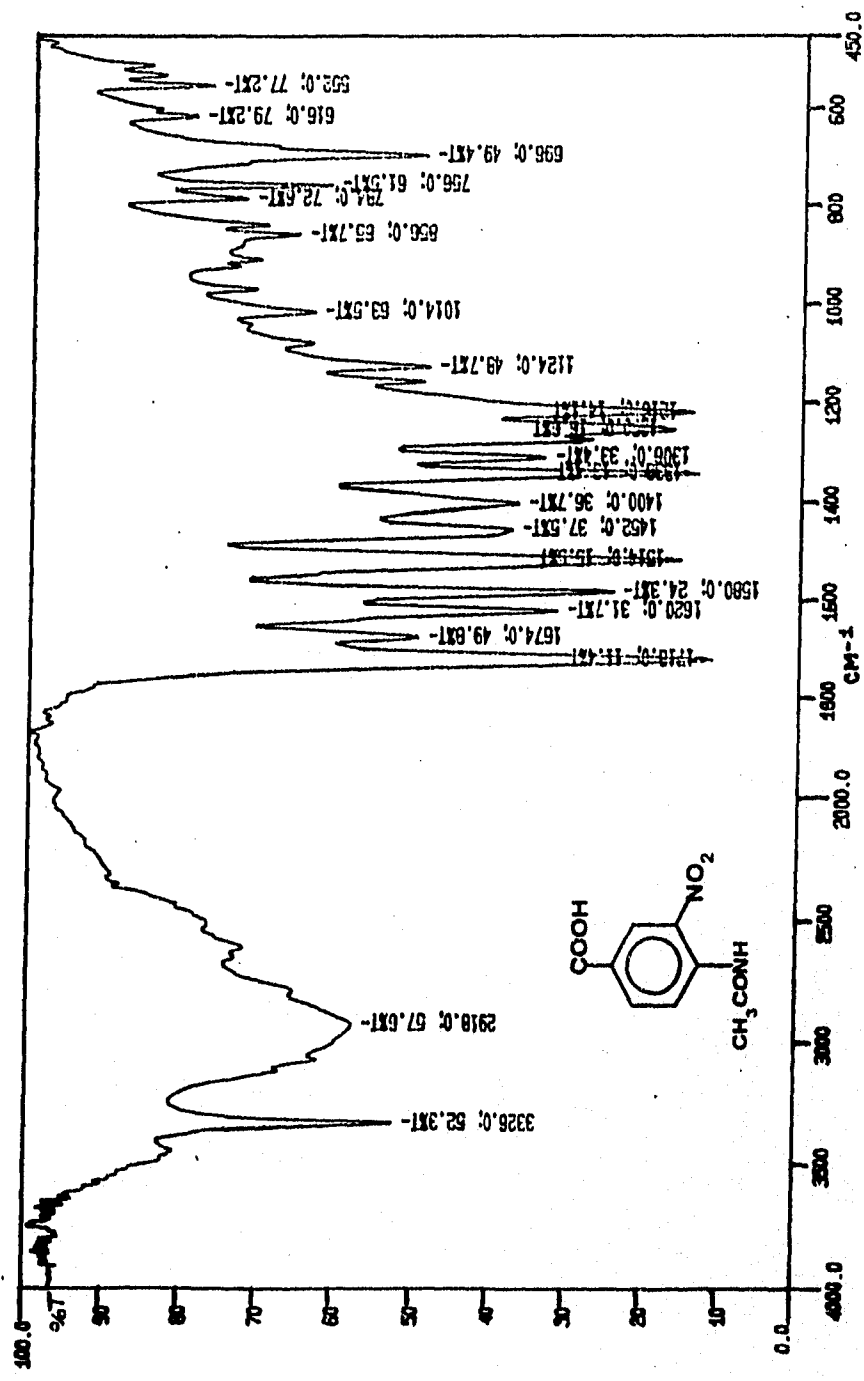
ESPECTROS



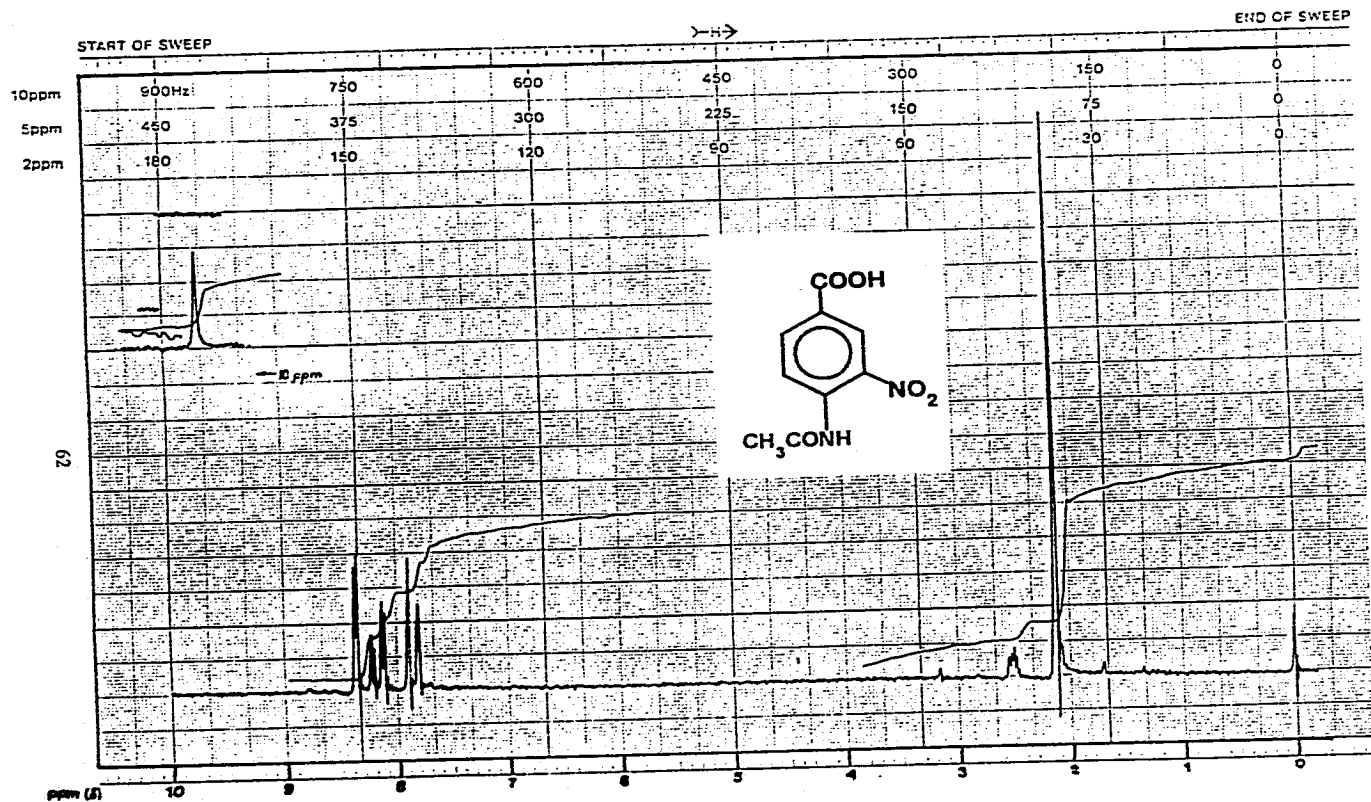
ESPECTRO No.1. IR (KBr) DEL ACIDO 4-ACETAMIDOBENZOICO.



ESPECTRO No. 2. <sup>1</sup>H RMN (90MHz) DEL ACIDO 4-ACETAMIDOBENZOICO.



ESPECTRO No. 3. IR (KBr) DEL ACIDO 4-ACETAMIDO-3-NITROBENZOICO.

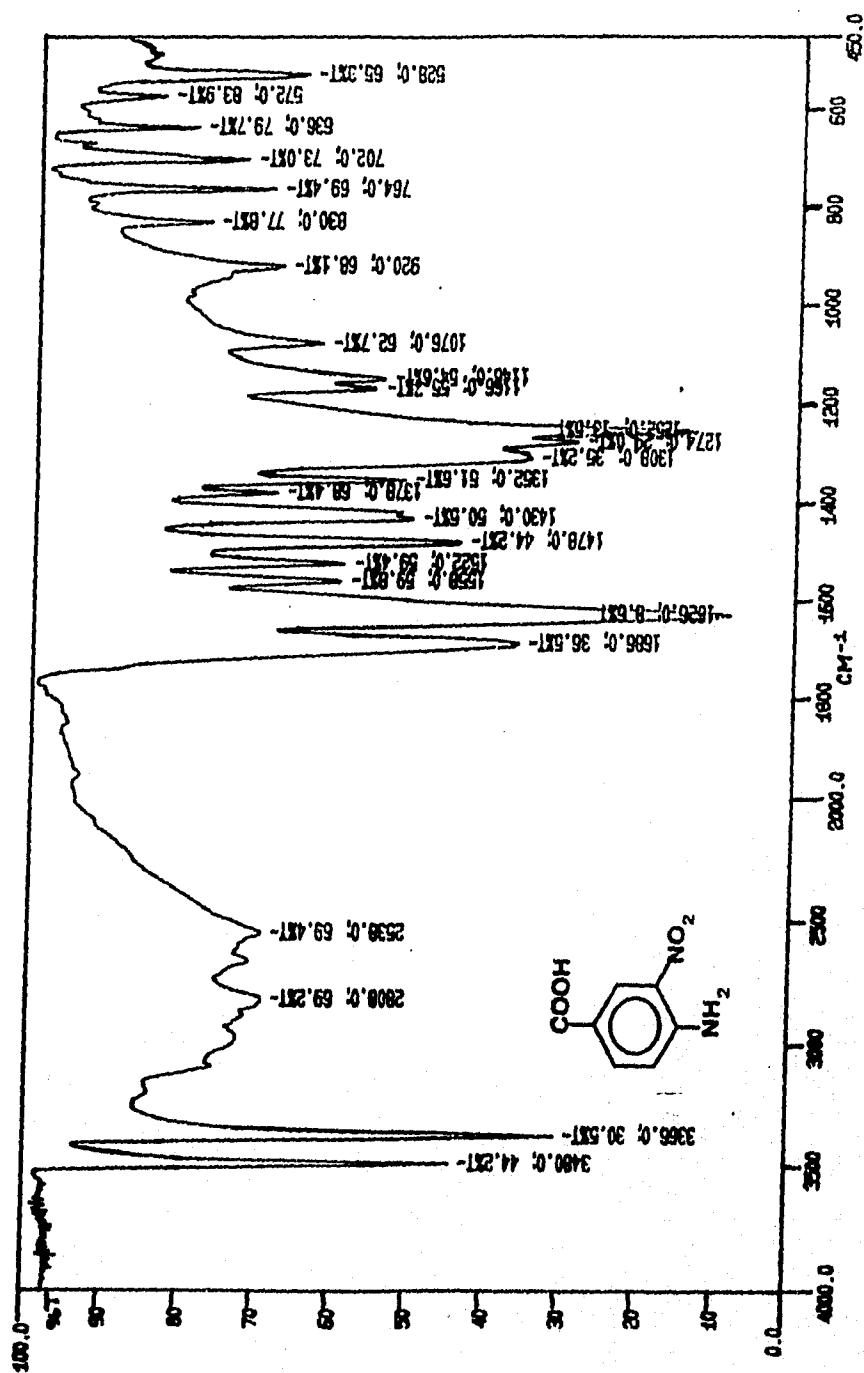


ESPECTROS

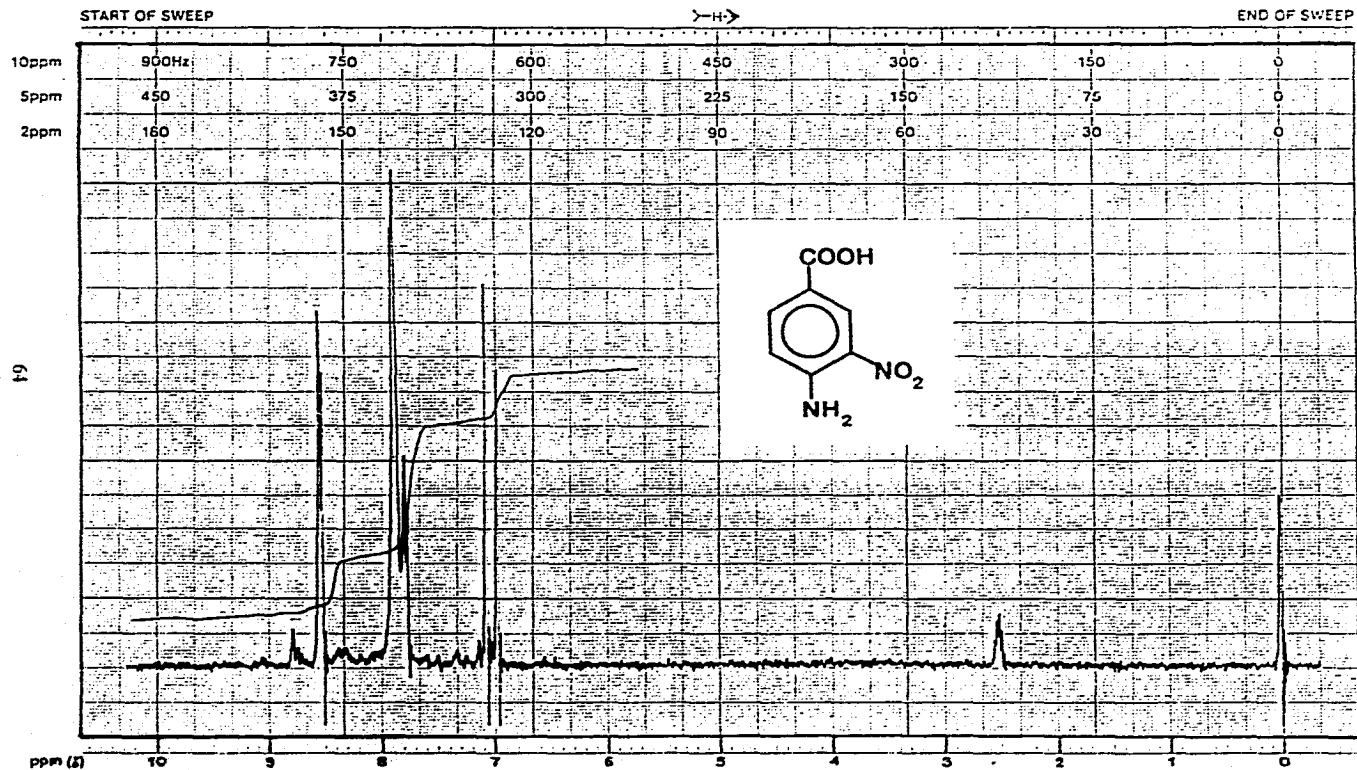
ESPECTRO No. 4. <sup>1</sup>H RMN (90MHZ) DEL ACIDO 4-ACETAMIDO-3-NITROBENZOICO.



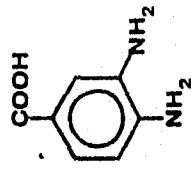
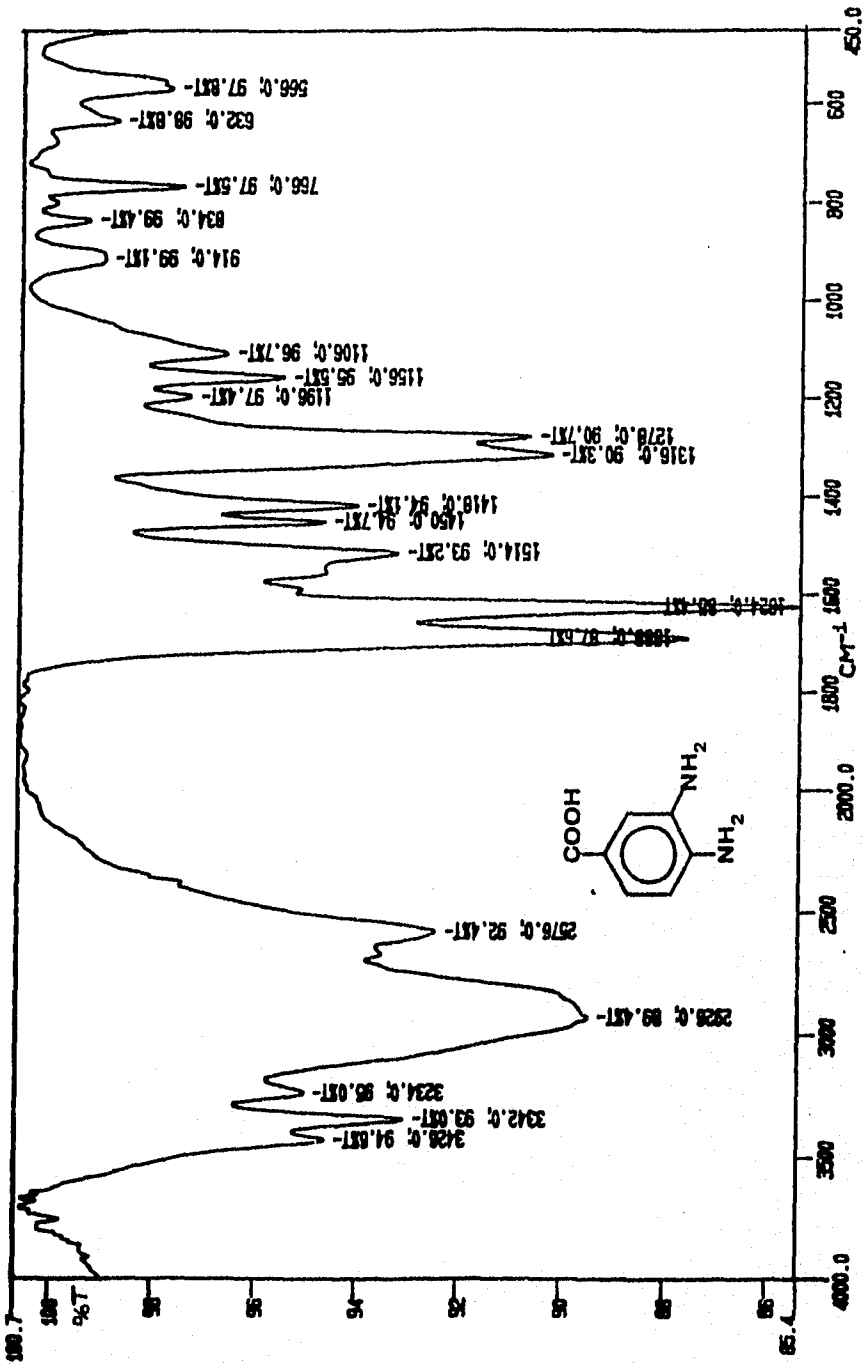
ESPECTROS



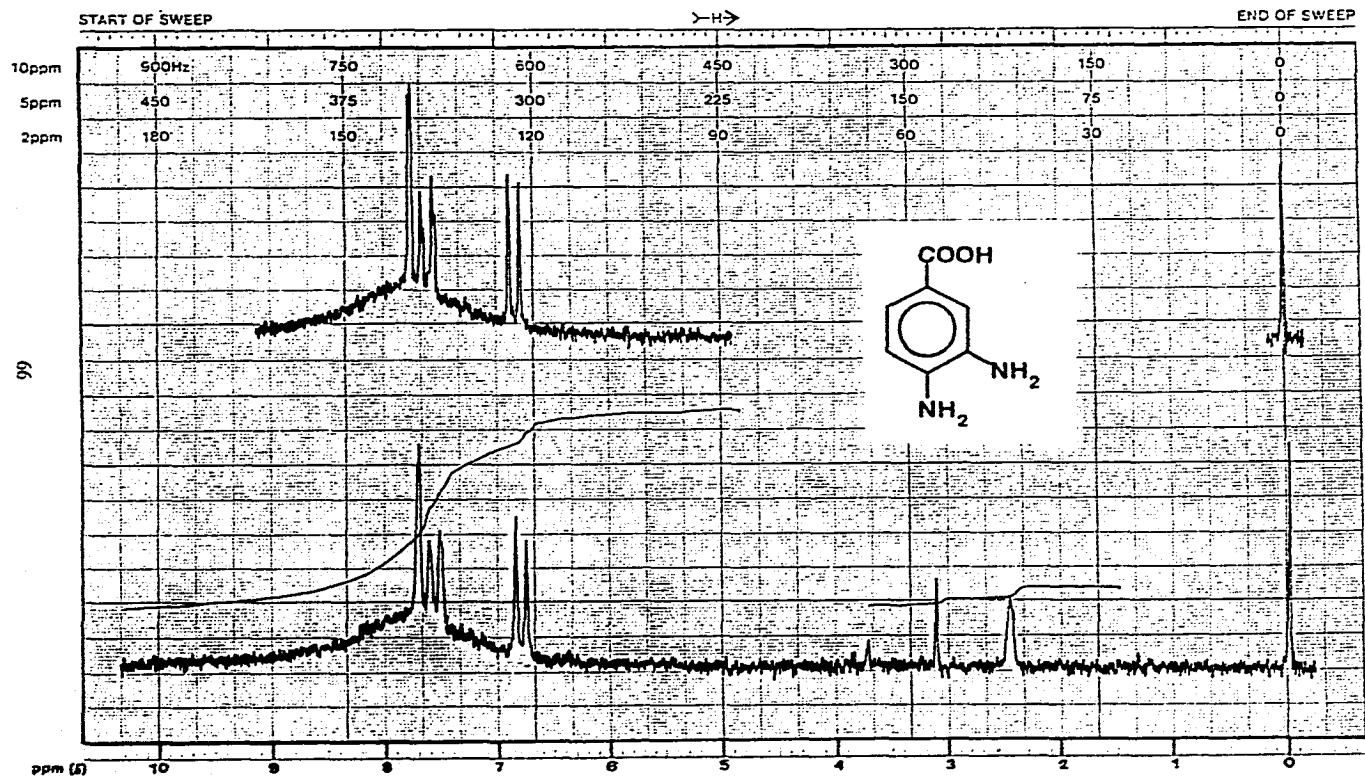
ESPECTRO No. 5. IR (KBr) DEL ACIDO 4-AMINO-3-NITROBENZOICO.



ESPECTRO No. 6. <sup>1</sup>H RMN (90MHz) DEL ACIDO 4-AMINO-3-NITROBENZOICO.

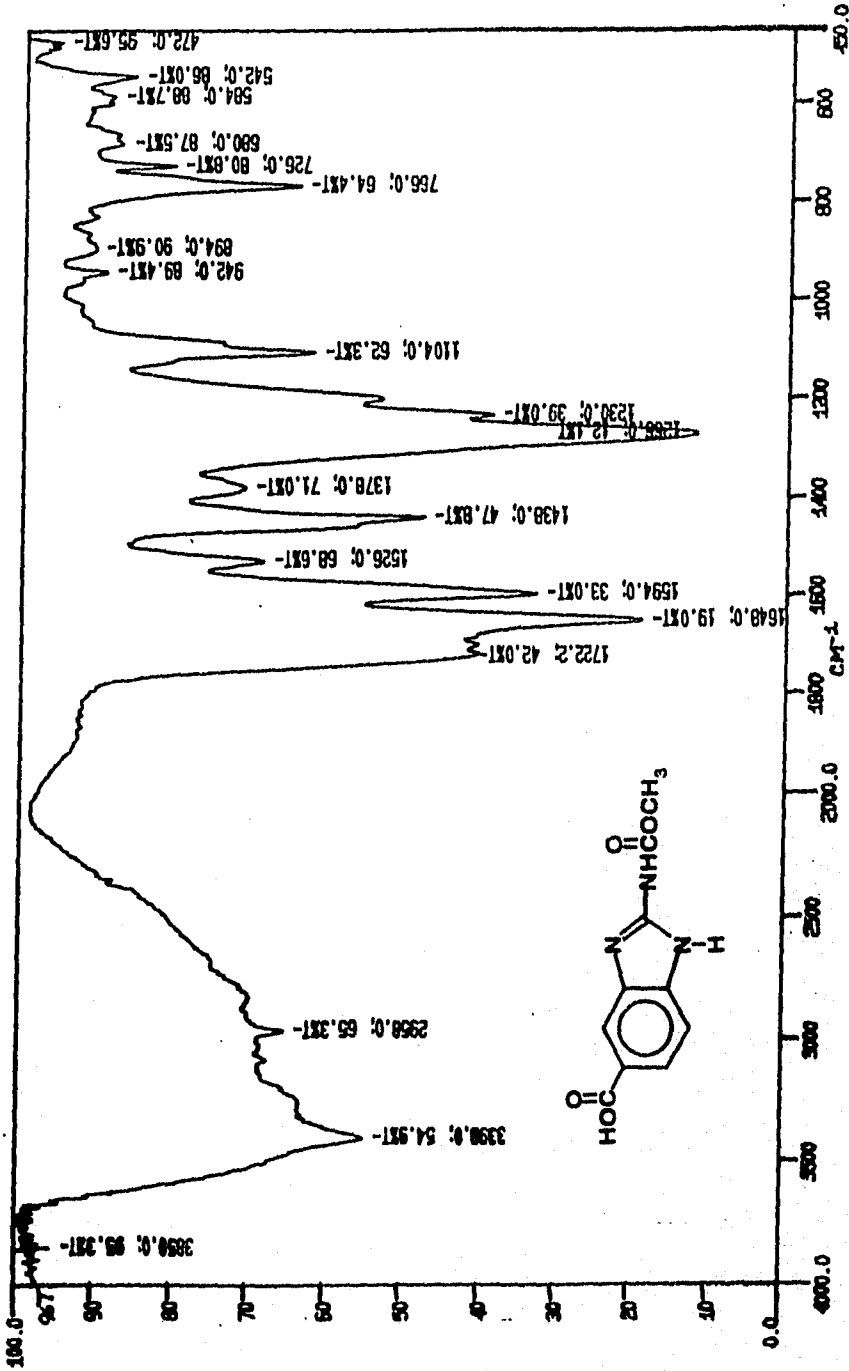


ESPECTRO No. 7. IR (KBr) DEL ACIDO 3, 4-DIAMINOBENZOICO.

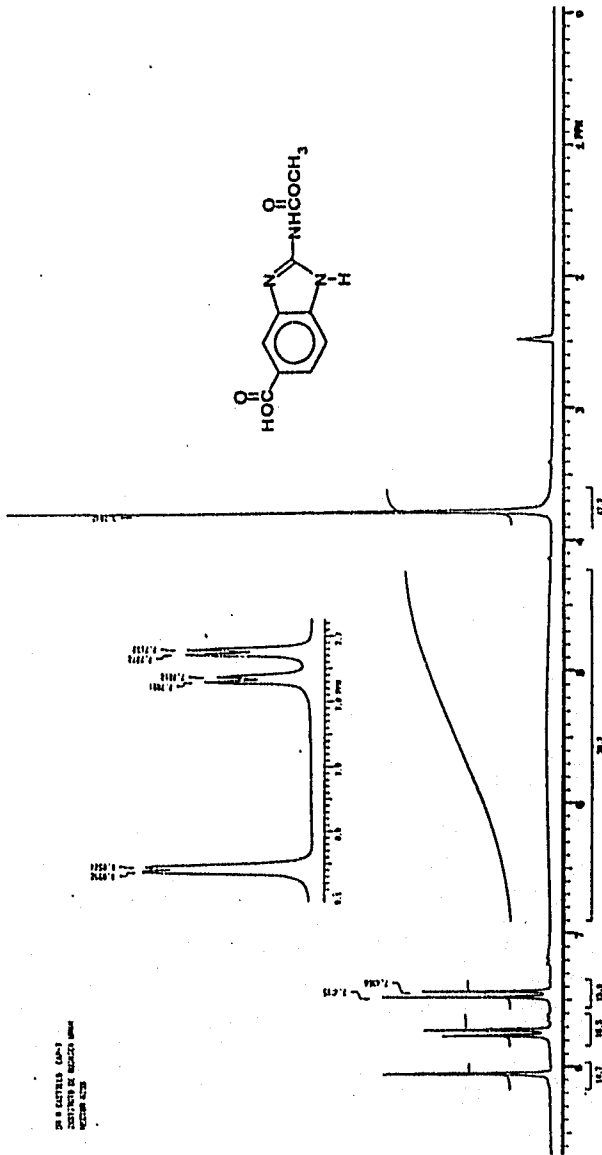


ESPECTRO No. 8. <sup>1</sup>H RMN (90MHz) DEL ACIDO 3, 4-DIAMINO BENZOICO.

ESPECTROS



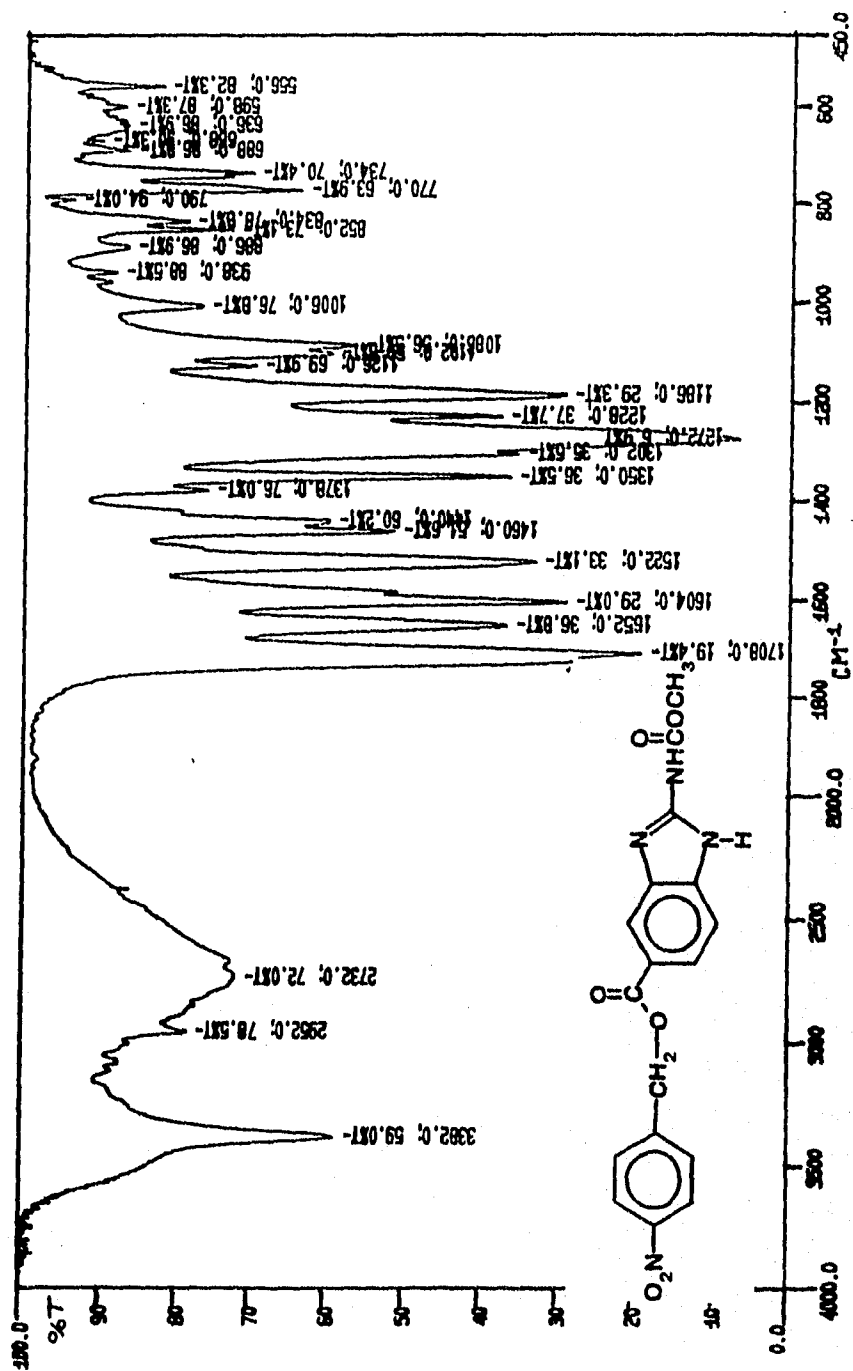
ESPECTRO No. 9. IR (KM) DEL 5-CARBOXI-1H-BENCIMIDAZOL-2-IL CARBAMATO DE METILO.



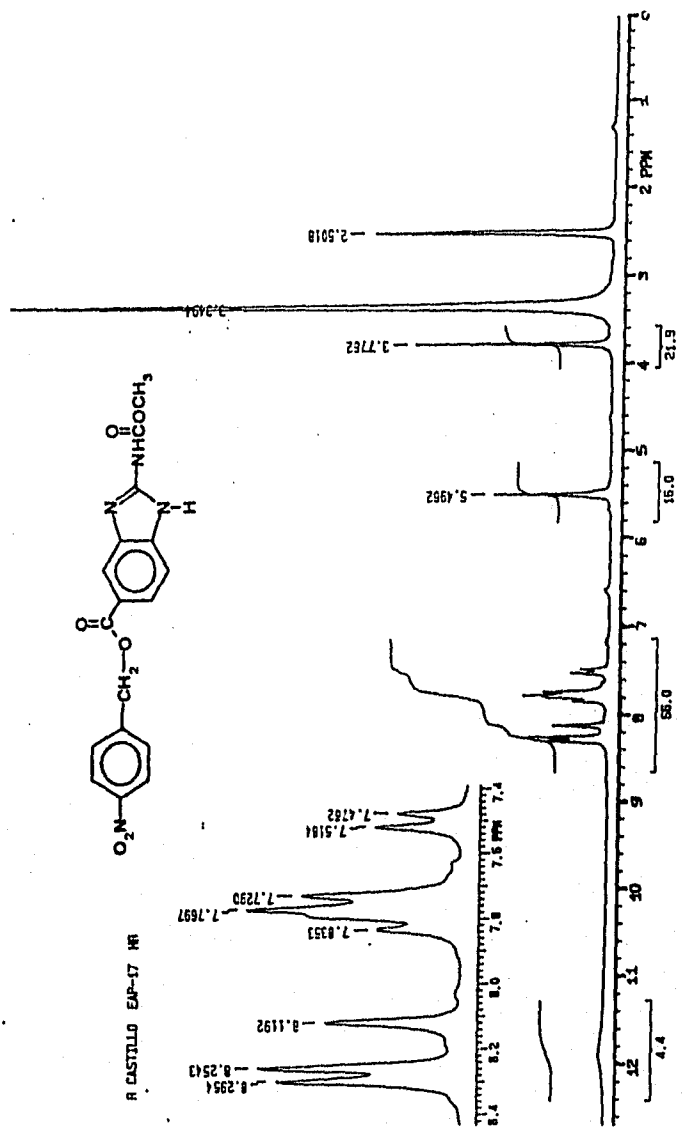
DR. R. CASTELLÓ GARCÍA  
 INSTITUTO DE QUÍMICA  
 UNIVERSIDAD DE VALENCIA

ESPECTRO NO. 16. <sup>1</sup>H RMN (300MHz) DEL 5-CARBOXI-1H-BENZIMIDAZOL-2-IL CARBAMATO DE METILO.

ESPECTROS



ESPECTRO No. 11. IR (KB) DEL 5-(4-NITROBENZIL-OXI-CARBONIL)-1H-BENZIMIDAZOL-2-IL CARBAMATO DE METILO.

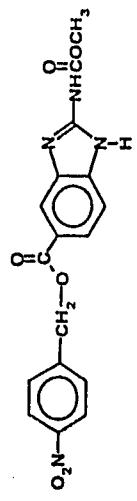
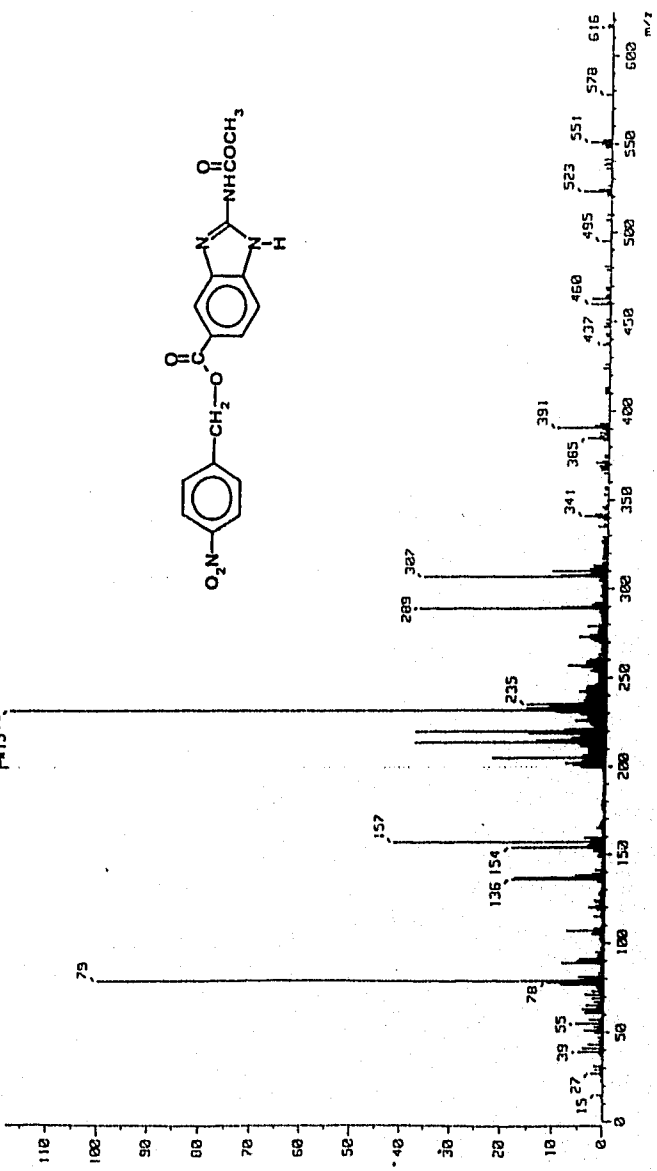


ESPECTRO No. 12. <sup>1</sup>H RMN (300MHz) DEL 5-(4-NITROBENCIL-OXI-CARBONIL)-1H-BENCIMIDAZOL-2-IL CARBAMATO DE METILO.



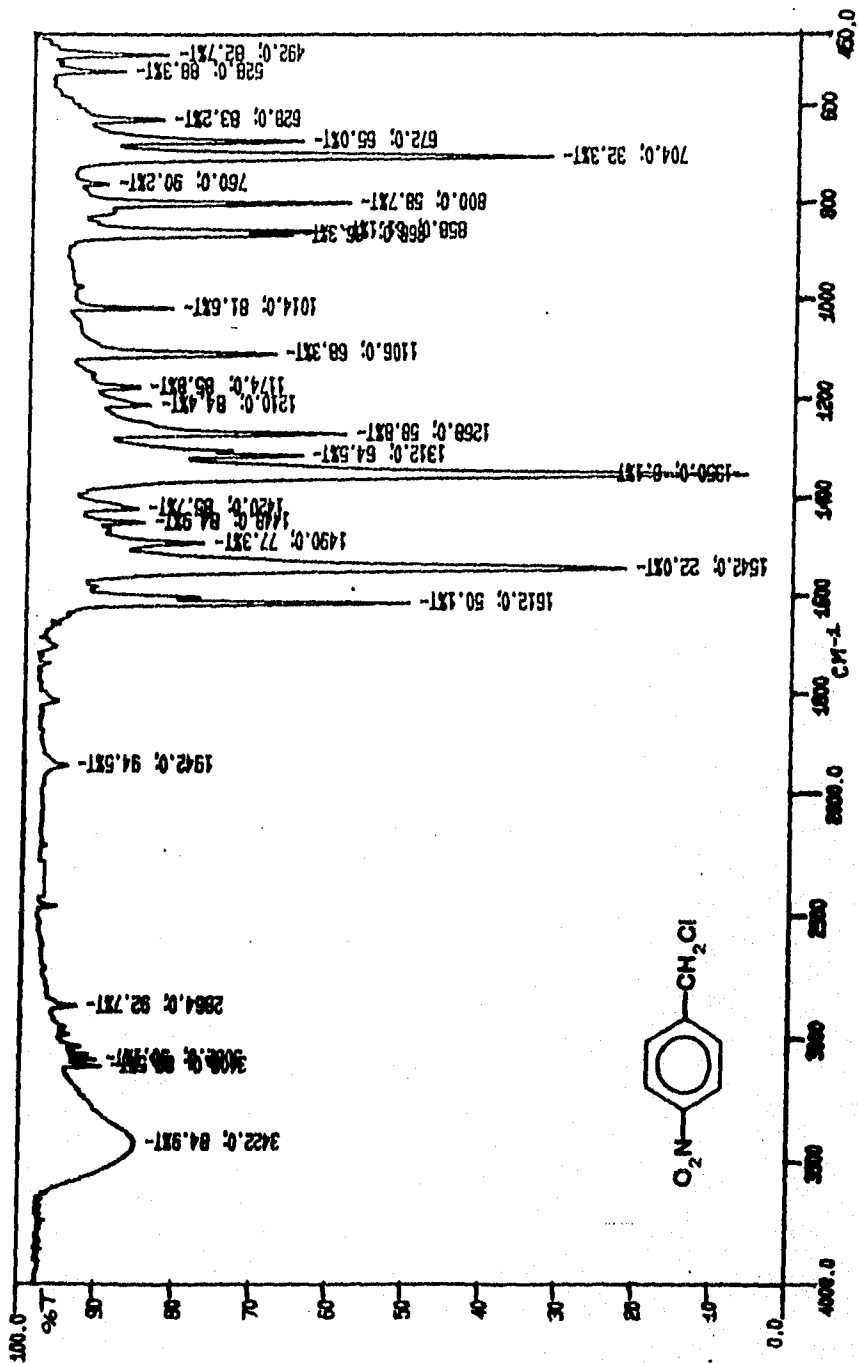
[ Mass Spectrum ]  
 Date : 13-Oct-95 12:49  
 Data : De-Castillo  
 Sample: Esp-17  
 Note : Oct-13  
 Inlet : Direct Ion Mode : FID+  
 Spectrum Type : Regular (RF-Linear)  
 RT : 0.00 min. Scan# : 1  
 BP : m/z 79.0000 Int. : 158.88  
 Output m/z range : 0.0000 to 625.1548  
 206567

Temp : 134.1 deg.C  
 Cut Level : 0.00 %

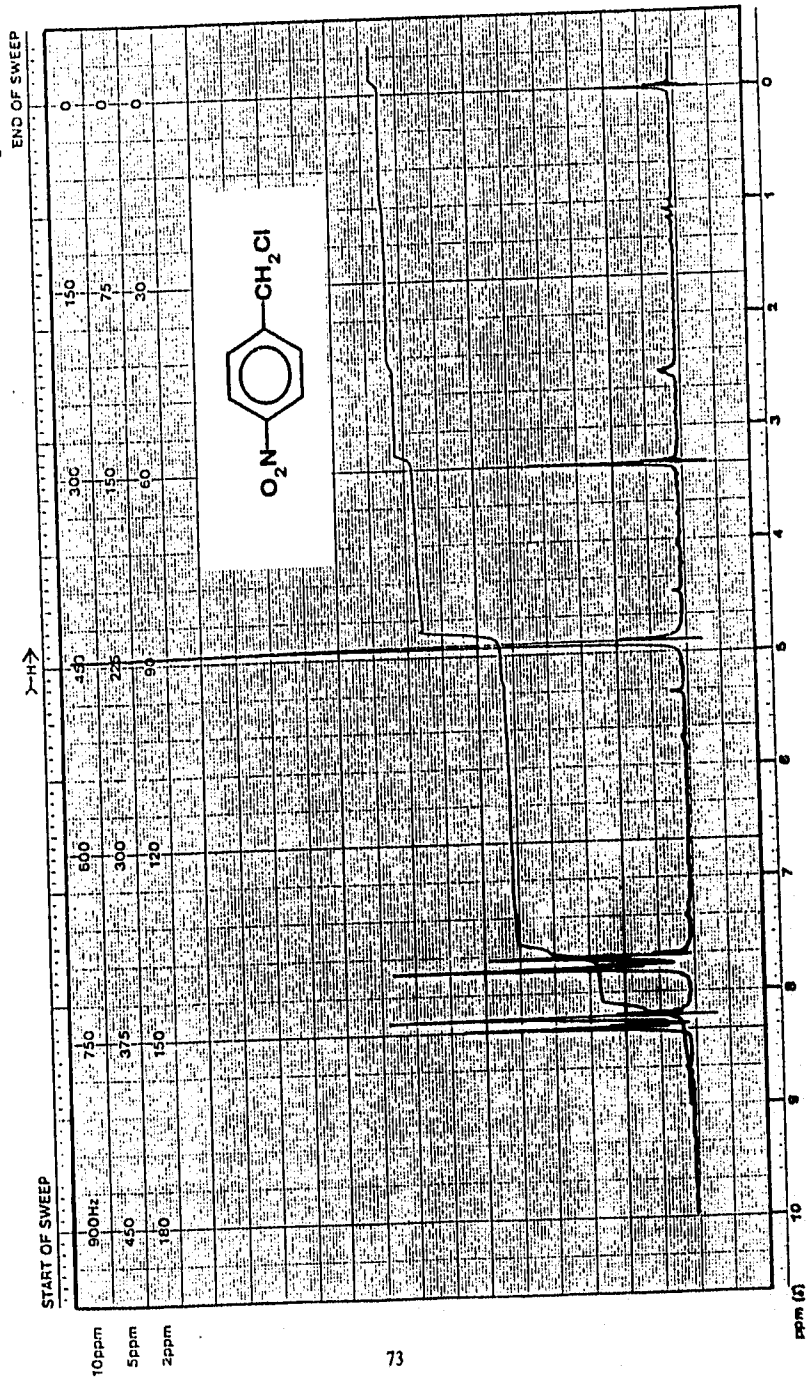


ESPECTRO No. 13. EM- FAB\* (ALCOHOL m-NITROBENCILICO) DEL 5-(4-NITROBENCILICO)-OXI-CARBONIL-1H-BENCIMIDAZOL-2-IL CARBAMATO DE METILO.

ESPECTROS



ESPECTRO No. 14. IR (KBr) DEL CLORURO DE 4-NITROBENCULO.



ESPECTRO No. 15. <sup>1</sup>H RMN (90MHz) DEL CLORURO DE 4-NITROBENCULO.

## 10. BIBLIOGRAFIA.

1. Romero Caballero Raúl. Microbiología y parasitología humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. 1<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana. **1993**; pp. 635-542.
2. Craig & Faust. Parasitología Clínica. Salvat Editores Barcelona **1984**; pp. 361-389.
3. Brown H.W. & Neva F.A. Parasitología Clínica. 5<sup>a</sup> ed. Nueva Editorial Interamericana. **1985**; pp. 153-166.
4. Siya Ram, Dean S. Wise, Linda L. Wotring, John N. Mc. Call, Leroy B. Townsend. Synthesis and Biological Activity of Certain Alkyl 5-(Alkoxy Carbonyl)-1H-Benzimidazole-2-Carbamates and Related Derivatives: A new Class of Potential Antineoplastic and Antifilarial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1992**; *35*(3): pp. 539-547.
5. Satyavan Sharma. Drugs for Filariasis: Four Decades of Research, Advances in Drug Research. **1993**; *Vol 24*: pp. 199-251.
6. Omar-MS; Raouf-AM; al-Amari-O.M. Histochemical Distribution of Esterases in Adult *Onchocerca fasciata* (Filarioidea; Onchocerciadae). *Tropical Medicinal Parasitology*. **1993**; *44*(4): pp. 295-298.
7. Campo-Aasen-I. Hydrolitic Activity of an Onchocercoma. *Acta Cientifica Venezolana*. **1992**; *43*(3): pp. 164-166.

8. E.A. Vande Waa. Chemotherapy of Filariases. *Parasitology Today*. 1991; 7(8): pp. 194-199.
9. C.D. Ginger. Filarial Worms: Target for Drugs. *Parasitology Today*. 1991 7(10): pp. 262-264.
10. S. Lustigman. Molling, Enzymes and New Targets for Chemotherapy of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Today*. 1993; 9(8): pp. 294-297.
11. Korolkovas Andrejus. *Essentials of Medicinal Chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley Interscience Publication. 1988; pp. 97-118.
12. Wells James I. *Pharmaceutical Preformulations: The Physicochemical Properties of Drugs*. Ellis Howwood Limited. Great Britain. 1988; pp. 21-83, 103-107.
13. E.P. Serjeant. *The Determination of Ionization Constants*. 3<sup>th</sup> ed. Ed. Chapman and Hall, N.Y. 1984; pp. 70-95.
14. D.D. Perrin, Boyd Dempsey. *Buffer for pH and Metal Ion Control*. *Science Paper Backs*. 1985; pp. 128-155.
15. Jung Cook H. Fuentes Noriega I. Rodriguez Alvarado M. *Manual de Prácticas de Biofarmacia*. Facultad de Química UNAM. 1994; pp. 1-15.
16. Aldrich Chemical Company Limited, 1990; 3

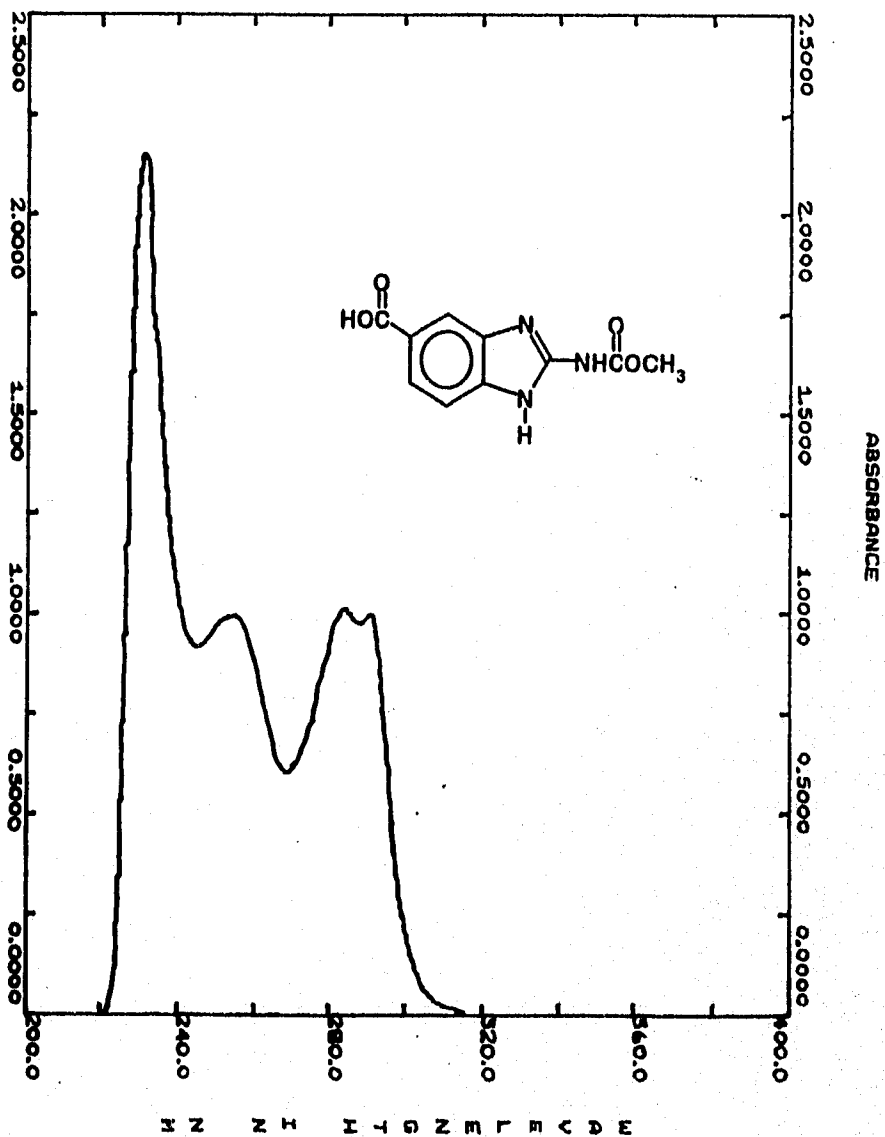
---

BIBLIOGRAFIA

17. Bundgaard H. Design and application of Prodrug. En A textbook of Drug Design and Development. *Krogsgaard-Larsen P., Bundgaard H* eds. Harwood Academic Publishers. Great Britain. **1991**; pp. 173-191.
  
18. Wermuth C. G. Designing Prodrugs and Bioprecursors. En Drug Design. *Fact or Fantasy*. *Jolles G.* edit. Academic Press. USA. **1984**; pp. 47-72.
  
19. Riley Thomas N. The Prodrug Concept and Drug Design and Development. *Journal of Chemical Education*. **1988**; pp. 65, 947-953.
  
20. Stella V. et al. Prodrugs. Do They Have Advantages in Clinical Practice?. *Drugs*. **1985**; pp. 29, 455-473.
  
21. Lacey E. The Role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* **1988**; 15(7): pp. 886-888.
  
22. Yalkowsky S.H, Morozowich W. A Physical Chemical. Basis for the Design of Orally Active Prodrugs. En *Drug Design*. Academic Press. U.S.A. **1980**; IX: p.p. 122-167.

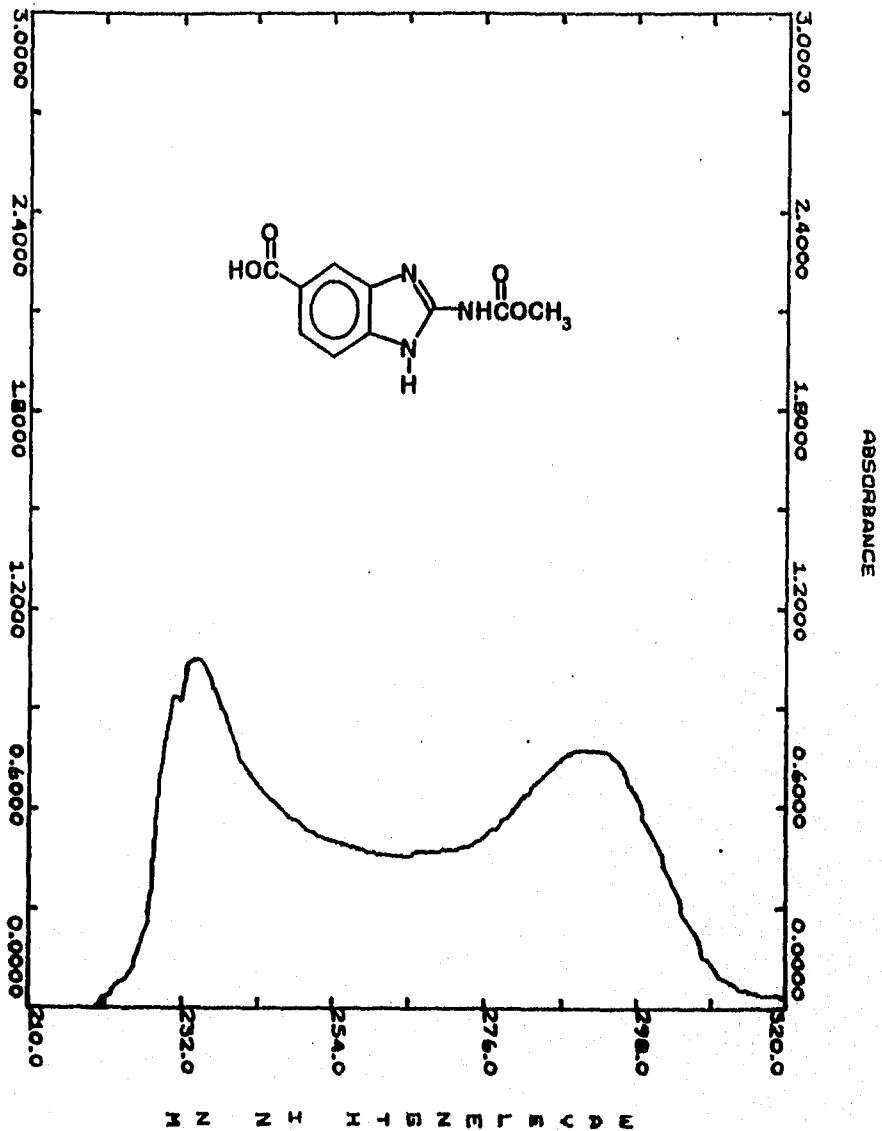
## I. APENDICE

1.- Barrido espectrofotométrico UV/Vis. de 400-200 nm del compuesto filarídica (V) a pH=2 a una concentración de 20µg/ml

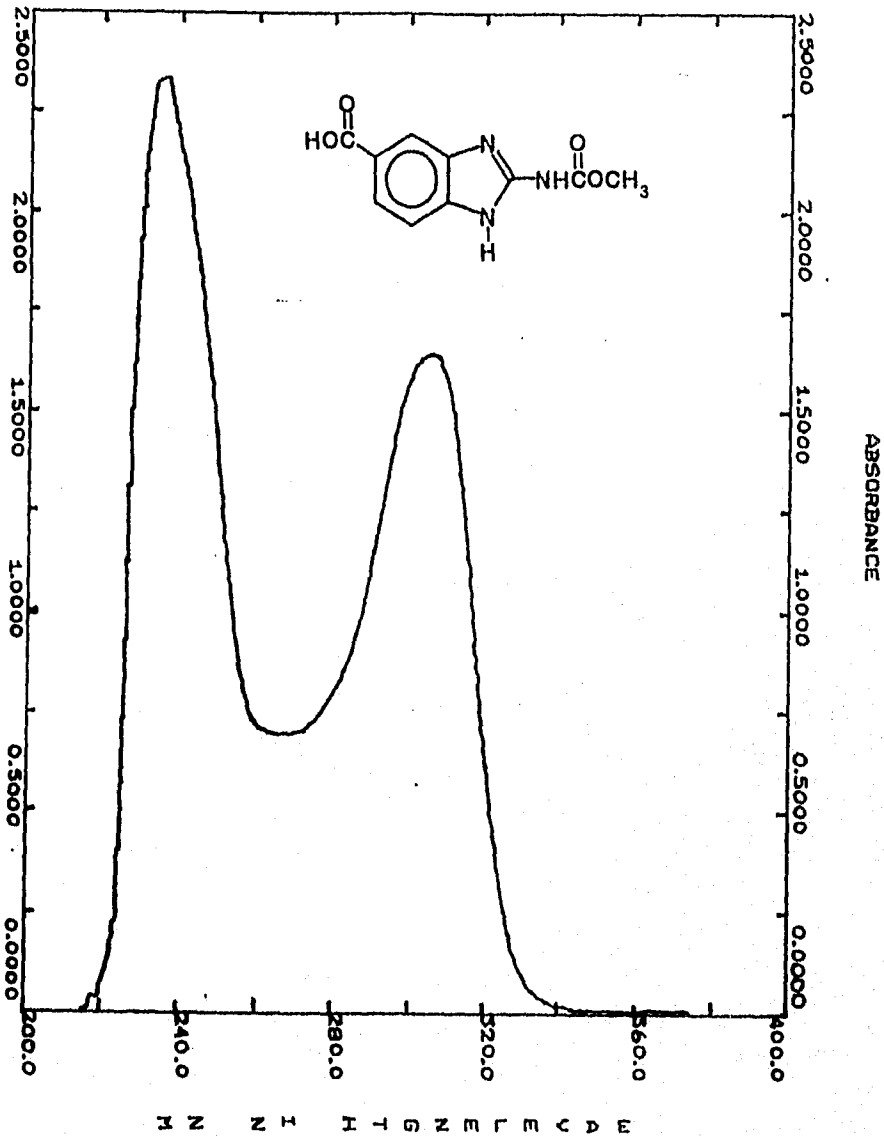




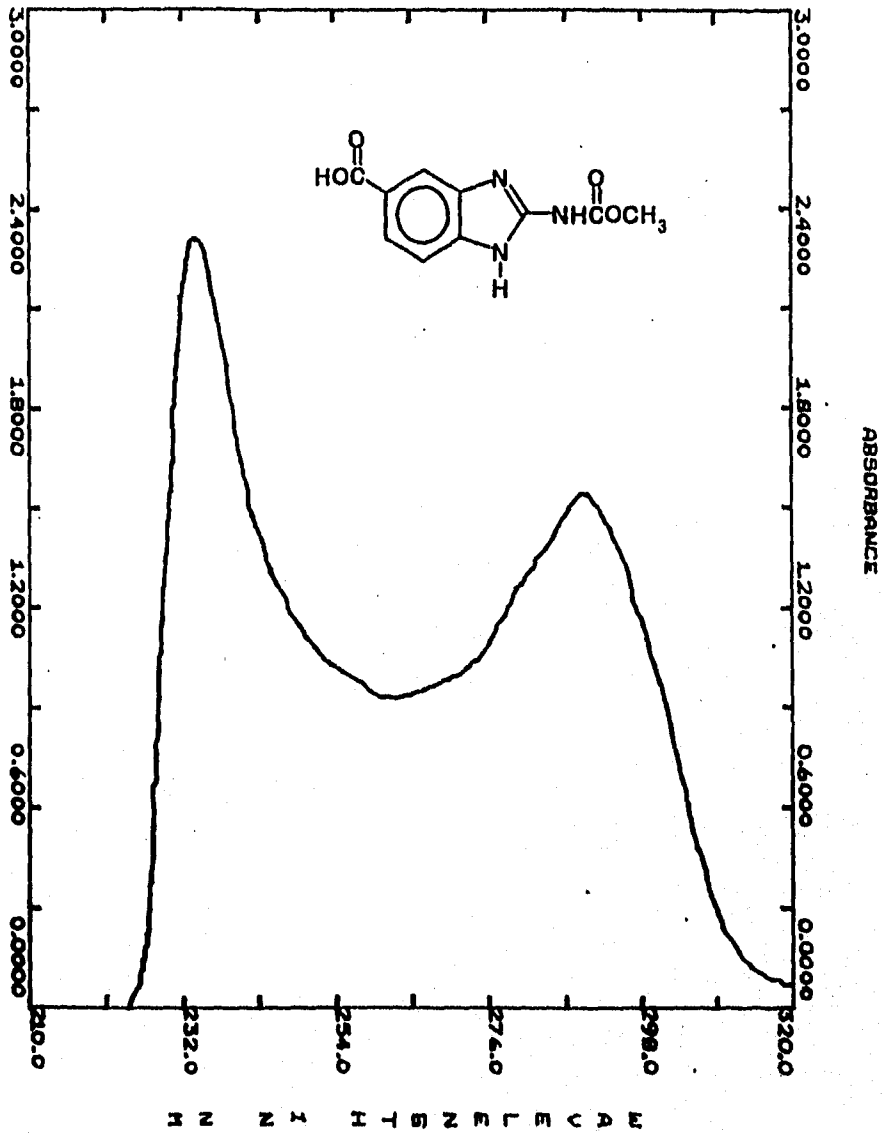
2.- Barrido espectrofotométrico UV/Vis. de 320-210 nm del compuesto filaricida (V) a pH=7 a una concentración de 15µg/ml



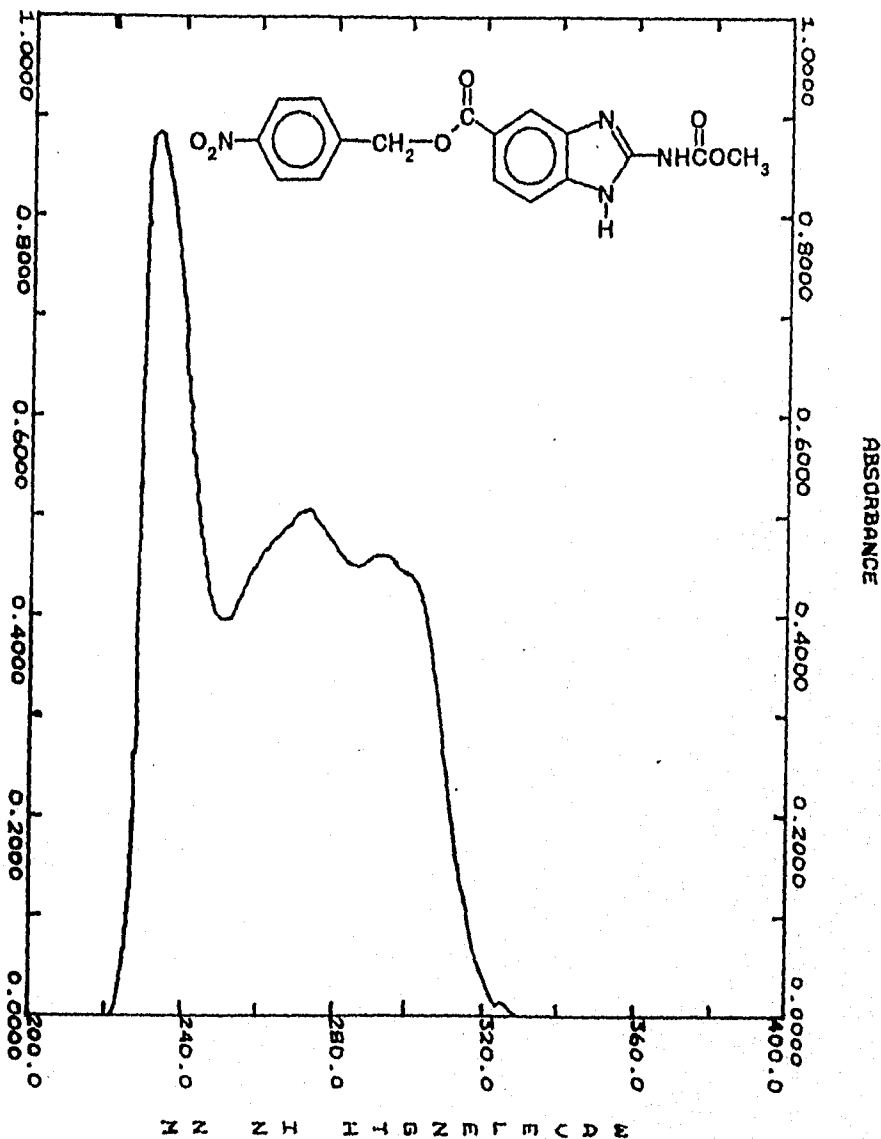
3.- Barrido espectrofotométrico UV/Vis. de 400-200 nm del compuesto filaricida (V) a pH=11 a una concentración de 20µg/ml



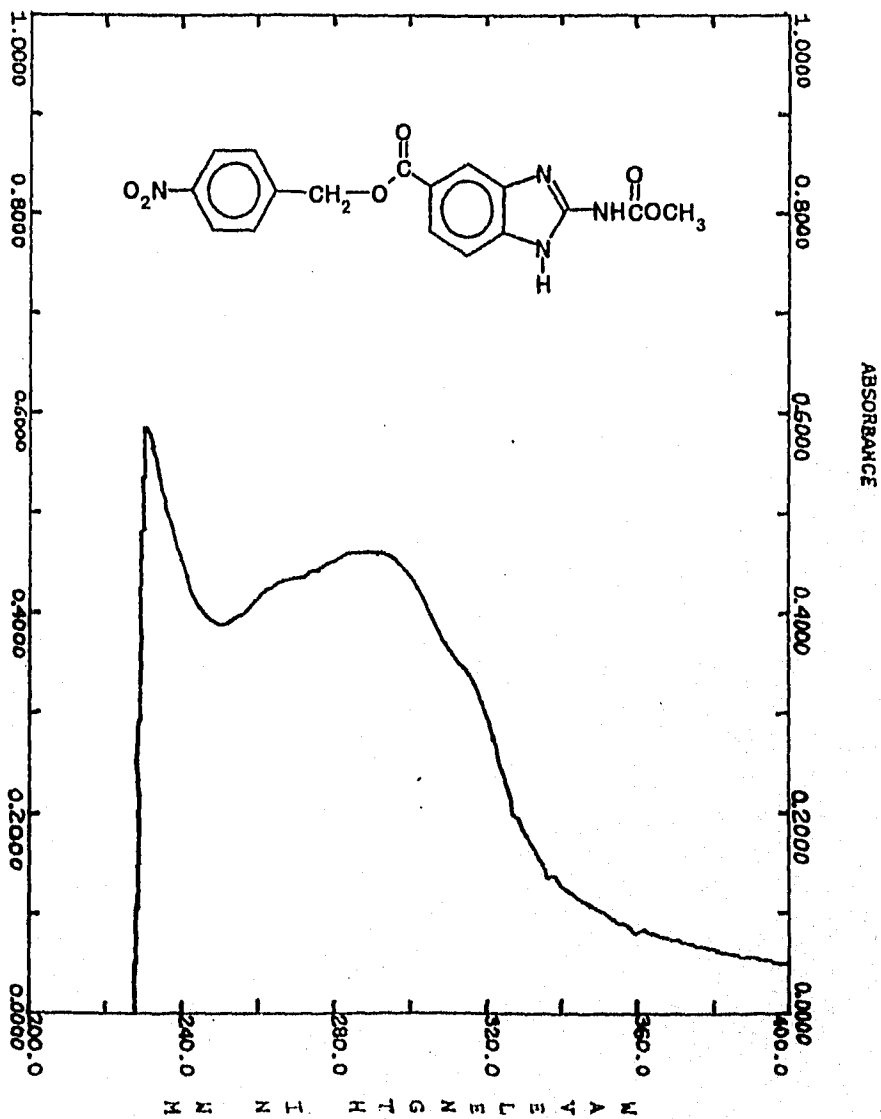
4.- Barrido espectrofotométrico UV/Vis. de 320-210 nm del compuesto filaricida (V) en solución acuosa a concentración de 30µg/ml. (se observa longitud de onda de máxima absorción).



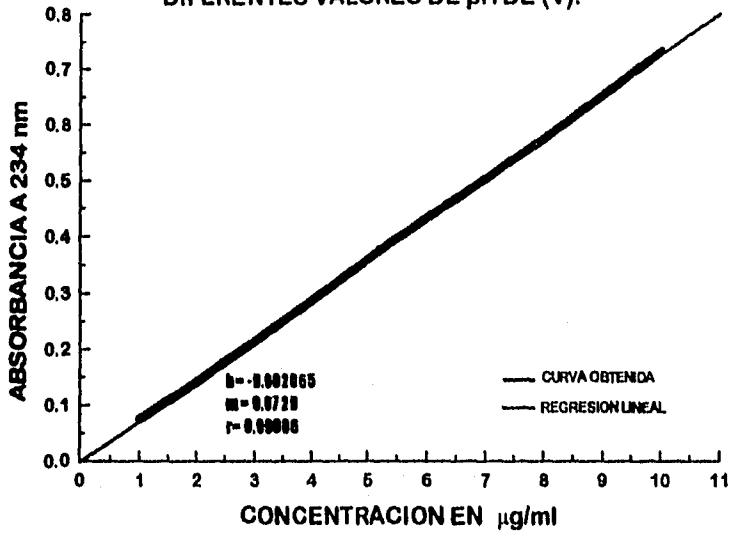
5.- Barrido espectrofotométrico UV/Vis. de 400-200 nm del compuesto profármaco (VII) en octanol a una concentración de 10µg/ml. (se observa longitud de onda de máxima absorción).



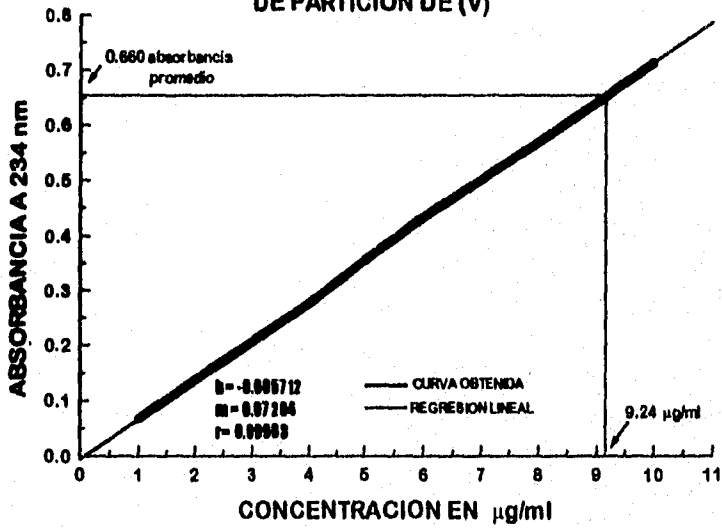
6.- Barrido espectrofotométrico UV/Vis. de 400-200 nm del compuesto profármaco (VII) en solución acuosa (cosolvenca con DMSO) a una concentración de 10µg/ml. (se observa longitud de onda de máxima absorción).



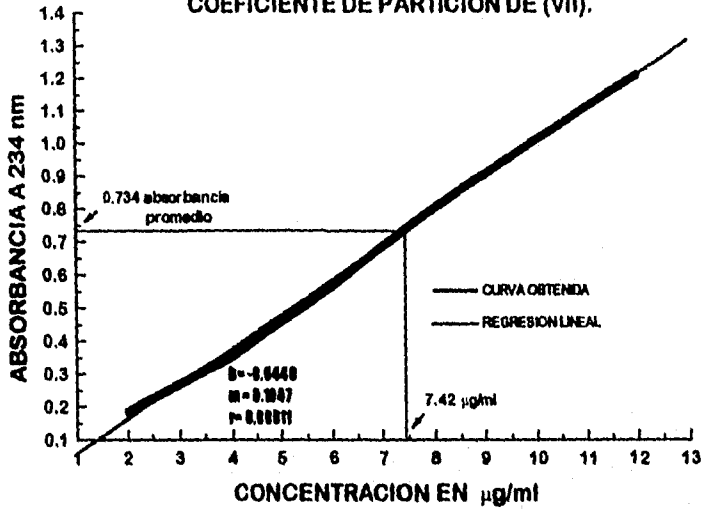
7.- CURVA PATRON PARA SOLUBILIDAD A DIFERENTES VALORES DE pH DE (V).



8.- CURVA PATRON PARA COEFICIENTE DE PARTICION DE (V)



9.- CURVA PATRON EN OCTANOL, PARA COEFICIENTE DE PARTICION DE (VII).



10.- CURVA PATRON PARA SOLUBILIDAD (COSOLVENCIA DMSO) A pH=2 DE (VII).

