



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación del comportamiento de dos profármacos
potenciales del ácido 2-(trifluorometil) 1H-bencimidazol-
5-carboxílico frente a *Giardia intestinalis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

BEATRIZ GODINEZ CHAPARRO



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MEXICO, D.F.

2005



m. 347886



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Prof. Alfonso Sebastián Lira Rocha
VOCAL	Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
SECRETARIO	Prof. Lilián Yépez Mulia
1er. SUPLENTE	Prof. Elena Guadalupe Ramírez López
2do. SUPLENTE	Prof. Alejandro Ortiz Osornio

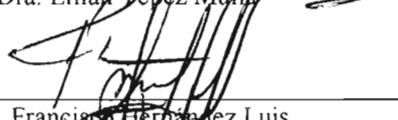
Sitio en donde se desarrolló el tema:

- Laboratorio 122, División de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.
- Laboratorio de Parasitología en la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en el Hospital de Pediatría en el Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS.

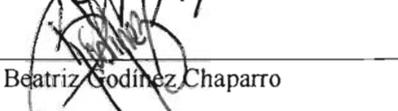
ASESOR


Dra. Lilián Yépez Mulia

SUPERVISOR TÉCNICO


Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE


Beatriz Godínez Chaparro

“Ten fe en tus propósitos y persevera en ellos con la confianza de hacerlos realidad, cualquier buen éxito súmalo al estímulo de tus esfuerzos. Cualquier fracaso anótalo en el catálogo de tus experiencias; mas nunca abandones tu tarea ni la empobrezcas con tu desaliento”

DEDICATORIAS

- A mis padres:

María Esther Chaparro Gómez y Juan C. Godínez Dávalos

Verdaderos símbolos de entrega, amistad, jovialidad, sencillez, honradez, superación personal, con respeto y cariño....

- A mis hermanos:

Beto y Gely, por su apoyo y cariño brindado durante todos estos años, así como por su entereza y determinación para alcanzar sus metas....

- A **Sonia López**:

Por ser mi maestra y guía de esta maravillosa vida.

AGRADECIMIENTOS

☞ A mis queridos Papas **Esther** y **Juan**, los cuales amo y admiro, por haber forjado mi carácter, darme las herramientas para caminar sola en este mundo, tenderme la mano o hasta por que no decirlo cargarme cuando lo necesite. Además de compartir conmigo tantos momentos de felicidad. Mil Gracias por ser mis papas!

☞ A mis pequeños hermanos; **Beto** y **Gely** por soportar mis volubilidades, pero recuerden que los quiero mucho y que sin ustedes no podría ser la hermana que soy.

☞ A **Sonia López**, aunque Dios decidió que era el momento de que partieras de esta vida. El tiempo que estuve a tu lado, fue suficiente para que despertaras a mi niña interior, a que saliera de mi burbuja de jabón, expandiendo los límites del yo. A hacerme responsable de mi y mis actos, entre muchas cosas más. Y como no admirar a una gran Mujer. Fuiste un ángel para mí en el momento de mayor dolor de mi vida. Muchas Gracias **Sonia** donde quiera que estés.

☞ Al **Dr. Francisco Hernández**, por ser un ejemplo a seguir en mi vida, por apoyarme y estar pendiente en la realización tanto experimental como escrita de esta tesis. Por la paciencia que me tuvo. Y por que no decirlo fue el mejor profesor que tuve en la carrera.

☞ A la **Dra. Lilian Yépez**. Por ofrecerme la oportunidad de ingresar a su grupo de trabajo, y proporcionándome las herramientas necesarias para

Agradecimientos

concluir con la tesis. Sin olvidar el tiempo que dedico a la corrección del trabajo escrito.

☞ Al **Dr. Rafael Castillo** y la **Mtra. Alicia Hernández**. Ambos fueron mis profesores de Química Orgánica en la carrera, además de ser buenos profesores son excelentes personas, gracias por permitirme conocerlos y hacer sentirme parte del laboratorio.

☞ A mis amigos entrañables del “Grupo selecto”; **Carlos Rubén, Poncho, Vane, Lety, Paty, Edith**. Que fueron mi segunda familia durante el transcurso de la carrera, mi consuelo en los momentos difíciles, pero sobre todo, por regalarme tantos momentos de felicidad a su lado.

☞ A mis dos amigos incondicionales **Aldo** y **Juan Manuel**, por acompañarme en los primeros cuatro semestres de esta maravillosa carrera; sin ellos probablemente me hubiera encerrado en mi burbuja de jabón.

☞ Como olvidarme de mis amigos **Javier** y **Gerardo** que junto con **Lety** y **Paty**, compartimos grandes momentos, en especial los días de entrega de premios del “Club de Solteros.”

☞ A mis compañeros del laboratorio 122 del Conjunto E, Facultad de Química. **Israel, Lalo, Gres, Paty, Nayeli, Fabián, José Luis, David, Maestra Olivia**, y **Walter**, por hacer mi estancia agradable y sentirme parte de este maravilloso laboratorio.

☞ También a mis compañeros del laboratorio de Parasitología en el Centro Medico Nacional Siglo XXI, **José, Amparo, Rosa, Jesús, Lety, Mike**,

Agradecimientos

Claudia, Lalo, Alejandro, Beatriz, Yareli. Por haberme permitido conocerlos y disfrutar el periodo de tiempo que estuve en el seguro social.

☞ A **Julio Hernández** por haberme tenido tanta paciencia como la entrega de enseñarme a manejar y resolver mis dudas sobre el HPLC.

☞ No crean que olvide a mis amigas que caminaron conmigo en algún momento de esta carrera, como lo son; **Mariana y Rebeca** que junto con **Lety, y Vane** fueron pioneras para que yo pudiera volver a confiar en la amistad de una mujer.

☞ A **Dios**, no por colocarte al final tienes menor importancia, simplemente a través de todas las personas que anteriormente mencione expresarte tu amor por mi.

☞ A la **UNAM** por acogerme dentro de sus filas de estudiantes desde la preparatoria, y darme las herramientas necesarias a través de mis profesores para enfrenarme al mundo laboral

☞ Al proyecto **DEGAPA PAFIIT IN203101** por el apoyo económico ofrecido tanto para la beca como los materiales utilizados en la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

	pag.
Introducción	1
1. Antecedentes	3
1.1. Las parasitosis como problemas de salud pública	3
1.2. <i>Giardia intestinalis</i> y Giardiasis	4
1.3. Los bencimidazoles como antiparasitarios	10
1.4. Los profármacos	18
1.5. Transporte a través de las membranas biológicas	21
2. Planteamiento del problema	23
3. Hipótesis	23
4. Objetivos	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos particulares	24
5. Metodología	25
5.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos FHL30 y FHL31 contra <i>G. intestinalis</i> por el método de resiembra	25
5.2. Determinación de las condiciones de trabajo para el análisis cuantitativo de FHL30 y FHL 31 por HPLC	27
5.3. Cuantificación de FHL30 y FHL31 en los sobrenadantes recuperados de la extracción del fluido de <i>G. intestinales</i>	27
5.4. Determinación de la estabilidad de los compuestos FHL30 y FHL31 en medio modificado TYI-S-33 complementado al 10% en un periodo de 48h por HPLC	30
6. Resultados	32
6.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos FHL30 y FHL31 contra <i>G. intestinalis</i> por el método de resiembra	33
6.2. Determinación de las condiciones de trabajo para el análisis cuantitativo de FHL30 y FHL 31 por HPLC	35
6.3. Cuantificación de FHL30 y FHL31 en los sobrenadantes recuperados de la extracción del fluido de <i>G. intestinalis</i> por HPLC	37
6.4. Estabilidad de los compuestos FHL30 y FHL31 en medio modificado TYI-S-33 complementado al 10% en un periodo de 48h por HPLC	37
7. Discusión de resultados	40
7.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos FHL30 y	

FHL31 contra <i>G. intestinalis</i> por el método de resiembra	40
7.2. Condiciones de trabajo para el análisis cuantitativo de FHL30 y FHL31 por HPLC	40
7.3. Cuantificación de FHL30 y FHL31 en los sobrenadantes recuperados de la extracción del fluido de <i>G. intestinales</i>	41
7.4. Estabilidad de los compuestos FHL30 y FHL31 en medio modificado TYI-S-33 complementado al 10% en un periodo de 48h por HPLC	42
8. Conclusiones	44
Bibliografía	45
Apéndice A	50
Apéndice B	54
Apéndice C	56
Apéndice D	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo 2002.....	3
Figura 2. Efermedades causadas por protozoarios intestinales más comunes en México en el 2003.....	4
Figura 3. Casos de Giardiasis en México por grupo de edades 2003.....	4
Figura 4. Estructuras del (A) trofozoito y (B) quiste de <i>G. intestinalis</i>	7
Figura 5. Ciclo de vida de <i>G. intestinalis</i> : A) trasmisión, B) desenquistamiento, C) reproducción del trofozoito, D) enquistamiento, E) re-infección.....	8
Figura 6. El tiabendazol y su metabolito inactivo.....	10
Figura 7. Estructura del Bencimidazol -2-carbamato de metilo moosustituído.....	14
Figura 8. Estructura y biocversión de un derivado biorreversible.....	19
Figura 9. Estructura de FHL30 y FHL31.....	21
Figura 10. Diagrama método de resiembra para la evaluación de la actividad antiparasitaria	26
Figura 11. Diagrama de flujo del método de extracción del fluido de <i>G. intestiales</i> ...	29
Figura 12. Tratamiento para los sobrenadates obtenidos durante la extracción del fluido de <i>G. intestinalis</i>	30

Figura 13. Metodología por HPLC para el fluido de <i>G. intestinalis</i>	30
Figura 14. Metodología prueba de estabilidad de los compuestos FHL30 y FHL31	31
Figura 15. Curva de crecimiento de <i>G. intestinalis</i> empleando un inóculo de 5×10^4 (trofozoitos/mL).....	32
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>G. intestinalis</i> empleando un inóculo de 2×10^7 (trofozoitos/mL).....	33
Figura 17. Potencia de los compuestos FH30 , FHL31 y ABZ con respecto al MTZ	34
Figura 18. Potencia de los compuestos FHL30 , FHL31 y MTZ con respecto al ABZ	34
Figura 19. Comportamiento de las CI_{50} de los compuestos, H , VRM15 , VRM16 , FHL30 , FHL31 , ABZ , MTZ	35
Figura 20. Curva de calibración para el compuesto FHL30	36
Figura 21. Curva de calibración para el compuesto FHL31	36
Figura 22. Estabilidad FHL30 determinada por HPLC.....	38
Figura 23. Estabilidad FHL31 determinada por HPLC.....	38
Figura 24. Líneas de limitación y ejemplo de trofozoitos a ser contados.....	50
Figura 25. Conteo a manera de meandro.....	50
Figura 26. Diagrama de diluciones empleadas en el método de resiembra.....	53
Figura 27. . Espectro UV para el compuesto FHL30 , tiempo de retención 3.384 min	59
Figura 28. Espectro UV a 270 nm del compuesto FHL30	59
Figura 29. Cromatograma del compuesto FHL31 , tiempo de retención.....	60
Figura 30. Espectro UV a 270 nm del compuesto FHL31	60
Figura 31. Cromatograma del medio de Cultivo TYI-S-33 complementado al 10%, 1:10, Medio:ACN para luego ser diluido 40:60, H ₂ O:ACN.....	61
Figura 32 Cromatograma del medio de cultivo TYI-S-33 complementado al 1%, 2:10 Medio:ACN.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de la Giardiasis.....	11
Tabla 2. propiedades físicas y biológicas del tracto gastrointestinal.....	16
Tabla 3. Actividad de derivados ecimidazólicos sobre <i>G. intestinalis</i>	17
Tabla 4. Diferencias operativas entre un derivado biorreversible y un bioprecursor..	19
Tabla 5. Gradiente para los compuestos FHL30 y FHL31	27
Tabla 6. CI ₅₀ y CI ₉₀ del albendazol, metronidazol, FHL30 y FHL31	34
Tabla 7. Tiempos de retención de los compuestos FHL30 , FHL31 , VRM15 , VRM16	35
Tabla 8. Cuantificación de FHL30 y FHL31 presente en las diferentes muestras analizadas por HPLC.....	37
Tabla 9. Estabilidad del compuesto FHL30	37
Tabla 10. Estabilidad del compuesto FHL31	38
Tabla 11. Curva de crecimiento de <i>G. intestinalis</i> con inoculo de 5X10 ⁴ (trofozoítos/mL).....	54
Tabla 12. Curva de crecimiento de <i>G. intestinalis</i> con inoculo de 2X10 ⁷ (trofozoítos/mL).....	54
Tabla 13. CI ₅₀ y CI ₉₀ para el albendazol.....	54
Tabla 14. CI ₅₀ y CI ₉₀ para el metronidazol.....	54
Tabla 15. CI ₅₀ y CI ₉₀ para el compuesto FHL30	55
Tabla 16. CI ₅₀ y CI ₉₀ para el compuesto FHL31	55
Tabla 17. Áreas correspondientes a la curva de calibración del compuesto FHL30 ...	56
Tabla 18. Concentraciones obtenidas en la extracción del fluido de <i>G. intestinalis</i> para el compuesto FHL30	56
Tabla 19. Estabilidad del compuesto FHL30 en medio de cultivo TYI-S-33 complementado al 10%.....	56
Tabla 20. Medianas por grupos a los diferentes tiempos de estabilidad del compuesto FHL30	57
Tabla 21. Áreas correspondientes a la curva de calibración del compuesto FHL31 ...	57
Tabla 22. Concentraciones obtenidas para 4 ensayos diferentes de la extracción del fluido de <i>G. intestinalis</i> para el compuesto FHL31	58
Tabla 23. Estabilidad del compuesto FHL31	58

Introducción

La giardiasis causada por el protozooario *Giardia intestinalis* es un problema de salud a nivel mundial. Esta enfermedad se ubica entre las 10 principales parasitosis del ser humano. El control de la giardiasis se realiza con el uso de agentes químicos terapéuticos, los más relevantes son el metronidazol, la furazolidona y la nitaxozanida; indicándose el metronidazol como fármaco de elección para el tratamiento de esta enfermedad. Aunque la terapia con estos fármacos es generalmente efectiva, su uso tiene limitaciones, ya que todos ellos exhiben efectos secundarios. Adicionalmente, se han encontrado trofozoítos de *G. intestinalis* resistentes al metronidazol y furazolidona, por el manejo inadecuado de estos fármacos en el tratamiento de esta parasitosis.

Los derivados del carbendazim (bencimidazol-2-carbamato de metilo), como el albendazol y el mebendazol, han mostrado ser efectivos en ensayos *in vitro* contra *G. intestinalis*. Sin embargo, cuando el albendazol se utiliza clínicamente, se tiene que administrar durante 7 días con dosis diarias de 15 mg/Kg. Debido a la baja solubilidad acuosa y metabolismo extenso de este principio activo, se requiere la administración de dosis altas características que constituyen desventajas para su eficiencia terapéutica. Por lo antes mencionado, existe la necesidad de buscar nuevos compuestos con actividad antiparasitaria que pudiesen rebasar los inconvenientes antes señalados.

Con ese propósito, nuestro grupo de investigación sintetizó una serie de derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, y evaluó su comportamiento frente *G. intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichinella spiralis*, mostrando, varios de ellos, actividad antiprotozoaria relevante ($CI_{50} < 10 \mu M$). De manera particular, el ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico (**VRM15**) y su isómero estructural, el ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-ilcarboxílico (**VRM16**) presentaron valores de concentración de inhibición del 50 % del crecimiento de los parásitos (CI_{50}) menores a 5 μM contra *G. intestinales*. Sin embargo, en estudios de permeabilidad de la

línea celular Caco-2, estos compuestos no mostraron un buen transporte; situación que indica problemas de absorción o ingreso al interior de las células.

Considerando lo anterior, se sintetizaron los compuestos **FHL30** y **FHL31**, los cuales derivan de **VRM15** y **VRM16**, respectivamente. En estos derivados se modificó el grupo carboxilo formando un enlace éster con la *N,N*-dietilglicolamida. El objetivo de la modificación es tener moléculas con propiedades de solubilidad acuosa y liposolubilidad favorables para disolverse y trasladarse a través de la membrana celular del parásito. Si esto se realiza de manera aceptable, los compuestos podrán llegar al interior del trofozoito de *G. intestinalis* en mayor concentración y su efectividad se verá aumentada.

El propósito de este trabajo fue evaluar *in vitro* la actividad giardicida de los compuestos **FHL30** y **FHL31**, y explorar su comportamiento de traslado al interior del protozoario *G. intestinalis*.

1. Antecedentes

1.1. Las parasitosis como problemas de salud pública

Las infecciones parasitarias tienen distribución mundial y representan un serio problema de salud pública en países en vías de desarrollo, siendo responsables de una alta morbilidad y mortalidad.¹ Las infecciones parasitarias que prevalecen en los climas tropicales están relacionadas con la temperatura, humedad, nutrición deficiente, inadecuadas medidas profilácticas y abundancia de portadores enfermos; que proveen la situación ideal para la diseminación y propagación de los parásitos.²

Se estima que alrededor de 3500 millones de habitantes en el mundo se ven afectados por algunos parásitos, de las cuales 450 millones se enferman. Estas infecciones en la República Mexicana, muestran que los helmintos intestinales más comunes que se pueden encontrar infectando al hombre son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Ancylostoma duodenale*. En cuanto a los protozoarios que causan la mayoría de las infecciones intestinales están *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*.³

El Centro de Vigilancia Epidemiológica Mexicano informó en el 2002, que las enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo más importantes fueron la giardiasis, teniasis, ascariasis, siendo esta última la de mayor incidencia en la población (Figura 1).⁴

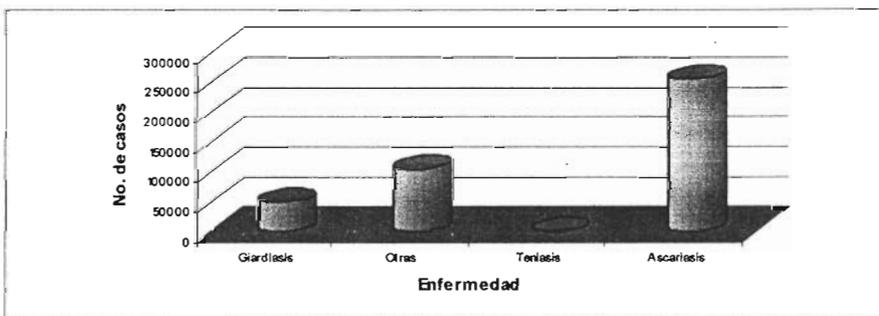


Figura 1. Enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo en el 2002.⁴

1.2. *Giardia intestinalis* y la giardiasis

La giardiasis es la enfermedad causada por *G. intestinalis*, tiene distribución cosmopolita, pero con cifras de frecuencia muy variables dependiendo de las condiciones sanitarias de cada región y del nivel educativo de la gente. Los reportes de trabajos hechos en México refieren que varía del 3 al 60%, dependiendo de la población estudiada, de los métodos de diagnóstico utilizados y de la edad de los sujetos.^{6,7}

Estadísticas de los parásitos causados por protozoarios realizadas en México por el Centro de Vigilancia Epidemiológica en el 2003 indicaron que, la giardiasis ocupó el segundo lugar en importancia (Figura 2).⁴

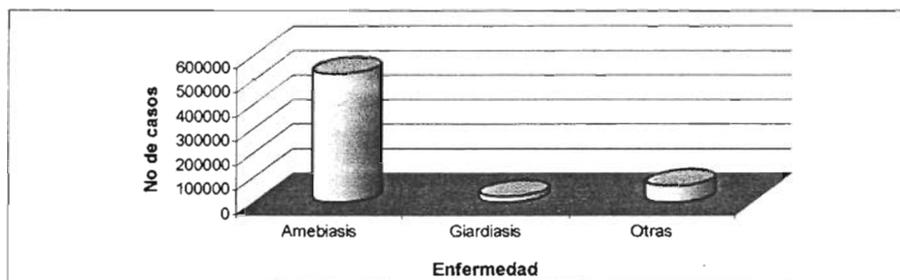


Figura 2. Enfermedades causadas por protozoarios intestinales más comunes en México en el 2003.⁴

La giardiasis es más frecuente en edades pediátricas que en el adulto. Se puede presentar desde la lactancia, aunque es raro durante los primeros seis meses de vida,⁷ pero tiene sus picos máximos de incidencia en los pre-escolares y escolares (Figura 3).⁴

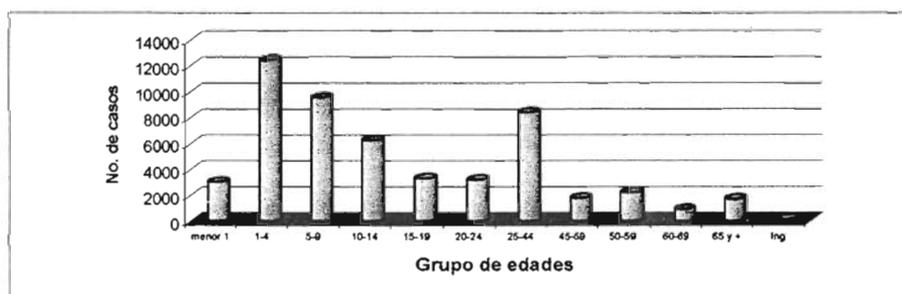


Figura 3. Casos de giardiasis en México por grupo de edades en el 2003.⁴

Los quistes de *G. intestinalis* son altamente infecciosos para el humano, y la infestación puede ser establecida por la ingestión de 10 quistes de este parásito.⁸ Según los estudios de brotes epidémicos acaecidos en varios países, ha quedado asentado que el agua tiene un papel importante en la transmisión, reportándose la presencia de quistes en acueductos que han sido sometidos a cloración.^{2,9,10} Los quistes de *G. intestinalis* son moderadamente susceptibles al ozono y a los halógenos, pero no lo son a los niveles de cloro usados en el agua potable.⁸ También se ha comprobado la transmisión de este parásito por malos hábitos de higiene, alimentos contaminados con heces y moscas domésticas.^{5,9} Así mismo, por la diseminación de quistes de una persona a otra en centros de atención sanitarias y en instituciones de salud.^{2,11}

Con mayor frecuencia, la giardiasis es la causa de la diarrea del viajero en el adulto. La giardiasis está presente en individuos con prácticas sexuales anales y orales.^{8,10,11,12} La infección es principalmente transmitida de persona a persona, pero se ha comprobado que algunos animales como perros, gatos, castores, caballos, ovejas y rumiantes, pueden ser reservorios de *G. intestinalis*, por consiguiente esta parasitosis puede considerarse como una zoonosis.^{8,9}

1.2.1. *Giardia intestinalis*

Giardia ha sido ubicada en la familia Sarcocystidophora, clase Zoomastigophorea, y ha sido clasificada en el orden Diplomonadida. El criterio morfológico ha dividido el género *Giardia* en tres especies: *Giardia agilis*, *Giardia muris* y *Giardia intestinales*.⁸ *Giardia agilis*, se diferencia porque el cuerpo del trofozoito mide 20 x 4.5 µm de largo y ancho respectivamente, el cuerpo parabasal tiene forma de lágrima colocado en paralelo a lo largo del axostilo,⁷ infecta principalmente anfibios.⁸ *Giardia muris*, se caracteriza por tener dos pequeños cuerpos centrales parabasales en forma de pera, los trofozoítos miden aproximadamente 10 µm de largo por 7 µm de ancho,⁷ infecta roedores, pájaros y reptiles.⁸ *Giardia intestinales* también llamada (*Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*), se distingue por su cuerpo parabasal en forma de coma, descansa transversalmente a través del axostilo, usualmente se observan dos cuerpos parabasales aunque algunas veces

solamente se encuentra uno. La morfología representativa de este tipo difiere entre el animal hospedero variando de 11-16 μm de largo y 5-9 μm de ancho;⁷ infecta una variedad de mamíferos, incluyendo al humano, también pájaros, reptiles, ente otras especies.

El trofozoíto de *G. intestinalis* tiene forma periforme y en la parte anterior posee dos núcleos que se unen entre sí en el centro, dando la apariencia de anteojos. Mide de 12 a 15 micras de longitud por 7 micras de ancho.⁹ La superficie ventral aplanada soporta un disco adhesivo cóncavo que ocupa la mitad anterior de su cuerpo. Este disco adhesivo se caracteriza por ser una estructura rígida, reforzada por microtúbulos y cinta fibrosa; esta estructura junto con el flagelo ventral participan en la adhesión del protozooario a la mucosa intestinal.¹³ *Giardia intestinalis* posee en su diámetro longitudinal y en la parte central, una barra doble o axostilo de cuyo extremo anterior emergen cuatro pares de flagelos, uno anterior, dos laterales y otro posterior. El axostilo es atravesado en el centro por dos estructuras en forma de coma, llamados cuerpos parabasales. Los dos núcleos poseen nucleolos centrales y están unidos entre sí por los rizoplastos que terminan en el extremo anterior del axostilo, en dos órganos puntiformes llamados blefaroplastos (Figura 4).¹⁴ El trofozoito presenta movimiento lento, vibratorio y rotatorio, lo cual permite observar la cavidad correspondiente al disco adhesivo,^{5,9} carece de mitocondria y peroxisomas.^{13,15} Trabajos recientes informaron de la presencia de aparato de Golgi y vacuolas periféricas con actividad de tipo lisosomal¹⁶ así como, de retículo endoplásmico.¹⁷ Los trofozoitos se alimentan por pinocitosis y numerosas vacuolas digestivas fueron descritas cerca de su superficie dorsal.⁷

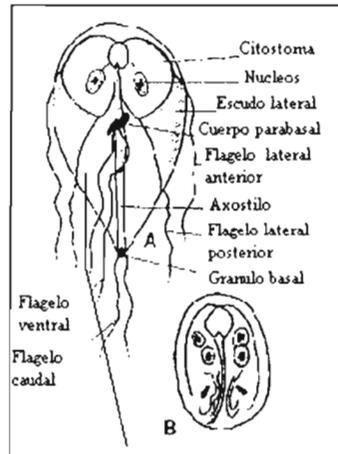


Figura 4. Estructuras del (A) trofozoito y (B) quiste de *G. intestinalis*.¹⁴

El quiste tiene forma ovalada con doble membrana, de 2 a 4 núcleos y algunas de las estructuras descritas para el trofozoito, de las cuales es notorio el axostilo. El tamaño promedio es de 10 micras de longitud.

1.2.2. Ciclo de vida

Los trofozoítos infectan el intestino delgado del humano, principalmente en el duodeno y yeyuno; se fijan por medio del disco adhesivo sobre la mucosa intestinal.^{5,9,13} Allí, se reproducen asexualmente por fisión binaria; el núcleo se divide primero, seguido por el aparato locomotor, el disco adhesivo, y por último, el citoplasma.¹³ Los trofozoítos que caen a la luz intestinal dan origen a quistes, que son eliminados con las materias fecales y pueden permanecer viables en el suelo húmedo o en el agua por varios meses. Los quistes ingresan por vía oral, y después de ser ingeridos, resisten la acción del jugo gástrico.⁹ Al entrar en contacto con el pH ácido del estómago, los quistes empiezan a desintegrarse en aproximadamente 10 min. se realiza el desenquistamiento¹⁸ este proceso finaliza a nivel de duodeno.¹³ La desintegración de un quiste da origen a cuatro trofozoítos. Los trofozoítos *per se* no son infecciosos cuando entran por vía oral, y al ser eliminados en las heces diarreicas mueren en el exterior (Figura 5).¹⁹

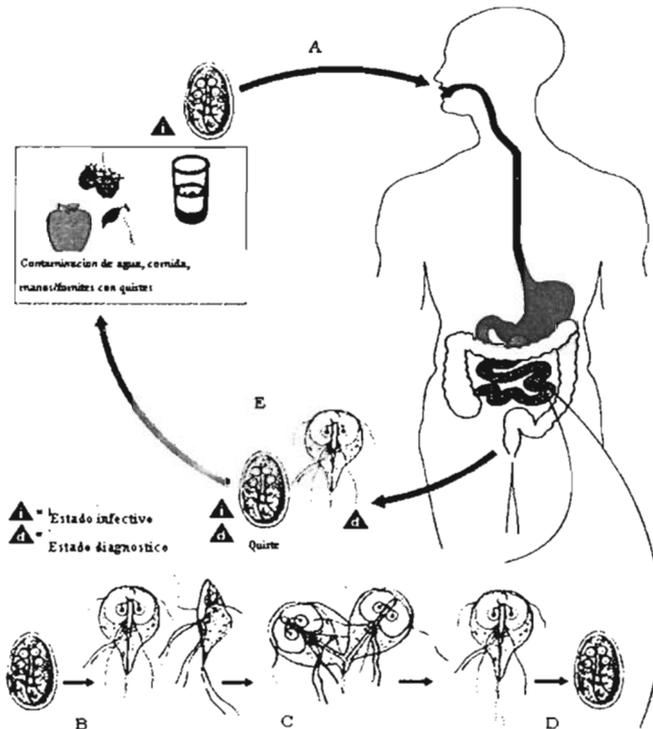


Figura 5. Ciclo de vida de *G. intestinalis*: A) transmisión, B) desenquistamiento, C) reproducción del trofozoíto, D) enquistamiento, E) re-infección.¹⁹

1.2.3. Patogénesis

El principal mecanismo de acción patógena en giardiasis se debe a la acción mecánica de los trofozoítos sobre la mucosa del intestino delgado, principalmente del duodeno y yeyuno. Las consecuencias de tal acción es el daño tisular que causa inflamación, esta a su vez llega a producir síndrome de mala absorción.^{9,18}

Además de la actividad mecánica, otros mecanismos patógenos que se presentan son: la secreción de sustancias citotóxicas, la inhibición de la actividad enzimática de las disacaridasas (lactasa, sucrasa y maltasa) de la tripsina y la lipasa, la hidrólisis de las sales

biliares, el incremento de la flora bacteriana y los trastornos en el transporte de los iones cloro y sodio.⁹

Los síntomas suelen presentarse después de 1 a 3 semanas de haber estado en contacto con el parásito. Las primeras manifestaciones son: diarrea, dolor abdominal, hinchazón, regurgitación, meteorismo, náuseas y vómitos¹⁶. Pueden presentarse malestares como: debilidad, pérdida de peso, distensión, fiebre baja, inapetencia, grandes cantidades de gases intestinales y dolor de cabeza.^{8,12,20}

1.2.4. Tratamiento

Los fármacos aceptados por la Secretaría de Salud en la República Mexicana para el tratamiento de la giardiasis son: el tinidazol, metronidazol, albendazol y nitaxozanida; indicándose al metronidazol como fármaco de primera elección para esta enfermedad,⁴ por su eficacia, biodisponibilidad y costo.²¹ Aunque la terapia con estos fármacos es usualmente efectiva, su uso tiene limitaciones, porque todos ellos exhiben efectos indeseables.²²⁻²⁴ En algunas ocasiones se presentan fallas en el tratamiento, requiriéndose repetir dicha terapia.²³

La giardiasis es un padecimiento asintomático en la mayoría de los casos. En áreas endémicas se ha observado que ocurren re-infecciones en menos de 6 meses después de finalizar el tratamiento, en la mayor parte de los individuos. En estas áreas se recomienda dar tratamiento continuo a portadores que laboran en el manejo comercial de alimentos, personal de guarderías, hospitales, pacientes con inmunodeficiencias y desnutridos. En los casos de giardiasis sintomática, no hay duda que todos deben recibir tratamiento.⁶ Recientemente, se anunció en los Estados Unidos de Norteamérica, la comercialización de una vacuna contra *G. intestinalis* para la prevención de signos clínicos de giardiasis y la reducción de quistes desechados en humanos y animales.²⁵

En la Tabla 1 se muestran los fármacos empleados en el tratamiento de la giardiasis. El secnidazol y tinidazol, además de tener buena eficacia, tienen la ventaja de

ser administrados en una sola ocasión. Sin embargo, al igual que los otros fármacos, presentan efectos adversos indeseables. Es importante señalar que la paromomicina aunque, tiene una eficacia moderada es el único medicamento que puede ser administrado durante el embarazo en casos de giardiasis.

1.3. Los bencimidazoles como antiparasitarios

En 1961 se descubrió que un derivado del bencimidazol, el tiabendazol, presentaba actividad antiparasitaria de amplio espectro contra helmintos gastrointestinales.³¹ Sin embargo, los primeros estudios *in vivo* de esta sustancia indicaron que presentaba una vida media de once minutos porque se oxidaba rápidamente a un metabolito inactivo, situación que limitó su eficacia clínica.¹

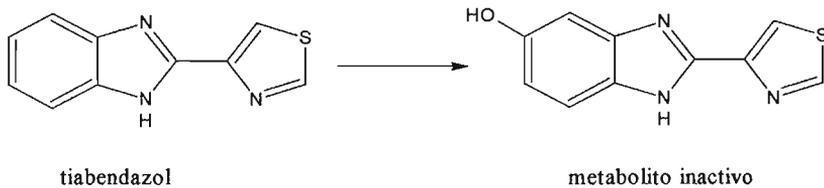
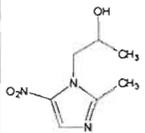
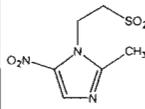
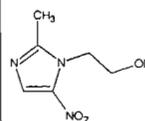
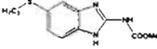
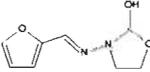
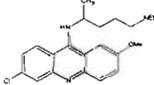
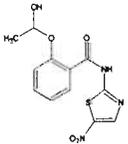
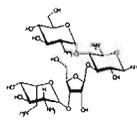


Figura 6. El tiabendazol y su metabolito inactivo.

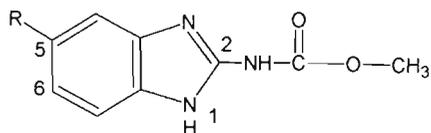
Tabla1. Fármacos empleados en el tratamiento de la giardiasis

Medicamento	Eficacia	Dosis	Reacciones adversas
secnidazol 	Mayor a 90% ⁹	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos: 2g • Niños: 30 mg/Kg Dosis única ⁹	<ul style="list-style-type: none"> • Poco frecuentes: náuseas, vómitos, dolor epigástrico, diarrea, vértigos y sabor metálico. • Raras: erupciones cutáneas, leucopenia moderada (reversible luego de la suspensión del tratamiento), vértigo, parestesia, incoordinación, ataxia y polineuritis sensitiva y motora³⁰.
tinidazol 	Mayor al 95% ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos: 2 g. • Niños: 60 mg/Kg Dosis única ^{8,9,22,26,27}	<ul style="list-style-type: none"> • Frecuentes: cefalea, anorexia, malestar y dolor gástrico, náuseas, diarrea, constipación, sabor metálico.^{22,27} • Poco frecuentes: lengua saburral, glositis, estomatitis, vómito. • Raras: hipoestesia o parestesia de extremidades, ataxia, encefalopatía, convulsiones, prurito, erupción cutánea, leucopenia²⁷.
metronidazol 	85-95% ²²	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos: 2g diarios durante tres días o 250 a 500 mg en tres administraciones diarias durante siete días²⁷. • Niños: 5mg/Kg. de peso tres veces al día durante cinco a siete días^{8,9,23,22,26}. 	<ul style="list-style-type: none"> • Frecuentes: náuseas, malestar gastrointestinal, diarrea, estreñimiento, cefalea. • Poco frecuentes: vómito, sabor metálico, reseca de boca, somnolencia. Raras: erupción cutánea, prurito, leucopenia, neuropatía periférica, tromboflebitis, oscurecimiento de la orina^{26,27}. • Graves: son raras y tienden a presentarse sobre todo en los tratamientos prolongados. Entre ellas figuran estomatitis y candidiasis, leucopenia reversible y neuropatías periféricas sensitivas, por lo general leves. En pacientes que reciben dosis muy altas se ha observado ataxia y ataques epileptiformes²⁶.No

			se debe combinar con el alcohol por que provoca efectos similares al antabuse ²¹ . También se han reportado efectos carcinogénicos y mutagénicos en roedores ²² .
albendazol 	95-97% ²⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos: 400 mg/día por 5 días. • Niños: 15 mg/Kg /día por 5 días²⁷. 	<ul style="list-style-type: none"> • Poco frecuentes: molestias gastrointestinales (dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos), mareo y cefalea. • Raras: hipersensibilidad (dérmica, febril), neutropenia o pancitopenia (generalmente reversibles), alopecia (reversible) e insuficiencia renal aguda³⁰.
furazolidona 	Menor al 80% ^{8,9}	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos: 100 mg cuatro veces al día por 10 días^{22,27}. • Niños: 1.25-2 mg/Kg. de peso cuatro veces al día durante siete a 10 días. En ningún caso se excederá de 8.8 mg/Kg. al día.^{22,27}. 	<ul style="list-style-type: none"> • Frecuentes: color anaranjado o rojizo oscuro de la orina. • Poco frecuentes: náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal. • Raras: reacciones hipersensibilidad, como prurito, enrojecimiento de la piel, erupción cutánea, dolor articular y leucopenia²⁷. • Pacientes con deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa puede promover hemólisis, y reacción como el antabuse si se ingiere alcohol. Ha causado tumores mamarios en ratas y se seguridad a sido cuestionable^{9,10,22}
quinacrina 	90-95% ^{8,22}	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos: 100 mg 3 veces al día por 7 días. • Niños: 2 mg/Kg 3 veces al día por 7 días^{9,22} 	<ul style="list-style-type: none"> • Frecuentes: cefalea, mareo, vómitos, la piel puede adquirir un color amarillento por depósito en piel, así como la orina. En las uñas y el paladar puede aparecer un color azul oscuro. • Ocasionales: psicosis tóxica transitoria inducida, toxicidad ocular, estimulación del SNC (convulsiones a altas dosis).

			<ul style="list-style-type: none"> Raras: discrasias sanguíneas, hepatotoxicidad, dermatitis exfoliativa. La duración de la psicosis es generalmente de 2 a 4 semanas y su evolución es relativamente benigna.
<p>nitazoxanida</p> 	<p>70-91%^{9,24}</p>	<ul style="list-style-type: none"> Adultos: 500 mg dos administraciones diarias por tres días. Niños 15 mg/kg/día divididos en 2 dosis administradas c/12 horas por tres días²⁹. 	<ul style="list-style-type: none"> Ocasionales: náuseas, algunas veces acompañadas de cefaleas, anorexia, y menos frecuentemente, vómito, malestar epigástrico, dolor abdominal del tipo cólico, vértigo, diarrea y debilidad. Raras: se ha reportado rash cutáneo y orina de coloración amarillenta, e incluso del eyaculado y escleróticas, sin valor patológico, que revirtió espontáneamente al finalizar el tratamiento²⁹.
<p>paromomicina</p> 	<p>60-70%</p>	<ul style="list-style-type: none"> 30 mg/kg/día (3 o 4 veces al día) por 10 días⁸ <p>Recomendado durante el embarazo</p>	<ul style="list-style-type: none"> Frecuente: dificultad para respirar, irritación de la garganta, hinchazón de labios, lengua o cara, vértigo. Disminución de la audición o presión en sus oídos. Raras: náuseas, vómito o diarrea, prurito anal.

A pesar de ello, el descubrimiento del tiabendazol fue muy importante ya que marcó la llegada de un nuevo grupo estructural para el tratamiento de enfermedades parasitarias. Para tratar de optimizar y buscar nuevos derivados del bencimidazol como agentes antiparasitarios, se sintetizaron y evaluaron cientos de compuestos. De este trabajo surgió la segunda generación de bencimidazoles con grupos como carbamato de metilo, acilamino, y urea en posición 2. Los bencimidazol-2-carbamatos de metilo (Figura 7) se ubicaron como agentes antihelmínticos de amplio espectro con buena eficacia clínica y prácticamente nulas reacciones secundarias.¹ Dos compuestos de este grupo son los de mayor uso, el albendazol y el mebendazol.



albendazol: $R = \text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

mebendazol: $R = \text{C}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$

Figura 7. Estructura de un bencimidazol-2-carbamato de metilo monosustituído.

De los estudios cualitativos de relaciones estructura-actividad realizados con la segunda generación de bencimidazoles, se determinó, que para conservar e incrementar la actividad antihelmíntica del bencimidazol, era muy importante conservar el átomo hidrógeno en la posición 1 y mantener sustituyentes en las posiciones 2 y 5 de esta estructura. Cualquier modificación en otra posición, causaría la pérdida de esta actividad biológica.¹

Se asume que la acción antihelmíntica del albendazol y el mebendazol se debe a su capacidad de inhibir la polimerización de la tubulina y por ende detener la formación de microtúbulos en la célula. Con este antecedente se pensó que ambos compuestos podrían

ser de utilidad para combatir a *G. intestinalis* dado que la mayor parte del disco adhesivo de este protozoario está constituido por esta macromolécula.

Los resultados experimentales mostraron que cuando *G. intestinalis* se expuso al albendazol, el disco adhesivo se observó fragmentado y con alteraciones en la estructura de los microtúbulos. También se presentaron precipitados densos en otras estructuras que contienen tubulina, como los flagelos y el cuerpo medio. Adicionalmente, se presentaron alteraciones en estructuras citosólicas que no contienen tubulina, por lo que se pensó que el albendazol se unió a otras proteínas en este protozoario.³²

Estudios *in vitro*, mostraron que el albendazol actuó a concentraciones mucho más bajas que las del metronidazol, pero para que se produjera efecto giardicida se necesitaron por lo menos 12 h de contacto con el parásito. El efecto producido se mantuvo por 72 h después de remover el fármaco, lo que indicó su irreversibilidad.³³ Cabe mencionar que la efectividad del albendazol está subestimada *in vivo* debido a que el tránsito gastrointestinal es rápido y el contacto del fármaco con el parásito es corto.³³ En la Tabla 2 se muestra el tiempo de residencia del contenido intestinal en el duodeno y yeyuno, mismo que no rebasa las tres horas en el ser humano. Esta información es importante al tomar en cuenta que el albendazol es un compuesto insoluble en agua (1 µg/mL), por lo que el tiempo de tránsito en duodeno y yeyuno, no es suficiente para alcanzar concentraciones adecuadas que pudiesen afectar a *G. intestinales*. Por ello clínicamente se tienen que administrar, por siete días, dosis altas (15 mg/Kg) para lograr erradicar la infección.

Tabla 2. Propiedades físicas y biológicas del tracto gastrointestinal³⁴

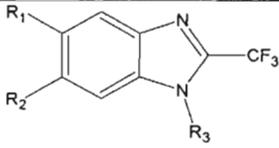
Segmento Gastrointestinal	Área superficial (m ²)	Longitud del segmento (cm)	Tiempo de residencia del contenido intestinal	pH del segmento
Cavidad oral	1	----	Segundos a minutos	6.5
Esófago	2	23-25	Segundos	---
Estómago	3.5	25	1.5 h	1-2
Duodeno	1.9	35	0.5-0.75 h	4.0-5.5
Yeyuno	184	280	1.5-2.0 h	5.5-7.0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

Tomado de Balimane y cols. 2000.³⁴

1.3.1. Los derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

La actividad antiparasitaria de una serie de derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol se evaluó contra *G. intestinalis* (Tabla 3).^{32,36-38} La actividad del compuesto **2** fue equivalente al metronidazol, mientras que los compuestos **1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, VRM-15** son mas activos que el metronidazol, los compuestos **5** y **8** fueron tan activos como el albendazol.³²

Tabla 3. Actividad de derivados bencimidazólicos sobre *G. intestinalis*

				
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ (μM)
1a	H	H	H	0.107
2a	Cl	H	H	1.282
3a	Cl	Cl	H	0.078
4a	H	H	CH ₃	0.064
5a	Cl	H	CH ₃	0.042
6a	H	Cl	CH ₃	0.127
7a	Cl	Cl	CH ₃	0.260
8b	Br	Br	H	0.040
9b	NO ₂	NO ₂	H	0.059
10d	COOCH ₃	H	H	1.190
11d	COOCH ₂ CON(CH ₃ CH ₂) ₂	H	H	3.120
12e	COOCH ₃	H	CH ₃	2.450
13e	H	COOCH ₃	CH ₃	8.820
14e	CONHCH ₃	H	CH ₃	0.420
15e	H	CONHCH ₃	CH ₃	0.210
VRM-15e	COOH	H	CH ₃	0.330
VRM 16e	H	COOH	CH ₃	2.770
Hc	COOH	H	H	3.010
Metronidazol				1.228
Albendazol				0.037

a, tomado de Navarrete-Vázquez y cols.³² (2001); b, tomado de Andrzejewska y cols.³⁶ (2002); c, tomado de Soriano-Agaton³⁸ (2002); d, tomado de Piña-Gallardo³⁷ (2003); e, tomado de Vilchis³⁴ (2004).

Los compuestos 1-metilados (4-7,12-15, VRM15, VRM16) fueron activos contra el protozooario, indicando que el hidrogeno en posición 1 no es indispensable en la actividad antiprotozoaria como sí lo es para la actividad antihelmintica.³⁵

Ensayos *in vitro* demostraron que estos derivados bencimidazólicos no inhibieron la polimerización de la tubulina de cerebro de rata, lo que sugiere que su mecanismo de acción es diferente al de los derivados del bencimidazol-2-carbamato de metilo, como el albendazol.³²

1.4. Los profármacos

Los profármacos son sustancias inactivas que requieren ser transformados dentro del organismo para que generen o liberen al principio activo, y sea este último el cual ejerza la acción biológica. En años recientes se han utilizado los profármacos para modificar las propiedades biofarmacéuticas de varios principios activos.^{39,40}

Los profármacos de acuerdo a su formación estructural se clasifican en dos grupos:

- a. Derivados biorreversibles: son profármacos que en su estructura presentan al principio activo unido a una porción estructural denominada modificador el cual cambiará las propiedades fisicoquímicas de este. El derivado biorreversible libera al principio activo dentro del organismo mediante reacciones químicas intramoleculares o reacciones enzimática de hidrólisis, oxidación y/o reducción.^{43,44,46}
- b. Bioprecusores: son profármacos que químicamente no presentan el principio activo en su estructura sino que al ser transformados enzimáticamente por medio de reacciones de oxidación/reducción generan al principio activo. Por ser estructuralmente distintos al principio activo, sus propiedades de solubilidad y lipofilia son totalmente diferentes al del fármaco que van a generar^{43,44,45}.

Tabla 4. Diferencias operativas entre un derivado biorreversible y un bioprecursor⁴⁷

Tabla 4. Diferencias operativas entre un derivado biorreversible y un bioprecursor⁴⁷

Características	Derivado biorreversible (Figura 8)	Bioprecursor
Constitución	Principio activo + modificador	No presenta al principio activo
Liposolubilidad	Fuertemente modificada	Ligeramente modificada
Bioactivación	Liberación o reconversión del principio activo por hidrólisis, oxidación, o reducción	Generación del principio activo por oxidación, reducción, o hidrólisis
Estabilidad	Problemas de estabilidad en solución acuosa	Estables en solución acuosa
Catálisis	Química o enzimática	Solamente enzimática

Tomada de Hernández Luis, 1999.⁴⁷

Tanto los bioprecursores como los derivados biorreversibles presentan algunas diferencias fisicoquímicas, mismas que pueden convertirse en ventajas y desventajas según sea el caso particular en que se les trate.^{43,44,45}

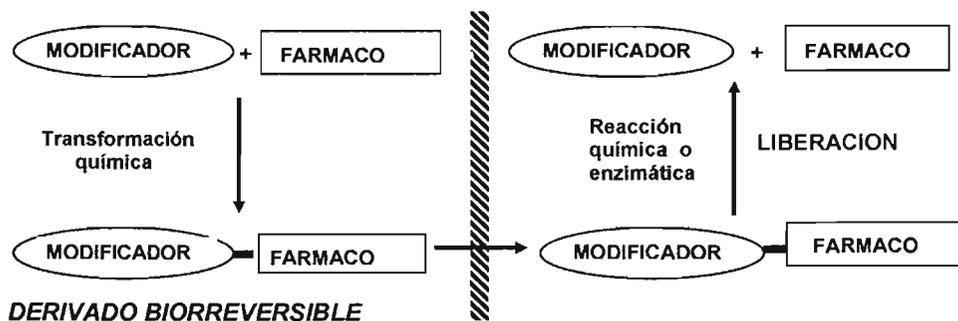


Figura 8. Estructura y bioconversión de un derivado biorreversible.

1.4.1. Profármacos con el grupo modificador *N,N*-dietilglicolamida

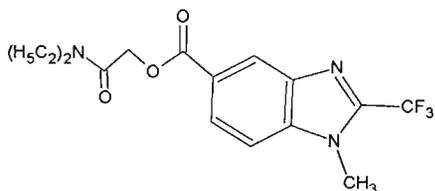
Los profármacos que modifican al grupo carboxilo de los principios activos son probablemente los mejor conocidos. La mayoría de ellos se transforman con la

participación de las esterasas. Estas enzimas se encuentran en la sangre, hígado y otros órganos o tejidos.³⁹

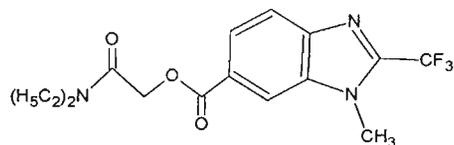
Los ésteres son biológicamente inactivos *per se*, aunque deben ser rápidamente hidrolizados después de ser absorbidos para liberar la actividad del ácido en la sangre. Los ésteres deben poseer propiedades fisicoquímicas (e.j. solubilidad acuosa y lipofilia) favorables para la absorción por vía oral. Estos requerimientos no se presentan adecuadamente en cualquier producto con este grupo funcional; de esta manera, un simple éster alifático o aromático con frecuencia no es lábil *in vivo*, por lo que no se puede asegurar una velocidad óptima de conversión al fármaco.⁴⁸

Un estudio de una larga serie de ésteres de glicolamida y ésteres estructuralmente relacionados del ácido benzoico, mostró que la porción estructural necesaria para una rápida velocidad de hidrólisis enzimática fue la *N,N*-dietilglicolamida. Consecuentemente, los profármacos con este modificador pueden ser fácilmente hidrolizados en condiciones biológicas. Esta estrategia fue aplicada a los ácidos acetilsalicílico, naproxen, ibuprofen y aminoácidos como el ácido tranexámico y fenilalanina.^{48,49}

Lo anterior dió la pauta para que a partir de los ácidos **VRM-15** (ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico) y **VRM-16** (ácido 1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-ilcarboxílico) bencimidazolicos cuya actividad antiparasitaria se evaluó contra *G. intestinales*, se diseñaran y sintetizaran los profármacos con el modificador *N,N*-dietilglicolamida: **FHL30** (1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-il-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo) y **FHL31**(1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-il-carboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo), con la finalidad de mejorar las características fisicoquímicas de las moléculas para una mejor distribución y transporte de los compuestos.



FHL 30



FHL 31

Figura 9. Estructura de FHL 30 y FHL 31.

1.5. Transporte a través de las membranas biológicas

Las membranas biológicas son las barreras que debe atravesar un fármaco para llegar a su lugar de acción.⁴² Están constituidas por una bicapa lipídica con moléculas de proteínas que estabilizan su organización y presentan soporte mecánico a la membrana.^{42,50} La bicapa lipídica constituye una barrera que impide el movimiento de la mayoría de las sustancias hidrosolubles. Sin embargo, las sustancias liposolubles pueden atravesar directamente esta bicapa.⁵⁰

El transporte de sustancias a través de la membrana puede producirse por difusión pasiva, transporte activo, difusión facilitada o endocitosis-exocitosis.⁴²

La difusión pasiva es la más utilizada por la mayor parte de los fármacos. La velocidad de difusión pasiva de una sustancia a través de la membrana celular es directamente proporcional al gradiente de concentración, el cual depende de la cantidad disuelta del compuesto en ambos lados de la membrana y de los parámetros que afectan la facilidad para que un fármaco pueda atravesar la membrana, como son la liposolubilidad, el tamaño molecular y el grado de ionización.⁵⁰⁻⁵¹

Dentro de factores que influyen en el transporte de un compuesto, sus propiedades fisicoquímicas ocupan un lugar preponderante, sobre todo en aquellos que son administrados en un lugar distinto a su sitio de acción. Las propiedades fisicoquímicas que influyen en la permeabilidad celular para que una molécula utilice el transporte pasivo son la lipofilia, hidrofilia, capacidad de aceptar o donar puentes de hidrógeno, tamaño, carga, conformación, área de superficie polar y número de enlaces de libre giro o

similitud a sustancias endógenas.⁵³⁻⁵⁵ Lo más importante de estas propiedades es que dependen una de la otra. En otras palabras, el cambio en una propiedad de una molécula usualmente afectará a una o mas de otras propiedades.⁵⁵

2. Planteamiento del problema

Recientemente se sintetizaron dos profármacos (**FHL30** y **FHL31**) de los compuestos **VRM15** y **VRM16**, al modificar el grupo carboxilo de estos últimos colocándoles la porción *N,N*-dietilglicolamida. Esta modificación se realizó tomando en cuenta trabajos previos que demostraron que esta porción estructural facilita el traslado de compuestos ácidos por la membrana celular del intestino delgado de roedores. Con esto en mente nos planteamos la siguiente pregunta ¿Los profármacos **FHL30** y **FHL31** ingresarán en mayor proporción al protozooario *G. intestinalis*, que los compuestos **VRM15** y **VRM16**, y con ello contar con moléculas con mayor potencia giardicida?

3. Hipótesis

Por sus características estructurales, los profármacos **FHL30** y **FHL31** atravesarán favorablemente la membrana plasmática del trofozoito de *G. intestinalis* en tiempos de exposición cortos (3 h) y presentarán mejor potencia giardicida que **VRM15** y **VRM16**.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Determinar el comportamiento de los compuestos **FHL 30** y **FHL 31** en estudios *in vitro* sobre el protozooario *Giardia intestinales*.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de trabajo para el análisis cuantitativo de **FHL30** y **FHL31** por HPLC.
- Evaluar la actividad antiparasitaria de los compuestos **FHL30** y **FHL31** contra *G. intestinalis* por el método de resimbra.
- Cuantificar por HPLC a **FHL30** y **FHL31** en los sobrenadantes recuperados de la extracción del fluido de *G. intestinalis* incubados por 3 h.
- Determinar la estabilidad de **FHL30** y **FHL31** en el medio TYI-S-33 complementado con suero de ternera al 10% en un periodo de 48 h.

5. Metodología

5.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos **FHL30** y **FHL31** contra *G. intestinalis* por el método de resiembra.

Para cumplir con este objetivo primeramente se realizaron experimentos para estudiar la curva de crecimiento del protozooario *G. intestinalis* y posteriormente determinar la actividad giardicida de los compuestos.

5.1.1. Curvas de crecimiento de *G. intestinalis*.

5×10^4 trofozoítos/mL de la cepa WB de *G. intestinalis* se incubaron en medio TYI-S-33 complementado con suero de ternera al 10% a diferentes tiempos (24 h, 48 h, 72 h y 94 h). Una vez concluida la incubación los tubos se enfriaron en hielo durante 1 h. Para cada tiempo se contó el número de trofozoítos en una cámara de Newbauer. El número de trofozoítos obtenido en cada tiempo se gráfico con respecto al tiempo.

Para cultivos masivos de *G. intestinalis* se incubaron 2×10^7 trofozoítos/mL de medio modificado TYI-S-33 complementado con suero de ternera al 10% a 37°C a los mismos tiempos arriba mencionados. Se enfriaron y se centrifugaron a 3500 rpm por 30 min a 4°C .

5.1.2. Determinación de la actividad giardicida de los compuestos **FHL30** y **FHL31** mediante el método de resiembra.⁵⁹

5×10^4 trofozoítos/mL de medio modificado TYI-S-33 complementado con suero de ternera al 10% se incubaron con las diferentes concentraciones del compuesto a evaluar ($1 \mu\text{g/mL}$, $0.5 \mu\text{g/mL}$, $0.1 \mu\text{g/mL}$, $0.05 \mu\text{g/mL}$, $0.01 \mu\text{g/mL}$) por 48 h a 37°C . Como testigos positivos se incluyeron al albendazol o al metronidazol en las mismas concentraciones. Como testigo negativo se incubaron los trofozoítos en medio libre de

compuesto. Los tubos se colocaron en hielo por 1 h y en condiciones de esterilidad se resembraron de cada uno de los tubos 50 μL de los trofozoítos y se adicionaron 950 μL de medio modificado TSY-I33 complementado con suero de ternera al 10% (apéndice A). Los tubos se incubaron a 37°C por 48 h. Transcurrido este tiempo, se contó el número de trofozoítos y se determinaron los valores de CI_{50} y CI_{90} con el análisis estadístico Probit.

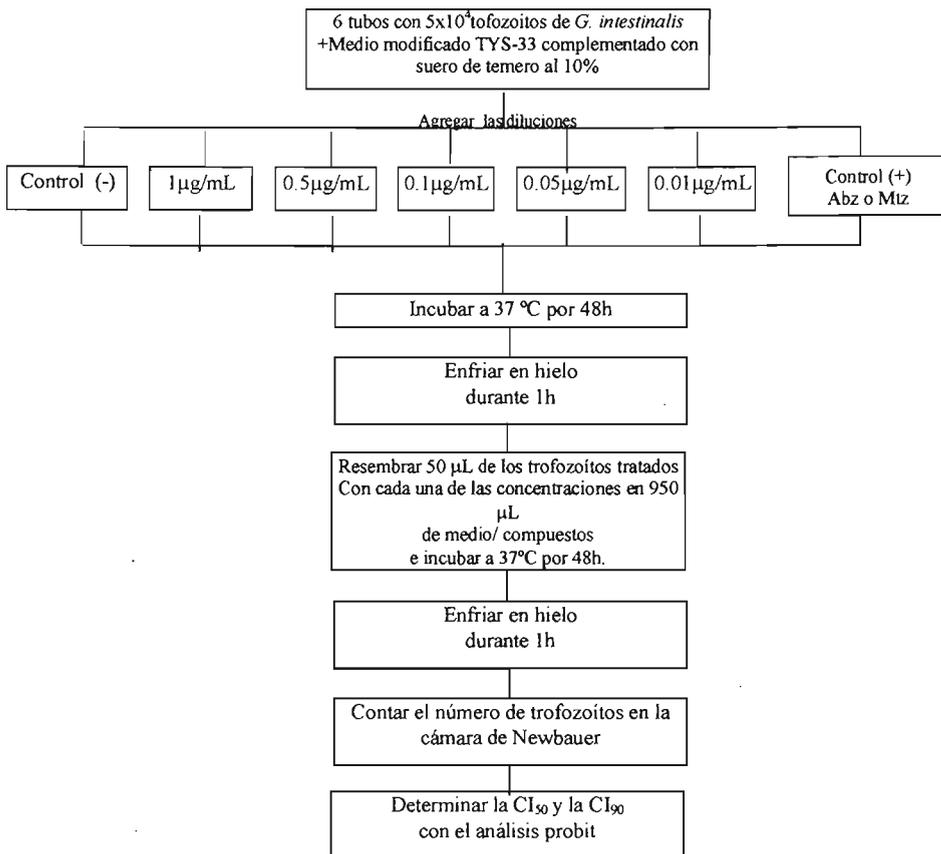


Figura 10. Diagrama método de resiembra para la evaluación de la actividad antiparasitaria.

5.2. Determinación de las condiciones de trabajo para el análisis cuantitativo de **FHL30** y **FHL31** por HPLC

Se utilizaron las columnas de fase reversa (Symmetry Shield™ RP₁₈, 3.9 x 150 mm) y Nova_Pack C₁₈ 3.9 x 150 mm) para los compuestos **FHL30** y **FHL31**, respectivamente. La composición de la fase móvil fue ajustada para cada compuesto con el propósito de proporcionar un apropiado tiempo de retención y separación de las posibles interferencias (Tabla 5). El flujo empleado fue de 0.7 mL/min, se monitoreó con un detector de re-arreglo de diodos (Waters 996) a 270 nm. Se inyectaron 25 µL de muestra. Los datos fueron manejados y procesados con el paquete de cómputo Millennium™.

Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon las siguientes concentraciones a partir de una solución patrón de 10mg/mL: 0.537µM, 6.716 µM, 33.582 µM, 60.44 µM, 100.746 µM y 167.91µM. Se inyectaron en el HPLC para obtener, el área, tiempo de retención así como su cromatograma a 270 nm.

Tabla 5. Gradiente para los compuestos **FHL30** y **FHL31**

Tiempo (min)	FHL30		FHL31	
	H ₂ O	ACN	H ₂ O	ACN
0	40	60	40	60
6	32	68	38	62
8	40	60	40	60

5.3. Cuantificación de **FHL30** y **FHL31** en los sobrenadantes recuperados de la extracción del fluido de *G. intestinalis* por HPLC

A partir de un cultivo masivo en fase logarítmica de *G. intestinalis* cepa WB, se inocularon 2×10^7 trofozoítos, en medio modificado TYI-S-33 complementado con suero

de ternera al 10%. Se incubaron a 37 ° C por 48 h. Transcurrido este periodo de tiempo se colocaron en hielo por 1h.

Partiendo de una solución patrón de 10 mg/mL, se tomó una alícuota de 464.4 µL para tener una concentración de 99.97 µM del compuesto a evaluar en un volumen final de 13 mL. Después se incubó a 37 ° C por 3h. Transcurrido este tiempo se colocó en hielo por 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm, 4° C por 30 min. Una vez cumplido este tiempo, se tomó 1 mL del sobrenadante y transfirió a un tubo de 1.5 mL. Al precipitado se le adicionaron 10 mL de PBS y se resuspendió. Enseguida se centrifugó a 3500 rpm a 4° C por 10min. Se realizaron 2 lavados con PBS y en cada uno se recolectaron 1 mL de sobrenadante y transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

Al paquete celular obtenido después de los dos lavados con PBS, se le adicionaron 150 µL de agua destilada, se resuspendió y transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Después se centrifugó a 3500 rpm, 4° C por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y adicionaron nuevamente 150 µL de agua destilada. Posteriormente, los trofozoítos se rompieron con 7 ciclos de congelamiento-descongelamiento (-70° C por 5 min- 37° C por 5 min). El fluido se centrifugó a 8000 rpm, 4° C por 10 min. El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 500 µL de TCA (CCl₃COOH) al 0.2%. Enseguida se centrifugó a 8000 rpm, 4 ° C por 10 min. El sobrenadante se conservó a -70°C.

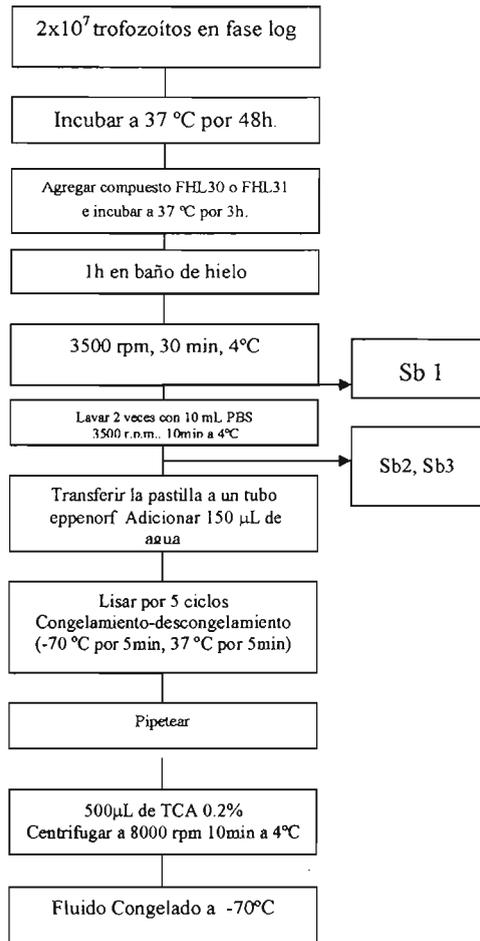


Figura 11. Diagrama de flujo del método de extracción del fluido de *G. Intestinales*

5.3.1 Análisis por HPLC del medio de cultivo y los dos lavados con PBS

En un tubo eppendorf de 2 mL , se colocaron $900\ \mu\text{L}$ de ACN (acetonitrilo) y $100\ \mu\text{L}$ de la muestra a examinar. Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm a 4°C por 10 min . El sobrenadante se pasó a través de un filtro milipore $0.45\ \mu\text{m}$ de 13 mm de diámetro. Se tomaron $600\ \mu\text{L}$ y se le agregaron $400\ \mu\text{L}$ de H_2O , para después inyectar en el HPLC.

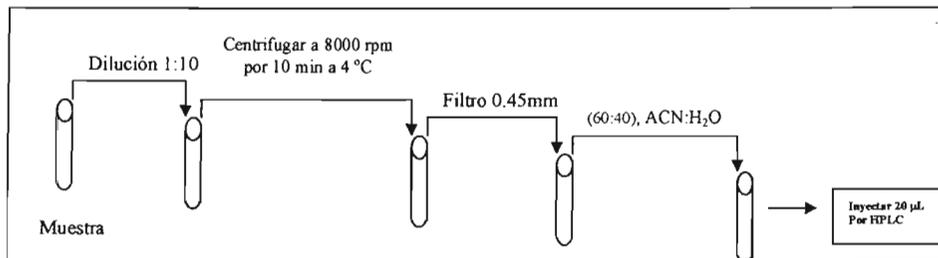


Figura 12. Tratamientos para los sobrenadantes obtenidos durante la extracción del fluido de *G. intestinalis*.

5.3.2. Análisis del fluido de *G. intestinalis* por HPLC

A un tubo eppendorf se le adicionaron 600 µL de ACN y 400 µL de la muestra. Se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de(0.45µm de 13 mm de diámetro) y se inyectó en el HPLC.

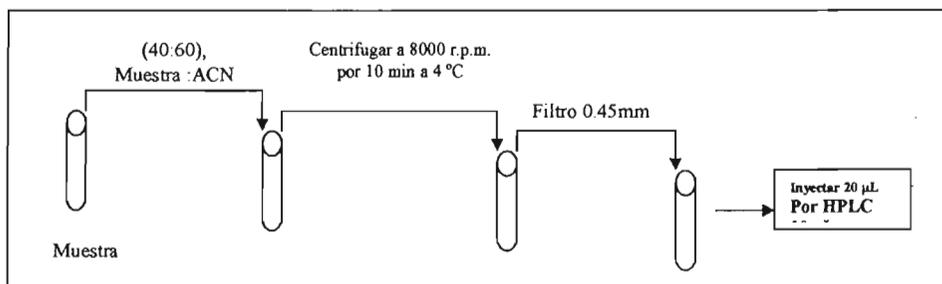


Figura 13. Metodología por HPLC para el fluido de *G. intestinalis*.

5.4. Determinación de la estabilidad de los compuestos **FHL30** y **FHL31** en medio TYI-S-33 complementado con suero de ternera al 10% en un periodo de 48 h por HPLC.

Para los compuestos **FHL30** y **FHL31** se partió de una solución patrón cuya concentración era de 23798.549 µM. Se tomó una alícuota de 900 µL y se añadió medio modificado TSY-I-33 complementado con suero de ternera al 10 %. La solución se agitó a 500 rpm a 37° C. Se tomaron 200 µL de la muestra a diferentes tiempos (1h, 3h, 8h, 24h y 48h) y adicionaron 800 µL de ACN. Enseguida se centrifugó a 8000 rpm durante

10 min. a 4° C. Los sobrenadantes se hicieron pasar a través de un filtro (45 µm X13 mm), para después ser analizados por HPLC. La prueba se realizó por triplicado.

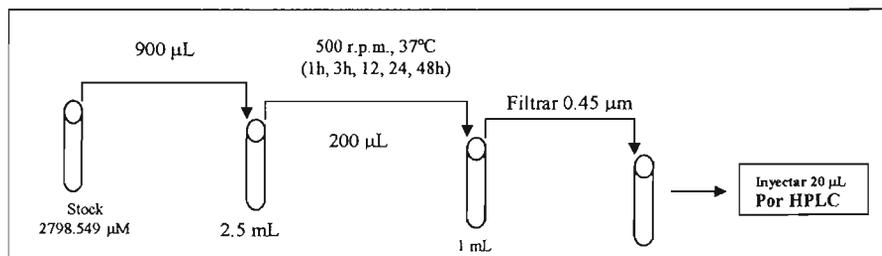


Figura 14. Metodología prueba de estabilidad de los compuestos **FHL30** y **FHL31**.

6. Resultados

6.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos FHL30 y FHL31 contra *G. intestinalis* por el método de resiembra

Primeramente se presentan los resultados obtenidos en los estudios de curvas de crecimiento y enseguida los de la actividad giardicida.

6.1.1. Curvas de crecimiento de *G. intestinalis*

Para conocer las condiciones de crecimiento óptimo de los trofozoítos que se emplearon en los ensayos de resiembra y extracción del fluido de *G. intestinalis*, se procedió a realizar las curvas de crecimiento de los trofozoítos empleando dos inóculos: 5×10^4 trofozoítos/mL y 2×10^7 trofozoítos/mL. Los resultados se presentan en las Figuras 15 y 16. Como puede observarse la fase logarítmica de crecimiento del parásito se obtuvo a las 48 h en ambos casos.

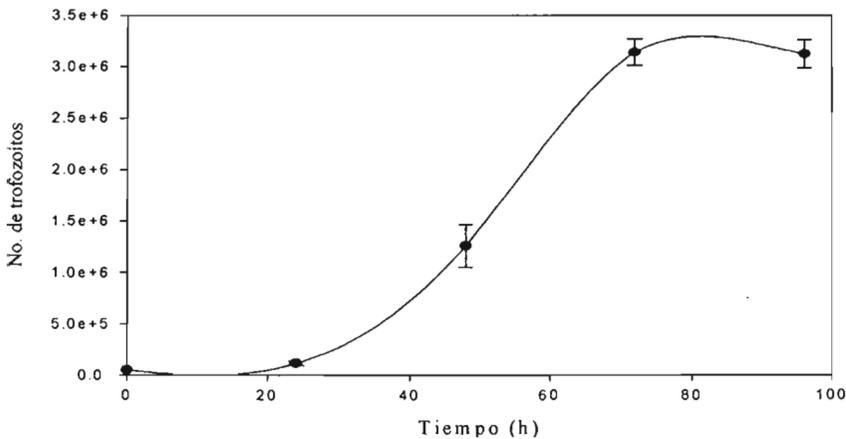


Figura 15. Curva de crecimiento de *G. intestinalis* empleando un inóculo de 5×10^4 trofozoítos/mL.

La curva de crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* no se afectó por el inoculo empleado obteniéndose la fase logarítmica de crecimiento entre 40 h y 70 h. El ensayo de resiembra se realiza considerando las 48 h con la finalidad de obtener cultivos en esta fase de crecimiento. Así mismo, la curva de crecimiento con el inoculo de 2×10^7 trofozoítos de *G. intestinalis* sirvió para poder generar cultivos masivos de este protozooario y con ello poder contar con suficiente número de trofozoítos para los ensayos de extracción del fluido del parásito.

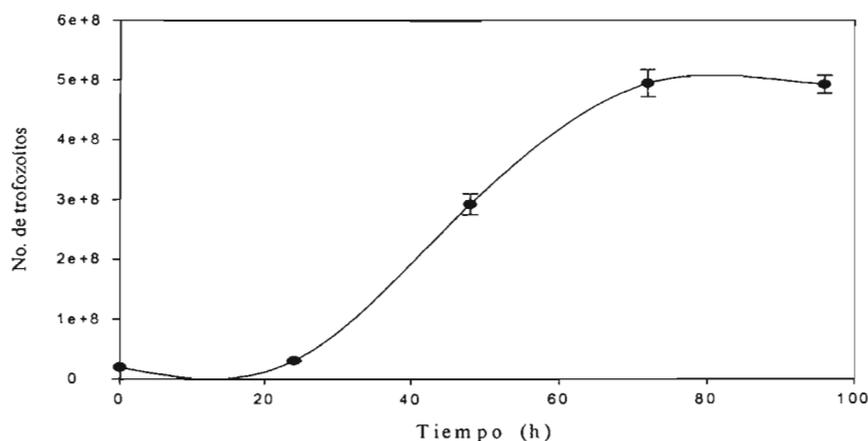


Figura 16. Curva de crecimiento de *G. intestinalis* empleando un inóculo de 2×10^7 (trofozoítos/mL).

6.1. Actividad antiparasitaria de los compuestos **FHL30** y **FHL31** contra *G. intestinalis*

Respecto a la actividad antiprotozoaria de los profármacos derivados biorreversibles **FHL30** y **FHL31**, se observaron valores de CI_{50} de $1.513 \mu\text{M}$ y de $1.292 \mu\text{M}$ respectivamente. El **FHL31** tuvo una actividad similar a la del metronidazol. Sin embargo, no fueron más activos que el albendazol. Los valores de CI_{50} y CI_{90} obtenidos para los compuestos **FHL30**, **FHL31**, de los controles positivos albendazol y metronidazol, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. CI_{50} y CI_{90} del albendazol, metronidazol, **FHL30** y **FHL31**

Compuesto	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} (μM)	CI_{90} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{90} (μM)
FHL30	0.540	1.513	1.513	80.176
FHL31	0.461	1.292	1.292	20.665
albendazol	0.016	0.059	0.120	0.452
metronidazol	0.236	1.384	61.186	357.492

La potencia de los profármacos con respecto al albendazol y metronidazol se presentan en las Figuras 17, 18 respectivamente. Por otra parte se muestra también el inverso de la CI_{50} de los compuestos **H**, **VRM15**, **VRM16**, **FHL30**, **FHL31**, **ABZ** y **MTZ** para así, poder observar la relación que guardan unos con otros en la figura 19.

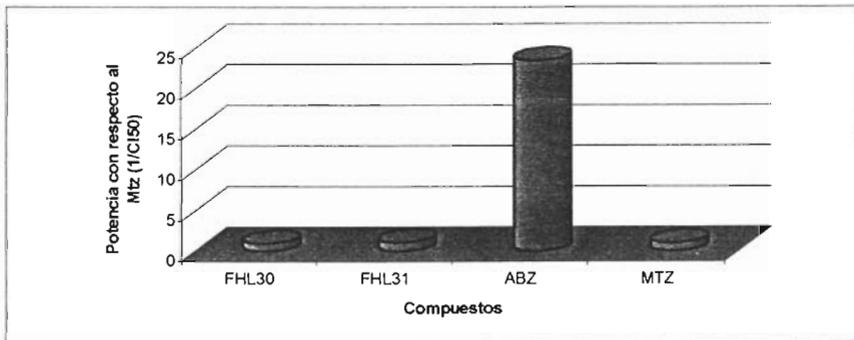


Figura 17. Potencia de los compuestos **FHL30**, **FHL31** y **ABZ** con respecto al **MTZ**.

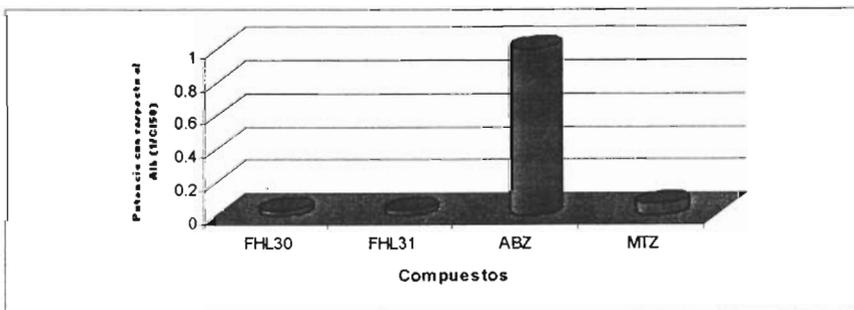


Figura 18. Potencia de los compuestos **FHL30**, **FHL31** y **MTZ** con respecto al **ABZ**.

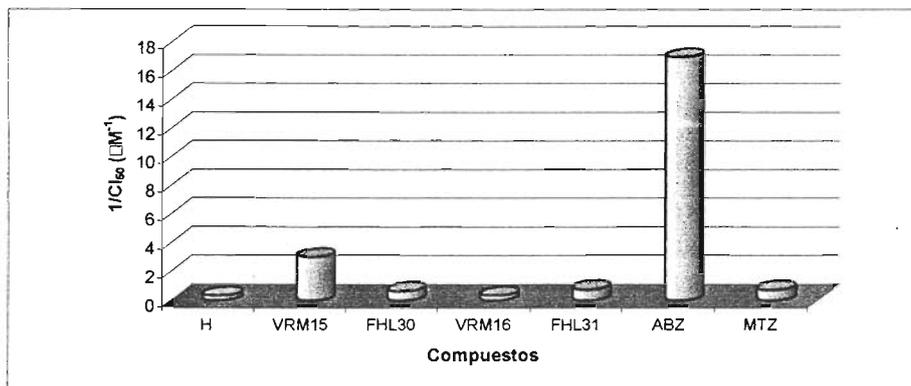
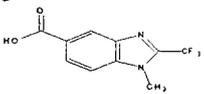
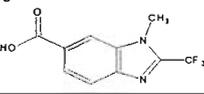
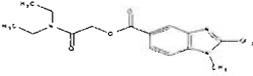
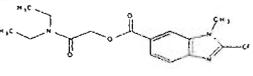


Figura 19. Comportamiento de las CI₅₀ de los compuestos, H, VRM15, VRM16, FHL30, FHL31, ABZ, MTZ.

6.2. Condiciones de trabajo para el análisis cuantitativo de FHL30 y FHL31 por HPLC

Los tiempos de retención obtenidos para los profármacos empleando HPLC bajo las condiciones experimentales indicadas en la metodología se presentan en la Tabla 7. En el análisis se incluyeron los compuestos VRM15 y VRM16.

Tabla 7. Tiempos de retención de los compuestos FHL30, FHL31, VRM15 y VRM16

Compuesto	Tiempo de retención (min)
VRM15 	2.88
VRM16 	1.40
FHL30 	3.41
FHL31 	2.38

6.2.1. Curva de calibración para los compuestos **FHL30** y **FHL31**

En la Figura 20 y 21 se muestran las curvas de calibración obtenidas para los compuestos **FHL30** y **FHL31**.

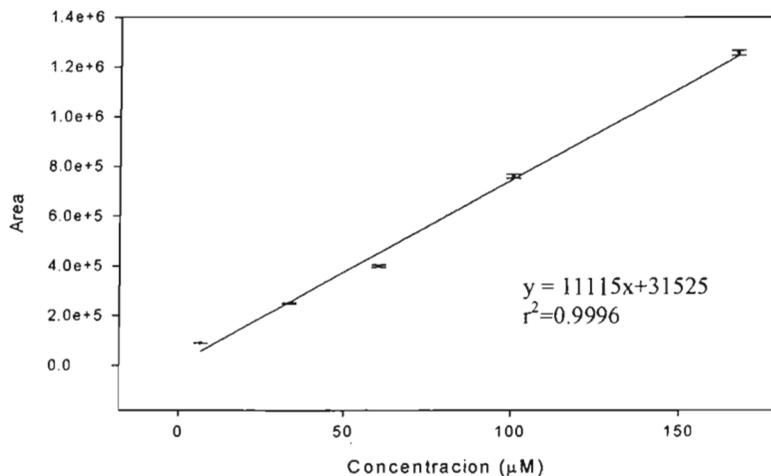


Figura 20. Curva de calibración para el compuesto **FHL30**.

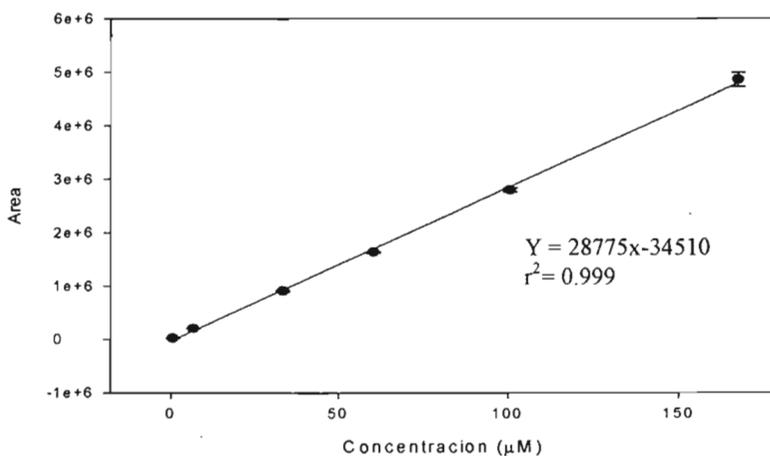


Figura 21. Curva de calibración para el compuesto **FHL31**.

6.3. Cuantificación de **FHL30** y **FHL31** en los sobrenadantes recuperados de la extracción del fluido de *G. intestinalis* por HPLC

Los resultados de la cuantificación de **FHL30** y **FHL31** en el medio de cultivo, los sobrenadantes 1(Sb1) y 2 (Sb2), así como del fluido de *G. intestinalis* se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Cuantificación de **FHL30** y **FHL31** presente en las diferentes muestras analizadas por HPLC

Muestra	FHL30 (μM)	FHL31 (μM)
Medio de Cultivo	87.27	93.89
Sb1	ND	ND
Sb2	ND	ND
Fluido de <i>G. intestinalis</i>	ND	ND

ND. No detectado

6.4. Estabilidad de los compuestos **FHL30** y **FHL31** en medio modificado TYI-S-33 complementado con suero de ternera al 10% en un periodo de 48h por HPLC

La estabilidad de los compuestos **FHL30** y **FHL31** se analizó por HPLC empleando las condiciones previamente descritas, se presentan las tablas 9 y 10 y las figuras 21 y 22.

Tabla 9. Estabilidad del compuesto **FHL30**

Tiempo (h)	Promedio	D.E.	C.V.%	% Variación
0	69.36	1.41	2.03	0.00
1	68.38	4.89	7.15	1.41
3	68.17	1.93	2.83	1.71
8	64.71	1.86	2.87	6.70
24	69.66	2.67	3.83	0.43
48	67.94	4.98	7.34	2.05

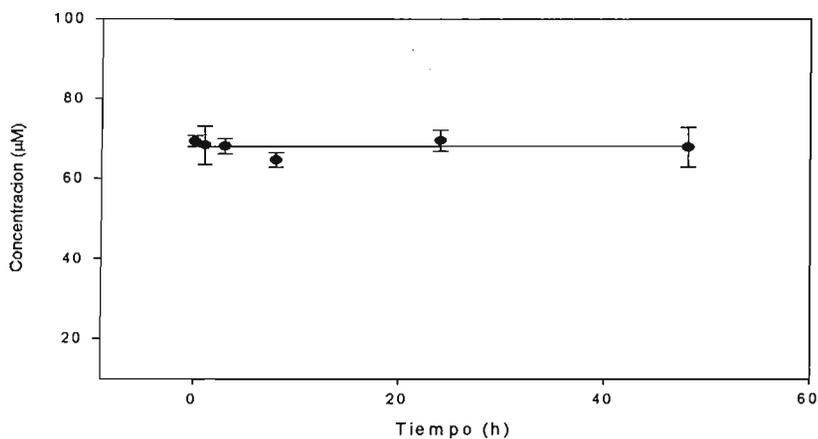


Figura 22. Estabilidad de FHL30 determinada por HPLC.

Tabla 10. Estabilidad del compuesto FHL31

Tiempo (h)	Promedio	D.E.	C.V.%	% Variación
0	62.52	3.71	5.93	0.00
1	60.85	2.08	3.42	2.66
3	54.45	1.42	2.61	12.90
8	49.18	2.80	5.70	21.33
24	42.53	1.48	3.48	31.96
48	39.34	2.16	5.50	37.07

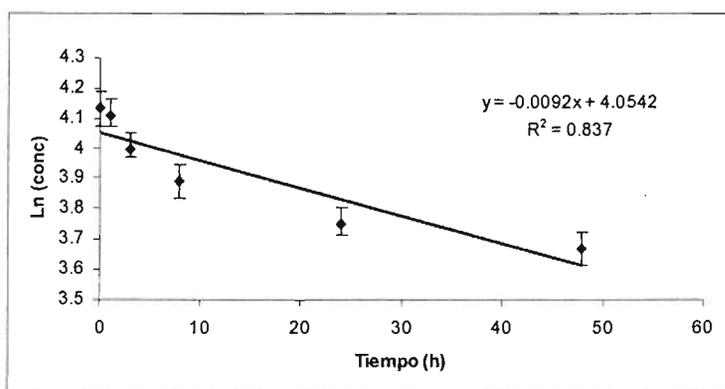


Figura 23. Estabilidad de FHL31 determinada por HPLC.

La Figura 23. nos muestra una cinética de pseudo primer orden por tratarse de la hidrólisis básica del éster. Por lo que podemos decir que la $V = 0.0092 \cdot [\text{FHL31}][\text{OH}]$. Ahora bien, sabemos que la $[\text{OH}] = 0.8325$, debido a que el medio de cultivo tiene un pH de 7.2. Por lo que la constante de velocidad puede expresarse de la siguiente manera $V = 0.0077[\text{FHL31}]$. Así mismo, el tiempo de vida media para esta reacción es de 75h.

7. Discusión de resultados

7.1 Evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos **FHL30** y **FHL31** contra *G. intestinalis* por el método de resiembra

El análisis de las actividades giardicidas del los compuesto **FHL30** y **FHL31** en comparación con los ácidos **VRM15** y **VRM16** se observo que en el caso del **VRM15**, éste fue 4.6 veces más activo que **FHL30**. y que el compuesto **FHL31** fue 2.1 veces más potente que el ácido **VRM16**. Al comparar las potencias de los compuestos **FHL30**, **FHL31**, **VRM15**, **VRM16** y **H**, es evidente que **VRM15>FHL30>H**, y para **FHL31>VRM16>H**. Por lo que los resultados obtenidos apoyan el concepto de que los bencimidazoles *N*-metilados son más potentes contra *G. intestinalis* que los análogos 1*H*-bencimidazólicos. Así mismo, los compuestos con relación 1,6 (grupo metilo/grupo ácido) son más activos que aquellos con relación 1,5.³⁵

Resulta de interés que los valores CI_{90} de los compuestos **FHL30** y **FHL31** son de mucho menor magnitud que el presentado por el metronidazol, lo que significa que se necesita menor cantidad de compuesto para poder matar al 90% de la población.

7.2 Condiciones de trabajo para el análisis cuantitativo de **FHL30** y **FHL31** por HPLC.

Las curvas de calibración para ambos compuestos presentan coeficientes de correlación de 0.9996 para **FHL30** y 0.999 para **FHL31**. De igual manera, los coeficientes de variación para ambas están por debajo del 2% (Tablas 17 y 20 , apéndice C). Lo anterior sugiere que la cuantificación de los compuestos **FHL30** y **FHL31** en los sobrenadantes de la extracción y la estabilidad de los mismos son confiables.

Al realizar la cuantificación por HPLC del medio de cultivo complementado, se detecto la presencia de algunos componentes con un tiempo de retención similar a los registrados para los compuesto **FHL30** y **FHL31**,por lo que se decidió tratar los

sobrenadantes recuperados durante la extracción del fluido de *G. intestinalis* con cartuchos sep pacK (Waters), y así disminuir la presencia de los componentes del medio de cultivo. La concentración del compuesto **FHL30** y **FHL31** se vió disminuida, por lo que se decidió no utilizar dicha herramienta. La segunda alternativa fue el uso de filtros (Supelco, Iso-Disc™ Nylon 0.45 µm x 13 mm de diametro). Lo cual permitió el paso del compuesto de interés y retuvo en buena proporción a los componentes del medio de cultivo. Del material filtrado se hizo una dilución ACN:H₂O (40:60) y se observo que los componentes del medio de cultivo libre de compuesto ya no eran detectados por el HPLC.

Sin embargo, en el estudio de estabilidad para el compuesto **FHL31** no se pudo eliminar por completo la presencia de uno de los componentes del medio de cultivo que presentaba el mismo tiempo de retención que este compuesto. Ya que la cantidad de medio de cultivo analizada era doble. Por lo que se decidió restar el área obtenida en el medio de cultivo para el mismo tiempo de retención que el compuesto **FHL31**.

7.3 Cuantificación de **FHL30** y **FHL31** en los sobrenadantes recuperados de la extracción del fluido de *G. intestinalis*

La membrana plasmática de este parásito, se encuentra constituida por componentes lipoideos que la hacen impermeable al paso de sustancias hidrofílicas;⁵⁰ por lo tanto, los compuestos deben tener un balance entre sus propiedades hidrofílicas y lipofílicas.

La adición del grupo *N,N*-dietilglicolamida en las posiciones 5(6) del anillo bencimidazolico en teoría le conferiría características fisicoquímicas necesarias a los compuestos **FHL30** y **FHL31** para poder atravesar la membrana plasmática de *G. intestinalis* en un tiempo de 3 h. Por lo anterior se realizo la determinación teórica del log P, de los compuestos mediante el programa de computo ACD/lab™ este valor fue de 2.23 ± 1.21 para los dos compuestos. la estimación de la liposolubilidad de un compuesto

resulta de interés cuando se desea conocer la capacidad para atravesar membranas biológicas (permeabilidad). Los valores de log P de 2.23 sugiere que presentan una lipofilia adecuada para poder atravesar la membranas biológicas a través de difusión pasiva, ya que dicho rango de valores de log P se ha establecido como ventana optima para absorción pasiva de fármacos.⁶⁰ Por otro lado, la velocidad con que difunde un fármaco a través de la membrana plasmática esta en función del gradiente de concentración en ambos lados de la membrana, el cual influye de manera proporcional.⁴² Lo anterior se considero al incubar por 3 h los trofozoitos de *G. intestinalis* con los compuestos **FHL30** o **FHL31** a una concentración de 99.97 μM la cual se hallaba por arriba de la CI_{50} y CI_{90} de ambos compuestos. Esta concentración empleada aseguro que el compuesto se encontrara disuelto en el medio de cultivo y con ello favorecer el gradiente de concentración para que los derivados pudieran atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva.⁶⁰

Sin embargo, a pesar del log P calculado para **FHL30** y **FHL31**, los resultados obtenidos muestran que los compuestos se detectaron únicamente en el medio de cultivo no presentándose en los Sb1 y Sb2 ni en el fluido *G. intestinalis*. Lo que sugiere que el tiempo de exposición (3 h) no es suficiente para que estos compuestos puedan atravesar la membrana de este parásito y por ende ejercer su acción giardicida.

7.4 Estabilidad de los compuestos **FHL30** y **FHL31** en medio modificado TYI-S-33 complementado al 10% en un periodo de 48h por HPLC

Al analizar la estabilidad del compuesto **FHL30**, las concentraciones de éste se mantuvieron prácticamente constantes. La NOM-073-SSA1-1993 establece que si el porcentaje de variación del compuesto es mayor al 10% , entonces se considera que el compuesto se está degradando y por lo tanto no es estable. Lo anterior nos da los argumentos para poder asegurar que el compuesto **FHL30** es estable durante 48 h. (tiempo de incubación en el método de resiembra) ya que en ninguno tiempo el porcentaje de variación rebasa el 10%. Además de este parámetro los resultados se sometieron al

análisis estadístico ANOVA (ver apéndice C), en donde también se pudo corroborar que no existen diferencias significativas. Con los resultados obtenidos se puede inferir que en el ensayo de actividad giardicida, en donde los trofozoítos se incuban por 48 h con **FHL30**, la actividad observada (CI_{50} de 1.513 μM) se debe a el mismo compuesto y no a la del ácido **VRM15**.

Con respecto a el compuesto **FHL31**, éste presenta degradación. Los porcentajes de variación a partir de las 3 h sobrepasan el 10% establecido por la NOM-073-SSA1-1993, por lo que podemos decir que este compuesto no es estable. Las enzimas presentes en el suero empleado para complementar el medio de cultivo TYI-S-33 pueden ser las responsables de la hidrólisis del éster.

La actividad giardicida que se observó del **FHL31** (CI_{50} 1.292 μM) pudiera deberse a su transformación a **VRM16**, ya que en el ensayo de estabilidad es evidente que **FHL31** se degrada rápidamente y a las 48 h queda muy poco **FHL31** presente.

Como puede apreciarse en la Figura 23, el coeficiente de correlación es de 0.837 lo que hace suponer que no se trata de una cinética de pseudo-primer orden como se estableció en los resultados. Esta reportado que los esteres presentan hidrólisis básica a pH neutros o en soluciones básicas,⁴¹ siendo el caso del medio modificado TYI-S-33 complementado al 10%, el cual tiene un pH de 7.2. Aunado a esto sabemos que se tiene un sistema acuoso, por lo que es de esperarse que el ester sufra hidrólisis por el ataque del OH^- al grupo carbonilo del ácido y así generar el ácido y alcohol correspondientes para el compuesto **FHL31**.

Lo anterior nos dice que tanto el derivado **FHL30** como el **FHL31** deben de degradarse por hidrólisis básica por tratarse de esteres. Sin embargo, es evidente que el mayor efecto estérico que guarda el grupo *N,N*-dietilglicolamida y el metilo en el compuesto **FHL31**, en una relación 1,6, altera la velocidad de hidrólisis haciendo esta mucho más rápida en comparación con el compuesto **FHL30**, con una relación 1,5.⁶¹

8. Conclusiones

- Los compuestos **FHL30** y **FHL31** fueron activos contra *G. intestinalis*, siendo menos potentes que el albendazol pero equiparales con el metronidazol.
- El **FHL31** con relación 1,6 entre el grupo N-metilo y el carbonilo fue ligeramente más activo que su isómero 1,5.
- Tanto el compuesto **FHL30** como el **FHL31** no atravesaron la membrana plasmática de *G. intestinalis* en 3 h.
- Puesto que **FHL31** presentó un tiempo de vida media mayor a 48 h, la actividad giardicida determinada fue debida a la del profármaco como tal.
- El sustituyente *N,N*-dietilglicolamida no confirió mejores características a los profármacos **FHL30** y **FHL31** para poder atravesar la membrana del parásito en un periodo de exposición de 3 h.

Con base en lo anterior se puede descartar la hipótesis planteada.

Bibliografía

1. Nitya Anand. Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs, Elsevier; 1997, 25, pp. 424.
2. Cline M. D.. Manual de Medicina de urgencias, 5ª edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana; México, 2003, pp. 2-33.
3. <http://www.monografias.com/trabajos12/enfin/enfin.shtml>.
4. <http://www.ssa.gob.mx>
5. Tag E.. Chemotherapeutic Targets in Parasites, Ed. Contemporary Strategies, Cambridge 2002.
6. Games E., Introducción a la Pediatría, 6ª edición Ed. Mendez editores; México, 2003, , p313-315.
7. Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., Gerald D., Schmidt., Larry S. Foundations of Parasitology, 6ª edición, Ed. Mc Graw Hill, México, 2000 , pp.84-89.
8. Rodney D. C. A., The Biology of Giardia spp. *Microbiological reviews*,1991, 706-732.
9. David B. Parasitosis Humanas; Corporación para investigaciones biológicas, 3ª edición, Colombia, 1988 , pp. 61-67.
10. William A. Petri Jr. Therapy of Intestinal Protozoa; *Trends in Parasitology*; 2003;19:523-526.
11. Harrison. Principios de Medicina Interna Compendio, 14ª edición, Ed. McGraw-Hill interamericana; México, 1999.
12. Chester B. Parasitología clínica; 2ª edición Ed. Salvat editores; México, 1986, pp. 52-56.
13. Gerald D.. Schmidt. Larry S. Foundations of Parasitology, 6ª edición Ed. Mc Graw Hill; México, 2000, , pp. 84-89.
14. www.merksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dolands...
15. Staffan G. Hagblom P. Daniel J.E. Palm. Giardia lamblia-a Model Organism for Eukaryotic Cell Differentiation; FEMS *Micribiology Letters* 2003;218:3-7

16. Argüerello R.; Ortega-Pierres M.. Formación del quiste de *Giardia lamblia*: un análisis molecular con perspectivas para el control de la giardiosis, *Avance y Perspectiva*; 1995;14:42-47.
17. Luján H.D.; Mowatt M.R.; Nash T.E., The Molecular Mechanisms of *Giardia* Encystation; *Parasitology Today*, 1998;14:446-449.
18. Adam R.; Biology of *Giardia lamblia*; *Clinical Microbiology*, 2001;447-475.
19. www.dpd.cdc.gov/.../body_Giardiasis_page/html
20. http://www.umm.edu/childsafety_spanish/outdoor_safety/ency/giardiasis/giardiasis.htm
21. Upcroft J.A; Upcroft P., Drug Resistance and *Giardia*; *Parasitology Today*, 1993;9:187-190.
22. Wolfe M. S. Giardiasis, *Clinical Microbiology reviews*, 1997;93-100.
23. Morgan U.M.; Reynoldson J.A; Thompon R.C., Activities of Several Benzimidazoles and Tubulin Inhibitors Against *Giardia* spp. In Vitro, *Antimicrobial Agents and Chemotherap*, 1993;37:328-331.
24. Cedillo-Rivera R.; Chavez B.; Gonzalez. A.; Tapia A.; Yépez-Mulia L., In vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Tricomonas vaginalis Trophozoites*, *Eukaryot Microbiology*, 2002;49:201-208.
25. Olson M.E.; Ceriand H.; Morck D.W., *Giardia* Vaccination, *Parasitology Today*, 2000;16: 213-217
26. Modelo OMS de Información Sobre Prescripción de Medicamentos, Medicamentos Utilizados en las Enfermedades Parasitarias, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1996, pp. 3-12.
27. Rodríguez C. R., Vademécum Académico de Medicamentos, 3ª edición, Ed. McGraw-Hill interamericana, México, 1999, pp.37,413,632,902.
28. Upcroft P., Drug Resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates, *Drug Resistance Updates*, Editorial Harcourt Brace & Co. Ltd 1998;166-168.
29. <http://www.plmlatina.com/cddef/cad/productos/4-11672.htm>
30. <http://www.aventispharma.com.ec/secnidial.htm>

31. Lymbery A.J., *Giardia* From Molecules to Disease, CAB International, Inglaterra, 1994 pp.3-31.
32. Navarrete-Vazquez G.; Cedillo-Rivera R.; Hernandez-Campos A.; Yepez- Mulia L.; Hernandez-Luis F.; Valdez J.; Morales R.; Cortes R.; Hernandez-Castillo R. Síntesis an Antiparasitic Activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazol derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*, 2001;11:187-190.
33. Reynoldson J.A.; Thompson R.C.A; Meloni B. P., The Mode of Action of Benzimidazoles Against Giardia and Their Chemotherapeutic Potential Against Giardia and Other Parasitic Protozoa. Coombs y M. North (ed), *Biochemical Protozoology*. Taylor and Francis, Londres. 1991, pp. 587-593.
34. Balimane P. V.; Chong S.; Morrison R.A., Current Methodologies Used for Evaluation of intestinal Permeability and Absorption, *Journal Pharmacology. Toxicology. Methods* 2000;44:301-312.
35. Miguel Ángel Vilchis Reyes, Síntesis actividad giardicida y permeabilidad aparente de derivados de 2-(trifluorometil) bencimidazol, Tesis de maestría Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2004.
36. Andezajewska M. Yépez-Mulia L.; Cedillo-Rivera R.; Tapia A.; Vilpo L.; Vilpo J.; y Kazimierczuk Z., Síntesis Antiprotozoal and Anticancer Activity of Substituted 2-Trifluoromethyl-and 2-Pentafluoroethylbenzimidazoles, *Europe Journal Medicinal Chemistry*, 2002;37:973-978.
37. Piña Gallardo Blanca Estela, Preparación de tres profármacos de ácido 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México 2003.
38. Soriano-Agaton F., Síntesis del 5-carboxi-2-(trifluorometril)-1H-bencimidazol, un bioprecursor y un análogo de tipo carboxamida. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México 2002.

39. Mork N.; Bundgaard H., Glycolamide Esters as Biolabile Prodrugs of Carboxylic Acid Agents: Synthesis, Stability, Bioconversion, and Physicochemical Properties, *Journal of Pharmaceutical sciences*, 1988;77: 285-298.
40. Mork N.; Bundgaard H., Prodrugs as Drug Delivery Systems. 68. Chemical and Plasma-Catalyzed Hydrolysis of Various Esters Benzoic Acid: a Reference System for Designing Prodrug Esters of Carboxylic Acid Agents, *International Journal of Pharmaceutics*, 1987;39:75-85.
41. Testa B.; Mayer J.M., Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Ed. Wiley-Vch, Alemania, 2003;3-12, 365-419.
42. Alvedaño C. Introducción a la Química Farmacéutica, 2ª edición, España, Ed. Mc-Graw- Hill Interamericana, 2001;145,188.
43. Wermuth C.G., The Practice of Medicinal Chemistry, Academic press, Great Britain, 1996;3-5,371
44. Korolkovas, A. Drug development. Essentials of Medicinal Chemistry, John Wiley Sons. 2a edición U.S.A. 1988;97-118.
45. Wermuth C.G. Designing prodrug and bioprecursors. En Drug Design. Fact or Fantasy. Editado por Folles G. Academic Press, U.S.A. 1984:47-72
46. Riley, Tomas N. The prodrug concept and new drug design and development, *Journal Chemical Education* 1988;65(11):947-953.
47. Francisco Hernández Luis, Preparación de derivados hidrosolubles del albendazol, Tesis doctorado, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 1999;8-16.
48. Bundgaard H.; Mork N., Glycolamide esters as a novel biolabile prodrug type for non-steroidal anti-inflammatory carboxylic acid drugs, *International Journal of pharmaceutics*, 1988;43:101-110.
49. Steffansen B.; Mork N.; Bundgaard H., Prodrugs as drug delivery systems. 95, Stability and enzymatic hydrolysis of glycolate, glycolamide and alkyl esters of tyrosine, *Acta Pharma. Nordica* 1989;2: 47-56.
50. Guyton H., Manual de fisiología médica, 10ª edición, México, Ed. Mc-Graw Hill interamericana 2001, pp. 29-35.

51. Yalkowsky, S.H.; Morozowich, W.A. physical chemical basis for the design of orally active prodrugs. En *Drug Desig*, Academic press, Nueva Orleans, 1980, 9, pp. 122-183.
52. Cingolani Horacio- B. Houssay A. y colaboradores, *Fisiología Humana de Houssay*, Ed. El Ateneo, Argentina, 2000, pp. 8-17
53. Lörenberg R.; y Amidon G L.; Modern Bioavailability, Bioequivalence and Biopharmaceutics Classification System. New Scientific Approaches to International Refulatory Standards. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;50:3-12.
54. Hillgren, K.M.; Kato, A; Borchardt, R.T. In vitro systems for studying intestinal drug absorption *En Medicinal Research Reviews* 1995, 15(2), 83-109.
55. Dresman J.B., Lennernas H., Oral Drug Absortion Prediction and assessment, Ed. Marcel Dekker Inc, Nueva York, USA, 2000;106:31-45.
56. Wells, J.L. Solubility. En *pharmaceutical Preformulation: The of Estimation for Organic Compounds*, Marcel Dekker Inc., U.S.A. 1981, 12, pp.183-211.
57. Yalkowsky S.H.;Benejee S., En *aqueosus Solubility Methods o Estimation for Organic Compounds*, Marcel Dekker, Inc., U.S.A.1992, pp. 2-12.
58. Smith D.A.; Waterbeemd H.; Walker D.F.; *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*, Vol. 13, Alemania, Ed Wiley-Vch, 2001, pp.1-12
59. Cedillo-Rivera, R.;Muñoz, O.J.*Medicinal .Microbiologs.*1992,37,221.
60. Panchagnula, R.; Thomas, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics* 2000, 201:131-150.
61. Krogsgaard-Larsen P.; *A Textbook of Drug Design and Development*, Dinamarca, Ed. Harwood Academic Publisches, 1991;114-191.
62. http://www.superior.de/pgr06_info_s.htm
63. García C. F.,*La tesis y el trabajo de tesis*, 2ª edición, México, Ed. Spanta, 1998.

Apéndice A

A.1 CUENTA DE TROFOZOITOS CON CÁMARA DE NEUBAUER

1. El recuento presupone un conocimiento exacto de las líneas límite de las cámaras de conteo utilizadas. Éstas se pueden ver en la (Figura 22.)
2. Los trofozoitos, que se encontraban en o cerca de las líneas de limitación, no se contaran dos veces o se sobrepasara el conteo, se siguieron determinadas reglas (Ej. figura 22).
3. Se contaron todas las células dentro de una zona de medición definida.
4. También se contaron las células (marcadas en negro), que se apoyan o tocan en las 2 caras, por ejemplo en la línea de media izquierda y superior (Figura 22).
5. Esto también fue válido para el tipo de la operación de conteo propiamente dicho, que se efectuó en forma de meandro. Se efectuó en el ángulo superior izquierdo en dirección de la flecha (Figura 23).



Figura 24. Líneas de limitación y ejemplo de trofozoitos a ser contados.⁶²

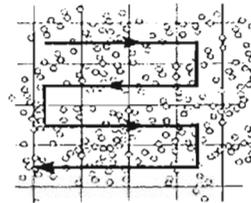


Figura 25. Conteo a manera de meandro.⁶²

6. En los conteos de cámaras, el diagrama del condensador en el microscopio invertido (Olympus CK2) se encontraba cerrado en gran parte.
7. La diferencia de las células contadas en los cuadrados grandes y en los cuadrados de grupos no podrá ser superior a 10 células. En todos los conteos de células, se realizaron dobles determinaciones. Después del

recuento de la red de conteo superior, se recuenta como control también la red de conteo inferior. Se tuvo cuidado de que la cámara no estuviera reseca.

8. Si en alguna de las redes se contaba mas de 50 trofozoitos se hacia una dilución 1:10, en donde se colocaban 100 µL de la muestra y 900 µL de PBS.
9. Al terminar de contar los trofozoitos en las cuatro redes, el total de estos se divide entre cuatro (obteniendo el promedio) el resultado es multiplicado por el factor de dilución y por 10 000. Con ello el número de trofozoitos por mL.

Este 10 000 se debe a que cada cuadrante tiene de superficie 0.1 mm, y cada lado 1mm por lo que tenemos entonces.

$$\text{Volumen} = 1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1\text{mL}, \text{ por lo tanto;}$$

Trofozoitos por cuadrante	0.1µl
X	1000µl

Donde X = 10 000

A.2 MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33

1. Se pesaron los siguientes reactivos

REACTIVO	PESO (g)	DISTRIBUIDOR
NaCl	2	J.T. Baker
KH ₂ PO ₄	1	J.T. Baker S.A. de C.V.
Na ₂ HPO ₄	0.6	J.T. Baker S.A. de C.V.
Biosate™ Peptona	30	Becton Dickinson
D-(+)-Glucosa	10	Sigma Chemical
L- cisteina	2	Sigma
Ácido ascórbico	0.2	SigmaChemical
Citrato férrico de amonio	0.0228	Sigma Chemical
Bilis bovina	0.8	Sigma Chemical

2. A un matraz Erlenmeyer de 2 L se le adicionaron 700 mL de agua bidestilada.
3. Se disolvió con agitación cada uno de los componentes del medio.

4. Se adicionó la cantidad suficiente de agua para llevar a un volumen de 900 mL.
5. Se Ajustó el pH con NaOH o HCl a 7.2.
6. Se filtro a través de membranas (Millipore MFTM Membrane filtros) con diámetros de 0.45 µm y 0.22 µm cada una de ellas.
7. Para ser recolectado en una botella estéril de 1L.

A.3 MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 COMPLEMENTADO CON SUERO DE TERNERA AL 10%

1. Se adicionaron 98.9 mL de medio de cultivo TSY-I33 a un frasco estéril con capacidad de 150 mL.
2. Se añadieron 10 mL de suero de ternero (Bovine Calf Serum, distribuido por HyClone) previamente calentado a 56°C durante 30 min.
3. Asi mismo, se adicionó 1 mL de antibiótico mezcla de Penicilina-Estreptomicina 10 000 U/mg/mL, en solución salina de NaCl al 0.85% (distribuido por In vitro).
4. Se agitó.

A.4 PBS 10 x (AMORTIGUADOR DE FOSTAFO SALINO)

Reactivo	Peso (g)	Peso (Gramos)
NaCl	80	J.T. Baker
KCl	2	Merk-México S.A de C.V.
KH ₂ PO ₄	2	J.T. Baker S.A. de C.V.
Na ₂ HPO ₄	21.5	J.T. Baker S.A. de C.V.

1. A un matraz Erlenmeyer de 2L se le adicionaron 500 mL de agua bidestilada, disolviendo con agitación cada uno de los componentes.
2. Una vez disueltos se transfirió cuantitativamente la mezcla del punto 2 a un matraz aforado de 1L llevando a volumen con agua bidestilada.

3. Se ajustó el pH con NaOH o HCl a 7.2.
4. Para después ser esterilizado por autoclave a (15 lb, 120° C por 20 min.).

NOTAS:

1. Para preparar PBS 1x solamente se realizó una dilución 1:10 con agua bidestilada.
2. En el caso del PBS al 0.2% de CCl_3COOH (Merck), se pesaron 20 mg de CCl_3COOH transfiriendo cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL y llevando a volumen.

A.5 DILUCIONES EMPLEADAS EN EL MÉTODO DE RESIEMBRA

Se partió de una solución patrón donde se disolvieron 10mg/ml del compuesto en DMSO (Baker). Se cuidó que la concentración final del DMSO en los tubos de ensayo no rebasaran el 1% de la concentración total con la finalidad de que el parásito no se viera afectado en su crecimiento debido a dicho disolvente.

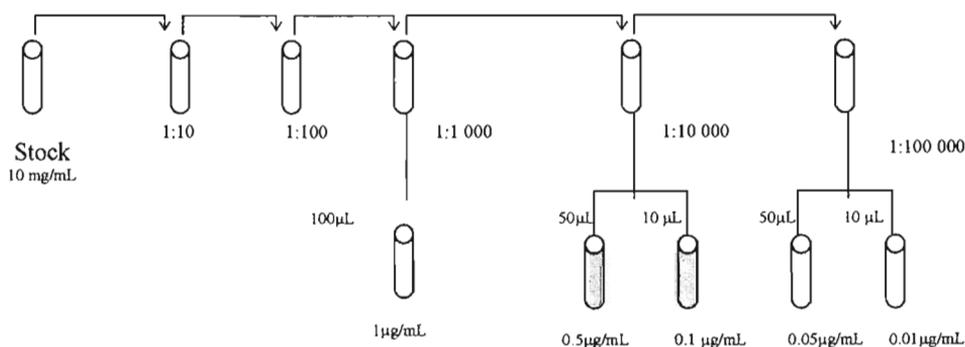


Figura 26. Diagrama de diluciones empleadas en el método de resiembra.

Apéndice B

B.1 CURVAS DE CRECIMIENTO DE *G. intestinalis*.

Tabla 11. Curva de crecimiento de *G. intestinalis* con inóculo de 5×10^4 (Trofozoitos/mL)

Tiempo (h)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación	C.V.%
0	5,00E+04	5,00E+04	5,00E+04	5,00E+04	0,0000	0,00
24	1,06E+05	1,02E+05	1,40E+05	1,16E+05	20914,18	18,03
48	1,46E+06	1,26E+06	1,05E+06	1,26E+06	205020,32	16,315
72	3,18E+06	3,00E+06	3,25E+06	3,14E+06	128970,28	4,10
96	3,20E+06	2,96E+06	3,20E+06	3,12E+06	138564,06	4,44

Tabla 12. Curva de crecimiento de *G. intestinalis* con inóculo de 2×10^7 (Trofozoitos/mL)

Tiempo (h)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación	C.V.%
0	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	0,0000	0,0000
24	3,20E+07	3,12E+07	2,98E+07	3,10E+07	1115407,2500	3,5973
48	2,75E+08	2,95E+08	3,10E+08	2,93E+08	17559422,9214	5,9862
72	4,75E+08	4,90E+08	5,20E+08	4,95E+08	22912878,4748	4,6289
96	4,90E+08	4,80E+08	5,10E+08	4,93E+08	15275252,3165	3,0963

B.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PROBIT PARA CADA UNO DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS.

Tabla 13. CI_{50} y CI_{90} para el albendazol

Ensayo	CI_{50} (µg/mL)	CI_{50} (µM)	CI_{90} (µg/mL)	CI_{90} (µM)
1	0,016	0,0603	0,119	0,4484
2	0,016	0,0548	0,12	0,4110
3	0,017	0,0640	0,084	0,3165
Promedio	0,016	0,0597	0,12	0,3919
C.V.%	3,5347	7,7541	19,0421	17,3429

Tabla 14. CI_{50} y CI_{90} para el metronidazol

Ensayo	CI_{50} (µg/mL)	CI_{50} (µM)	CI_{90} (µg/mL)	CI_{90} (µM)
	0,241	1,4094	79,305	463,7719
	0,226	1,3216	88,68	518,5965
	0,243	1,4211	15,574	91,0760
Promedio	0,2367	1,3840	61,1863	357,8148
C.V.%	3,9260	3,9260	65,0122	65,0122

Tabla 15. CI_{50} y CI_{90} para el compuesto **FHL30**

Ensayo	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CI_{50} (μM)	CI_{90} ($\mu\text{g/ml}$)	CI_{90} (μM)
1	0.6146	1.7200	37.4076	104.6870
2	0.5073	1.4197	30.7195	85.9700
3	0.5003	1.4000	17.82	49.8701
Promedio	0.5407	1.5132	28.6490	80.1757
C.V.%	11.8506	11.8506	34.7537	34.7537

Tabla 16. CI_{50} y CI_{90} para el compuesto **FHL31**

Ensayo	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} (μM)	CI_{90} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{90} (μM)
1	0.3638	6.2955	1.0181	17.6183
2	0.5397	12.057	1.5104	33.7421
3	0.4820	3.8005	1.3489	10.6359
Promedio	0.4618	7.3843	1.2925	20.6654
C.V.%	19.4155	57.3454	19.4155	57.3454

Apéndice C

Resultados Analíticos por HPLC para los compuestos **FHL30** y **FHL31** correspondiente a las curvas de calibración y concentración presente de cada compuesto en el medio modificado TSY-I33 complementado al 10% recuperado del sobrenadante del proceso de extracción del fluido de *G. intestinalis*.

Compuesto **FHL30**

Tabla 17. Áreas correspondientes a la curva de calibración del compuesto **FHL30**

Concentración (μM)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Promedio	D.E.	C.V.%
6.716	90334.75	90080.71	90770.51	90005.48	90005.48	345.16	0.38
33.582	413493.15	410670.42	411867.57	409390.70	249698.09	1747.53	0.70
60.44	707265.83	707937.85	717364.35	703386.49	400927.56	5933.21	1.48
100.746	1162788.40	1178859.85	1160397.58	1167475.84	760084.34	8198.23	1.08
167.91	1893599.69	1876108.80	1878160.95	1894064.22	1254975.52	9678.26	0.77

Tabla 18. Concentraciones obtenidas en la extracción del fluido de *G. intestinalis* para el compuesto **FHL30**

Ensayo	Repetición 1 Concentración (μM)	Repetición 2 Concentración (μM)	Repetición 3 Concentración (μM)	Promedio Concentración (μM)	D. E.	C.V.%
1	91.14	91.73	101.42	94.76	5.77	6.09
2	101.09	93.66	93.59	96.11	4.31	4.49
3	77.15	78.04	79.24	78.14	1.05	1.34
4	77.17	78.07	79.26	78.17	1.05	1.34
Promedio				86.80		
D.E.				9.99		
C.V.				11.51		

Tabla 19. Estabilidad del compuesto **FHL30**

Tiempo (h)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	D.E.	C.V.%
0	70.31	67.74	70.02	69.36	1.41	2.03
1	73.95	64.78	66.41	68.38	4.89	7.15
3	67.06	67.06	70.40	68.17	1.93	2.83
8	63.85	63.45	66.85	64.71	1.86	2.87
24	67.50	68.83	72.64	69.66	2.67	3.83
48	62.22	71.34	70.25	67.94	4.98	7.34

Estadística.

Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis un camino de análisis de varianza sobre filas. Confianza ($P = <0.001$)

Tabla 20. Medianas por grupos a los diferentes tiempos de estabilidad del compuesto **FHL30**

Tiempo (h)	0	1	3	8	24	48
Repeticion1	70.30	73.94	67.05	63.84	67.49	62.21
Repeticion2	67.74	64.77	67.06	63.44	68.83	71.34
Repeticion3	70.02	66.40	70.40	66.84	72.64	70.25
Medianas	68.88	65.59	67.06	63.64	68.16	66.23

$H = 2.200$ con 5 grados de libertad ($P = 0.821$)

La diferencia en los valores de las medianas entre los grupos tratados no son suficientemente grandes excluye la posibilidad de que la diferencia se debe a simple rangos de variabilidad. Por lo que no existe diferencia estadística significativa ($P = 0.821$)

Compuesto **FHL31**

Tabla 21. Áreas correspondientes a la curva de calibración del compuesto **FHL31**

Concentración (μM)	Repetición				Promedio	D.E.	C.V.:%
	Repetición1	2	3	4			
0.54	22302.00	22339.00	22355.00	23397	22598.25	532.96	2.36
6.72	203305.58	203029.24	203305.58	203029.24	203167.41	159.54	0.08
33.58	901035.70	916736.52	900214.00	924247	910558.31	11877.65	1.30
60.44	1626137.00	1664745.00	1643889.00	1625504	1640068.75	18526.89	1.13
100.75	2761353.64	2778090.02	2825631.00	2834237.56	2799828.06	35602.57	1.27
167.91	4867215.78	4884432.75	5007036.23	4687006.83	4861422.90	131892.91	2.71

Tabla 22. Concentraciones obtenidas para 4 ensayos diferentes de la extracción del fluido de *G. intestinalis* para el compuesto **FHL31**

Ensayo	Repetición 1 (μM)	Repetición 2 (μM)	Repetición 3 (μM)	Promedio (μM)	D.E.	C.V.%
1	99.55	94.10	89.84	94.49	4.87	5.15
2	101.47	90.20	89.12	93.60	6.84	7.31
3	93.85	100.81	92.49	95.71	4.46	4.66
4	96.47	99.25	79.50	91.74	10.69	11.66
Promedio				93.89		
D.E.				1.67		
C.V.%				1.78		

Tabla 23. Estabilidad del compuesto **FHL31**

Tiempo (h)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	D.E.	C.V.%
0	61.43	66.64	59.47	62.52	3.71	5.93
1	61.56	62.48	58.51	60.85	2.08	3.42
3	55.87	53.03	54.46	54.45	1.42	2.61
8	52.19	48.71	46.65	49.18	2.80	5.70
24	40.83	43.34	43.44	42.53	1.48	3.48
48	39.10	37.31	41.62	39.34	2.16	5.50

Apéndice D

En la siguiente sección se presentan los cromatogramas representativos obtenidos por HPLC.

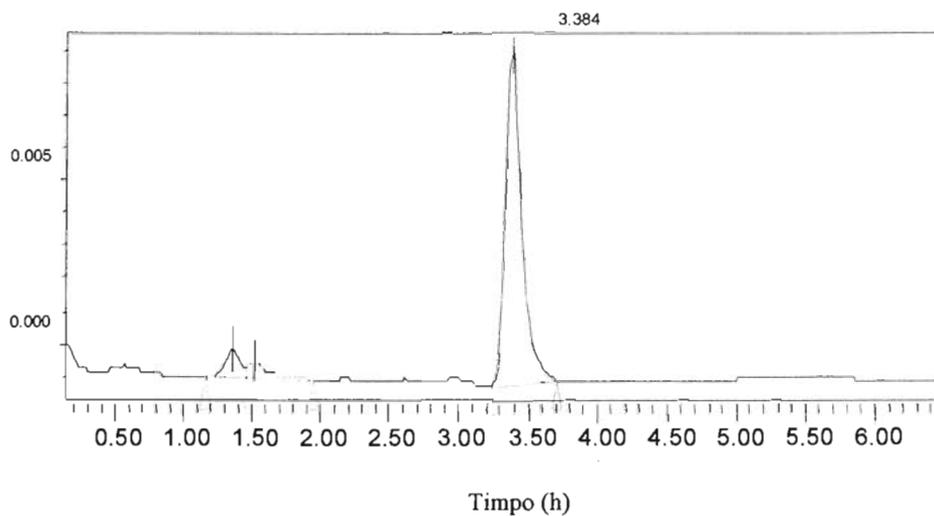
D.1 Cromatogramas para el compuesto **FHL30**

Figura 27. Espectro UV para el compuesto **FHL30**, tiempo de retención 3.384 min.

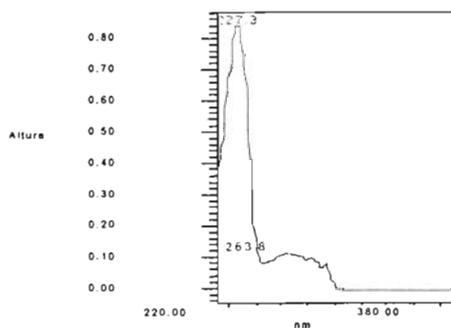


Figura 28. Espectro UV a 270 nm del compuesto **FHL30**.

D.2 Cromatogramas para el compuesto **FHL31**

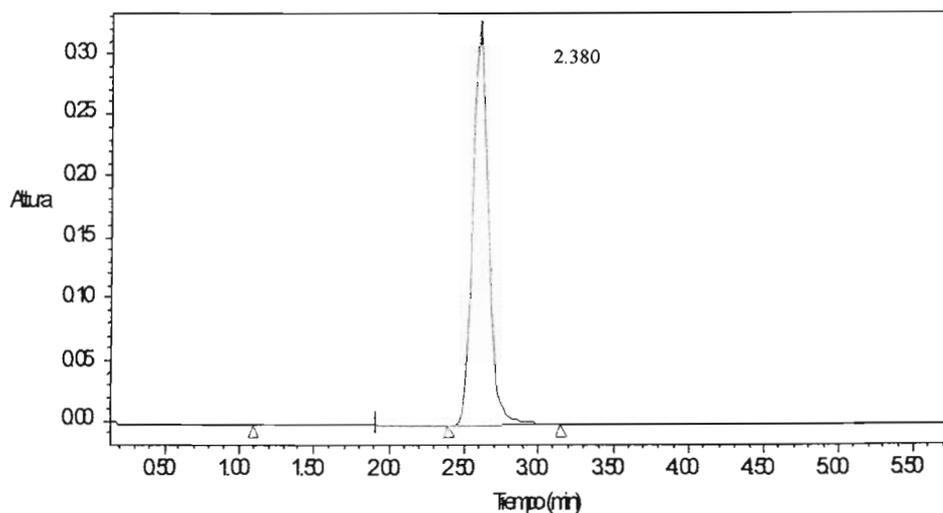


Figura 29. Cromatograma del compuesto **FHL31**, tiempo de retención de 2.380 min.

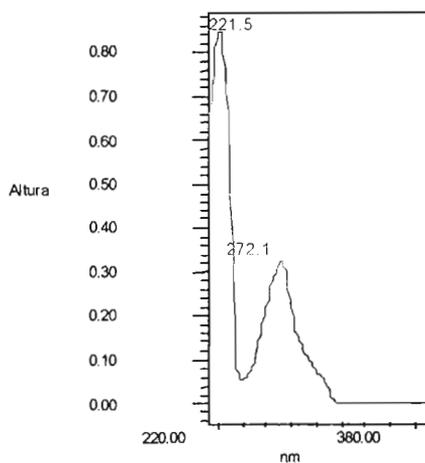


Figura 30. Espectro UV a 270 nm del compuesto **FHL31**.

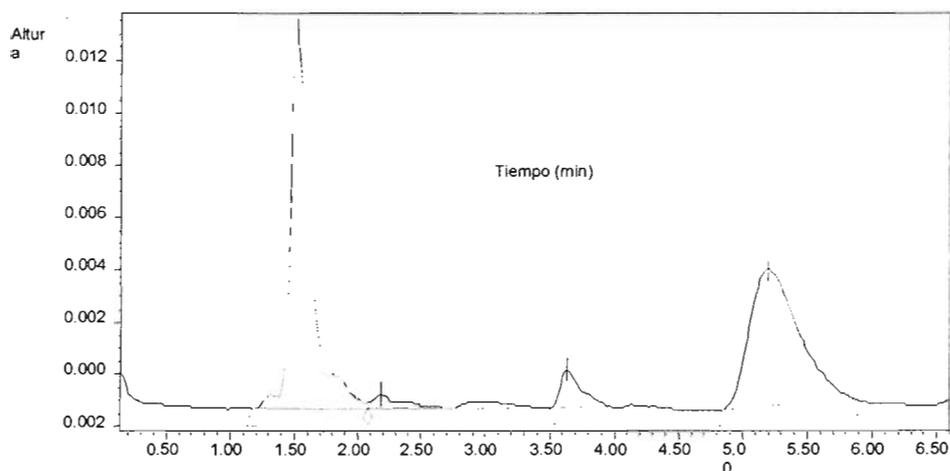


Figura 31. Cromatograma del medio de Cultivo TYI-S-33 complementado al 10%, 1:10, Medio:ACN para luego ser diluido 40:60, H₂O:ACN

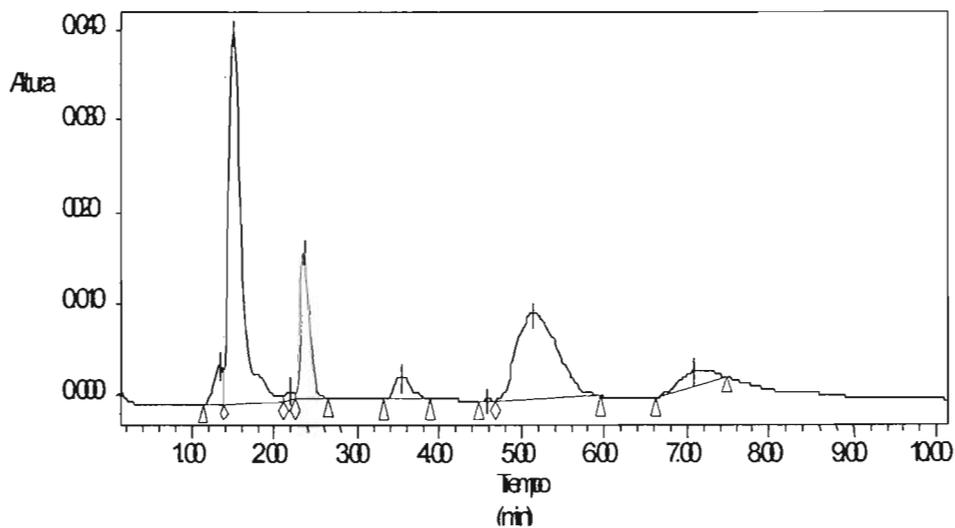


Figura 32. Cromatograma del medio de cultivo TYI-S-33 complementado al 1%, 2:10 Medio:A