



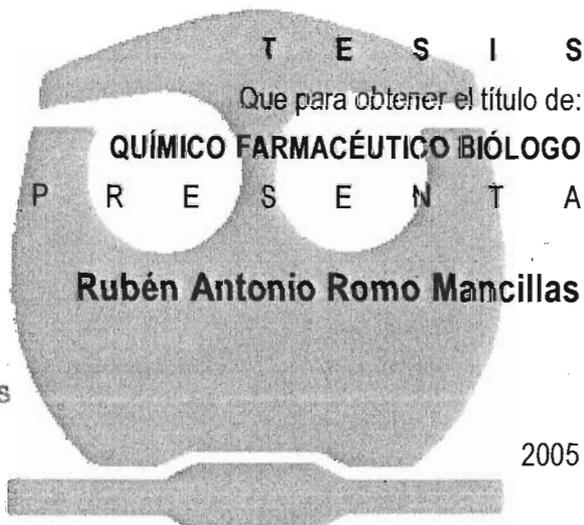
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis de profármacos del fasciolicida experimental
5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol y su estudio de
solubilidad en medio acuoso.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

México, D. F.



2005

m. 349228



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:

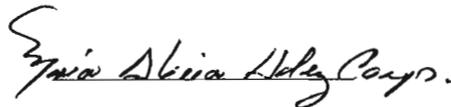
PRESIDENTE	Profa. Ofelia Espejo González
VOCAL	Prof. Armando Cabrera Ortiz
SECRETARIO	Profa. María Alicia Hernández Campos
1° SUPLENTE	Profa. María de Lourdes García Peña
2° SUPLENTE	Profa. Marisol Reyes Lezama

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 122; Conjunto E.
Departamento de Farmacia
Facultad de Química, U. N. A. M.
Ciudad Universitaria, México, D. F.

ASESOR:

M. en C. María Alicia Hernández Campos



SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. Julio César Rivera Leyva

SUSTENTANTE:

Rubén Antonio Romo Mancillas



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

NOMBRE: Rubén Antonio

Romo Mancillas

FECHA: 19/12/2005



¡Oh Dios!
Dame serenidad para aceptar las cosas que no puedo cambiar,
Valor para cambiar las que se puedan,
Y sabiduría para conocer la diferencia

San Francisco de Asís

AGRADECIMIENTOS:

- A Dios, por haberme puesto donde estoy y por permitirme ser un humilde observador de Su maravillosa obra: la vida.

Una falsa ciencia hace ateos; una verdadera ciencia prosterna al hombre ante la divinidad.

Voltaire

- A mis fuentes de conocimientos y disciplina profesional: a la UNAM y a la congregación de los hermanos maristas.

Tan solo por la educación puede el hombre llegar a ser hombre. El hombre no es más que lo que la educación hace de él.

Immanuel Kant

- A la M. en C. Alicia Hernández Campos, al Dr. Rafael Castillo y al Dr. Francisco Hernández Luis. Durante la carrera fueron los mejores maestros que pude haber tenido, pero su conocimiento de vida fue lo mejor que ustedes me han proporcionado. Con su guía, conocimientos, aliento, experiencia y, sobre todo, su pasión por su trabajo hicieron posible este proyecto. Ha sido un honor y un placer formar parte de su excelente grupo de trabajo. A ustedes todo mi agradecimiento, este trabajo es suyo.

El trabajo hecho con gusto y con amor, siempre es una creación original y única.

Roberto Sapriza

- Al QFB Julio César River Leyva, por hacer posible la realización de los estudios *in vitro* de este trabajo. Los fines de semana empleados fueron muy útiles, mi querido Julius; gracias por regalarme tu tiempo para completar este trabajo.

La sabiduría es hija de la experiencia.

Leonardo da Vinci

- A Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Marisela Gutiérrez y al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, por la realización de las pruebas espectrométricas y espectroscópicas de este trabajo.

Cualesquiera que hayan sido nuestros logros, alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos.

Althea Gibson

- A la Gerencia de Recursos Humanos de la Subdirección de Finanzas y Administración de PEMEX-Refinación por los apoyos económicos que durante 10 años me fueron facilitados para mis estudios a nivel básico, medio superior y superior. Asimismo, a DGAPA-UNAM y al CONACYT por los apoyos económicos proporcionados durante el servicio social y este trabajo de tesis con los proyectos IN214502-3 y V-43629-M respectivamente.

Cuando bebas agua, recuerda la fuente.

Proverbio chino

Dadme un punto de apoyo y moveré la tierra.

Arquimedes



DEDICATORIAS:

- A mis padres Carlos y Josefina: no puedo expresar con palabras lo que siento, por ser mi sustento, mi soporte, mi origen, mi ejemplo a seguir, mi razón para cada día ser mejor. Su apoyo, constante y perenne, hicieron de mí lo que soy, por lo que mis logros son suyos; no los defraudaré.

Un buen padre vale por cien maestros.

Jean Jacques Rousseau

- A mi hermano Carlos: mi compañero de juegos en la niñez y mi compañero de juergas en la juventud, mi estándar de referencia, mi consejero, mi amigo. Tu relativa lejanía me ha hecho darme cuenta lo cerca que estas de mí. El que seas mi hermano me hace una de las personas más afortunadas de este mundo.

Hay que tener aspiraciones elevadas, expectativas moderadas y necesidades pequeñas.

H. Stein

- A las familias Romo Mondragón y Mancillas Ramos con sus respectivas derivaciones: los abuelos Rubén, Luz, Fernando^(†) y Ofelia (Chata); a sus hijos Rubén, Guadalupe, Susana, Fernando, Miguel, Patricia y Gerardo, así como a sus cónyuges y descendencia (léase: mis tíos, primos y sobrinos). También a las ramas familiares anexas a estas dos grandes familias (no... no me olvidé de ti, "abuelo" Chava ni de la tía Lupilla y la tía Sopa, ni del tío Juan y tía Ma. Cristina). A todos ustedes, por aguantar mis exabruptos y mis ausencias, por extemar su preocupación por mi sanidad mental... en pocas palabras, por su amor: Mil gracias!!!. Por fin me he dado cuenta de la trascendencia de la frase: "La sangre es más pesada que el agua".

La verdadera educación de un hombre comienza varias generaciones atrás.

Manero

- A la ilustre y nunca bien ponderada HHPB: Alberto, Rubas, Fernando, Elihú, Gerardo, Víctor, Edgar, Paty y Chuya. Algún tiempo atrás conocieron a un ermitaño que hoy les agradece infinitamente su amistad brindada a lo largo de estos años; y aunque no siempre es posible vernos para recordar aquellos tiempos, sepan ustedes que siempre los llevo conmigo en mis recuerdos y, más importante, en mi corazón. No está de más recordar que gracias a sus consejos y regaños (signos inequívocos de su amistad), yo estoy aquí para agradecerse los.

No hay soledad más triste ni afectiva que la de un hombre sin amigos, sin los cuales el mundo es un desierto, pues vivir sin amigos no es vivir.

Francis Bacon

Un amigo es uno que lo sabe todo de ti y a pesar de ello te quiere.

Elbert Green Hubbard

- Al grupo de místicos (a.k.a. grupo selecto #1): Lorena, Irene, Malena, Oliver, Job, Aarón, Leonor, Karina y Gaby (Torba). Por hacer más tolerable la insoportable levedad del ser... químico, que incluyen los desvelos, las prácticas, peleas ocasionales sobre temas relevantes e irrelevantes, cortar nudos gordianos... etc. Su amistad es algo que atesoro en mi corazón y que, a pesar de todo, no cambiaría ni un ápice.

Mi mejor amigo es el que enmienda mis errores o reprueba mis desaciertos.

San Martín

- Al grupo selecto #2: Poncho, Betty, Carlos, Vane, Lety, Edith y Aldo. En estos últimos meses han sido una muy agradable compañía, un pozo de consejos inapreciable y, a pesar de la renuencia inicial, se han hecho un lugar en mi corazón (y espero que yo en el suyo también). Como toda amistad, la nuestra ha sufrido embates importantes que, sin embargo, se han librado bastante bien. Gracias a ustedes he dejado de ser una mala influencia...

Un hermano no siempre puede ser un amigo, pero un amigo será siempre un hermano.

Benjamín Franklin

- A los ñoños (el comal le dijo a la olla, a.k.a. grupo selecto #3): Erika, Isaac, Tanya, Gaby, Jeaneth y Minerva. ¡Cómo olvidar los cafés en Diseño, y con la consecuente volada de clases! Ustedes estuvieron ahí cuando yo estaba en el último círculo del infierno, y me ayudaron a salir de él para empezar la lenta recuperación... jamás lo olvidaré.

Una verdadera amistad es la que sigue a tu lado incluso cuando no te queda más que ofrecer, salvo tu compañía.

Anónimo

- A todos mis compañeros, presentes y ausentes, del laboratorio 122: Nayeli, Maricela, Victor, Paty, Poncho, Carlos, Jorge, Israel, Ariadna, Lalo, Vilchis, Cecilia, Betty, Oscar, Toño, David...evidentemente al Doc. Castillo, a la Maestra Alicia y al Doc. Francisco. Todos ustedes forman o formaron parte de este gran grupo de investigación, en el cual yo me sentí como en mi segunda casa... (ahora entienden porqué me la paso sonriendo o riéndome todos los días).

Encuentra la felicidad en el trabajo o no serás feliz.

Cristóbal Colón

- A los exColegio México (Bernardo, Escamilla, Mónica...), a los biomédicos (Ivonne) y a todos aquellos químicos (Atziri, Joanna, el Inge David, ...) cuya convivencia enriqueció de mi vida, más de lo que ustedes pueden pensar.

El triunfo no está en vencer siempre, sino en nunca desanimarse.

Napoleón

Finalmente...

- A todas aquellas que pasaron por mi corazón, de una forma u otra: Por usTedes conocí Las mIeEs y Bondades del cielo y las llamas del infierno... Gracias, porque sin una musa en quien inspirarme jamás hubiera llegado hasta donde llegué, y que mejor forma de conocerse a uno mismo sino yendo de la agonía al éxtasis y de regreso, deseando ser alguien mejor, merecedor de ustedes.

Se necesita solo de un minuto para que te fijes en alguien, una hora para que te guste, un día para quererlo, pero se necesita de toda una vida para que lo puedas olvidar.

Anónimo

Todo viejo amor es un recuerdo agradable mientras no interviene la persona que lo inspiró.

Noel Clarasó

Y llamando a sus discípulos, les dio poder sobre los espíritus inmundos para expulsarlos, y para curar toda enfermedad y toda dolencia...

Curad enfermos, resucitad muertos, purificad leprosos, expulsad demonios. Gratis lo recibisteis, dadlo gratis.

San Mateo: 10:1,8

Al vencer sin obstáculos se triunfa sin gloria.

Pierre Corneille

Para el logro del triunfo ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios.

Simón Bolívar

No se sale adelante celebrando éxitos, sino superando fracasos.

Orison S. Marden

El éxito es un 99% de fracaso.

Soichiro Honda

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
2. Antecedentes	
2.1. Fasciolosis	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Importancia médica y económica	3
2.1.3. Control y tratamiento	5
2.2. Los bencimidazoles como agentes terapéuticos antiparasitarios	7
2.2.1. Mecanismo de acción de bencimidazoles	8
2.2.2. El compuesto Alfa como agente fasciolicida	8
2.2.3. Propiedades fisicoquímicas del compuesto Alfa	10
2.2.4. Formulaciones comerciales y experimentales de bencimidazoles	11
2.3. Los profármacos como método de optimización de fármacos	12
2.3.1. Clasificación de profármacos	12
2.3.2. Profármacos de bencimidazoles	14
2.3.3. Importancia de las propiedades fisicoquímicas en la actividad biológica	15
2.3.4. Criterios para la elaboración de derivados biorreversibles	18
2.3.5. El diseño de derivados biorreversibles hidrosolubles	18
2.3.5.1. Modificadores iónicos o ionizables en condiciones fisiológicas	19
2.3.5.2. Modificadores del punto de fusión	22
• Interludio fisicoquímico: cinética química	23
3. Objetivos e hipótesis	
3.1. Planteamiento del problema	24
3.2. Hipótesis	24
3.3. Objetivos	
3.3.1. Objetivo general	25
3.3.2. Objetivos específicos	25
3.4. Consideraciones para el diseño	26
4. Procedimiento experimental	
4.1. Instrumentación y materiales	29
4.1.1. Síntesis del compuesto Alfa y sus derivados biorreversibles	29
4.1.2. Evaluación de la estabilidad <i>in vitro</i> y solubilidad de los derivados biorreversibles	30
4.2. Preparación de los derivados biorreversibles	30
4.2.1. Métodos de preparación	33
• 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (II)	33
• 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol (III)	34
• 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol (Alfa)	34
• [6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metanol (ARM-8)	35
• [6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]carboxilato de etilo (ARM-1)	36
• Acetato de [6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metilo (ARM-2)	37
• Ácido 4-[[6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metoxi]-4-oxobutanoico (ARM-3)	38
• 3-(<i>N,N</i> -Dietilamino)propanoato de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metilo (ARM-4)	39
• 4-Aminometilbenzoato de [6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metilo (ARM-5)	40

• 6-Cloro-1-(clorometil)-2-(metiltilio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol (ARM-9)	41
• 6-Cloro-1-[[2-(dimetilamino)etoxi]metil]-2-(metiltilio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol (ARM-6)	41
• 6-Cloro-2-(metiltilio)-5-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-carboxilato de 2-cloroetilo (ARM-10)	42
• 6-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(metiltilio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-carboxilato de 2-(dimetilamino)etilo (ARM-7)	43
4.3. Evaluación de la estabilidad <i>in vitro</i> y solubilidad de los derivados biorreversibles	
4.3.1. Estabilidad ante la hidrólisis <i>in vitro</i>	44
4.3.2. Solubilidad en medio acuoso	44
5. Resultados y discusión	
5.1. Preparación de los derivados biorreversibles	45
5.1.1. Síntesis del compuesto Alfa	45
5.1.2. Síntesis de los derivados biorreversibles ARM-1-7	47
5.1.2.1. Síntesis del derivado tipo <i>N</i> -alcoxycarbonilo ARM-1	50
5.1.2.2. Síntesis del hemiaminal intermediario ARM-8	51
5.1.2.3. Síntesis de los derivados tipo <i>N</i> -aciloximetilo ARM-2 a 5	52
5.1.2.3.1. Síntesis del derivado tipo <i>N</i> -aciloximetilo ARM-2	52
5.1.2.3.2. Síntesis del derivado tipo <i>N</i> -aciloximetilo ARM-3	54
5.1.2.3.3. Síntesis de los derivados tipo <i>N</i> -aciloximetilo ARM-4 y 5	54
5.1.2.4. Síntesis del derivado tipo <i>N</i> -alcoximetilo ARM-6	58
5.1.2.5. Síntesis del derivado tipo <i>N</i> -alcoxycarbonilo ARM-7	59
5.2. Evaluación de la estabilidad <i>in vitro</i> y solubilidad de los derivados biorreversibles	60
5.2.1. Estabilidad ante la hidrólisis <i>in vitro</i>	60
5.2.2. Solubilidad en medio acuoso	66
6. Conclusiones	
6.1. Conclusiones finales	68
6.2. Perspectivas del trabajo	69
7. Bibliografía	70
8. Apéndice	74

ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo vital de <i>Fasciola hepatica</i>	2
Figura 2. Reemplazo isostérico en el Triclabendazol	9
Figura 3. Concepto de profármaco unido a un acarreador	13
Figura 4. Pro-bencimidazoles	15
Figura 5. Mecanismo de hidrólisis para los derivados biorreversibles tipo <i>N</i> -aciloximetilo	21
Figura 6. Mecanismo de autohidrólisis facilitada por la presencia de grupos amino vecinales	21
Figura 7. Derivados biorreversibles propuestos con menor punto de fusión que el compuesto Alfa	25
Figura 8. Derivados biorreversibles propuestos con grupo ionizable en medios biológicos	25
Figura 9. Tautomería de los bencimidazoles asimétricos	28
Figura 10. Formación del intermediario xantato de etilo	46
Figura 11. Equilibrio de formación del hemiaminal ARM-8	51
Figura 12. CCF esquemática del comportamiento de la reacción para obtener ARM-2 (Sistema III)	53
Figura 13. Mecanismo de reacción del 1,1'-carbonildiimidazol con ácidos carboxílicos para formar ésteres	55
Figura 14. Fragmentación propuesta para el compuesto ARM-4 en espectrometría de masas	55

Figura 15. Método de obtención de ARM-6	58
Figura 16. Comparación esquemática de los espectros UV de compuesto Alfa, ARM-2 y el Alfa acilado	63
Figura 17. Comportamiento de los isómeros <i>a</i> en disolventes próticos	65
Figura 18. Comportamiento de los isómeros <i>b</i> en disolventes próticos	66
Esquema 1. Ruta sintética para la obtención del compuesto Alfa	31
Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de los derivados biorreversibles tipo <i>N</i> -alcoxicarbonilo (ARM-1,7)	31
Esquema 3. Ruta sintética para la obtención del derivado biorreversible tipo <i>N</i> -alcoximetilo (ARM-6)	32
Esquema 4. Ruta sintética para la obtención de los derivados biorreversibles tipo <i>N</i> -aciloximetilo (ARM-2 a 5)	32
Esquema 5. Determinación de la solubilidad acuosa	44
Esquema 6. Alternativas para la obtención de ARM-4 y ARM-5ferboc	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Niveles de infección en humanos alrededor del mundo	4
Tabla 2. Prevalencia de fasciolosis animal en México	5
Tabla 3. Eficacia comparada de los fármacos contra <i>Fasciola</i> en ovejas	6
Tabla 4. Espectro de eficacia de fármacos a las dosis recomendadas en ovejas	6
Tabla 5. Diferencias entre bioprecusores y profármacos con acarreador	14
Tabla 6. Ejemplos de profármacos hidrosolubles modelo y su estabilidad	19
Tabla 7. Profármacos de varios grupos funcionales presentes en los fármacos	20
Tabla 8. Cambios de puntos de fusión para algunas modificaciones con profármacos	22
Tabla 9. Órdenes de reacción más comunes	23
Tabla 10. Lineamientos de Lipinski en los derivados biorreversibles ARM-1-7	26
Tabla 11. Sistemas de elución cromatográfica	33
Tabla 12. Propiedades de los compuestos I-III y Alfa	45
Tabla 13. Propiedades de los compuestos ARM-1 a 10	47
Tabla 14. Identificación espectrométrica y espectroscópica de los compuestos Alfa y ARM-1 a 10	48
Tabla 15. Comportamiento de ARM-1 en acetonitrilo	61
Tabla 16. Comportamiento de ARM-1 en metanol	61
Tabla 17. Comportamiento de ARM-2 en acetonitrilo	62
Tabla 18. Comportamiento de ARM-2 en metanol	62
Tabla 19. Comportamiento de ARM-3 en acetonitrilo	63
Tabla 20. Comportamiento de ARM-3 en agua	64
Tabla 21. Comportamiento de ARM-7 en metanol	64
Tabla 22. Comportamiento en disolventes próticos de los compuestos ARM-1 a 3 y 7	65
Tabla 23. Estimación de la solubilidad de ARM-3	67
Tabla 24. Solubilidad aparente de ARM-3 en medios acuosos	67

1. Introducción

El propósito central de la Química Farmacéutica es el descubrimiento y desarrollo de sustancias químicas medicamentosas para la prevención y tratamiento de enfermedades que aquejan al hombre y a los animales. La mayoría de los fármacos que se utilizan en la actualidad se han encontrado de manera empírica, a partir de productos naturales, por casualidad, o se han obtenido por medio de la síntesis química. Esto ha sido el resultado de un largo y complejo proceso de investigación que, desde el descubrimiento de un compuesto líder, hasta el desarrollo de un medicamento, tiene una duración de aproximadamente 10 años, con costos económicos muy altos. En el ámbito de las enfermedades parasitarias, desde 1978 se ha venido usando el Triclabendazol para combatir la fasciolosis, parasitosis causada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Esta parasitosis es de gran importancia en el sector veterinario y en los últimos años, para la salud humana.

Actualmente, la fasciolosis se considera como una enfermedad emergente a nivel mundial. En algunos lugares, como Australia y el Reino Unido, se han detectado cepas resistentes al Triclabendazol. En la búsqueda de alternativas terapéuticas, en trabajos anteriores en nuestro laboratorio se diseñó y sintetizó un análogo del Triclabendazol: el 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (al que en este trabajo referiremos como compuesto **Alfa**), cuyas evaluaciones preeliminares indicaron un buen potencial fasciolicida tanto *in vitro*, como en pruebas *in vivo* en ganado vacuno y ovino. Dicho análogo presenta muy baja solubilidad en agua, propiedad que dificulta su formulación para la administración fácil y rápida en animales.

En el presente trabajo se buscó el mejoramiento de la solubilidad acuosa de dicho análogo para el diseño de futuras formulaciones en solución, bajo el enfoque de la química farmacéutica. Específicamente, el trabajo consistió en el diseño y síntesis de derivados biorreversibles. Estos derivados fueron de dos tipos: el fasciolicida unido a un grupo de carácter alifático por medio de un acoplador, y el fasciolicida unido a un grupo ionizable en medios biológicos por medio de un acoplador. Se elucidó la estructura molecular de dichos derivados por medio de técnicas espectrométricas y espectrométricas, y se determinaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Adicionalmente, se evaluó su estabilidad ante la hidrólisis, determinando su viabilidad en el futuro diseño de formulaciones en solución.



2. Antecedentes

2.1. Fasciolosis

2.1.1. Generalidades

Se estima que 40 millones de personas están infectadas por al menos una de las diferentes especies de trematodos y varias de estas infecciones están resurgiendo. La enfermedad llamada fasciolosis es causada por el parásito *Fasciola hepatica*, un trematodo que constituye un problema severo de salud pública alrededor del mundo. Estos parásitos, también conocidos como duelas hepáticas, son los trematodos más grandes que infectan al ser humano: cada adulto mide 25-30 mm de largo por 10-15 mm de ancho.

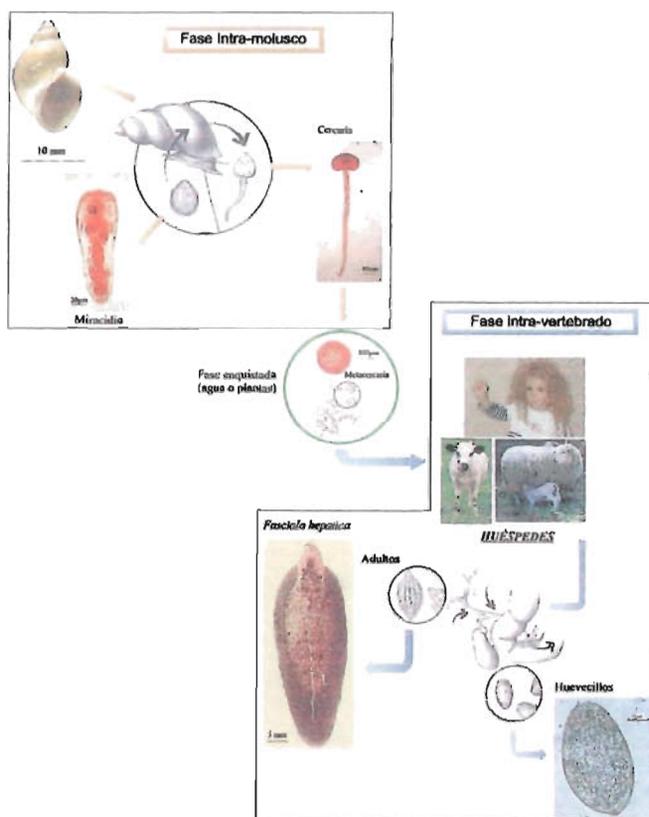


Figura 1. Ciclo vital de *Fasciola hepatica*¹.



Su huésped definitivo frecuentemente es un mamífero (humanos, vacas, ovejas, conejos, etc.), y su huésped intermediario es un molusco gástrópodo (caracoles, babosas, etc.) siendo la mayor fuente de infección del huésped definitivo plantas asociadas a cuerpos de agua. Cuando se ingieren las metacercarias, éstas eclosionan en el lumen del intestino y migran hacia el hígado donde se alimentan de las células de la parénquima hepática, causando fuertes hemorragias. *F. hepatica* crece lentamente, alcanzando la madurez sexual a los 2 meses de permanecer en los conductos biliares, es hermafrodita y puede recurrir a la auto-fecundación. Los huevecillos, que son producidos por cada gusano aproximadamente después de una semana de desarrollo, pasan del conducto biliar al duodeno y subsecuentemente a las heces. Los huevos deben depositarse en agua fresca para completar su desarrollo y eclosión, que ocurre de 10-15 días hasta meses después, dependiendo de la temperatura. Inmediatamente después de la eclosión, los miracidios ciliados nadan activamente y buscan a un molusco, y, una vez penetrado sus tejidos, se desarrollan y multiplican asexualmente. En este estado es donde la morfogénesis procede del miracidio al esporocisto y luego al estado de redia. Cada redia da origen a muchas cercarias, que salen del molusco al agua; las cercarias se enquistan cerca de plantas acuáticas o, incluso, en el agua². Las cercarias enquistadas, o metacercarias, son resistentes a cambios de temperatura así como a otros parámetros ambientales.

La fasciolosis se adquiere por la ingestión de vegetales o agua contaminada con las metacercarias. Como se mencionó previamente, una vez en el hígado causa hemorragias y perforaciones. En esta fase aguda de la enfermedad puede ocurrir la muerte en el ganado altamente infectado.

2.1.2. Importancia médica y económica

La fasciolosis, que probablemente es la infección por helmintos más común en el ganado (prevalence del 30 al 90%, sobre todo en zonas tropicales), se ha reconocido como un verdadero problema veterinario, ya que la infección del ganado induce pérdidas en la productividad del mismo con consecuencias económicas importantes como son: decomiso parcial o total del hígado de rastros, baja producción y mala calidad de leche, bajas tasas de crecimiento y mala



conversión alimenticia, baja producción y mala calidad de lana, trastornos reproductivos, entre otros.³

La importancia en la salud pública de esta parasitosis en humanos se ha incrementado en los últimos 25 años con un estimado de 7,071 casos (en el año 1998) en 51 países de todos los continentes, ⁴ llegándose a considerar como una de las enfermedades emergentes con síntomas muy leves o presentándose de manera sub-clínica:⁵

- América: 3,267 casos.
- Europa: 2,951 casos.
- Asia: 354 casos.
- África: 487 casos.
- Oceanía: 12 casos.



El número real de casos es, sin duda, mucho mayor. En estimaciones actuales se considera que 17 millones de personas están infectadas^{1, 4, 5} con *F. hepatica* y cerca de 180 millones están en riesgo de infección.¹ La gran presencia en humanos ya no se correlaciona con áreas en las cuales la fasciolosis es un problema veterinario mayor.

Tabla 1. Niveles de infección en humanos alrededor del mundo⁵

Nivel de infección	País	Porcentaje de población infectada
Muy bajo	Francia	0.00034 %
	Chile	0.7 %
Intermedio	Egipto (delta del río Nilo)	7.3 %
	Perú (Cajamarca)	8.7 %
	Puerto Rico (Corozal)	10.7 %
	Irán	Variable
	Oeste de Europa	
Alto	Perú (Puno)	15.6 %
	Perú (valle Mantaro)	34.2%
	Bolivia	53-100%

En años recientes (2002) se diagnosticaron 2,594 casos de fasciolosis en humanos en 42 países; entre ellos, Argentina, Bolivia, Cuba, Perú y Puerto Rico, por lo que no debe ser subestimada la presencia del parásito.⁶

En México se han realizado diversos estudios en los diferentes estados de la república, los cuales se muestran en la siguiente tabla:



Tabla 2. Prevalencia de fasciolosis animal en México⁷.

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

Datos conservadores obtenidos en México muestran que de 36 millones de bovinos, 18 millones están expuestos a la infección por *F. hepatica*, en virtud de que el ganado se encuentra localizado en zonas reconocidas como “fasciolosas”. Sin embargo, estudios epidemiológicos muestran que alrededor de 5 millones están realmente infectados y si reconocemos que cada animal pierde en su vida productiva 30 Kg de carne y a su vez multiplicamos estas pérdidas por \$30 pesos que actualmente cuesta cada kilo, se obtiene una pérdida global aproximada de \$4,500 millones.⁷

2.1.3. Control y tratamiento

El control de la fasciolosis humana se lleva a cabo mediante la abstención del consumo del berro silvestre o plantas acuáticas, evitar el empleo de excremento de ovinos, bovinos o de aguas residuales como abono, especialmente en zonas endémicas. El tratamiento terapéutico común en humanos es el usado en la amibiasis aguda: Dehidroemetina a una dosis de 1 mg/Kg por día durante 10 días³. El control de la infección animal se puede realizar en cualquier fase del desarrollo, o bien, reduciendo el número de hospederos intermediarios. El uso del Triclabendazol en humanos fue aprobado desde 1989 por la Organización Mundial de la Salud para combatir la gran epidemia de fasciolosis presente en Irán⁸ en ese año; desde ese entonces se administra una dosis única de 10 mg/Kg y es comercializado actualmente por Novartis Pharma Inc.

Actualmente, varios compuestos químicos están disponibles como mecanismo de control y tratamiento de la fasciolosis animal, incluyendo el Closantel, Clorsulon, Rafoxanida, Nitroxinil y Triclabendazol (ver tablas 3 y 4), siendo éste último el fármaco de elección y los anteriores como fármacos alternativos. Después de la dosificación, la concentración terapéutica de estos



fármacos en la sangre se alcanza en los dos primeros días y sólo las infecciones ya presentes son curadas; sin embargo, los animales en pasturas contaminadas son susceptibles a la reinfección. Estos fármacos tienen actividad variable contra el estado parasítico de los trematodos ya citados y marcadas diferencias en toxicidad.

El Triclabendazol requiere atención especial, debido a que es el único fármaco efectivo contra las primeras fases de la infección, p. ej., la migración al hígado que provoca fasciolosis aguda.^{2,9}

Tabla 3. Eficacia comparada de los fármacos contra *Fasciola* en ovejas⁹

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

*Datos para ganado vacuno.

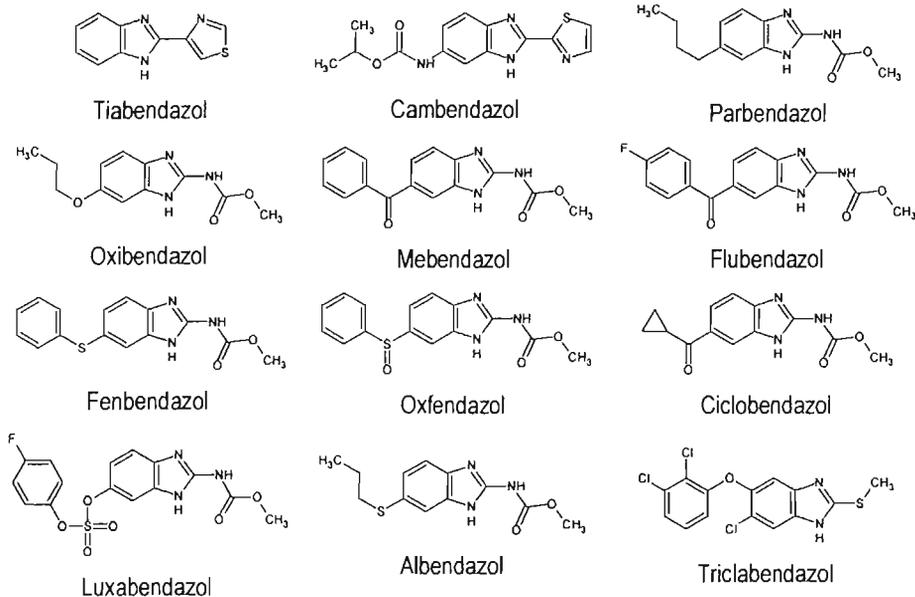
Tabla 4. Espectro de eficacia de fármacos a las dosis recomendadas en ovejas⁹

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



2.2. Los bencimidazoles como agentes terapéuticos antiparasitarios

Los bencimidazoles son antihelmínticos de amplio espectro usados para el control de varios parásitos: nematodos, trematodos y cestodos. Su introducción como antihelmínticos de amplio espectro marcó el inicio de una nueva era en el tratamiento de muchas infecciones por nematodos. Entre ellos se encuentran:³



A pesar de que algunos de estos bencimidazoles tienen actividad contra varios cestodos y nematodos, e incluso contra algunos trematodos, tienen poca o nula actividad contra *F. hepatica*. Sólo el Albendazol se ha recomendado para su uso en la fasciolosis, a pesar que su actividad se restringe a organismos adultos y requiere de dosis muy grandes. El Luxabendazol es otro bencimidazol contra organismos adultos e incluso de 6 semanas de edad, pero no es muy usado. El fármaco de elección es el Triclabendazol; se ha encontrado que este derivado del bencimidazol tiene una gran eficacia contra organismos jóvenes y adultos de *F. hepatica*; también es efectivo contra *F. gigantica*, y *Fascioloides magna*, careciendo de actividad contra nematodos y cestodos.⁹ La presencia de un átomo de cloro y el grupo metiltio, así como la ausencia del grupo carbamato en este bencimidazol lo distinguen claramente del resto.



2.2.1. Mecanismo de acción de bencimidazoles

Los bencimidazol-2-carbamatos (BC) se unen directamente a la β -tubulina, con esto impiden la polimerización de la misma, lo que causa la despolimerización de los microtúbulos, con la subsiguiente perturbación de los procesos donde éstos están involucrados.¹⁰ Se ha encontrado que la toxicidad específica de los bencimidazoles para los helmintos se debe a su mayor afinidad por la β -tubulina del helminto en comparación a la de los mamíferos.

Estudios con inhibidores de la polimerización de la tubulina, como el taxol y la colchicina, sugieren que los BC clásicos se unen a la β -tubulina en el mismo sitio que éstos, no así el Triclabendazol, que también tiene este mecanismo de acción pero su sitio de unión parece ser otro ya que presenta los mismos efectos asociados a la inhibición de microtúbulos¹⁰. Al tener un sitio de unión distinto al de los BC, el Triclabendazol tiene una acción selectiva sobre la β -tubulina presente en *F. hepatica*.¹¹

Otros mecanismos descritos para los BC son, por ejemplo, la inhibición de la síntesis de proteínas y el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa.^{10, 11} Tanto la inhibición de la síntesis de proteínas como la inhibición de la formación de microtúbulos pueden estar separadas, pero se considera que están interrelacionadas, porque cualquier disrupción de microtúbulos causará desorganización de los organelos, como el Retículo Endoplásmico Rugoso y el aparato de Golgi, que están activamente involucrados en la síntesis de proteínas.¹⁰

2.2.2. El compuesto Alfa como agente fasciolicida

El uso desmedido del Triclabendazol en el tratamiento de la fasciolosis ha tenido como consecuencia inevitable la selección de poblaciones resistentes a este fármaco en varias áreas del mundo. Desde 1995 se ha reportado resistencia al Triclabendazol en Australia, Escocia, Irlanda, Gales, y Holanda,^{2, 11} aunque se considera que estas poblaciones resistentes todavía no se han convertido en un problema económico mayor. Sin embargo, la preocupación es grande, ya que desde el lanzamiento del Triclabendazol en 1983 para uso veterinario, no se ha registrado ningún nuevo fasciolicida.



En el grupo de investigación del laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM se han realizado estudios para obtener mayor información sobre las relaciones estructura-actividad de los bencimidazoles antiparasitarios (antiprotozoarios, antihelmínticos, etc.). Los resultados de los estudios estructura-actividad para los bencimidazoles muestran que se requiere de un sustituyente metilto en la posición 2 de este anillo, para que el bencimidazol tenga actividad fasciolicida; los sustituyentes en posición 5 y 6 son importantes pero no esenciales, por lo que se pueden realizar sustituciones por otros grupos que tienen comportamiento electrónico similar.¹² Dentro de los compuestos que se ha preparado y a los que se les determinó la actividad fasciolicida *in vitro*, está el compuesto Alfa, que resulto ser activo contra metacercarias recién desenquistadas a concentraciones de 10µg/mL. En estos ensayos se observó, además, que las metacercarias se lisaron por efecto del compuesto Alfa.¹³

El compuesto Alfa, bioisótero del Triclabendazol, se diseñó considerando el reemplazo isotérico del grupo 1,2-diclorofenilo, en el Triclabendazol, por su equivalente isotérico 1-naftilo, como lo muestra la figura 2, conservándose la actividad fasciolicida.



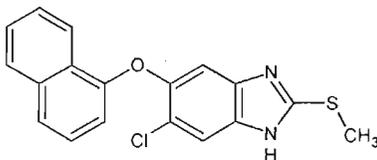
Figura 2. Reemplazo isotérico en el Triclabendazol.¹⁴

En estudios *in vivo* en ovinos y bovinos, el compuesto Alfa mostró una gran actividad fasciolicida. A una dosis de 15 mg/Kg en suspensión oral tuvo una efectividad del 100% contra parásitos con 3 días y hasta 10 semanas de edad.¹⁴ Además, estudios de microscopía electrónica han demostrado daño importante en la estructura de la *F. hepatica*,¹⁵ y más recientemente, daño en la estructura de *F. hepatica* resistente al Triclabendazol.¹⁶ Los resultados obtenidos son promisorios, ya que, como se vio anteriormente, la mayoría de los fasciolicidas usados hasta el momento como la Rafoxanida, Nitroxinil, Closantel o Clorsulon solo actúan contra parásitos de 6 semanas o más de edad, o en la fase inmadura como la Diamfenetida.^{10, 11}



Dentro de los esfuerzos por mejorar la dosis y la formulación se ha propuesto que el compuesto Alfa sea formulado en solución inyectable de 10 mg/mL, de fácil administración para uso veterinario.

2.2.3. Propiedades fisicoquímicas del compuesto Alfa



Nombre químico:	5(6)-Cloro-2-metiltio-6(5)-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol
Fórmula molecular:	C ₁₈ H ₁₃ N ₂ OSCl ₂
Peso molecular:	340.83
Props. organolépticas:	Polvo cristalino de color blanco, con ligero olor característico
Punto de fusión:	181-182 °C
Solubilidad:*	Buffer fosfatos pH = 7.4: > 0.0002 mg/mL Buffer fosfatos pH = 6.0: 0.00047 mg/mL Buffer fosfatos pH = 2.2: 0.00380 mg/mL Buffer fosfatos pH = 1.3: 0.00620 mg/mL NaOH 0.1 N: 0.0032 mg/mL HCl 0.1 N: 0.010 mg/mL Metanol: 0.100 mg/mL Propilenglicol: 0.041 mg/mL
pK _a :*	2.87
Log P:	1.44* (calculado**: 6.41)
Farmacocinética:*	Por administración oral: modelo abierto de dos compartimientos, absorción lenta con una t _{1/2} de 6.17 h, concentración en plasma máxima de 8 µg/mL a las 11 h. y vida media de eliminación entre 13.54 y 24.99 h. De absorción más rápida, concentración plasmática menor que el Triclabendazol. Excreción por vía urinaria.
Farmacodinamia:*	Metabolismo más extenso que el Triclabendazol, dando origen a dos metabolitos principalmente: el sulfóxido y la sulfona. La actividad es atribuida tanto al principio activo (aunque no es detectable en plasma) así como al metabolito sulfóxido.
λ _{max} :*	220 nm, 302 nm

* Ver referencias 3 y 12.

** Programa ACDLabs®/LogP



Teniendo un compuesto tan prometedor para el tratamiento de la fasciolosis, se ha buscado mejorar la administración del mismo. Se ha considerado que la presentación de una formulación inyectable sería muy conveniente para la fácil administración del compuesto Alfa.

2.2.4. Formulaciones comerciales y experimentales de bencimidazoles

Por vías de administración no convencionales se han tenido logros efímeros; como por ejemplo, la efectiva dosificación de BC por medio de una formulación transdérmica en cintas con polietilenglicol/polivinilpirrolidona.¹⁷ La desventaja de esta presentación es que se necesita un contacto íntimo de las cintas con la piel del animal, limitándose mucho su aplicación.

En la historia de los bencimidazoles se han preparado algunas formulaciones inyectables para uso en veterinaria:¹⁸ algunos de los primeros bencimidazoles se logró su formulación en vehículos aceptados para su uso en veterinaria, llegándose a comercializar Oxfendazol (Endovet®, Novartis) y Sulfóxido de Albendazol (Ricozol®, Bayer). Estas formulaciones tienden a causar necrosis en el sitio de aplicación por su pH tan ácido. Hasta ahora no hay formulaciones inyectables de Triclabendazol, debido al problema de solubilidad que presenta, extensible a todos los bencimidazoles.

Ahora bien, para hacer una formulación de un principio activo en solución, primero se tiene que aumentar la solubilidad de éste, para lo cual existen las siguientes estrategias:¹⁹

- Mediante formulaciones de diferente composición (área de la tecnología farmacéutica).
- Mediante la formación de sales farmacéuticas del compuesto.
- Mediante la unión covalente del compuesto con entidades solubilizantes, es decir, profármacos del compuesto.

Las dos primeras opciones generalmente se abordan juntas, dando como resultado formulaciones con mezclas de disolventes y sales. Pero, debido a que para preparar sales es necesario modificar el pH, el resultado es que dichos preparados son muy irritantes causando dolor y hasta necrosis del tejido en el sitio de aplicación.



La última de las opciones, los profármacos, se está convirtiendo en una parte integral en la investigación del diseño de fármacos. Por ejemplo, cuando al Oxfendazol se le adicionó un residuo de *n*-butilcarbamoilo en la posición 1 del anillo se obtuvo un compuesto altamente soluble en propilenglicol, lo que permitió la formulación de un inyectable para su administración en ovejas.¹⁸

2.3. Los profármacos como método de optimización de fármacos

El término profármaco se refiere a un compuesto farmacológicamente inactivo que es convertido a un fármaco activo a través de una biotransformación metabólica.²⁰ Existen muchas razones por las cuales se aborda la estrategia de síntesis de profármacos en el diseño de fármacos,^{20, 21} entre las cuales las más relevantes son:

- Solubilidad
- Especificidad en el blanco
- Liberación prolongada
- Poca aceptación del paciente
- Absorción y distribución
- Inestabilidad
- Toxicidad
- Problemas en formulación

El diseño racional de profármacos requiere que se identifiquen claramente las causas o razones por las cuales se va a utilizar este enfoque, sólo así se pueden identificar los medios por los cuales se puede resolver el problema a vencer.^{22, 23}

2.3.1. Clasificación de profármacos

Existen muchas clasificaciones de profármacos: desde el punto de vista químico, por su mecanismo de activación, y por su direccionamiento. A continuación se profundiza un poco en estas clasificaciones.

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

Profármacos unidos a un acarreador: como su nombre indica, son compuestos que contienen un compuesto activo unido a un acarreador que puede ser removido enzimáticamente:



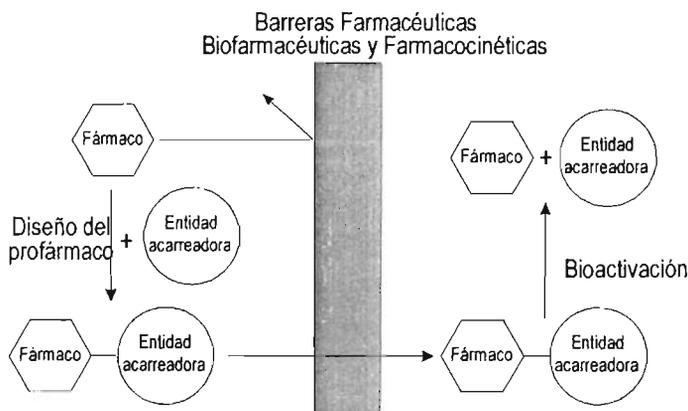


Figura 3. Concepto de profármaco unido a acarreador^{22, 24}

Dentro de esta clasificación tenemos:

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

Dentro de esta clase se pueden considerar a los fármacos que se les une un acarreador (como un anticuerpo o una entidad química cuya biotransformación sea sitioespecífica) que es capaz de transportarlos desde el sitio de aplicación, de una manera selectiva, a las células blanco, conocidos como *fármacos dirigidos*, así como también a los fármacos unidos a polímeros (como el polietilenglicol) para lograr una liberación retardada del mismo, conocidos como *profármacos macromoleculares*.²⁵



Bioprecursores: son compuestos que al ser metabolizados dan origen a un nuevo compuesto que es el principio activo, o que puede metabolizarse más, para originar al fármaco activo.

Para el diseño de los precursores se toman en cuenta las reacciones metabólicas de Fase I: reacciones que involucran la transformación de entidades específicas en una molécula sustrato y la creación de nuevos grupos funcionales.²¹

Tabla 5. Diferencias entre bioprecursores y profármacos con acarreador^{19, 20}

Característica	Profármacos	
	Unidos a un acarreador	Bioprecursores
Constitución	Principio activo + acarreador	Sin acarreador
Lipofilidad	Fuertemente modificada	Ligeramente modificada
Bioactivación	Hidrolítica	Oxidativa o reductiva
Catálisis	Química o enzimática	Enzimática

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

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

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

Finalmente, desde el punto de vista del **direccionamiento**, los profármacos se dividen en:²⁵

Bioactivados selectivamente en un tejido (Terapia anticuerpo-enzima-profármaco).

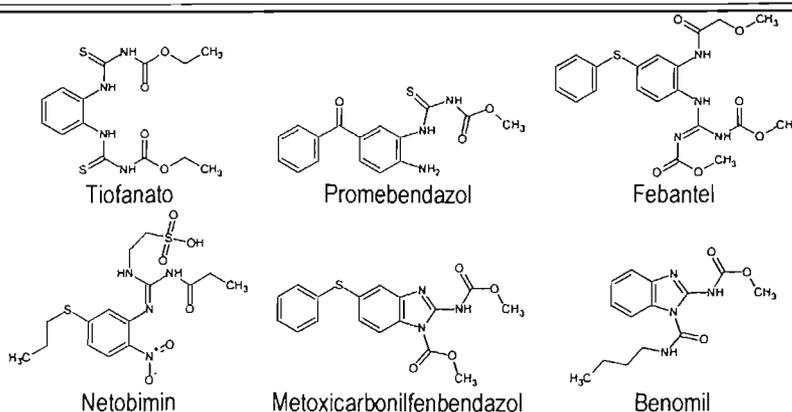
Liberación química selectiva.

Transporte selectivo a un tejido.

2.3.2. Profármacos de bencimidazoles

Debido a la baja solubilidad en agua de los derivados del bencimidazol, se han realizado varios esfuerzos, desde el enfoque de los profármacos, para remediar este problema. Dichos profármacos reciben el nombre de pro-bencimidazoles, algunos de los cuales son derivados biorreversibles y otros son bioprecursores. En la figura 4 se muestran algunos ejemplos de probencimidazoles que se encuentran en investigación preclínica.



Figura 4. Pro-benzimidazoles²⁵

En los ejemplos mostrados Tiofanato, Promebendazol, Febantel y Netobimin son bioprecusores que por ciclación intramolecular dan origen al benzimidazol. Dentro de este grupo, el Febantel actualmente es de uso veterinario en forma de inyectable, dando Fenbendazol y Oxfendazol. Otro ejemplo de bioprecursor interesante es el análogo 5-trifluorometil del Netobimin, que cuando se administró a gerbos infectados con *Echinococcus multilocularis* produjo una importante disminución de la infección provocada por el benzimidazol, que es activo contra este parásito.²⁶

El Metoxicarbonilfebendazol es un ejemplo de derivados biorreversibles. Al Mebendazol se le agregó un grupo metoxicarbonilo en la posición 1 del anillo de benzimidazol, modificando con esto sus propiedades farmacocinéticas; este profármaco se ha administrado a conejos, lográndose el incremento en la concentración plasmática del principio activo en relación a aquellos animales que solo recibieron Mebendazol.²⁷

2.3.3. Importancia de las propiedades fisicoquímicas en la actividad biológica

No importando la ruta de administración, un fármaco debe pasar a través de muchas membranas biológicas durante el proceso de absorción, distribución, biotransformación y eliminación. La habilidad de un fármaco para llevar a cabo su efecto está relacionado con la concentración del mismo en el sitio de acción y su capacidad de interactuar con el blanco biológico, ya sea bloqueándolo o estimulándolo, por lo que la absorción del mismo (el movimiento del fármaco desde el sitio de aplicación al compartimiento extracelular del cuerpo) y su

distribución por el cuerpo son determinantes en la actividad biológica del fármaco. Dentro de las variables que afectan la absorción y distribución de fármacos tenemos:²⁸

- Propiedades fisicoquímicas del compuesto activo: naturaleza química, peso molecular, solubilidad en agua y coeficiente de partición.
- Variables fisiológicas: motilidad gástrica, pH en el sitio de absorción, área de absorción, flujo sanguíneo, eliminación presistémica, ingestión con o sin alimentos.

Para el diseño de nuevas entidades farmacológicas con aceptables propiedades biofarmacéuticas se tienen que tomar en cuenta cuatro parámetros asociados con su permeabilidad, liposolubilidad y su solubilidad en medios acuosos, estos son: peso molecular, logP, entidades donadoras de puentes de hidrógeno y entidadesceptoras de puentes de hidrógeno. Tras un análisis de los fármacos actualmente en el mercado, y tomando en cuenta las propiedades anteriores, se han propuesto las siguientes guías para pronosticar futuros problemas de absorción y/o permeabilidad²⁹ de la nueva entidad, llamadas "reglas del 5" o "lineamientos de Lipinski". Se presentarán problemas si:

- Hay más de 5 donadores de puentes de hidrógeno (expresado como la suma de OH's y NH's);
- El peso molecular es mayor a 500;
- El log P es mayor a 5; y,
- Hay más de 10 aceptores de puentes de hidrógeno (expresado como la suma de N's y O's).

Cabe mencionar que las excepciones a estas guías son los compuestos que son sustratos para transportadores biológicos.

Experimentalmente, la liposolubilidad de los fármacos se estima a través del coeficiente de partición (P) existente entre el 1-Octanol (fase orgánica que simula a la membrana fosfolipídica de la célula) y agua, siendo esta relación de carácter logarítmico,²⁰ donde α es el grado de disociación del compuesto en agua:



$$\log P = \log \left(\frac{[\text{Fármaco}]_{\text{loc. etanol}}}{[\text{Fármaco}]_{\text{agua}} (1 - \alpha)} \right)$$

Actualmente se cuenta con programas computacionales para calcular el logaritmo del coeficiente de partición (logP), los cuales se basan en las aportaciones que hacen los sustituyentes y porciones estructurales de un compuesto a su lipofilicidad, aplicados a la ecuación de Hansch para el cálculo del coeficiente de partición. En este trabajo se utilizó para tal motivo el paquete computacional ACDLabs®/LogP.

La solubilidad acuosa es una propiedad muy importante. Una solubilidad acuosa mayor al 1% a 37°C de un principio activo nos dice que no habrá problemas en la biodisponibilidad del fármaco. No obstante, esto es sólo un supuesto en la relación solubilidad-absorción, relación determinada por la velocidad de disolución y solubilidad dependientes del pH del entorno fisiológico, del tamaño de partícula o área superficial, y por la dosis administrada del compuesto.³⁰ A diferencia del coeficiente de partición, no existe un método no experimental para estimar la solubilidad de los compuestos orgánicos a partir de su estructura y/o propiedades físicas, por lo que tiene que ser determinada experimentalmente.

La mayoría de los fármacos son moléculas pequeñas con un peso molecular menor a 1000 y pueden pasar a través de las membranas biológicas por difusión, siempre y cuando no estén ionizadas. Generalmente las moléculas solubles en agua, con una liposolubilidad baja, pasan a través de membranas por medio de difusión facilitada o por pinocitosis, aunque algunos trabajos indican que las moléculas pequeñas también pueden pasar por difusión simple a través de la membrana lipídica. Fármacos con alta liposolubilidad pasan fácilmente a través de la membrana, incluso, si sus dimensiones permiten, por difusión facilitada.

Los prerequisites fisicoquímicos también difieren según la vía de administración a utilizar. Dentro de las vías parenterales tenemos: intravenosa, intramuscular y subcutánea; y pueden ser empleadas cuando las vías enterales (oral, sublingual y rectal) están contraindicadas o son inadecuadas³¹.



2.3.4. Criterios para la elaboración de derivados biorreversibles

El enfoque de los profármacos debe de explorarse cuando el desarrollo de un agente bastante promisorio e innovador es precedido por un defecto farmacocinético o farmacéutico. Cuando se considera la adición de una entidad acarreadora, se debe tener en mente la estabilidad química del acoplador que debe ser suficientemente estable para permitir la síntesis, purificación y formulación del profármaco. Algunos autores³² recomiendan que, en casos de profármacos de sustancias nuevas, se deben de investigar diferentes prototipos de profármacos. La viabilidad de esos prototipos se evaluará posteriormente en experimentos farmacocinéticos.

Teniendo lo anterior en mente, para el diseño de este tipo de profármacos se debe considerar lo siguiente:^{20, 21}

- Generalmente, la unión entre el acarreador y el fármaco es de tipo covalente.
- El profármaco debe ser inactivo o menos activo que el fármaco.
- La síntesis del profármaco no debe ser significativamente más cara que la del fármaco.
- La unión se debe romper *in vivo* y debe ser lo suficientemente estable para permitir la formulación farmacéutica del profármaco.
- El acarreador no debe ser tóxico, y preferentemente sin actividad biológica *per se*.
- La separación del fármaco de su acarreador debe llevarse a cabo rápidamente para asegurar niveles efectivos del principio activo en el sitio de acción y así minimizar el metabolismo del profármaco o la inactivación gradual del fármaco.

2.3.5. El diseño de derivados biorreversibles hidrosolubles

El agua es el disolvente preferido para la preparación de formas farmacéuticas líquidas como soluciones orales e inyecciones; sin embargo, en muchos casos, la solubilidad del principio activo en agua es muy baja para permitir la preparación de una formulación acuosa. El enfoque de los profármacos es usado frecuentemente para alterar la solubilidad de un principio activo para propósitos de formulación.²⁴ Desde el punto de vista químico, la entidad que dará solubilidad al profármaco puede ser un grupo hidrofílico neutro o un ácido o base orgánico ionizable.¹⁹

Los métodos más comunes para preparar derivados biorreversibles son:¹⁹

- Formación de ésteres, hemiésteres, ésteres de carbonato, ésteres de nitrato, amidas, ácidos hidroxámicos, carbamatos, iminas, bases de Mannich, o enaminas del fármaco.
- Introducción de las funcionalidades: azo, glicósido, péptido, y éter.
- Preparación de polímeros, sales, complejos, fosfamidas, acetales, hemiacetales y cetales del fármaco.

Con la preparación de estos derivados biorreversibles, se utilizan dos estrategias:²²

- Introducción de un grupo iónico o ionizable presente en el acarreador.
- Derivatización para que el profármaco tenga un punto de fusión menor al del fármaco.

Un requisito elemental para este enfoque es la disponibilidad de un grupo funcional, en el fármaco, que cumpla con los requisitos para la síntesis de un profármaco, y la conversión del profármaco al fármaco *in vivo*. Idealmente, el profármaco debe convertirse en el fármaco tan pronto como el objetivo se cumple; por ejemplo: los profármacos diseñados para solucionar problemas de solubilidad en formulaciones intravenosas preferentemente deben convertirse de manera inmediata al fármaco después de la inyección, para que la concentración del profármaco circulante sea insignificante con respecto al fármaco.

2.3.5.1. Modificadores iónicos o ionizables en condiciones fisiológicas

Este es el enfoque más utilizado para aumentar la solubilidad de los fármacos y se basa en la relación solubilidad- pH para ácidos y bases débiles. En la siguiente tabla se ejemplifican algunos profármacos modelo:

Tabla 6. Ejemplos de profármacos hidrosolubles modelo y su estabilidad²²

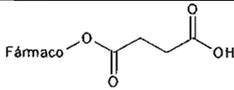
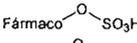
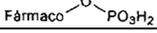
Derivado	Estabilidad en solución	Estabilidad enzimática
Hemisuccinatos 	Limitada	Limitada
Sulfatos 	Alta	Pobre
Fosfatos 	Alta	Variable



Tabla 6. Ejemplos de profármacos hidrosolubles modelo y su estabilidad²² (Continuación)

Derivado		Estabilidad en solución	Estabilidad enzimática
Ésteres de α -aminoácidos		Limitada	Alta
Dialquilaminoacetatos		Limitada	Alta
Ésteres de Aminometilbenzoato		Alta	Alta

Para la formación de un profármaco se consideran los grupos funcionales presentes en el mismo y se proyectan derivaciones. En la siguiente tabla se ejemplifican algunos profármacos con diferentes grupos funcionales:

Tabla 7. Profármacos de varios grupos funcionales presentes en fármacos²²

Grupo funcional	Profármaco	
	R-COOR'	Ésteres
R-COOH	R-COO-CHR-OCO-R'	α -aciloxialquil ésteres
	R-CONH-R'	Amidas
	R-NH-CO-R'	Amidas
	R-NH-COO-R'	Carbamatos
R-NH ₂	R-N=CR ₂ '	Iminas
	R-NH-C=C-	Enaminas
	R-NH-COO-CHR-OCO-R'	Derivados <i>N</i> -aciloxialcoxicarbonilo
	R'-CONR-CH ₂ -NR ₁ R ₂	Bases de Mannich
NH ácido	R-CONR-CH ₂ -OH	<i>N</i> -Metiloles (hemiaminales)
	R-CONR-CHR ₁ -OCOR ₂	Derivados <i>N</i> -Aciloxialquilos

Para los casos de grupos NH ácidos (por ejemplo hidantoínas, imidas e imidazoles) se puede usar la *N*-aciloximetilación. La regeneración del fármaco *in vivo* se lleva a cabo en 2 pasos: ruptura enzimática del éster seguida de la descomposición espontánea del intermediario *N*-hidroximetilo, dando como productos al fármaco libre, formaldehído y el ácido carboxílico empleado, como lo indica la siguiente figura:



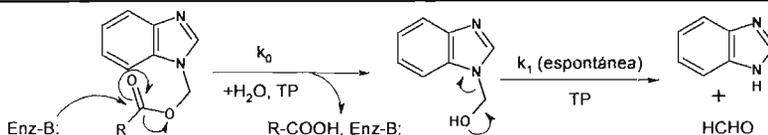


Figura 5. Mecanismo de hidrólisis para los derivados biorreversibles tipo *N*-aciloximetilo.²⁰

En varios estudios previamente realizados²⁷ se ha estudiado la cinética de hidrólisis para derivados de tipo *N*-aciloximetilo y *N*-alcoxicarbonilo en medios acuosos, encontrándose que la hidrólisis de estos compuestos sigue una cinética de pseudo-primer orden a pH fijo, siendo más estables en un rango de pH de 4-6; dicha hidrólisis es función del pH, de la constante de ionización del heterociclo protonado, y del grado de ionización (determinada por la constante de ionización) del derivado formado. En estos mismos estudios se menciona que la hidrólisis enzimática de estos compuestos corresponde a una cinética estricta de primer orden, que correspondería a la descomposición espontánea del intermediario emanado de la ruptura enzimática del éster.

El formaldehído liberado después de la hidrólisis puede ser tóxico³³ (DL₅₀ de 260 mg/Kg) ya que se convierte rápidamente, por enzimas, en formiato y éste muy lentamente a su vez en dióxido de carbono.³⁴ En este respecto la FDA recomienda realizar estudios toxicológicos cuando se trata de profármacos que utilizan al formaldehído como acoplador fármaco-acarreador.³⁵

La formación de ésteres de α -amino y aminoácidos de cadena corta tiene la limitante de que éstos sufren hidrólisis intramolecular más rápido que hidrólisis enzimática, al pH (3-5) en el cual es mayor su solubilidad acuosa,²⁰ por efecto del grupo amino, como muestra el siguiente esquema.

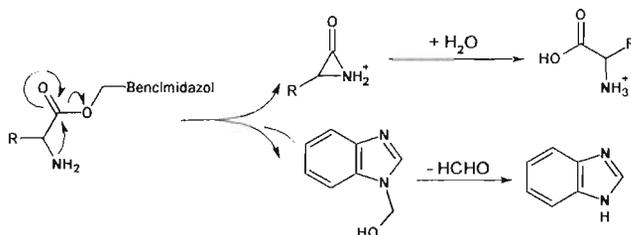


Figura 6. Mecanismos de autohidrólisis facilitada por la presencia de grupos amino vecinales.²⁰



Se ha demostrado²⁰ que se puede bloquear esta catálisis intramolecular por impedimento estérico de manera eficiente y tener una hidrólisis enzimática rápida, incorporando un grupo fenilo entre el grupo éster y el grupo amino, conservando el pK_a del grupo amino.

Las características deseables en el grupo ionizable a utilizar son la relación de la entidad utilizada (ácido o base), sus sales y el valor del pK_a. El pH donde se pueda encontrar la mejor solubilidad acuosa será: para ácidos, un pH mayor a su pK_a, y para bases uno menor a su pK_a. Además, la estabilidad del enlace modificador-fármaco será mayor en donde se presente el más alto grado de solubilización.²⁵

2.3.5.2. Modificadores del punto de fusión

Una energía de red cristalina alta de los compuestos sólidos tiene como resultado un punto de fusión alto y poca solubilidad en la mayoría de los disolventes. Por lo tanto, un intento por reducir esta energía puede resultar en el mejoramiento de la solubilidad acuosa.²² Según estudios realizados³⁶ se ha demostrado que en solución los imidazoles y bencimidazoles no sustituidos en posición 1 tienen una gran tendencia a formar puentes de hidrógeno intermoleculares, incrementando su energía de red cristalina.

En base a diversos estudios, se ha establecido que cuando se cambia 100°C el punto de fusión de un fármaco, vía la formación de un profármaco, hay un cambio significativo en la solubilidad acuosa y biodisponibilidad.

Tabla 8. Cambios de punto de fusión para algunas modificaciones con profármacos²⁵

Fármaco	Profármaco	$\Delta p.f. (^{\circ}C)$	
		Aromático	Alifático
R-COOH	R-COOCH ₃	-100	-70
	R-COOC ₂ H ₅	-150	-70
	R-COOC ₆ H ₅	70	-
	R-COONH ₂	50	20
R-OH	R-OCH ₃	-100	-30
	R-OC ₂ H ₅	-100	-50
	R-OCOCH ₃	-20	-20
	R-OCOC ₆ H ₅	0	0
R-NH ₂	R-NHCOCH ₃	60	-
	R-NHCOC ₆ H ₅	60	-



- *Interludio fisicoquímico: Cinética química*

Recordando conceptos de cinética química, el orden de la reacción gobierna la forma matemática de la ley de velocidad y, por tanto, la variación de la concentración de todas las especies con el tiempo;³⁷ dicho orden debe ser obtenido por experimentación. En la siguiente tabla se enlistan los órdenes de reacción más comunes:

Tabla 9. Órdenes de reacción más comunes

Orden	Ley de velocidad	Ecuaciones*	Observaciones
Cero	$\frac{d(Rx)}{dt} = -k$	$C = C_0 - kt$ $t_x = \frac{1}{k} \frac{C_0}{2}$	La descomposición de orden cero es una relación lineal entre la concentración del reactivo y el tiempo, por lo que depende de la concentración inicial del reactivo.
Primero	$\frac{d(Rx)}{dt} = -kC$	$C = C_0 e^{-kt}$ $t_x = \frac{\ln 2}{k}$	La descomposición de primer orden, la concentración del reactivo disminuye exponencialmente con el tiempo, teniendo un valor de k de constante de velocidad y no depende de la cantidad inicial de reactivo.
Segundo	Un reactivo: $\frac{d(Rx)}{dt} = -kC^2$	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$ $t_x = \frac{1}{kC_0}$	Para una reacción de segundo orden, al igual que en orden cero, la concentración a determinado tiempo depende de la concentración inicial del reactivo.
	Dos reactivos: $\frac{d(Rx)}{dt} = -kC_A C_B$	$\frac{1}{C_x} = \frac{1}{C_{ox}} + (-n_x)kt$ $\ln \frac{C_A}{C_{oA}} - \ln \frac{C_B}{C_{oB}} = -k(n_B C_{oA} - n_A C_{oB})$	En el caso de que A y B estén presentes en la relación estequiométrica requerida, la ley de velocidad tiene la forma de la primera ecuación. Si no se tienen los reactivos en relación estequiométrica, la ley de velocidad tiene la forma de la segunda ecuación, que se simplifica poniendo en exceso uno de los dos reactivos.

* $t_{1/2}$: vida media de reacción, es decir, el tiempo para que la concentración del reactivo alcance la mitad de su valor inicial.

n_x : coeficiente estequiométrico del reactivo x.

Una de las formas de determinar la ley de velocidad de una reacción es midiendo C como una función del tiempo y realizar transformaciones matemáticas a ambas variables y graficando dichas transformaciones hasta encontrar en la gráfica. Por ejemplo, en una reacción de primer orden, al graficar $\ln C$ contra el tiempo se encontrará una línea recta cuyo valor absoluto de la pendiente es la constante k de velocidad. Experimentalmente, se puede determinar colocando en exceso los reactivos participantes excepto uno, para observar la dependencia de la velocidad de reacción de la concentración de éste último.

3. Objetivos e hipótesis.

3.1. Planteamiento del problema.

El compuesto Alfa se presenta como una opción viable para el tratamiento de la fasciolosis, ya que se ha comprobado que actúa en todas las etapas de *Fasciola hepatica*. Este compuesto podría constituirse como una alternativa al Triclabendazol para el futuro tratamiento de esta enfermedad tanto en animales como en humanos. Sin embargo, su baja solubilidad acuosa consecuencia de la capacidad de este compuesto de formar puentes de hidrógeno intermoleculares, dificulta su formulación en solución para una fácil administración en animales.

Ahora bien, desde la perspectiva de la Química Farmacéutica se puede utilizar el enfoque de los profármacos para modificar las propiedades fisicoquímicas del compuesto Alfa, y, con esto, su solubilidad acuosa.

Establecido lo anterior surgen las siguientes interrogantes:

- ¿Aumentará la solubilidad acuosa del compuesto Alfa al modificar la estructura del mismo como un profármaco?, y
- ¿Los nuevos compuestos tendrán las suficientes solubilidad y estabilidad en agua para ser considerados, en un futuro, como candidatos viables para una formulación en solución?

3.2. Hipótesis.

- Si se añade una porción estructural alifática en la posición 1 del compuesto Alfa, entonces éste tendrá una menor capacidad de formar puentes de hidrógeno intermoleculares, por lo que disminuirá su punto de fusión y aumentará su solubilidad acuosa.
- Si se añade una porción estructural ionizable en medios biológicos en la posición 1 del compuesto Alfa, se aumentará la polaridad de la molécula incrementándose su solubilidad acuosa.
- Los derivados ionizables tendrán una mejor solubilidad acuosa que los neutros debido a su mayor capacidad para interactuar con el disolvente.



- o Los derivados con unión fármaco-acoplador $N(sp^2)-C(sp^2)$ serán más estables ante la hidrólisis que los que tienen unión $N(sp^2)-C(sp^3)$ por la menor polarización del carbono en el enlace.

3.3. Objetivos.

3.3.1. Objetivo general.

Modificar la solubilidad acuosa del compuesto Alfa por medio del diseño y la síntesis de profármacos del tipo derivado biorreversible.

3.3.2. Objetivos específicos.

- 3.3.2.1. Preparar al compuesto Alfa a partir de 5-cloro-4-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina.
- 3.3.2.2. Preparar derivados biorreversibles del compuesto Alfa que presenten menores puntos de fusión que este fármaco experimental.

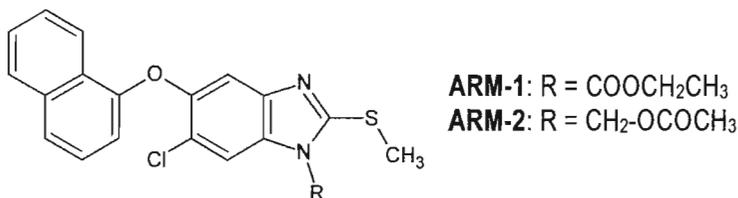


Figura 7. Derivados biorreversibles propuestos con menor punto de fusión que el compuesto Alfa.

- 3.3.2.3. Preparar derivados biorreversibles que presenten un grupo ionizable en medios biológicos para incrementar su solubilidad acuosa.

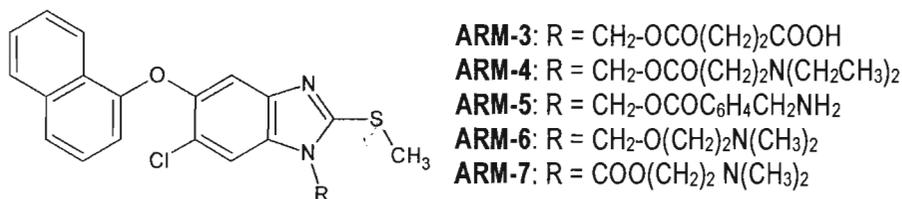


Figura 8. Derivados biorreversibles propuestos con grupo ionizable en medios biológicos.

- 3.3.2.4. Caracterizar a los derivados biorreversibles mediante sus propiedades físicas: punto de fusión, R_f , así como por métodos espectroscópicos (RMN, IR, UV) y espectrometría de masas.



3.3.2.5. Determinar la estabilidad en solución de los derivados biorreversibles.

3.3.2.6. Determinar la solubilidad acuosa de los derivados biorreversibles que presenten una estabilidad en solución significativa.

3.4. Consideraciones para el diseño.

Para el diseño de los derivados biorreversibles se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- ✓ Lineamientos de Lipinski.²⁹
- ✓ Consideraciones estructurales y facilidad de síntesis.
- ✓ Estado de ionización en medios biológicos.

Para estas evaluaciones teóricas se realizaron en parte gracias al programa computacional ACD/Labs® con los módulos que se describen a continuación:

- El módulo LogPdB se utilizó para la predicción de los coeficientes de partición de los compuestos, por medio de un algoritmo que considera las contribuciones atómicas, fragmentos estructurales e interacciones intramoleculares de los fragmentos constituyentes de la molécula.
- El módulo pKadB se utilizó para la predicción de las constantes de ionización de los compuestos, lo cual lo realiza a través de un algoritmo que considera parámetros estéricos (volumen y refractividad molares), electrónicos y parámetros hidrofóbicos (Hansch) de fragmentos presentes en la molécula.

La evaluación de los compuestos bajo los lineamientos de Lipinski se engloba en la siguiente tabla:

Tabla 10. Lineamientos de Lipinski aplicadas sobre los compuestos ARM-1-7

Regla	ARM-1	ARM-2	ARM-3	ARM-4	ARM-5	ARM-6	ARM-7
Donadores de puentes de hidrógeno	0	0	1	0	2	0	0
Peso molecular	412.89	412.89	470.93	498.04	504.00	441.97	455.96
Log P (calculado)	7.11	6.61	6.41	7.82	7.50	5.97	6.73
Aceptores de puentes de hidrógeno	5	5	5	6	5	5	6



Como se observa en la tabla anterior, los compuestos propuestos no presentarán problemas serios de permeabilidad y/o absorción, considerando que el Log P proviene de un algoritmo y no es dato experimental. Quizá solo **ARM-5** presente problemas, ya que su peso molecular es mayor a 500.

Con respecto a las consideraciones estructurales para el diseño de los derivados biorreversibles ARM-1 a 7 se tienen 3 tipos de compuestos:

- Tipo *N*-alcoxicarbonilo: **ARM-1** y **ARM-7**
- Tipo *N*-aciloximetilo: **ARM-2**, **ARM-3**, **ARM-4** y **ARM-5**
- Tipo *N*-alcoximetilo: **ARM-6**

Estos compuestos pueden analizarse desde varios puntos de vista:

- **ARM-1** y **ARM-2** son isómeros estructurales, **ARM-7** tiene un átomo de oxígeno más que **ARM-6**. Estos cambios sutiles se propusieron con la finalidad de estudiar la estabilidad del acoplador (CH_2O , y CO_2) frente a la hidrólisis *in vitro*.
- Se diseñaron tres ésteres que difieren en la porción ionizable, un hemisuccinato (**ARM-3**), un derivado de un β -aminoácido (**ARM-4**) y un derivado del ácido 4-aminometilbenzoico (**ARM-5**) con el propósito de estudiar el efecto en la solubilidad así como en la estabilidad.
- Finalmente, se consideró el compuesto **ARM-6**, que es un éter, para estudiar la viabilidad sintética de este tipo de compuestos.

Cabe aquí mencionar que en el caso de obtener mezclas de isómeros debido a la tautomería presente en los bencimidazoles asimétricos, como el compuesto Alfa, no se pretendió hacer la separación de los derivados biorreversibles.



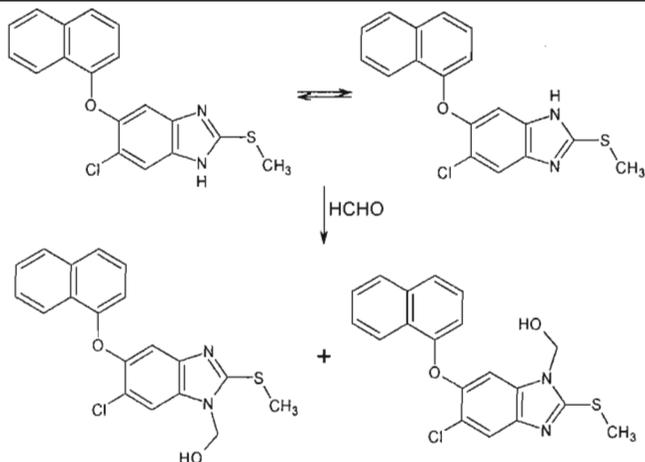


Figura 9. Tautomería de los benzimidazoles asimétricos³⁷.

Se consideró al formaldehído como cacoplador en los derivados *N*-aciloximetilo y *N*-alcoximetilo, ya que la dosis a la que se administra el compuesto Alfa (12 mg/Kg) es única y se espera que la cantidad de formaldehído liberado en la hidrólisis se encuentre por debajo de su DL₅₀, presentándose leves signos o no presentándose algún signo de toxicidad por el mismo.



4. Procedimiento experimental

Para cumplir con el objetivo previamente planteado, el trabajo experimental se dividió en dos partes: la primera involucra la síntesis del compuesto Alfa y de sus derivados biorreversibles, y en la segunda la evaluación de la solubilidad y estabilidad mediante la determinación de la cinética de hidrólisis en agua.

4.1. Instrumentación y materiales

Tanto en la síntesis como en la evaluación se utilizaron los siguientes instrumentos y materiales de especial mención:

4.1.1. Síntesis del compuesto Alfa y sus derivados biorreversibles

- ✓ La 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina se sintetizó previamente en el laboratorio, como parte de programas de Servicio Social y bajo procedimientos ya establecidos¹².
- ✓ Puntos de fusión (p.f.) fueron determinados con un aparato de punto de fusión para capilares marca Büchi B-540. Los puntos de fusión obtenidos no están corregidos.
- ✓ Las cromatografías en capa fina (CCF) para el monitoreo de reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® F₂₅₄ 20X20 cm, y para la separación de muestras se utilizaron placas cromatográficas preparativas de gel de sílice 60 Merck® F₂₅₄ 200X200X2 mm. Como revelador se utilizó una lámpara UV UVGL-25 Mineralight® o una cámara de revelado con Yodo resublimado. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck® con una distribución de tamaño de partícula de 0.2 a 0.5 mm.
- ✓ La evaporación de disolventes se realizó en un rotaevaporador Büchi R-114 con bomba de vacío y condensador VWR Scientific-1107.
- ✓ Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer con Transformada de Fourier FT-IR-1605, utilizando pastillas de KBr.



- ✓ Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas Jeol JMS-SX102A, por medio de la técnica de bombardeo de átomos rápidos (FAB) utilizando Xenón como gas acarreador y por la técnica de introducción directa con impacto electrónico (ID/IE).
- ✓ Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian Unity Inova a una frecuencia de 300 Hz, utilizando Tetrametilsilano (TMS) como estándar interno y disolventes deuterados.

4.1.2. Evaluación de la estabilidad in vitro y solubilidad de los derivados biorreversibles

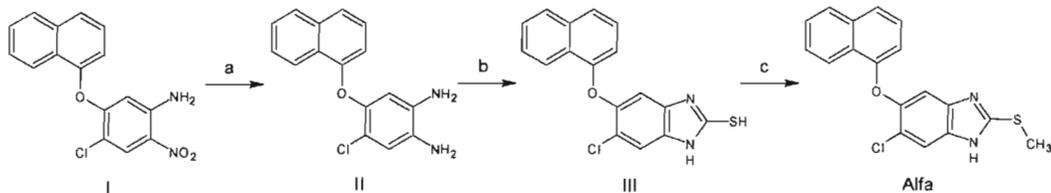
- ✓ Para la determinación de la concentración de los derivados y del compuesto Alfa en las muestras, tanto en la solubilidad como en la cinética, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC) con bomba binaria Waters® 1525 y detector de arreglo de fotodiodos Waters® 996, conectado a una estación de trabajo Dell® como interfase de salida. El rango de detección se fijó de 200 a 400 nm, siendo las longitudes de onda de trabajo 220 y 304 nm, con un flujo de fase móvil de 1 mL/min y corridas de 6 a 15 minutos. El volumen de inyección fue de 20 μ m.
- ✓ Se utilizó una columna Waters® μ Bondapak C₁₈ (3.9X300 mm) como fase estacionaria.
- ✓ Metanol, Acetonitrilo y Agua grado HPLC, en proporción 40:30:30, como fase móvil.
- ✓ Tanto para la cinética de hidrólisis como para el estudio de estabilidad en solución se utilizó un termomezclador Eppendorf®-R.
- ✓ Para el filtrado de las muestras de solubilidad, se utilizaron aerodiscos de 1 cm de diámetro de nylon Titan® con un tamaño de poro de 0.45 μ m.

4.2. Preparación de los derivados biorreversibles

Para la síntesis del compuesto Alfa se siguió la ruta sintética ilustrada en el esquema 1, para lo cual se partió de la 5-cloro-4(1-naftiloxi)-2-nitroanilina que por medio de una reducción química y un posterior ciclocondensación con xantato de etilo en medio básico se obtuvo el 2-mercaptobencimidazol, que finalmente se metiló cuidadosamente con CH₃I. Una vez purificado el



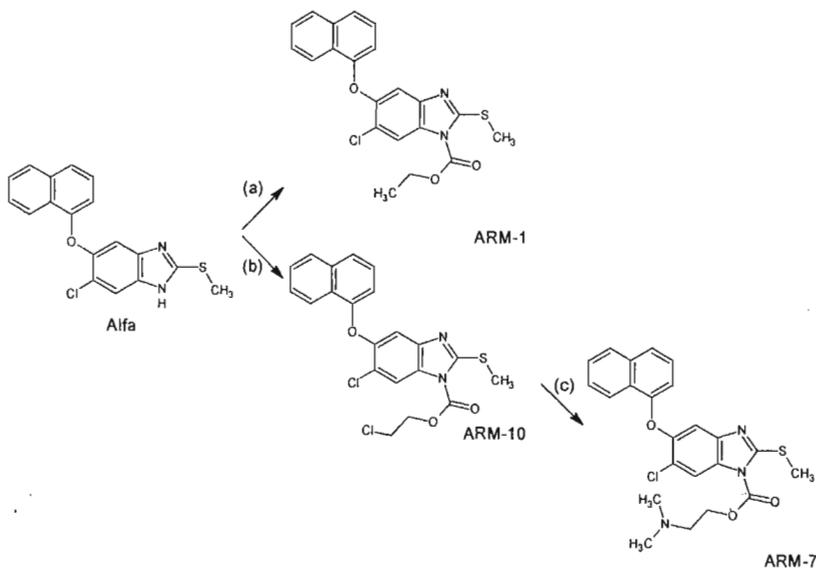
compuesto Alfa, se procedió a la síntesis de los derivados biorreversibles según las rutas ilustradas en los esquemas 2, 3 y 4.



a) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EtOH, reflujo; b) CS_2 , KOH, EtOH, 55-65°C; c) CH_3I , KOH, EtOH, 0-5°C

Esquema 1. Ruta sintética para la obtención del compuesto Alfa.

Para la preparación de los derivados tipo *N*-alcoxicarbonilo (**ARM-1** y **ARM-7**), se hizo reaccionar al compuesto Alfa con el cloroformiato de alquilo correspondiente, como lo muestra el esquema 2. En el caso de **ARM-7**, esto llevó a la formación del intermediario clorado **ARM-10** el cual por sustitución nucleofílica dio **ARM-7**.



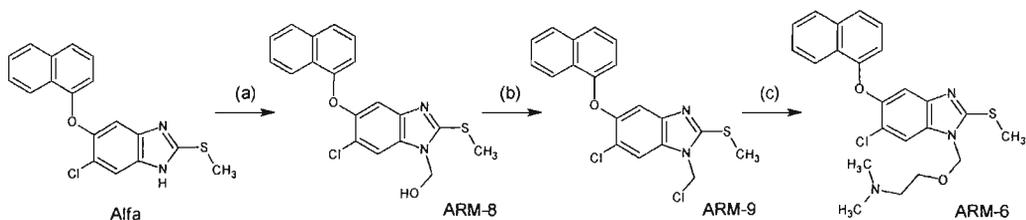
a) $\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_3$, TEA, CHCl_3 , 0-5°C, 3h; b) $\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{-Cl}$, TEA, CHCl_3 , 0-5°C, 3h; c) $\text{Me}_2\text{NH} \cdot \text{HCl}$, TEA, THF, reflujo 48 h

Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de los derivados biorreversibles tipo *N*-alcoxicarbonilo (ARM-1, 7)

Para la preparación del derivado biorreversible tipo *N*-alcoximetilo (**ARM-6**), se propuso una síntesis de éteres tipo Williamson con el bencimidazol funcionalizado como halogenuro de alquilo



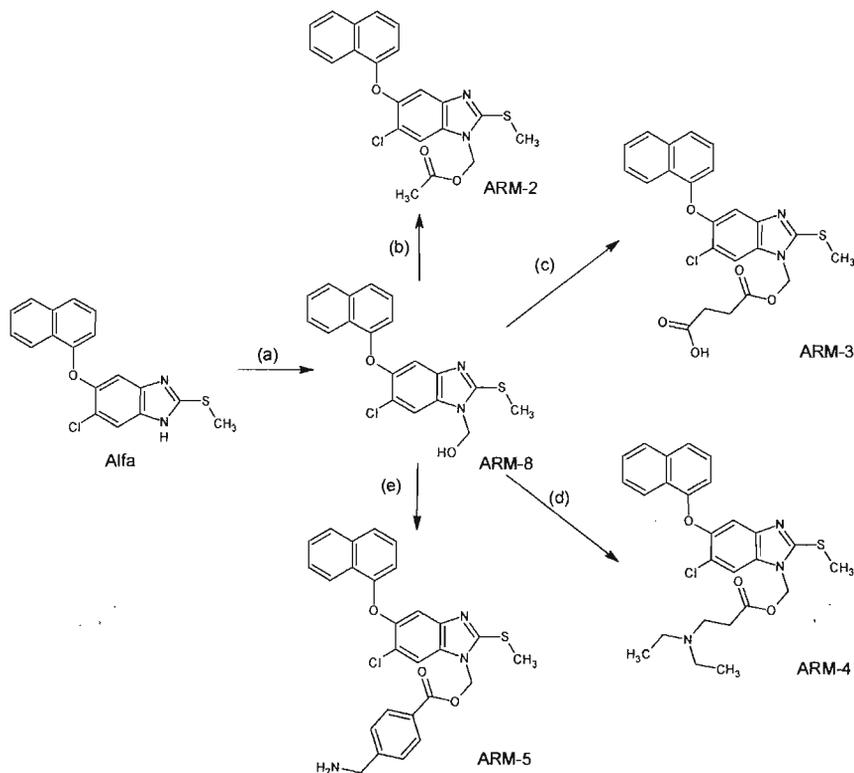
(ARM-9) y un alcóxido, como se muestra en el esquema 3.



a) $(\text{CH}_2\text{O})_n$, K_2CO_3 , agua; b) SOCl_2 , CHCl_3 0-5°C a t.amb., 2 h; c) *N,N*, -dimetiletanolamina, NaH 60%, benceno, 24 h.

Esquema 3. Ruta sintética para la obtención del derivado biorreversible tipo *N*-alcoximetilo (ARM-6).

Finalmente, para la preparación de los derivados biorreversibles tipo *N*-aciloximetilo (ARM-2, ARM-3, ARM-4 y ARM-5), se propuso hacer reaccionar al hemiaminal ARM-8 con derivados reactivos de los ácidos carboxílicos correspondientes, según lo muestra el esquema 4.



a) $(\text{CH}_2\text{O})_n$, K_2CO_3 , agua, 24 h; b) Anhídrido acético, piridina- CHCl_3 , 24h; c) Anhídrido succínico, piridina- CHCl_3 , 24h; d) *N,N*-dietil- β -alanina, 1,1'-carbonildiimidazol, acetonitrilo, reflujo 4h; e) Ácido 4-(*t*-boc-aminometil)benzoico, 1,1'-carbonildiimidazol, acetonitrilo, 4h; HCl, éter.

Esquema 4. Ruta sintética para la obtención de los derivados biorreversibles tipo *N*-aciloximetilo (ARM-2 a 5).

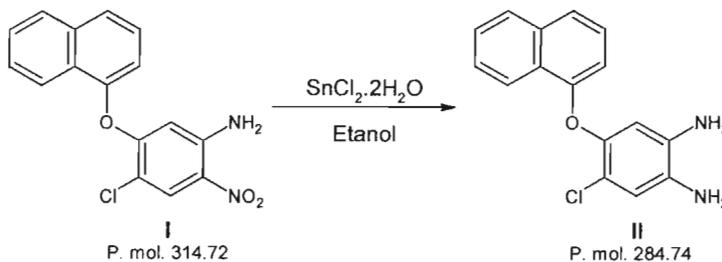
Tabla 11. Sistemas de elución cromatográfica.

Sistema	Composición		Sistema	Composición	
I	Cloroformo	98%	IV	Tolueno	88%
	Metanol	2%		Tetrahidrofurano	9%
II	Cloroformo	90%		Ácido acético	3%
	Metanol	10%	V	Cloroformo	95%
III	Cloroformo	100%	Acetona	5%	
			VI	Hexano	50%
			Acetato de etilo	50%	

4.2.1. Métodos de preparación

A continuación se detallan los métodos de preparación para los intermediarios, el compuesto Alfa y sus derivados biorreversibles ARM-1-7.

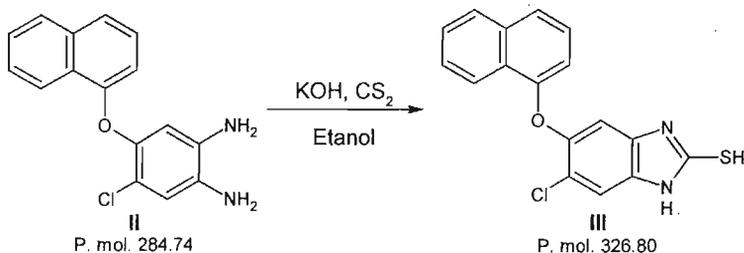
- 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (II)



En un matraz bola de 3 bocas con un refrigerante en posición de reflujo, agitador magnético y atmósfera de nitrógeno, se suspendieron 100 g (317.7 mmol) del compuesto I y 430.2 g (1.9 mol) de cloruro estannoso dihidratado en 500 mL de etanol. La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas; posteriormente, se vertió sobre 1000 mL de agua hielo y se llevó a pH 9 con hidróxido de sodio. El sólido se separó por filtración, se lavó con etanol y acetato de etilo varias veces. El primer filtrado (alcohólico) se concentró *in vacuo*, el residuo se redisolvió en acetato de etilo y se juntó con los lavados de acetato anteriores. Después, los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron a sequedad con el rotaevaporador. Se obtuvo un residuo oleoso que pesó 90.0 g (99.5%), con R_f de 0.310 en el sistema I con una gota de amoníaco.

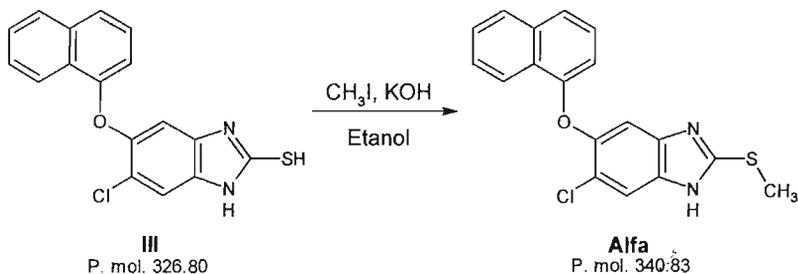


- 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (III)



En un matraz de 3 bocas, provisto de termómetro, refrigerante en posición de reflujo, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se mezclaron 90.0 g del compuesto II (316.1 mmol) 450 mL etanol, 26.8 g (477.3 mmol, 1.51 eq) de KOH, disueltos en 25 mL de agua, y 28.6 mL (474.1 mmol, 1.5 eq.) de disulfuro de carbono. La mezcla se calentó a reflujo suave (50-60°C) durante 4 h; posteriormente, se vertió en agua y aciduló a pH 5-6 con ácido acético al 20%. El sólido se separó por filtración al vacío y lavó con agua repetidas veces. Finalmente, el sólido se decoloró con carbón activado (15%) en una mezcla cloroformo-metanol 2:1. Se obtuvieron 78.3 g (75.8%) de un polvo blanco con un punto de fusión de 273-275°C y R_f de 0.468 en el sistema II con una gota de ácido acético.

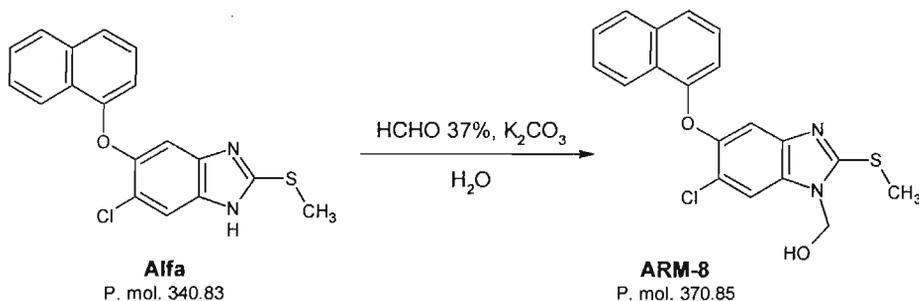
- 5-Cloro-2-(metilito)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (Alfa)



En un matraz de 3 bocas, provisto de termómetro, embudo de adición, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 78.3 g (239.6 mmol) del compuesto III en 400 mL de etanol. Luego, se añadieron 16.1 g (287.5 mmol, 1.2 eq.) de KOH disueltos en 40 mL de agua. La mezcla se enfrió a 6-8 °C y, mediante el embudo de adición se añadieron, gota a gota, 16.4 mL (263.6 mmol, 1.1 eq.) de yodometano. Al término de la adición se mantuvo la temperatura y la

agitación durante 1 h entre 5-10°C. Posteriormente, la mezcla se vertió sobre 1000 mL de agua y se llevó el pH a 6-7 con HCl 20%; el sólido que se formó se separó por filtración al vacío y lavó repetidas veces con agua. El filtrado se concentró y el sólido se filtró y lavó repetidas veces con agua. Los dos sólidos obtenidos se juntaron, pesando 69.1g (84.7%), y redisolvieron en acetato de etilo caliente y la solución se trató con carbón activado a reflujo durante 1 h. Después de separar por filtración el carbón, la solución amarilla se concentró a un tercio de su volumen en el rotaevaporador, luego se vertió sobre un volumen igual de metanol, agitando vigorosamente. Precipitó un sólido blanco, el cual se separó por filtración, lavó con metanol frío y secó al aire, dando 37.4 g (45.8%) de un polvo blanco, con un punto de fusión de 180.8-188.2°C y con un R_f de 0.367 en el sistema I.

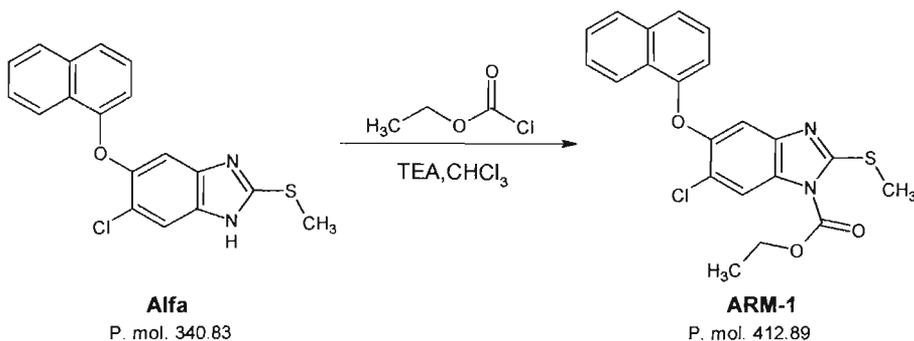
- [6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-1-il]metanol (ARM-8)



En un matraz bola de 500 mL con una boca, contando con un agitador magnético, se suspendieron 10 g (29.3 mmol) de Alfa en 125 mL de agua. Después, a la suspensión se añadieron 0.365 g (2.6 mmol) de carbonato de potasio; una vez disuelto éste, se añadieron 30 mL (400.5 mmol) de una solución de formaldehído al 37%. La suspensión se dejó en agitación durante toda la noche. Posteriormente la mezcla se filtró; el sólido se lavó con solución de formaldehído al 4% y secó al aire durante 24 h dando 9.823 g (90.3% de rendimiento) de un polvo blanco, con un punto de fusión de 94.5-97.8°C y un R_f de 0.263 en el sistema V.



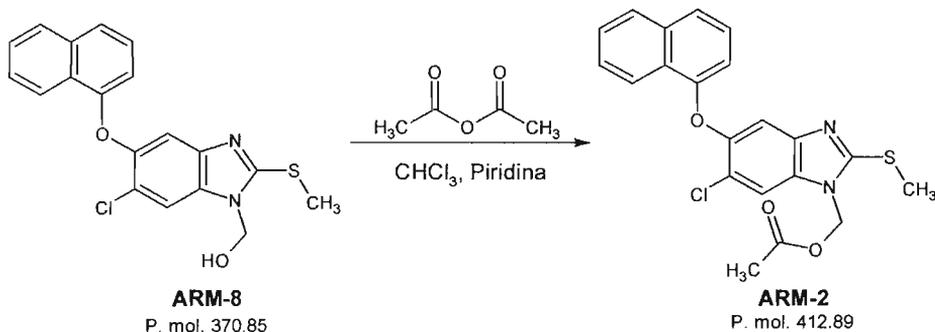
- **6-Cloro-2-(metiltilio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-carboxilato de etilo (ARM-1)**



En un matraz bola de 50 mL con una boca, agitador magnético y trampa de humedad, se mezclaron 1.0 g (2.9 mmol) de compuesto Alfa, 0.5 mL (3.5 mmol) de trietilamina y 10 mL de cloroformo. A la solución ámbar, enfriada sobre baño de hielo, se añadieron 0.5 mL (5.3 mmol) de cloroformiato de etilo; terminada la adición se permitió que la reacción alcanzara la temperatura ambiente y se dejó en agitación por 3 h. Una vez verificado el consumo total de la materia prima mediante CCF, la suspensión se concentró a sequedad con ayuda de un rotaevaporador. El concentrado se resuspendió en 10 mL de éter isopropílico con 0.5 mL de cloroformo, formándose un sólido blanco, éste se separó por filtración, lavó con éter isopropílico y secó al aire. Se obtuvo 1.0 g (83.3%) de un polvo blanco con un punto de fusión de 147.1-149.1°C; en CCF presentó dos manchas correspondientes a los dos isómeros con R_f de 0.526 y 0.421 en el sistema III.



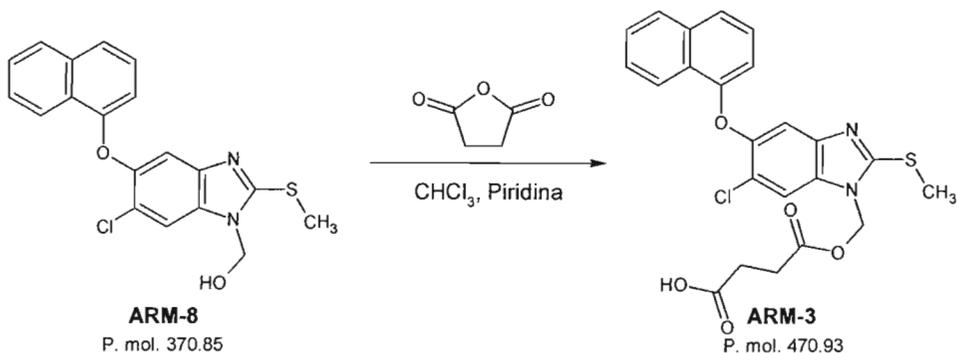
- Acetato de [6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metilo (ARM-2)



En un matraz bola de 50 mL con una boca, con un agitador magnético y trampa de humedad, se disolvió totalmente 1.0 g (2.7 mmol) de **ARM-8** en 10 mL de cloroformo, más 1 mL de piridina. Posteriormente, a la solución se añadieron lentamente 0.4 mL (4.2 mmol) de anhídrido acético, se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Después que se comprobó el consumo total de la materia prima, se añadieron 30 mL más de cloroformo a la mezcla de reacción y se lavó con 30 mL de ácido clorhídrico al 20%. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad con el rotaevaporador; se obtuvo una resina que se resuspendió en 10 mL de éter isopropílico y 0.5 mL de Cloroformo, formándose un sólido blanco que se filtró al vacío, lavó con éter isopropílico y se secó al aire durante 24 h. Se obtuvieron 0.4069 g (36.6% de rendimiento) de un polvo blanco, con un punto de fusión de 148.5-156.8°C que en CCF mostró dos productos, con R_f de 0.500 y 0.389 en el sistema III.



- Ácido 4-([6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-il]metoxi)-4-oxobutanoico
(ARM-3)

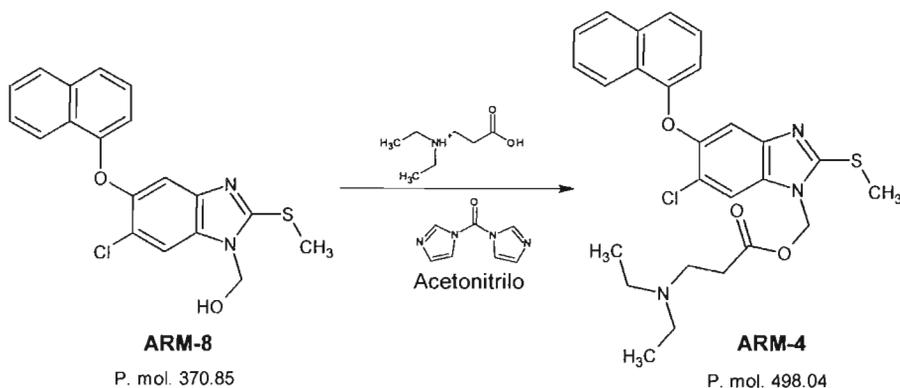


En un matraz bola de 50 mL con una boca, provisto de un agitador magnético y trampa de humedad, se disolvieron 1.0 g (2.7 mmol) de **ARM-8** en 10 mL de cloroformo, más 1 mL de piridina. Posteriormente, a la solución se añadieron 0.5 g (5.0 mmol) de anhídrido succínico; la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Terminada la reacción, ésta se diluyó con 30 mL de cloroformo a la solución. La solución se lavó con 30 mL de ácido clorhídrico al 20%; la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y llevó a sequedad con el rotaevaporador obteniéndose un sólido resinoso que se suspendió en 10 mL de éter isopropílico con 0.5 mL de cloroformo. Con este tratamiento se formó un sólido blanco el cual se separó por filtración, lavó con éter isopropílico frío y secó al aire durante 24 h.

Se obtuvieron 0.937 g (73.8%) de una muestra del polvo. Una muestra del polvo se recrystalizó en acetonitrilo sin calentamiento para los análisis espectrométricos y espectroscópicos, presentando un punto de fusión de 159.9-161.5°C y un R_f de 0.292 en el sistema IV.



- 3-(*N,N*-Dietilamino)propanoato de [6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-*il*]metilo (**ARM-4**)

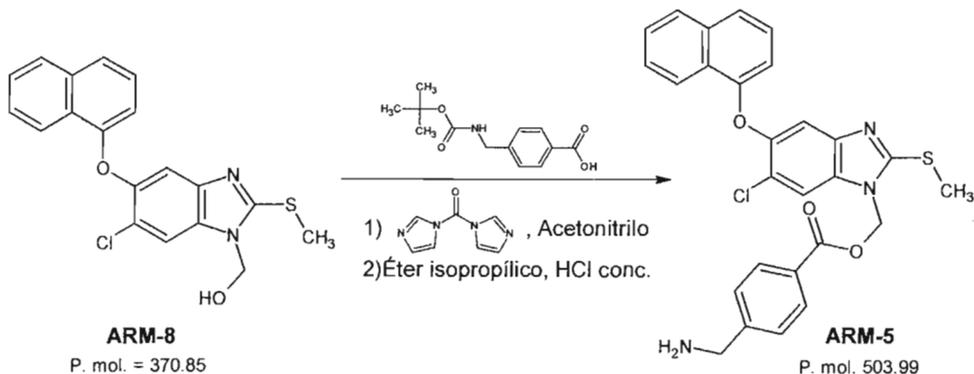


En un matraz bola de 50 mL con una boca, acondicionado con agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo y trampa de humedad, se suspendieron 0.734 g (4.0 mmol) de clorhidrato de *N,N*-dietil- β -alanina y 0.984 g (6.1 mmol) de 1-1'-carbonyldiimidazol en 5.0 mL de acetonitrilo. La suspensión se calentó a reflujo suave (durante 2 horas) hasta lograr la solución. Después, a la solución se le añadió 1.0 g (2.7 mmol) de **ARM-8** y 5 mL más de acetonitrilo; la reacción se calentó a reflujo durante 24 h. Al término de este periodo la mezcla de reacción se concentró a sequedad con el rotaevaporador. La CCF de la resina obtenida (sistema VI) mostró 2 manchas, la de R_f mayor (0.448, sistema VI) se extrajo con lavados sucesivos de éter isopropílico; los extractos etéreos se juntaron y se llevaron a sequedad. Se obtuvieron 1.09 g de una resina que también mostró dos manchas: una con un R_f de 0.333 (identificada como **ARM-4**) y otra de 0.214 (identificada como compuesto Alfa) en el sistema V.

Intentos posteriores de purificación conllevaron a la destrucción del compuesto, regenerándose el compuesto Alfa.



- 4-Aminometilbenzoato de [6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-metiltio-1H-bencimidazol-1-il]metilo
(ARM-5)



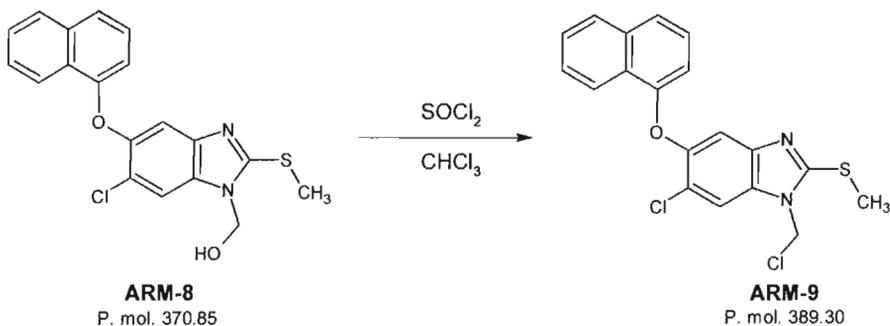
En un matraz bola de 50 mL con una boca, provisto con un agitador magnético, refrigerante en posición de reflujo y trampa de humedad, se suspendieron 1.016 g (4.0 mmol) de ácido 4-(*ter*-butoxicarbonil)aminometilbenzoico en 5.0 mL de acetonitrilo. La suspensión se trató con 0.984 g (6.1 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol. La suspensión formada se calentó a reflujo ligero durante 2 horas.

Una vez que se verificó el consumo de la materia prima mediante CCF (sistema VI), a la mezcla se añadió 1.0 g (2.7 mmol) de **ARM-8** y 5 mL más de acetonitrilo; la reacción se calentó a reflujo durante 2 h. Al término de este periodo la mezcla de reacción se concentró a sequedad con el rotaevaporador. La CCF (sistema III) de la resina mostró 4 elementos con los siguientes R_f : 0.617, 0.583, 0.40, y 0.217 (Alfa), por lo que se realizó una cromatografía en columna para la separación e identificación del elemento más abundante, R_f de 0.40; se obtuvieron 0.3 g (18.4%) de un producto que se identificó como **ARM-5** "*ter*-*bo*c" protegido.

Intentos posteriores de desprotección causaron la destrucción del producto, originando al ácido 4-aminometilbenzoico y al compuesto Alfa.

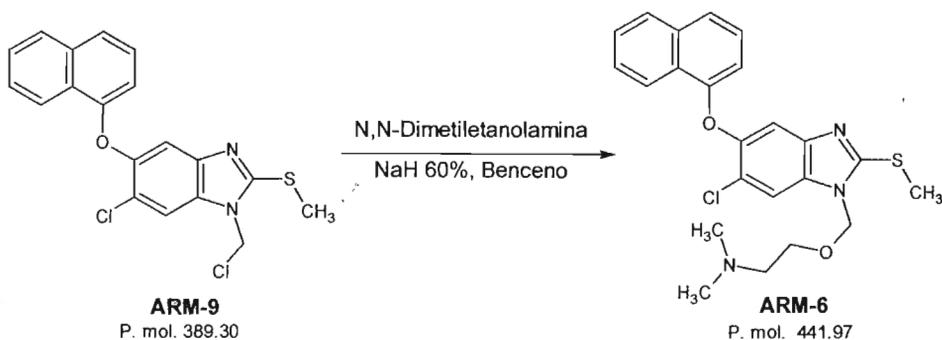


- 6-Cloro-1-(clorometil)-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (ARM-9)



En un matraz bola de 50 mL con una boca, adaptado con agitación magnética y trampa de humedad, se disolvió 1.0 g (2.7 mmol) de **ARM-8** en 10 mL de cloroformo. A la solución fría (sobre un baño de hielo) se le añadieron 0.3 mL (4.0 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla se agitó durante 2 h, permitiéndose que se alcanzara la temperatura ambiente. Después de verificar el consumo de la materia prima mediante CCF, la mezcla de reacción se diluyó con 20 mL más de cloroformo, después se lavó con solución de bicarbonato de sodio al 10%. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad con el rotaevaporador. La resina obtenida pesó 0.975 g (37.2%) y presentaba dos manchas en CCF: 0.569 y 0.508 en el sistema V. La mezcla cruda se utilizó para la siguiente reacción.

- 6-Cloro-1-[[2-(dimetilamino)etoxi]metil]-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (ARM-6)



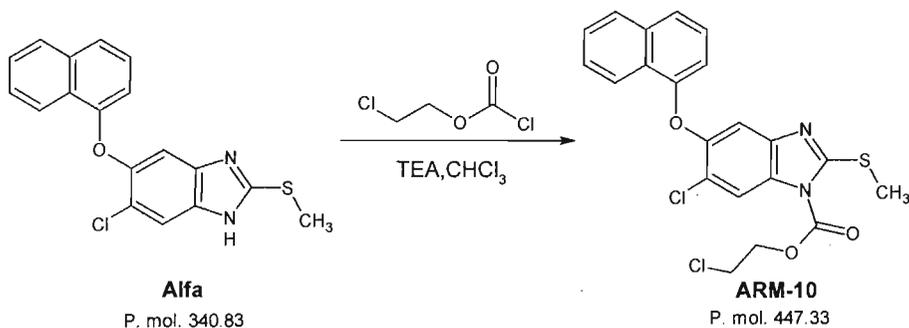
En un matraz bola de una boca de 50 mL se suspendieron 0.4 mL (3.9 mmol) de N,N-dimetiletanolamina en 10 mL de benceno. La suspensión se trató, bajo condiciones anhidras, con



0.300 g (7.5 mmol) de hidruro de sodio al 60%, dejándose reaccionar durante 1h. Después, se añadió 1.0 g (2.5 mmol) de **ARM-9** proveniente del crudo de la reacción anterior se calentó a reflujo durante 24 h. Al término de este tiempo se llevó la mezcla a sequedad con el rotaevaporador. La CCF de la resina (sistema III) mostró 2 manchas: una con R_f de 0.217 (Compuesto Alfa) y una en el punto de aplicación.

Intentos de purificación provocaron la destrucción del producto, recuperándose únicamente de la resina el compuesto Alfa.

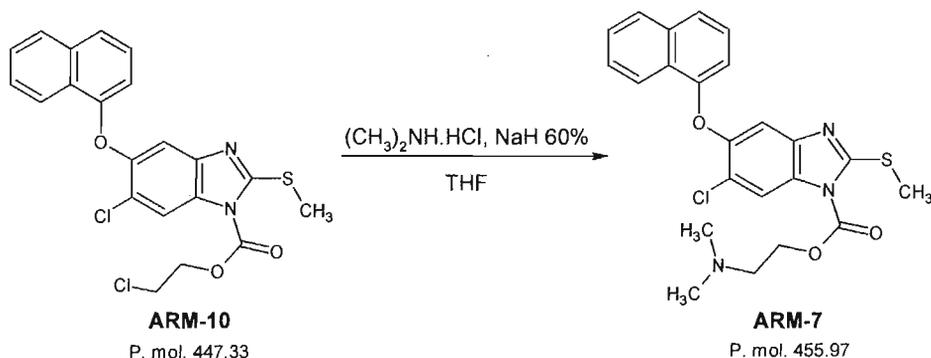
- 6-Cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-1-carboxilato de 2-cloroetilo (**ARM-10**)



En un matraz bola de 50 mL con una boca, contando con un agitador magnético y trampa de humedad, se suspendió 1.0 g (2.9 mmol) de compuesto Alfa en 10 mL de cloroformo. A esta suspensión se adicionaron 0.5 mL (3.5 mmol) de trietilamina. Posteriormente se añadieron 0.4 mL (4.4 mmol) de cloroformiato de 2-cloroetilo; después que terminó la adición se permitió que la reacción alcanzara temperatura ambiente, dejándose en agitación 3 horas. Una vez verificado el consumo total de la materia prima mediante CCF, la suspensión se concentró a sequedad con ayuda de un rotaevaporador; el concentrado se resuspendió en 10 mL de éter isopropílico más 0.5 mL de cloroformo. El sólido blanco, que precipitó, se separó por filtración, se lavó con éter isopropílico y secó al aire. Se obtuvieron 1.02 g (77.8%) de un producto que en CCF mostró dos manchas con R_f de 0.354 y 0.292 en el sistema III. El producto fundió con descomposición a 138°C



- Obtención del 6-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(metiltilio)-1H-bencimidazol-1-carboxilato de 2-(dimetilamino)etilo (ARM-7)



En un matraz bola de una boca de 50 mL, adaptado con un refrigerante en posición de reflujo y una trampa anhidra se suspendieron 0.228 g (2.8 mmol) de clorhidrato de dimetilamina en 5 mL de tetrahidrofurano. A dicha suspensión se añadieron rápidamente 0.112 g (2.8 mmol) de hidruro de sodio al 60% en aceite mineral. Se dejó con agitación hasta que dejó de burbujear (aproximadamente 2 h). Una vez terminada la reacción, se añadió 1.0 g (2.2 mmol) de **ARM-10** y 5 mL más de tetrahidrofurano. La reacción se mantuvo en agitación durante 24 h. Posteriormente la reacción se concentró a sequedad; la resina obtenida se disolvió en 40 mL de cloroformo, se lavó con 60 mL de agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. El residuo se redisolvió en 10 mL de cloroformo y se trató con una corriente rápida de cloruro de hidrógeno anhidro, recién generado, durante 2 h. El sólido blanco que precipitó se separó por filtración al vacío y lavó con éter de petróleo. La CCF del sólido reveló que dicho sólido era compuesto Alfa. De las aguas madres se obtuvo un polvo blanco cuando éstas se trataron con más éter; el sólido se separó por filtración al vacío, se lavó con éter de petróleo fresco y secó al aire, dando 0.3071 g (26.0%) de un polvo blanco que en CCF mostró dos manchas con R_f de 0.200 y 0.169 en el sistema IV. El producto fundió con descomposición a 181.2 y 183.7°C.



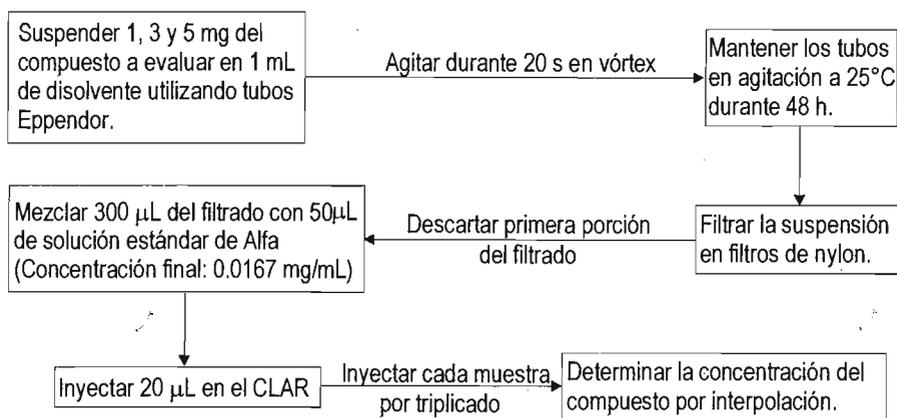
4.3. Evaluación de la estabilidad in vitro y solubilidad de los derivados biorreversibles

4.3.1. Estabilidad ante la hidrólisis in vitro

La evaluación de la estabilidad de los compuestos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Para lo cual primeramente se prepararon soluciones stock (concentración: 0.25 mg/mL) para cada uno de los compuestos a evaluar en acetonitrilo, metanol o agua. La estabilidad se monitoreó por medio de la relación de áreas de los picos (área del compuesto dividida entre el área del compuesto Alfa). Se consideró como compuesto estable si la relación de áreas no disminuyó más del 10%⁶⁸ en el tiempo de monitoreo; e inestable cuando esta relación de áreas fue mayor al 10% de la relación inicial. Se consideró al compuesto Alfa como estándar interno y la evaluación de la degradación se realizó por periodos entre 2 y 5 h.

4.3.2. Solubilidad en medio acuoso

A los derivados biorreversibles que presentaron estabilidad en disolventes próticos se les determinó la solubilidad acuosa en solución amortiguadora de Fosfatos (pH = 7.0) según el siguiente diagrama de flujo:



Esquema 5: Determinación de la solubilidad acuosa.



5. Resultados y discusión

5.1. Preparación de los derivados biorreversibles

5.1.1. Síntesis del Compuesto Alfa

Una vez llevada a cabo la ruta de síntesis propuesta en el esquema 1, a los compuestos se les determinaron sus constantes físicas así como espectroscópicas y espectrométricas. En la tabla siguiente se engloban las propiedades físicas obtenidas de los compuestos II, III y Alfa.

Tabla 12. Propiedades de los compuestos I-III y Alfa

Compuesto	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	R _f	Sistema
II	99.5	Nd	0.310	I Amoniaco
III	75.8	273-275	0.468	II Ac. acético
Compuesto Alfa	45.8	180.8-188.2	0.367	II

Nd: No determinado

Como ya se mencionó en la descripción de la metodología, para la preparación de los derivados biorreversibles, objetivo de este trabajo, fue necesario sintetizar al compuesto Alfa. Para ello se partió del éter 4-cloro-5(-naftiloxi)-2-nitroanilina (I). El primer paso fue la reducción del grupo nitro con cloruro estannoso. El éxito de la reacción dependió del eficiente manejo de las sales de estaño, el rendimiento fue superior al 90% cuando las sales de estaño se precipitaron a pH 9-10. La obtención de la o-feniléndiamina II también se realizó utilizando como agente reductor hierro pulverizado; se utilizaron 4 equivalentes de hierro pulverizado y 2.5 equivalentes de ácido clorhídrico concentrado. El tratamiento posterior de la mezcla de reacción fue exactamente el mismo que al usar cloruro estannoso. Sin embargo, la remoción de los óxidos de hierro fue operativamente más sencilla, aunque la coloración roja que éstos le dan al producto, fue muy difícil de eliminar, a costa del rendimiento. Trazas de óxidos de hierro aparecieron incluso en el compuesto Alfa, cuando éstos no se eliminaron a tiempo, por lo que esta ruta se desechó como alternativa.



La ciclocondensación de II para obtener del anillo de 2-mercaptobencimidazol, III, se realizó mediante la formación del intermediario reactivo xantato de etilo, producto de la reacción entre el hidróxido de potasio, el etanol y el disulfuro de carbono presentes en el medio de reacción. Este intermediario, al reaccionar con la diamina II, formó el compuesto III:

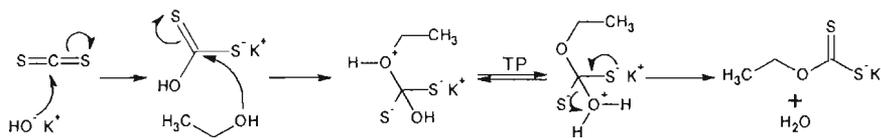


Figura 10: Formación del intermediario xantato de etilo.

Cuando se añadió agua (15-40%) a la mezcla de reacción, ésta fue más lenta, pero el rendimiento fue mayor. La cantidad de disulfuro de carbono no debe excederse de lo calculado, ya que de ser así, se obtiene un producto color rojo ladrillo. Cuando esto sucedió, hubo que decolorar el tiol con carbón activado en medio alcalino

Finalmente, el compuesto Alfa se obtuvo por metilación con yodometano en medio alcalino lo que favoreció la formación del anión del azufre, nucleófilo de la reacción. En esta reacción fue muy importante el control de la temperatura y de los equivalentes de reactivos de lo contrario se corre el riesgo de obtener dos compuestos dimetilados isoméricos, producto de la metilación en el nitrógeno bencimidazólico.

La calidad del producto dependió mucho del 2-mercaptobencimidazol usado como materia prima. La identidad del compuesto obtenido se llevó a cabo por comparación con una muestra de referencia y por técnicas espectrométricas y espectroscópicas. La variabilidad en el punto de fusión se debió a la presencia de polimorfismos en el compuesto ya que se obtuvo como un polvo. Las constantes espectroscópicas del compuesto Alfa se enlistan más adelante en la tabla 14.

En espectro de Infrarrojo se identificaron las bandas características de algunos grupos funcionales de la molécula: El NH del bencimidazol (3300 cm^{-1}), los sistemas aromáticos (3052 , 1595 y 1504 cm^{-1}) y el éter aromático entre el bencimidazol y el naftilo (1258 y 1156 cm^{-1}). En el espectro de masas se comprobó el peso molecular de 340 m/z , además de observarse el ión



342, que denota la presencia de cloro en el compuesto por la relación isotópica del mismo. Finalmente, en el espectro de RMN ^1H se presentó un singulete que integró para 3 hidrógenos a 2.667 ppm indicativo de la presencia del grupo 2-metiltio; los dos singuletes del anillo de bencimidazol se encontraron en 7.221 ppm, el H_4 y 7.685 ppm el H_7 . El protón del nitrógeno apareció como un doblete intercambiable con agua deuterada en 12.700 ppm.

5.1.2. Síntesis de los derivados biorreversibles ARM-1-7

Los derivados biorreversibles se sintetizaron según los esquemas 2, 3 y 4 propuestos en la metodología. En la tabla 13 se enlistan las propiedades físicas y rendimientos obtenidos de los compuestos **ARM-1** a **ARM-10**.

Tabla 13. Propiedades de los compuestos ARM-1-10

Compuesto	P. M.	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	R _f	Sistema*
ARM-1	412.89	83.3	147.1-149.1	0.526 0.421	III
ARM-2**	412.89	36.6	148.5-156.8	0.5 0.389	III
ARM-3	470.93	73.8	159.9-161.5	0.292	IV
ARM-4	498.04	-	Nd	0.333	V
ARM-5	504.00	-	Nd	Nd	-
ARM-6	441.97	-	Nd	0.0	III
ARM-7	455.96	26.0	181.2-183.7 (d)	0.2 0.169	IV
ARM-8	370.85	90.3	94.5-97.8	0.263	V
ARM-9	389.30	37.2	Nd	0.569 0.508	V
ARM-10	447.34	77.8	138.8 (d)	0.354 0.292	III

Nd: No determinado (d): descomposición

*: Ver Pág. 33 para la composición de los sistemas de elución.

** : Mezcla de **ARM-2** con Alfa acetilado.

Para la identificación estructural de los compuestos obtenidos, se realizaron experimentos de espectrometría y espectroscopia, cuyos resultados se enlistan en la tabla 14:



Tabla 14. Identificación espectrométrica y espectroscópica de los compuestos Alfa y ARM-1-10³⁸⁻⁴⁰

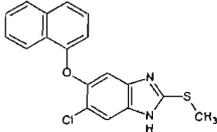
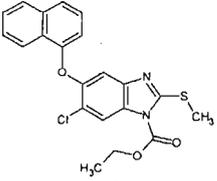
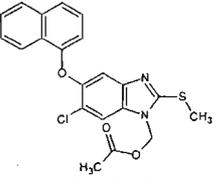
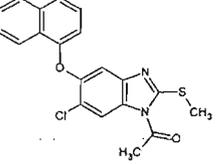
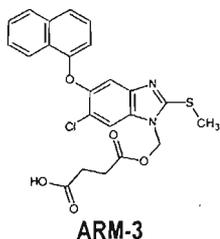
Compuesto	Método analítico y señales																
 <p>Alfa</p>	<p>Espectro IR (KBr) (cm⁻¹): Metilos y metilenos: 2928.7, 1390.7, 1459.3, 1415.41. Sistema aromático: 3052.5, 1595.9, 1504.7, 763.7. Éter aromático: 1257.8, 1156.4. NH: ≈3300, 1019.9, 867.8</p> <p>Espectro de Masas (IE/ID) (m/z): 340 (M⁺, 100%), 342 (M⁺+2, 38%), 305 (M⁺-35, 31%), 290 (M⁺-50, 26%)</p> <p>Espectro RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) (ppm):</p> <table> <tr> <td>2.677 (s, 3H, CH₃-S);</td> <td>7.685 (s, 1H, H₇);</td> </tr> <tr> <td>6.567 (d, 1H, H₂);</td> <td>7.896 – 7.927 (m, 1H, H₅);</td> </tr> <tr> <td>7.221 (s, 1H, H₄);</td> <td>8.181 – 8.210 (m, 1H, H₈);</td> </tr> <tr> <td>7.314 (t, J₇ = 1.2Hz, J₂ = 9.3Hz, 1H, H₃);</td> <td>12.700 (d, 1H, int. D₂O, NH);</td> </tr> <tr> <td>7.527 – 7.601 (m, 3H, H₄H₆,H₇);</td> <td></td> </tr> </table>	2.677 (s, 3H, CH ₃ -S);	7.685 (s, 1H, H ₇);	6.567 (d, 1H, H ₂);	7.896 – 7.927 (m, 1H, H ₅);	7.221 (s, 1H, H ₄);	8.181 – 8.210 (m, 1H, H ₈);	7.314 (t, J ₇ = 1.2Hz, J ₂ = 9.3Hz, 1H, H ₃);	12.700 (d, 1H, int. D ₂ O, NH);	7.527 – 7.601 (m, 3H, H ₄ H ₆ ,H ₇);							
2.677 (s, 3H, CH ₃ -S);	7.685 (s, 1H, H ₇);																
6.567 (d, 1H, H ₂);	7.896 – 7.927 (m, 1H, H ₅);																
7.221 (s, 1H, H ₄);	8.181 – 8.210 (m, 1H, H ₈);																
7.314 (t, J ₇ = 1.2Hz, J ₂ = 9.3Hz, 1H, H ₃);	12.700 (d, 1H, int. D ₂ O, NH);																
7.527 – 7.601 (m, 3H, H ₄ H ₆ ,H ₇);																	
 <p>ARM-1 isómeros a y b</p>	<p>Espectro IR (KBr) (cm⁻¹): Metilos y metilenos: 2997.8, 2924.8, 1469.7, 1446.2, 1372.8. Sistema aromático: 3049.6, 1595.8, 1506.4, 773.1. Éter aromático: 1258.0, 1148.5. Éster carbámico: 1748.5, 1201.9.</p> <p>Espectro de Masas (FAB) (m/z): 413 (M⁺+1, 80%), 414 (M⁺+2, 45%)</p> <p>Espectro RMN ¹H (TMS, CDCl₃) (ppm):</p> <table> <tr> <td>1.229 (t, J = 7.2Hz, 3H, CH₃-CH₂ b);</td> <td>4.397 (c, J = 7.2 Hz, 2H, CH₃-CH₂ b);</td> </tr> <tr> <td>1.558 (t, J = 6.9Hz, 3H, CH₃-CH₂ a);</td> <td>4.604 (c, J = 7.2 Hz, 2H, CH₃-CH₂ a);</td> </tr> <tr> <td>2.640 (s, 3H, CH₃-S, a);</td> <td>6.754 -8.324 (m, ≈18H, H₄, H₇, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇ y H₈; a y b).</td> </tr> <tr> <td>2.714 (s, 3H, CH₃-S, b);</td> <td></td> </tr> </table>	1.229 (t, J = 7.2Hz, 3H, CH ₃ -CH ₂ b);	4.397 (c, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₃ -CH ₂ b);	1.558 (t, J = 6.9Hz, 3H, CH ₃ -CH ₂ a);	4.604 (c, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₃ -CH ₂ a);	2.640 (s, 3H, CH ₃ -S, a);	6.754 -8.324 (m, ≈18H, H ₄ , H ₇ , H ₂ , H ₃ , H ₄ , H ₅ , H ₆ , H ₇ y H ₈ ; a y b).	2.714 (s, 3H, CH ₃ -S, b);									
1.229 (t, J = 7.2Hz, 3H, CH ₃ -CH ₂ b);	4.397 (c, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₃ -CH ₂ b);																
1.558 (t, J = 6.9Hz, 3H, CH ₃ -CH ₂ a);	4.604 (c, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₃ -CH ₂ a);																
2.640 (s, 3H, CH ₃ -S, a);	6.754 -8.324 (m, ≈18H, H ₄ , H ₇ , H ₂ , H ₃ , H ₄ , H ₅ , H ₆ , H ₇ y H ₈ ; a y b).																
2.714 (s, 3H, CH ₃ -S, b);																	
 <p>ARM-2 (a)</p>	<p>Espectro IR (KBr) (cm⁻¹): Metilos y metilenos: 2925.6, 1448.4, 1388.9. Sistema aromático: 3109.9, 1595.4, 1506.0, 775.2. Éter aromático: 1258.8 Éster: 1718.5, 1240.1, 1149.1.</p> <p>Espectro de Masas (IE/ID) (m/z): 412 (M⁺, 53%, a), 382 (M⁺, 84%, b), 353 (M⁺-59, 4%, a), 340 (M⁺-72, 67%), 305 (M⁺-107, 48%).</p> <p>Espectro RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) (ppm):</p> <table> <tr> <td>2.088 (s, 3H, CH₃-COOR a);</td> <td>7.415 (s, 1H, H₄, b);</td> </tr> <tr> <td>2.568 (s, 3H, CH₃-S, a o b);</td> <td>7.348 - 7.454 (m, 2H, H₃, a y b);</td> </tr> <tr> <td>2.715 (s, 3H, CH₃-S, b o a);</td> <td>7.566 – 7.773 (m, 6H, H₄, H₆, H₇, a y b);</td> </tr> <tr> <td>2.855 (s, 3H, CH₃-CON, b);</td> <td>7.971 (s, 1H, H₇, a);</td> </tr> <tr> <td>6.138 (s, 2H, CH₂-OCOR, a);</td> <td>7.941 – 8.017 (m, 2H, H₅, a y b);</td> </tr> <tr> <td>6.627 (dd, J₁ = 0.9Hz, J₂ = 7.5Hz, 1H, H₂, b);</td> <td>8.044 (s, 1H, H₇, b);</td> </tr> <tr> <td>6.775 (dd, J₁ = 0.6Hz, J₂ = 7.8Hz 1H, H₂ · a);</td> <td>8.169 (m, 2H, H₈, a y b).</td> </tr> <tr> <td>7.340 (s, 1H, H₄, a);</td> <td></td> </tr> </table>	2.088 (s, 3H, CH ₃ -COOR a);	7.415 (s, 1H, H ₄ , b);	2.568 (s, 3H, CH ₃ -S, a o b);	7.348 - 7.454 (m, 2H, H ₃ , a y b);	2.715 (s, 3H, CH ₃ -S, b o a);	7.566 – 7.773 (m, 6H, H ₄ , H ₆ , H ₇ , a y b);	2.855 (s, 3H, CH ₃ -CON, b);	7.971 (s, 1H, H ₇ , a);	6.138 (s, 2H, CH ₂ -OCOR, a);	7.941 – 8.017 (m, 2H, H ₅ , a y b);	6.627 (dd, J ₁ = 0.9Hz, J ₂ = 7.5Hz, 1H, H ₂ , b);	8.044 (s, 1H, H ₇ , b);	6.775 (dd, J ₁ = 0.6Hz, J ₂ = 7.8Hz 1H, H ₂ · a);	8.169 (m, 2H, H ₈ , a y b).	7.340 (s, 1H, H ₄ , a);	
2.088 (s, 3H, CH ₃ -COOR a);	7.415 (s, 1H, H ₄ , b);																
2.568 (s, 3H, CH ₃ -S, a o b);	7.348 - 7.454 (m, 2H, H ₃ , a y b);																
2.715 (s, 3H, CH ₃ -S, b o a);	7.566 – 7.773 (m, 6H, H ₄ , H ₆ , H ₇ , a y b);																
2.855 (s, 3H, CH ₃ -CON, b);	7.971 (s, 1H, H ₇ , a);																
6.138 (s, 2H, CH ₂ -OCOR, a);	7.941 – 8.017 (m, 2H, H ₅ , a y b);																
6.627 (dd, J ₁ = 0.9Hz, J ₂ = 7.5Hz, 1H, H ₂ , b);	8.044 (s, 1H, H ₇ , b);																
6.775 (dd, J ₁ = 0.6Hz, J ₂ = 7.8Hz 1H, H ₂ · a);	8.169 (m, 2H, H ₈ , a y b).																
7.340 (s, 1H, H ₄ , a);																	
 <p>Alfa acetilado (b)</p>																	



Tabla 14. Identificación espectrométrica y espectroscópica de los compuestos Alfa y ARM-1-10 (Continuación)

**Espectro IR (KBr) (cm⁻¹):**

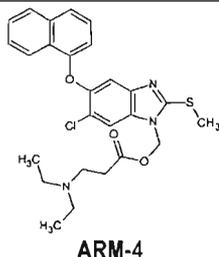
Metilos y metilenos: 2929.2, 2723.8, 1446.4.
 Sistema aromático: 3050.3, 1596.3, 1504.8, 770.2.
 Éter aromático: 1258.4.
 Éster: 1748.3, 1203.0, 1134.3.
 Ácido carboxílico: 3414.2, 1727.0, 1391.9, 1230.0.

Espectro de Masas (FAB) (m/z):

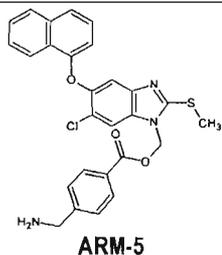
471 (M⁺+1, 25%), 470 (M⁺, 10%), 341 (M⁺-129, 100%), 340 (M⁺-130, 42%).

Espectro RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) (ppm):

2.549 – 2.613 (m, 4H, -(CH ₂) ₂ -CO ₂ H);	7.550 (s, 1H, H ₄);
2.830 (s, 3H, CH ₃ -S);	7.574 - 7.664 (m, 3H, H ₄ , H ₆ , H ₇);
3.000 – 4.000 (sa, 1H, int. D ₂ O, COOH);	7.768 (s, 1H, H ₇);
6.120 (s, 2H, CH ₂ -OCO-R);	7.953 – 7.985 (m, 1H, H ₅);
6.707 (d, J _f = 7.5 Hz, 1H, H ₂);	8.350 – 8.383 (m, 1H, H ₈).
7.382 (t, J _f = 7.8 Hz, 1H, H ₃);	

**Espectro de Masas (FAB) (m/z):**

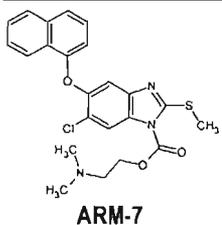
493 (M⁺-4, 10%), 341 (M⁺-156, 32%)

**Espectro de Masas (FAB) (m/z):****ARM-5 fer-boc:**

604 (M⁺+1, 18%), 603 (M⁺, 11%), 341 (M⁺-262, 32%)

ARM-5:

506 (M⁺+3, 3%), 504 (M⁺+1, 3%), 341 (M⁺-162, 100%)

**Espectro IR (KBr) (cm⁻¹):**

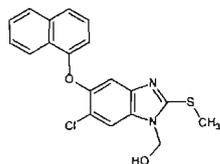
Metilos y metilenos: 2933.2, 1453.2, 1390.2.
 Sistema aromático: 3051.3, 1595.9, 1485.7.
 Éter aromático: 1259.2, 1150.7.
 Éster carbámico: 1738.1, 1229.7, 1197.5.
 Amina trisuslituida: 3430.7, 1098.3.

Espectro de Masas (FAB) (m/z):

455 (M⁺, 10%), 457 (M⁺+2, 6%), 385 (M⁺-70, 25%), 341 (M⁺-114)



Tabla 14. Identificación espectrométrica y espectroscópica de los compuestos Alfa y ARM-1-10 (Continuación)

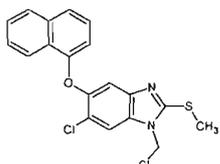
ARM-8
isómeros a y b**Espectro IR (KBr) (cm^{-1}):**

Metilos y metilenos: 2873.0, 1459.7, 1391.4.

Sistema aromático: \approx 3000, 1596.0, 1574.5, 1505.5.

Éter aromático: 1259.3, 1158.2.

Alcohol: 3472.1, 1055.9, 1334.4, 770.9.

Espectro de Masas (FAB) (m/z):371 (M^+ +1, 100%), 341 (M^+ -29, 62%)**Espectro RMN ^1H (TMS, Acetona- d_6) (ppm)**2.739 (s, 3H, CH_3 -S a);2.776 (s, 3H, CH_3 -S b);5.579 (s, 2H, CH_2 -OH, a);5.669 (s, 2H, CH_2 -OH, b);5.909 (da, 2H, int. D_2O , OH a y b);6.633 - 6.692 (m, 2H, H_2 , a y b);7.336 - 7.405 (m, 3H, H_4 , H_3 , a y b);7.439 (s, 1H, H_4 b);7.574 - 7.655 (m, 6H, H_4 , H_6 , H_7 a y b);7.738 (s, 1H, H_7 a);7.768 (s, 1H, H_7 b);7.944 - 7.987 (m, 2H H_5 , a y b);8.331 - 8.404 (m, 2H, H_8 , a y b).

ARM-9

Espectro de Masas (EI/ID) (m/z):388 (M^+ , 100%), 390 (M^+ +2, 75%), 353 (M^+ -35, 20%), 340 (M^+ -48, 20%).**Espectro IR (KBr) (cm^{-1}):**

Metilos y metilenos: 2930.4, 1390.4, 1448.3.

Sistema aromático: 3055.2, 1609.5, 1505.9, 771.2.

Éter aromático: 1258.5, 1155.7.

Éster carbámico: 1753.8, 1229.4.

Espectro de Masas (EI/ID) (m/z):446 (M^+ , 100%), 448 (M^+ +2, 77%), 411 (M^+ -35, 28%), 340 (M^+ -106, 48%).**Espectro RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) (ppm):**2.597 (d, 3H, CH_3 -S),4.102 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 2H, CH_2 - CH_2 -OCO),4.754 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H, CH_2 - CH_2 -Cl),6.736 (dd, $J_1=7.5\text{Hz}$, $J_2=0.9\text{Hz}$, 1H, H_2),7.354 (s, 1H, H_4),7.399 (t, 1H, H_3),7.568 - 7.606 (m, 3H, H_4 , H_6 , H_7),7.967 - 7.998 (m, 1H, H_5),8.126 (s, 1H, H_7),8.168 - 8.200 (m, 1H, H_8).

ARM-10

5.1.2.1. Síntesis del derivado tipo N-alcoxicarbonilo ARM-1

Para obtener el compuesto **ARM-1** se realizó la acilación directa del compuesto Alfa con el cloroformiato de etilo,⁴¹ utilizando como base la trietilamina. Este compuesto se obtuvo como mezcla de isómeros debido a la tautomería presente en un benzimidazol asimétrico como lo es el compuesto Alfa. La adición del cloroformiato a la mezcla de reacción se realizó en frío para evitar su descomposición. El producto se aisló de la mezcla de reacción por lavados con éter

isopropílico para evitar la hidrólisis del mismo ya que mostró ser lábil frente a los disolventes próticos como el agua.⁴²

ARM-1 tuvo un punto de fusión menor al del compuesto Alfa, siendo este cambio de 36°C aproximadamente, lo que sugirió menores interacciones intermoleculares. Este cambio en la estructura se observó en el espectro de infrarrojo por la ausencia de la banda de NH del bencimidazol y aparición de las señales del éster carbámico (1748 y 1201 cm^{-1}). En espectrometría de masas se observó el ión 413 m/z (recuérdese que por la técnica de FAB, se observan los iones más una unidad) concordante con el peso molecular del compuesto más una unidad. El espectro de RMN ^1H mostró duplicidad de las señales debido a la mezcla de isómeros. Los dos tripletes a 1.229 y 1.568 ppm y los dos cuartetos en 4.397 y 4.604 ppm corroboraron la presencia del grupo 1-etoxicarbonilo de ambos isómeros. La región aromática del espectro conservó las señales presentes en el espectro del compuesto Alfa.

5.1.2.2. Síntesis del hemiaminal intermediario ARM-8

Para la obtención de los derivados biorreversibles ARM-2 - 6 se utilizó como materia prima el *N*-hidroximetil bencimidazol (**ARM-8**). Éste es el hemiaminal generado por la reacción entre formaldehído⁴³ y el compuesto Alfa. En todos los casos, el formaldehído se añadió al medio de reacción en exceso y el producto se lavó con formaldehído al 4% para evitar la reacción inversa (hidrólisis). También se probó la reacción utilizando paraformaldehído disuelto en agua, con resultados similares.

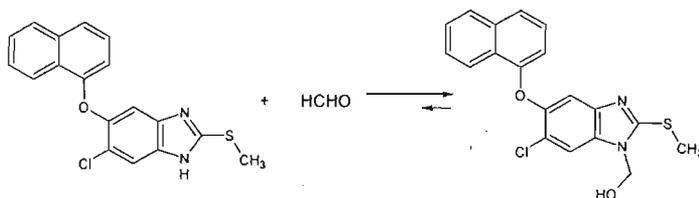


Figura 11. Equilibrio de formación del hemiaminal ARM-8.

Por medio del método descrito fue como se logró aislar **ARM-8** para su identificación y caracterización. Otros métodos ensayados consistieron en el uso de paraformaldehído en tetrahidrofurano,⁴⁴ piridina y formaldehído,⁴⁵ formaldehído en metanol⁴⁶ o etanol.⁴⁷ Sin embargo,

la dificultad para determinar el punto final de la reacción, por la similitud en R_f entre **ARM-8** y compuesto Alfa, hicieron inviables estos métodos, debido a que los productos obtenidos tuvieron cantidades considerables de compuesto Alfa. Cuando se intentó purificarlos, se provocó la hidrólisis.

En este caso, la disminución en el punto de fusión fue más dramática, (88°C). Una vez aislado el compuesto **ARM-8**, se identificó por medio de los espectros de IR, RMN y masas. En el espectro de Infrarrojo se conservan las señales para sistemas aromáticos y éteres aromáticos observados en el compuesto Alfa, pero se observó la desaparición de las señales del nitrógeno protonado y aparecieron las del alcohol (3472, 1334 y 771 cm^{-1}), confirmándose así el cambio en la estructura química. En el espectro de masas, los iones 371 m/z y 373 m/z (M^+ y M^{+2}), confirmaron el peso molecular del compuesto además de la presencia de cloro. Por último, en el espectro de RMN ^1H se observó duplicidad de las señales, por tratarse de una mezcla isomérica, los singuletes en 5.579 y 5.669 ppm, correspondieron a los dos hidrógenos de cada metileno en la posición 1 así como una banda ancha intercambiable con D_2O en 5.909 ppm correspondiente al hidroxilo para ambos isómeros.

5.1.2.3. Síntesis de los derivados tipo N-aciloximetilo ARM-2 a 5

Para formar los compuestos **ARM-2** - **ARM-5**, el hemiaminal **ARM-8** se hizo reaccionar con intermediarios reactivos provenientes de los ácidos carboxílicos correspondientes. **ARM-2** y **ARM-3** se obtuvieron al hacer reaccionar **ARM-8** con los anhídridos correspondientes, mientras que para **ARM-4** y **ARM-5** se buscó su obtención por reacción de **ARM-8** con los derivados imidazólidos de los ácidos carboxílicos correspondientes tratados con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI). A continuación se discute brevemente la preparación y las dificultades que se tuvieron para la obtención de los compuestos **ARM-2** a **ARM-5**.

5.1.2.3.1. Síntesis del derivado tipo N-aciloximetilo ARM-2

Para obtener **ARM-2**, se utilizó anhídrido acético en piridina y cloroformo⁴³, obteniéndose una mezcla de cuatro compuestos: dos isómeros que correspondieron al compuesto Alfa acetilado en posición 1 y dos isómeros que correspondieron a **ARM-2**. Los derivados N-acetilados se trataron



de eliminar mediante lavado continuo con éter isopropílico, afectando de manera importante el rendimiento de ARM-2. La formación de estos compuestos *N*-acetilados se puede explicar por dos factores: la cantidad de compuesto Alfa presente *ab initio* y la descomposición parcial de ARM-8 en compuesto Alfa.⁴⁷ También pudo deberse a la mayor nucleofilia del nitrógeno del bencimidazol en contraste con la del oxígeno del grupo hidroxilo, ésto hizo que el anhídrido reaccionara primero con el nitrógeno, formando dos productos: los acetilados del compuesto Alfa y los ésteres del hemiaminal.

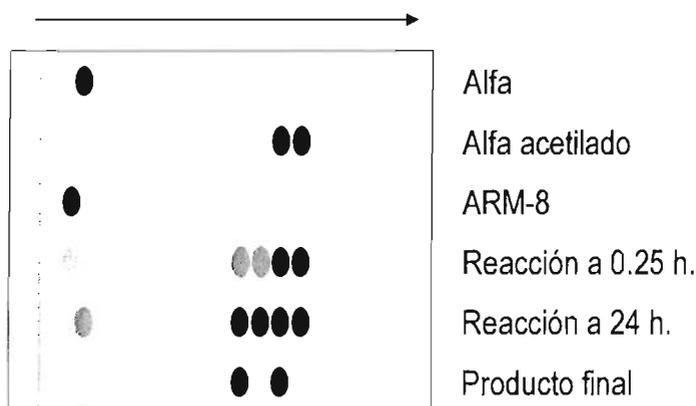


Figura 12. CCF esquemática del comportamiento de la reacción para obtener ARM-2 (Sistema III).

Con respecto a la identificación, el espectro de Infrarrojo conservó las señales de sistemas aromáticos y éter aromático, presentándose las señales de éster (1718 , 1240 y 1149 cm^{-1}); en espectrometría de masas se observó el ión molecular en 412 m/z además del fragmento 353 m/z correspondiente a la pérdida del acetiloxi, denotando la presencia de **ARM-2**, pero también se observó un pico, que fue el mayoritario, en 382 m/z que delató la formación del Alfa acetilado. Finalmente en RMN ^1H se observó la mezcla de los compuestos, presentándose señales en 2.088 ppm correspondiente a los hidrógenos del acetilo de un isómero de ARM-2 y a 2.855 ppm correspondiente a los hidrógenos del acetilo de Alfa acetilado, en 6.138 ppm una señal que integró para 2 hidrógenos correspondiente a los hidrógenos del metileno en **ARM-2**, y de 6.627 - 8.169 ppm una señal múltiple que correspondió a los hidrógenos aromáticos de ambos compuestos.



5.1.2.3.2. Síntesis del derivado tipo N-aciloximetilo ARM-3.

ARM-3 se obtuvo al hacer reaccionar al hemiaminal **ARM-8** con anhídrido succínico recién preparado⁴⁸ con buenos rendimientos. Igual que en los casos anteriores, los lavados de éter contribuyeron a la remoción de compuesto Alfa y posiblemente a la de uno de los isómeros.

Este compuesto tuvo un punto de fusión ligeramente menor que el del compuesto Alfa. En lo que concierne a la identificación del compuesto, el espectro de Infrarrojo conservó las señales de sistemas aromáticos y éter aromático, presentándose las señales de éster (1748, 1202 y 1134 cm^{-1}) y de ácido carboxílico (3414, 1727, 1392, y 1230 cm^{-1}). En espectrometría de masas se observó el ión 471 m/z, concordante con el peso molecular del compuesto más una unidad, y en RMN ^1H se observó sólo uno de los isómeros de **ARM-3** con señales múltiples de 2.549 a 2.613 ppm correspondientes a los hidrógenos de los metilenos del succinato, una señal intercambiable con D_2O en 3-4 ppm correspondiente al hidrógeno del hidroxilo del ácido, un singulete en 6.120 ppm correspondiente a los hidrógenos del puente de metileno, y señales de entre 6.695 y 8.283 ppm que corresponden a los hidrógenos aromáticos.

5.1.2.3.3. Síntesis de los derivados tipo N-aciloximetilo ARM-4 y 5

La obtención de **ARM-4** y **ARM-5** se buscó mediante la formación de ésteres por medio de la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol usando CDI como agente acoplante.^{49, 50} El ácido 3-(N,N-dietilamino)propiónico se trató con CDI y el intermediario imidazólido resultante se hizo reaccionar con el alcohol **ARM-8** para obtener **ARM-4**. De la misma manera se trató el ácido 4-(*ter*-butoxicarbonil)aminometilbenzoico, previamente sintetizado,²⁵ para obtener **ARM-5terboc**, éste finalmente se desprotegió para obtener **ARM-5**. En ambos casos se logró la formación exitosa del intermediario reactivo del ácido carboxílico correspondiente (imidazólido). El problema con este método, y como lo muestra la figura 13, es la formación de 2 moles de imidazol por cada mol de éster como producto secundario y su eliminación conllevó a la destrucción de los compuestos **ARM-4** y **ARM-5**. No obstante, en muestras tomadas de crudos de reacción y analizadas por espectrometría de masas fue como se identificó a los productos **ARM-4** y **ARM-**

5terboc.



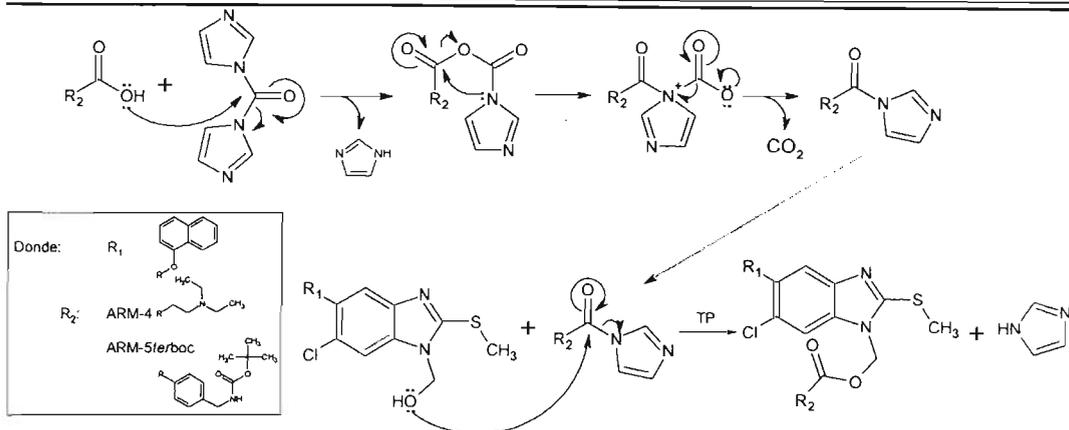


Figura 13. Mecanismo de acción del 1,1'-carbonildiimidazol con ácidos carboxílicos para formar ésteres⁵¹.

En el caso de **ARM-4** no se observó el ión molecular (497 m/z) pero sí M^+4 ; la formación de este ión molecular puede explicarse por el siguiente rearrreglo:

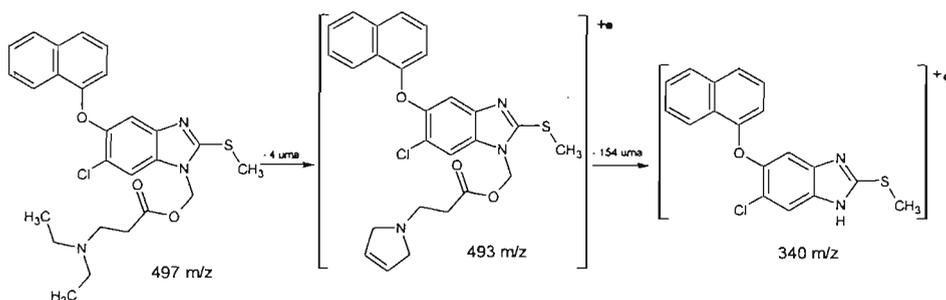
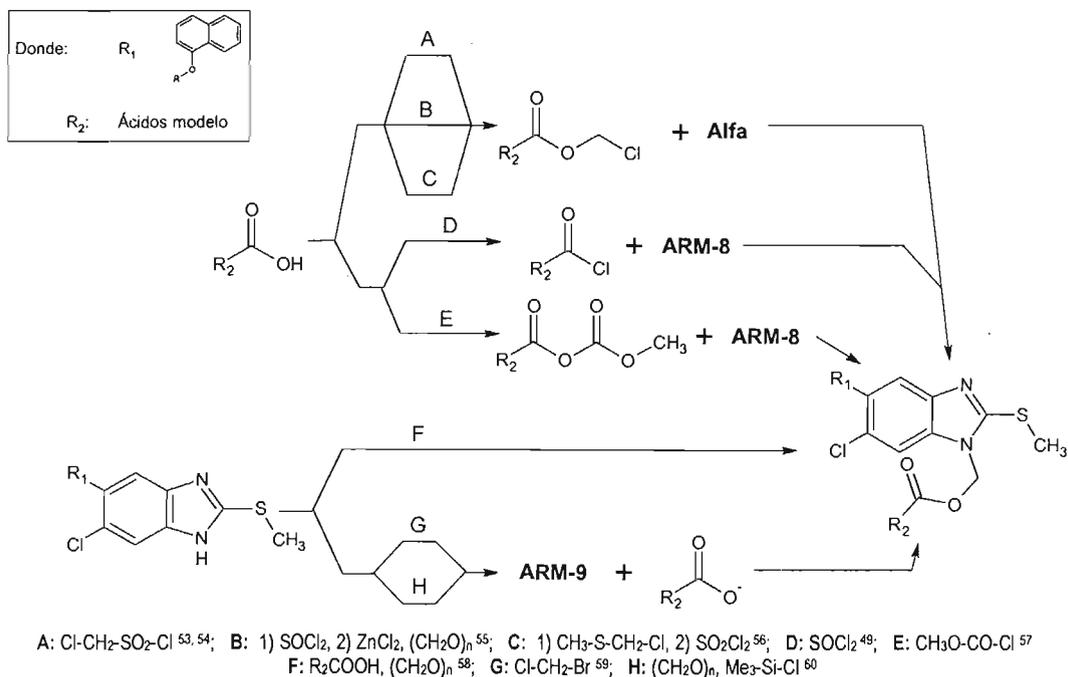


Figura 14. Fragmentación propuesta para el compuesto ARM-4 en espectrometría de masas

Para **ARM-5**, primero se comprobó la formación del éster intermediario **ARM-5terboc** por medio del espectro de masas, en la modalidad FAB, mostró un ión de 603 m/z (ver espectro A.1.17, pág 91). Con la certeza de haber obtenido el éster, se procedió a la desprotección de la amina con ácido clorhídrico concentrado en éter, formándose un sólido que después de su análisis espectrométrico resultó ser sólo compuesto Alfa y trazas del compuesto **ARM-5**, por lo que no fue posible aislado (ver espectro A.1.16, pág. 90). Se exploraron otros métodos de desprotección⁵² pero todos los utilizados causaron la destrucción de **ARM-5**.

A pesar de estas desventajas, fue el mejor método encontrado para la formación de estos compuestos. A continuación en el esquema 6 se describen algunos métodos que se exploraron.

Para el estudio se utilizaron, como ácidos modelo, el ácido benzoico y el ácido 2-(4-metoxi)fenilacético, además de los ácidos precursores de **ARM-4** y **ARM-5**:



Esquema 6. Alternativas para la obtención de **ARM-4** y **ARM-5**terboc.

Las estrategias propuestas en estos métodos se pueden dividir en tres: obtener un éster o derivado de ácido intermediarios para reaccionar con el bencimidazol (rutas A, B y C) o con el hemiaminal (rutas D y E) del bencimidazol; la reacción de Mannich (ruta F); y obtener intermediarios provenientes del hemiaminal del bencimidazol (rutas G y H) para dar compuestos tipo *N*-aciloximetilo. A continuación se describen los resultados obtenidos.

✓ **Método A:** Se buscó la síntesis del clorometil éster haciendo reaccionar el ácido benzoico con bromoclorometano en medio básico, lográndose únicamente la formación de un diéster (comprobado por espectrometría de masas, ver espectro A.1.29, pág. 103). Entonces se procedió a activar al bromoclorometano con ácido clorosulfónico formando al clorosulfato de clorometilo, lo cual implicó usar grandes cantidades de materia prima para obtener rendimientos muy bajos de este clorosulfato. Éste se hizo reaccionar con el ácido carboxílico para formar el clorometil éster,

pero sólo se favoreció la formación del diéster del ácido, comprobado por CCF. Este diéster fue muy estable a los ataques nucleofílicos, incluso con bases fuertes, por lo que no reaccionó.

Método B: La formación de cloruro de ácido de la 3-(*N,N*-dietil)amino- β -alanina, del ácido 2-(4-metoxi)fenilacético y del ácido *p*-(aminometil)benzoico con cloruro de tionilo no se llevó a cabo en su totalidad, ya que los ácidos se carbonizaron parcialmente. Cuando se utilizó cloruro de benzoilo si se formó el clorometil éster pero también se favoreció la formación del diéster del ácido, que en CCF se mostró como el producto mayoritario. Intentos de reacción con el ácido fenilacético, sin formar el cloruro de ácido, no procedieron.

Método C: El uso de clorometil metil tioéter, bajo las condiciones de reacción recomendadas,⁵⁶ formó totalmente al diéster benzoico, comprobado por CCF y por la formación de sulfuro de metilo fácilmente detectable. Al añadir el cloruro de sulfurilo se originó la hidrólisis total del diéster.

Método D: La formación de cloruro de ácido de la 3-(*N,N*-dietil)amino- β -alanina, del ácido 2-(4-metoxi)fenilacético y del ácido *p*-(aminometil)benzoico con cloruro de tionilo no se llevó a cabo en su totalidad, ya que los ácidos se carbonizaron parcialmente. Al agregar **ARM-8** se formó una mezcla de productos, similar a la formación de **ARM-2**, solo que en este caso fue imposible separar el compuesto de interés. Esta misma situación se presentó al añadir cloruro de benzoilo.

Método E: Se formó el carbonato intermediario de la misma manera que se obtuvo **ARM-1** y **ARM-10**; sin embargo al agregar **ARM-8** con hidruro de sodio o metóxido de sodio se provocó la hidrólisis de **ARM-8**, además de que dió una serie de compuestos (observado por CCF). Por otra parte, al añadir únicamente **ARM-8** sin formar el alcóxido, no se observó reacción después de 24 h.

Método F: La reacción de Mannich tiene la gran desventaja de que se forma una mezcla compleja de productos;⁵⁸ a partir del mezclado del bencimidazol, el ácido y el formaldehído, pudo haber dado dímeros del bencimidazol como del ácido aparte del *N*-aciloximetil-bencimidazol. Al principio y en condiciones moderadas (reflujo de acetona) por CCF nunca se vió consumo de las



Se buscó que un alcóxido (proveniente del 2-Dimetilaminoetanol) reaccionara con el compuesto **ARM-9**, teniendo éste último un buen grupo saliente. Inicialmente se intentó la sustitución de un grupo hidroxilo presente en **ARM-8** por un yoduro,⁶⁴ pero debido a la insolubilidad del hemiaminal en disolventes no polares utilizados en esta sustitución no se obtuvo el yodometilo. Se pretendió tener otro buen grupo saliente y se realizó la sustitución por un metilsulfonato del hemiaminal **ARM-8** (mesilato),⁴⁹ pero se formó el dímero de compuesto Alfa (694 m/z, ver espectro A.1.25, pág 99), quizá por la alta reactividad del mesilato formado que reaccionó con el compuesto Alfa presente, proveniente de **ARM-8**. Finalmente, se optó por la formación del compuesto **ARM-9** (con cloro) por medio de la sustitución del grupo hidroxilo por cloruro con cloruro de tionilo,^{49, 65} sin embargo, en este caso también se halló el dímero de compuesto Alfa, en un 50%, con respecto a la formación del compuesto **ARM-9**, comprobado por la espectrometría de masas con la que fue identificado tanto **ARM-9** como el dímero de Alfa.

El crudo de reacción se hizo reaccionar con el alcóxido de la *N,N*-dimetiletanolamina apropiadamente formado con hidruro de sodio. Después del tiempo de reacción se identificó mediante CCF la presencia de un compuesto además del compuesto Alfa, que al revelarse con yodo, mostró la presencia de una amina. Dicha mancha desapareció antes de que se pudiera mandar a espectrometría de masas, por lo que no se pudo comprobar siquiera la existencia de **ARM-6**.

5.1.2.3.5. Síntesis del derivado tipo *N*-alcoxicarbonilo **ARM-7**

ARM-7 se obtuvo a través de la sustitución de cloro por amina⁶⁶ en el compuesto intermediario **ARM-10** el cual se preparó por acilación directa con buen rendimiento (77.8%).

El punto de fusión de **ARM-10** fue menor que el del compuesto Alfa. En el espectro IR se observaron las señales representativas del éster carbámico (1754 y 1156 cm⁻¹) conservándose las señales presentes en el compuesto Alfa. La comprobación del peso molecular del compuesto (446 m/z) se realizó por espectrometría de masas. Y en el espectro de RMN ¹H se observaron las señales para los metilenos del grupo 2-cloroetoxicarbonil a 4.102 ppm y 4.754 ppm; en este caso no se observó la mezcla isomérica.

Una vez obtenido ARM-10 y debidamente aislado e identificado, se procedió a la sustitución nucleofílica del cloro por la dimetilamina, la cual llevó mucho tiempo de reacción lo que provocó la hidrólisis de alrededor del 50% del compuesto **ARM-10**. Los procedimientos de separación de **ARM-7** del compuesto Alfa fueron infructuosos, por lo que se prefirió únicamente formar el clorhidrato del producto restante mediante el burbujeo de cloruro de hidrógeno. El punto de fusión del producto obtenido no cambió significativamente con respecto al del compuesto Alfa, debido a la cantidad del mismo presente. Aislado, se obtuvo el ión de 455 m/z por espectrometría de masas coincidente con el peso molecular del compuesto; y por infrarrojo se observan las señales presentes en el compuesto **ARM-10** adicionalmente de la señal de NH de bencimidazol (3431 y 1098 cm^{-1}), comprobando la presencia de Alfa en el compuesto **ARM-7**.

5.2. Evaluación de la estabilidad in vitro y solubilidad de los derivados biorreversibles

Siguiendo el Procedimiento Experimental se evaluó la estabilidad de los derivados biorreversibles obtenidos y aislados, y posteriormente se determinó la solubilidad del compuesto que presentó estabilidad en solución.

5.2.1. Estabilidad ante la hidrólisis in vitro

Bajo el esquema planteado en el Procedimiento Experimental^{42, 67, 68} se evaluó la estabilidad de los compuestos **ARM-1**, **ARM-2**, **ARM-3** y **ARM-7**, únicos compuestos que se lograron obtener, en disolventes polares apróticos como el acetonitrilo y próticos como metanol y agua. En todos los casos se observó la presencia de compuesto Alfa desde el inicio del muestreo por lo que el método usado no permitió determinar de manera cuantitativa la concentración de los compuestos evaluados (para cromatogramas representativos, ver Apéndice págs. 106-108).

Para definir el orden de la cinética de degradación de cada compuesto en el medio indicado y obtener la constante de velocidad correspondiente, se ajustaron los datos de la relación de áreas obtenidas a los diferentes modelos (ver Antecedentes pág. 23). Se consideró como modelo más adecuado aquél que presentó el mejor ajuste lineal. El tiempo de vida media se calculó con la ecuación correspondiente al modelo seleccionado.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 15. Comportamiento de ARM-1 en acetonitrilo

t (min)	$A_{\text{ARM-1a}}/A_{\alpha}$	%ARM-1a	$A_{\text{ARM-1b}}/A_{\alpha}$	%ARM-1b
0.0	3.9838	83.41	4.2594	82.08
19.6	4.8041	100.58	5.2032	100.27
39.6	5.1348	107.50	5.6165	108.24
59.2	4.6810	98.00	5.0272	96.88
100.4	5.1651	108.14	5.6956	109.76
175.8	4.7592	99.64	5.2116	100.44
223.5	4.9068	102.73	5.3094	102.32
X	4.7764		5.1890	
Sx	0.3947		0.4735	
%CV	8.3%		9.1%	

X: media Sx: desviación estándar %CV: coeficiente porcentual de variación

Como se observa en la tabla 13, el compuesto **ARM-1** en acetonitrilo presentó una estabilidad⁶⁷ relativa durante el tiempo de evaluación por lo que fue posible calcular un promedio de la relación ARM-1/Alfa; el coeficiente de variación del isómero **a** fue de 8.3% y del **b** 9.1%, por lo que ambos se consideraron estables durante el tiempo de muestreo.

Tabla 16. Comportamiento de ARM-1 en metanol

t (min)	$A_{\text{ARM-1a}}/A_{\alpha}$	%ARM-1a	1/%ARM-1a	$A_{\text{ARM-1b}}/A_{\alpha}$	%ARM-1b	1/%ARM-1b
0.0	3.3428	100.00	0.0100	5.3315	100.00	0.0100
23.8	0.8425	25.20	0.0397	1.3384	25.10	0.0398
45.1	0.2641	7.90	0.1266	0.8573	16.08	0.0622
66.7	0.3067	9.18	0.1090	0.5386	10.10	0.0990
102.3	0.2102	6.29	0.1590	0.2745	5.15	0.1942
120.2	0.1292	3.86	0.2587	0.2155	4.04	0.2474
		m	0.00182		m	0.00198
		b	0.00821		b	-0.00962
		r ²	0.8950		r ²	0.9628
		$t_{1/2}$ (min)	6.46		$t_{1/2}$ (min)	14.94

En metanol si se observaron cambios mayores al 10%, por lo que los datos se ajustaron a una cinética de hidrólisis. La mejor correlación se ajustó a una cinética de segundo orden ($r^2=0.895$ para el isómero **a** y $r^2=0.962$ para el isómero **b**). El isómero **b** fue el más estable de los dos ya que su $t_{1/2}$ fue 2.3 veces mayor que el del isómero **a**; las diferencias entre los dos isómeros pueden radicar en el efecto estérico que tiene el grupo naftilo sobre el sustituyente añadido, siendo este efecto mayor en el isómero que guarda una relación 1-6 con el grupo naftilo que el isómero 1-5.

Tabla 17. Comportamiento de ARM-2 en acetonitrilo

t (min)	A _{acil} /A _α	%acl	A _{ARM-2a} /A _α	%ARM-2a
0.0	17.0917	101.74	10.0937	95.14
11.2	16.9804	101.08	10.1185	95.37
21.8	16.0109	95.31	9.5327	89.85
33.0	17.2700	102.80	10.2942	97.03
112.4	19.0127	113.18	12.4576	117.42
266.1	14.4294	85.89	11.1592	105.18
X	16.7992		10.6093	
Sx	1.5151		1.0473	
%CV	9.0%		9.9%	

Al igual que en **ARM-1**, **ARM-2** en acetonitrilo presentó una estabilidad relativa durante el tiempo de evaluación; el coeficiente de variación del isómero detectado fue 9.9%, por lo que se consideró estable.

Tabla 18. Comportamiento de ARM-2 en metanol

t (min)	A _{acil} /A _α	%acl	1/%acl	A _{ARM-2a} /A _α	%ARM-2a	1/%ARM-2a
0.0	15.6292	100.00	0.0100	6.8328	100.00	0.0100
10.7	5.7949	37.08	0.0270	4.9799	72.88	0.0137
22.7	3.7294	23.86	0.0419	4.1526	60.78	0.0165
34.2	3.0105	19.26	0.0519	3.1541	46.16	0.0217
59.8	2.0113	12.87	0.0777	1.8594	27.21	0.0367
152.4	1.0158	6.50	0.1539	0.5439	7.96	0.1256
215.0	0.7559	4.84	0.2068	0.3215	4.71	0.2125
226.5	0.8122	5.20	0.1924	0.2691	3.94	0.2539
261.9	0.7401	4.74	0.2112	0.1800	2.63	0.3796
	m	0.00078		m	0.00124	
	b	0.02277		b	-0.01659	
	r ²	0.9820		r ²	0.9290	
	t _{1/2}	3.54		t _{1/2}	29.50	

Al igual que **ARM-1**, el compuesto **ARM-2** presentó degradación en metanol, donde se ajustó a una cinética de segundo orden ($r^2=0.929$). Los resultados se muestran en la tabla 18. En este experimento se detectaron dos compuestos. Luego de analizar su estabilidad y espectro UV (ver espectros A.2.6, A.2.7 y A.2.8 del Anexo, págs. 108 y 109) cuya comparación esquemática se muestra en la Figura 16, se observó que uno de ellos, el menos estable, era producto de la acilación directa del compuesto Alfa que resistió a la purificación que se realizó del compuesto, como ya se discutió anteriormente. Dicho compuesto tuvo una vida media muy corta ($t_{1/2}= 3.54$ min). Evidentemente, el otro compuesto detectado, el más estable, es uno de los isómeros de **ARM-2**.

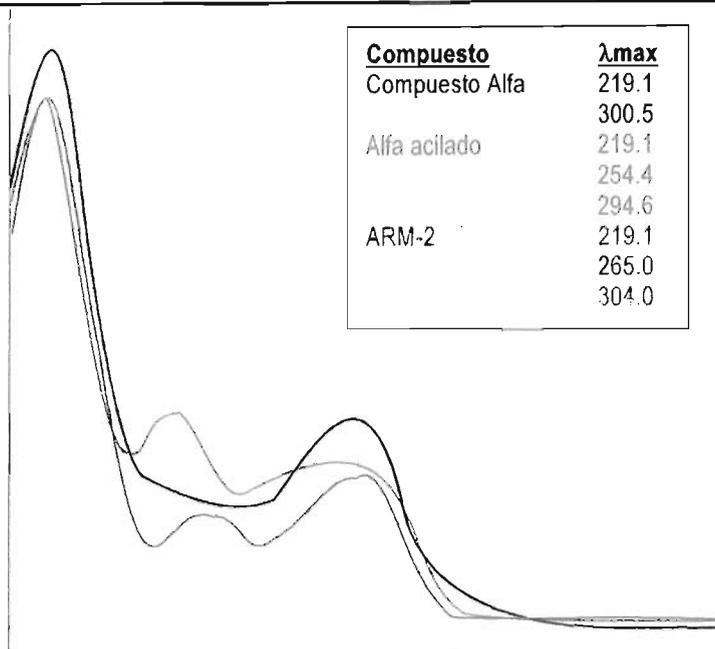


Figura 16. Comparación esquemática de los espectros UV de compuesto Alfa, ARM-2 y el Alfa acilado.

Tabla 19. Comportamiento de ARM-3 en acetonitrilo

t (min)	A_{ARM-3a}/A_{α}	%ARM-3a	A_{ARM-3b}/A_{α}	%ARM-3b
0.0	0.6447	89.27	0.0156	89.43
24.0	0.7702	106.65	0.0185	105.95
75.7	0.7667	106.18	0.0184	105.48
113.1	0.6615	91.60	0.0161	92.17
216.3	0.7676	106.30	0.0187	106.97
266.5	0.6186	85.67	0.0131	75.23
X	0.7221		0.0175	
Sx	0.0634		0.0015	
%CV	8.8%		8.5%	

Al igual que en los casos anteriores, **ARM-3** en acetonitrilo no presentó una tendencia a disminuir durante el tiempo de evaluación, por lo que se consideró estable.

En el monitoreo en agua, tal y como pasó en acetonitrilo, no se observó que la relación de áreas tuviera una tendencia a disminuir, por lo que se consideró estable en medio acuoso. Los resultados de este estudio se observan en la tabla 20.

Tabla 20. Comportamiento de ARM-3 en agua

t (min)	A_{ARM-3a}/A_c	%ARM-3a	A_{ARM-3b}/A_c	%ARM-3b
0.0	0.3882	86.87	0.0103	97.85
15.7	0.4888	109.39	0.0136	128.51
30.4	0.4567	102.19	0.0110	103.87
39.0	0.4247	95.05	0.0105	99.54
47.7	0.3933	88.01	0.0105	99.47
56.5	0.4267	95.49	0.0103	97.81
65.8	0.4157	93.03	0.0105	99.69
76.1	0.5078	113.65	0.0114	107.72
76.1	0.4090	91.52	0.0108	102.05
84.7	0.3907	87.43	0.0105	99.23
93.3	0.4412	98.74	0.0110	103.95
101.9	0.4280	95.78	0.0098	92.73
114.3	0.4942	110.60	0.0093	87.81
122.9	0.4845	108.42	0.0111	104.72
132.3	0.5097	114.06	0.0102	96.06
150.9	0.4906	109.79	0.0084	79.00
X	0.4469		0.0106	
Sx	0.0434		0.0011	
%CV	9.7%		10.3%	

ARM-7, también, presentó degradación en metanol, tal como en el caso de **ARM-1**. El mejor ajuste fue a una cinética de segundo orden, a pesar de su relativamente bajo índice de correlación ($r^2= 0.734$ y 0.873). Estos resultados se presentan en la tabla 21.

Tabla 21. Comportamiento de ARM-7 en metanol

t (min)	A_{ARM-7a}/A_c	%ARM-7a	1/%ARM-7 ^a	A_{ARM-7b}/A_c	%ARM-7b	1/%ARM-7 ^b
0.0	0.7693	100.00	0.0100	0.4107	100.00	0.0100
9.9	0.1249	16.23	0.0616	0.0620	15.10	0.0662
25.2	0.0487	6.33	0.1580	0.0422	10.26	0.0974
50.6	0.0374	4.87	0.2055	0.0405	9.86	0.1014
68.0	0.0310	4.03	0.2481	0.0386	9.39	0.1064
77.9	0.0281	3.65	0.2738	0.0377	9.18	0.1089
87.8	0.0281	3.65	0.2738	0.0124	3.01	0.3323
188.3	0.0238	3.09	0.3234	0.0061	1.48	0.6771
		m	0.00158		m	0.00343
		b	0.09372		b	-0.03007
		r^2	0.7343		r^2	0.8739
		$t_{1/2}$	12.62		$t_{1/2}$	14.61

En las tablas anteriores se observa que las cinéticas de hidrólisis de los compuestos evaluados se ajustan de una mejor manera a una cinética de segundo orden.

Los resultados sobre el estudio de hidrólisis *in vitro* se resumen en la tabla 22 que se muestra a continuación:

Tabla 22. Comportamiento en disolventes próticos de los compuestos ARM-1 a 3 y 7

Compuesto	Disolvente	Orden	Ecuación de velocidad	k	t _{1/2} (min)
ARM-1a	Metanol	2°	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	0.00182	6.46
ARM-1b				0.00198	14.94
ARM-2a	Metanol	2°	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	0.00124	29.50
ARM-3	Agua		Estable		
ARM-7a	Metanol	2°	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	0.00158	12.62
ARM-7b				0.00343	14.61

Aunque éste es sólo un estudio semicuantitativo, se puede observar que los compuestos de tipo *N*-alcoxicarbonilo (**ARM-1** y **ARM-7**, cuyos tiempos de vida media van de 6 a 15 minutos) son más inestables que los compuestos *N*-aciloximetilo (**ARM-2**, con tiempo de vida media de 30 minutos y **ARM-3**, estable mínimo durante 3 h), aseveración observable con mayor claridad si se comparan a los compuestos isoméricos **ARM-1** y **ARM-2** en las siguientes gráficas.

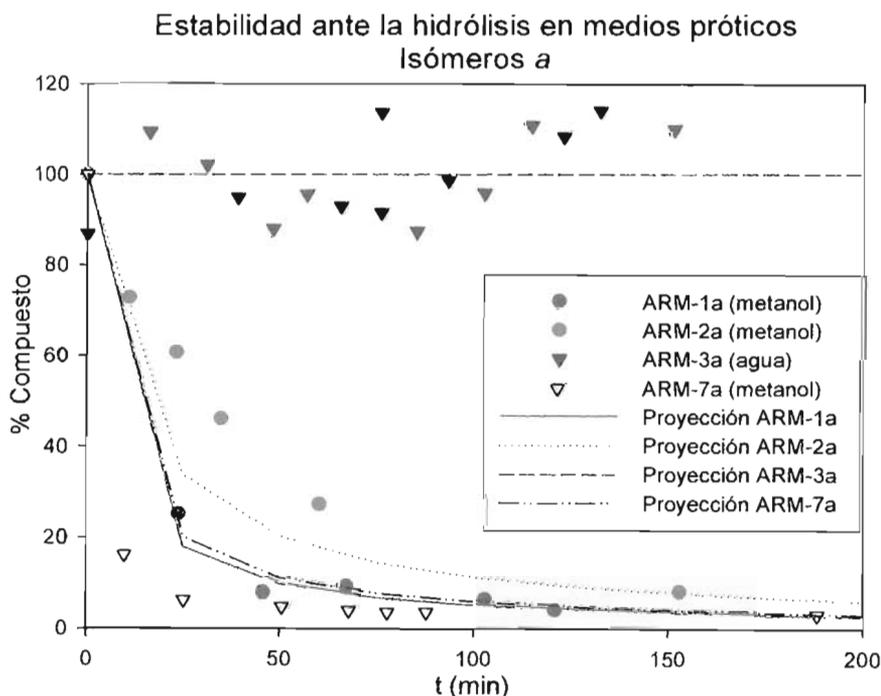


Figura 17. Comportamiento de los isómeros a en medios próticos.

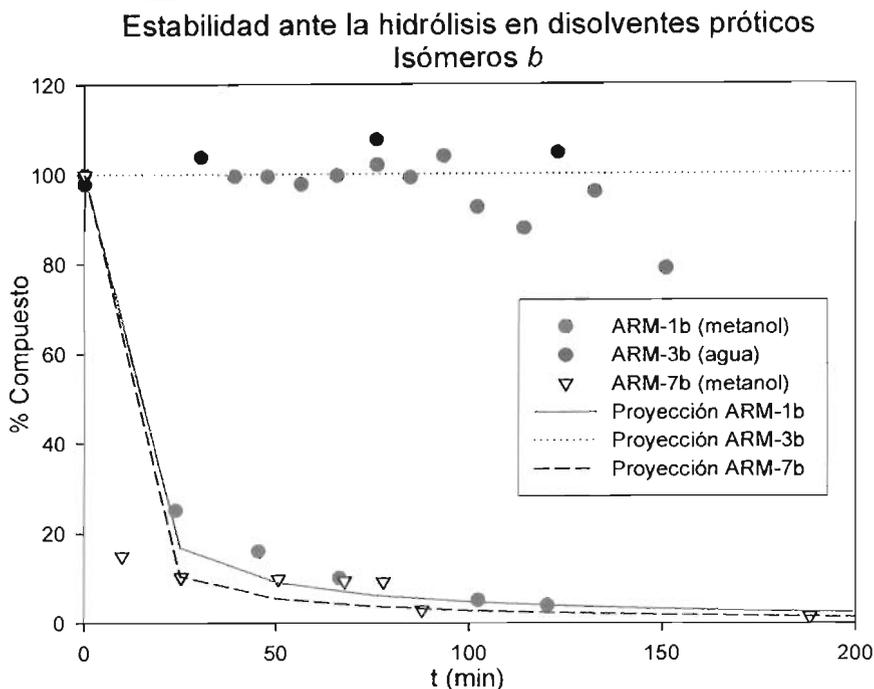


Figura 18. Comportamiento de los isómeros b en medios próticos.

Después de las evaluaciones, y al observar que únicamente el compuesto **ARM-3** se mantuvo estable, se procedió a estimar la solubilidad del mismo en agua.

5.2.2. Solubilidad en medio acuoso

Para la estimación de la solubilidad del compuesto **ARM-3** se utilizó solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0 con fuerza iónica fija de 0.5 M. Debido a que en todas las muestras que se evaluaron de **ARM-3** siempre se observó mínima contaminación por el compuesto Alfa, no se determinó el coeficiente de absortividad molar (ϵ) para determinar con precisión la solubilidad de **ARM-3**; por lo que la solubilidad real podría ser mayor a la aquí estimada.

Para determinar la concentración en cada muestra se realizó una serie de inyecciones con estándar interno (compuesto Alfa) a una concentración de 0.014 $\mu\text{g/mL}$. Multiplicando esta concentración por la relación de áreas detectadas ($A_{\text{ARM-3a}}/A_{\text{Compuesto Alfa}}$) y, considerando que no hay diferencia entre los coeficientes de absortividad ($\epsilon_{\text{ARM-3a}}/\epsilon_{\text{Compuesto Alfa}} = 1$) se obtiene una

estimación de la concentración de **ARM-3a** presente en la muestra. Al hacer el promedio de las concentraciones en la muestra se determinó la solubilidad aparente de **ARM-3** en la solución amortiguadora.

Tabla 23. Estimación de la solubilidad de ARM-3

Inyección	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$A_{\text{ARM-3a}}/A_{\alpha}$	0.029	0.033	0.03	0.033	0.029	0.05	0.051	0.042	0.043	0.04
[ARM-3a] ($\mu\text{g/mL}$)	0.412	0.47	0.429	0.468	0.408	0.716	0.724	0.596	0.618	0.577
Inyección	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$A_{\text{ARM-3a}}/A_{\alpha}$	0.033	0.05	0.038	0.044	0.041	0.051	0.054	0.039	0.049	0.053
[ARM-3a] ($\mu\text{g/mL}$)	0.478	0.709	0.546	0.635	0.582	0.735	0.778	0.559	0.707	0.758

Tabla 24. Solubilidad aparente de ARM-3 en medios acuosos

Solubilidad ARM-3	Solubilidad Alfa	Relación $S_{\text{ARM-3}}/S_{\text{Alfa}}$
0.595 $\mu\text{g/mL}$	< 0.2 $\mu\text{g/mL}$	2.975
1.263 μM	< 0.587 μM	2.152

La relación entre solubilidades molares del compuesto ARM-3 y compuesto Alfa nos indica un aumento en la solubilidad del mismo; el aumento de la solubilidad no fue suficiente para pensar en una formulación en solución ya que se requiere una solubilidad de alrededor de 10 mg/mL para que el volumen de inyección de la preparación parenteral sea apropiado.



6. Conclusiones

6.1. Conclusiones finales

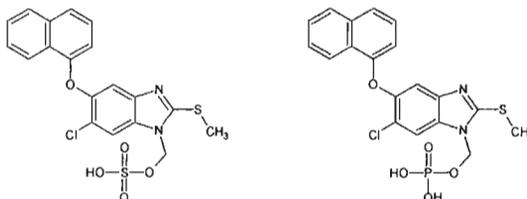
- Se preparó el compuesto Alfa a partir de 5-cloro-4-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina en una secuencia de tres pasos con éxito; el rendimiento global fue de 34.5%.
- Se lograron obtener y caracterizar totalmente cuatro derivados biorreversibles (**ARM-1**, **ARM-2**, **ARM-3** y **ARM-7**). Los derivados **ARM-4** y **ARM-5** no se lograron aislar ya que fueron muy inestables; sólo se comprobó su presencia por espectrometría de masas. El derivado **ARM-6** no se obtuvo.
- Los compuestos **ARM-1**, **2**, **3** y **7** fueron estables en medios polares apróticos (acetónitrilo).
- De los compuestos obtenidos e identificados, el **ARM-3** fue el más estable en medios próticos (agua) por lo que se eligió para determinar su solubilidad acuosa.
- El compuesto **ARM-3** fue 2.2 veces más soluble que el compuesto Alfa. Este aumento en la solubilidad es significativo, mas no es suficiente para considerar la formulación de **ARM-3** en solución.
- Al añadir una porción alifática se disminuyó ligeramente el punto de fusión, pero no se pudo observar el efecto sobre la solubilidad de los derivados biorreversibles. Por otro lado, al añadir una porción ionizable se mejoró, aunque no considerablemente, la solubilidad del compuesto Alfa.
- Los derivados con unión fármaco-acoplador $N(sp^2)-C(sp^2)$ (**ARM-1**, **ARM-7**) fueron más inestables que los de unión $N(sp^2)-C(sp^3)$ (**ARM-2**, **ARM-3**); esto se reflejó en su estabilidad ante la hidrólisis teniendo los primeros tiempos de vida media menores a 15 minutos, los segundos, mayores a 30 minutos y en el mejor de los casos, mayor a 3 horas.



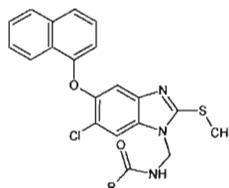
6.2. Perspectivas del trabajo.

En el presente trabajo se trató de abarcar lo más posible en la exploración de derivados biorreversibles para poder aumentar la solubilidad del compuesto Alfa. Por ser un trabajo que inicia un proyecto de investigación, quedan pendientes varios aspectos:

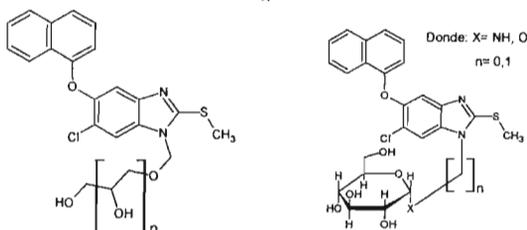
- ✓ Síntesis de derivados biorreversibles del tipo ésteres inorgánicos:



- ✓ Síntesis de derivados biorreversibles del tipo bases de Mannich:



- ✓ Síntesis de derivados biorreversibles del tipo éteres de polialcoholes:



- ✓ Síntesis de las sales farmacéuticas (clorhidrato, lisinato, arginato, glutamato, etc.) de los derivados biorreversibles.
- ✓ Evaluar los derivados sintetizados de carácter no polar (ARM-1 y ARM-2) en cuanto a su solubilidad y estabilidad en medios oleosos permitidos para su uso como vehículos farmacéuticos.
- ✓ Evaluar, tanto los derivados sintetizados como los propuestos, en disolventes polares no acuosos y mezclas de disolventes permitidos para su uso como vehículos farmacéuticos.
- ✓ Someter a aquellos compuestos con los cuales se haya logrado una solución a pruebas de reversibilidad *in vivo*.



7. Bibliografía.

1. Hurtrez-Boussès S., Meunier C., Durand P., Renaud F.; Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*); *Microbes and Infection*, 3, (2001), 841-849.
2. Dalton J., Neill S., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., et. al.; *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines; *International Journal for Parasitology*, 33, (2003), 1173-1181.
3. Rivero Martínez, M.; Farmacocinética del α BIOF10 en borregos; Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, Facultad de Química, U.N.A.M.; 1998.
4. Fayer, R.; Global change and infectious diseases; *Journal of Parasitology*; 86, (2000), 1174-1181.
5. Mas-Coma, M.S., Esteban J.G., Bargues M.D.; Epidemiology of human fasciolosis: a review and proposed new classification; *Bulletin of the World Health Organization*, 77, (1999), 340-346.
6. Rivera Fernández N., Ibarra Velarde F., Castillo Bocanegra R., Hernández Campos A.; Eficacia del 5-Cloro-2-metilthio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en obinos Pelibuey; *Veterinaria Mexicana*, 33, (2002), 55-61.
7. Quiroz, R. H., Ibarra F.; Temas selectos de Parasitología; Vol. I; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – U.N.A.M.; México: 2000, pp. 130-151.
8. Savioli L., Chitsulo L., Montresor A.; Nuevas posibilidades de lucha contra la fasciolosis; *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*; Recopilación de artículos No. 1, (1999), 7.
9. Fairweather I., Boray J. C.; Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance And Its Management; *The Veterinary Journal*, 158, (1999), 81-112.
10. Robinson M.W., Hoey E.M., Fairweather I., Dalton J.P., McGonigle S., Trudgett A.; Characterisation of a β -tubulin gene from the liver fluke, *Fasciola hepatica*; *International Journal for Parasitology*, 31, (2001), 1264-1268.
11. Robinson M.W., Trudgett A., Hoey E.M., Fairweather I.; Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: β -tubulin and response to *in vitro* treatment with Triclabendazole; *Parasitology*, 124, (2002), 325-338.
12. Tamayo Esquivel, David, Escalamiento de la síntesis y desarrollo de una forma farmacéutica para el fasciolicida Alfa; Tesis para obtener el grado de licenciatura, Facultad de Química, U.N.A.M.; 2001.
13. Hernández Campos, M. A.; Síntesis de bencimidazoles con actividad antihelmíntica potencial; Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, Facultad de Química, U.N.A.M.; 1990.
14. Hernández-Campoš A., Ibarra-Velarde F., Vera-Montenegro Y., Castillo R.; Synthesis and fasciolicidal activity of 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50 (2002), 649-652.
15. Rivera N., Ibarra F., Zepeda A., Fortoul T., Cató G., Hernández A., Castillo R.; The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in their natural host; *Parasitology research*; 95 (2005); 379-382.
16. Dr. Ian Fairweather, comunicación personal.



17. Gupta, S., Srivastava. J.K., Katiyar, J. C., Jain, G. K., Singh. S., Satin. J. P. S., Transdermal device of a substituted benzimidazole carbamate and its efficacy against helminth parasites; *Tropica Medica*; 34 (1992); 113-119.
18. Hennessy, D. R.; Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of antihelmintic compounds; *Veterinary parasitology*; 72 (1997); 367-390.
19. Wermuth, C.G.; The practice of Medicinal Chemistry; 2° Ed.; Academic Press; R.U.: 2003; pp. 561-581, 617-628.
20. Silverman, R.; The organic chemistry of drug design and drug action; Academic Press; E.U.: 1992; pp. 352-397.
21. Korolkovas, A.; Essentials of medicinal chemistry; 2° Ed., John Wiley & Sons; E.U.: 1988; pp. 26-28, 97-118.
22. Krogsgaard-Larsen, P.; Bundgaard, H.; A textbook of drug design and development; Harwood academic publishers; Suiza: 1991; pp. 114-191.
23. Abraham, D.J.; Burger's medicinal chemistry and drug discovery; 6° Ed.; Vol. 2; John Wiley & Sons; E.U.: 2003; pp. 499-526.
24. Riley, T.N.; The prodrug concept and new drug design and development; *Journal of Chemical Education*; 65 (1988), 947-953.
25. Hernández-Luis, Francisco; Preparación de derivados hidrosolubles del Albendazol; *Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias químicas*, Facultad de Química, U.N.A.M., 1999.
26. Welchshofer, N.; Delabre-Defayolle, I.; Paris, J.; Petaby, A.F.; In vivo morphological damage induced by new benzimidazole prodrug in *Echinococcus multilocularis* metacestodes; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 79 (1990); 606-608.
27. Nielsen, L. S.; Bundgaard, H.; Improved per oral bioavailability of mebendazole in rabbits by administration of various N-alkoxycarbonyl derivatives of mebendazole; *International Journal of Pharmaceutics*; 104 (1994), 175-179.
28. Page, C.; Curtis M.; Sutter, M.; Walker, M.; Hoffman, B.; Integrated pharmacology; Mosby International: España, 1997; pp. 67-72.
29. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.; Experimental and computacional approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings; *Advanced drug delivery reviews*; 46 (2001); pp.3-26.
30. Yalkowsky S. H.; Banerjee, S.; Aqueous solubility. Methods of estimation for organic compounds; Marcel-Dekker Inc.: E.U., 1992; pp. 2-12, 41-47.
31. Gennaro, A. R.; Remington: The science and practice of pharmacy; 20° Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: E.U., 2000; pp. 1111-1117.
32. Ettmayer, P.; Amidon, G.L.; Clement, B.; Testa, B.; Lessons learned from marketed and investigational prodrugs; *Journal of Medicinal Chemistry*; 47 (2004), 2393-2404.
33. Formaldehyde in drinking-water. WHO Guidelines for drinking water quality; World Health Organization. (Acceso Abril 2005)

34. Klassen, C. D.; Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons; 6° Ed.; Mc. Graw-Hill: E.U., 2001; pp.153-154, 895.
35. Stella, V. J.; Prodrug strategies for improving drug-like properties; AAPS Workshop on optimization of drug-like properties during lead optimization. 19-22 septiembre, 2004; N. J., E. U.
36. Paquette, L.; Fundamentos de Química heterocíclica; Ed. Limusa: México, 2000; pp. 189-192.
37. Castellan, G. W.; Fisicoquímica; 2° ed.; Pearson Educación: México, 1998; pp. 846-859.
38. Spectroscopy tools. Institut für Chemie, Universität Potsdam (Acceso enero 2005)
<http://www.chem.uni-potsdam.de/tools/>
39. Infrared spectroscopy. Department of chemistry, Michigan State University (Acceso enero 2005)
<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>
40. ACDLabs/¹H-RMN Predictor v.4.56. *Advanced Chemistry Development Inc.*
41. Nielsen S., L.; Bundgaard, H.; Falch, E.; Prodrugs of thiabendazole with increased water-solubility; *Acta Pharmaceutica Nordica*; 4 (1992), 43-49.
42. Nielsen, L.; Sløk, F.; Bundaard, H.; N-Alcoyxcarbonyl prodrugs of mebendazole with increased water solubility; *International Journal of Pharmaceutics*, 102 (1994), 231-239.
43. Varia, S.A.; Schuller, S.; Sloan K.B.; Stella V.J.; Phenytoin prodrugs III: Water-soluble prodrugs for oral and/or parenteral use; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 73 (1984), 1068-1073.
44. Katritzky, A. R., Akutagawa, K.; A New Synthetic Method for the 2-Substitution of N-Unsubstituted Benzimidazoles: Formaldehyde as a Versatile Protecting Agent for Heterocyclic NH; *Journal of Organic Chemistry*, 54 (1989), 2949-2952.
45. Bosch, J.; Roca, T.; Domenech, J.; Suriol, M.; Synthesis Of Water-Soluble Phenytoin Prodrugs; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9 (1999), 1859-1862.
46. Chung, M.; Carvalho G., R.; Favarato M., T.; Ferreira G., M.; *et al*; Synthesis and in Vitro evaluation of Potential Antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A New Nitrofurazone Prodrug; *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 11 (2003), 4779-4783.
47. Bundgaard, H.; Johansen, M.; Pro-drugs as drug delivery systems VIII. Bioreversible derivatization of hydantoin s by N-hydroxymethylation; *International Journal of Pharmaceutics*, 5 (1980), 67-77.
48. Fieser, F.L.; Martin E.L.; *Organic Syntheses*, Vol. Col. 2, 560. (Acceso enero 2005):
<http://www.orgsyn.org>
49. Smith, M. B.; March J.; March's advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms and structure; 5° ed.; John Wiley & Sons, Inc., E.U.: 2001; pp. 477-478, 484-486, 493-494, 518-519, 523-524, 1189-1191.
50. Bundgaard, H.; Larsen, C.; Thorbek, P.; Pro-drugs as drug delivery systems XXVI. Preparation and enzymatic hydrolysis of various water-soluble amino acid esters of metronidazole; *International Journal of Pharmaceutics*, 18 (1984), 67-77.
51. Staab, H. A.; New methods of preparative organic chemistry. Syntheses using heterocyclic amides (Azolides); *Angewante chemie International edition*, 1 (1962), 351-367.



52. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M.; Protective groups in organic synthesis; 3^oed., Wiley-Interscience: E.U. 1999; pp. 328-330.
53. Harada, N.; Hongu, M.; Tanaka, T.; Kawaguchi, T.; Hashiyama, T.; Tsujihara, K.; A simple preparation of chloromethyl esters of the blocked amino acids; *Synthetic communications*; 24 (1994); 767-772.
54. Binderup, E.; Hansen, E. T.; Chlorosulfates as reagents in the synthesis of carboxylic acid esters under phase-transfer conditions; *Synthetic communications*; 14 (1984), 857-864.
55. Ulich, L. H.; Adam, R.; The Reaction Between Acid Halides And Aldehydes, III; *Journal of Organic Chemistry*; (1921), 660-667.
56. Hou, Y.; Xie, W.; Janczuk, A. J.; Wang, P. G.; O-Alkylation of Cupferron: Aiming at the Design and Synthesis of Controlled Nitric Oxide Releasing Agents; *Journal of Organic Chemistry*; 65 (2000), 4333-4337.
57. Linder, M.L.; Steurer, S.; Podlech, J.; *Organic Syntheses*, Vol. 79, 154-164. (Acceso enero 2005)
<http://www.orgsyn.org>
58. Burke, P. J., Koch T. H.; Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Doxorubicin-Formaldehyde Conjugates Targeted to Breast Cancer Cells; *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (2004), 1193-1206.
59. Wheeler, W. J.; Preston, D. A.; Wright, W. E.; Huffman, G. W.; Osborne, H. E.; Howard, D. P.; Orally active esters of cephalosporin antibiotics. 3. Synthesis and biological properties of Aminoacyloxymethyl esters of 7-[D-(-)-Mandelamido]-3-[[1-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]methyl]-3-cephem-4-carboxylic acid; *Journal of Medicinal Chemistry*; 22 (1979); 657-661.
60. Iley, J.; Barroso, H.; Moreira, R.; Lopes, F.; Calheiros, T.; Acyloxymethyl as a Drug Protecting Group. Part 7: Tertiary Sulfonamidomethyl Ester Prodrugs of Benzylpenicillin: Chemical Hydrolysis and Anti-Bacterial Activity; *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 8 (2000), 1629-1636.
61. Preston P. N.; Synthesis, Reactions, and Spectroscopic Properties of Benzimidazoles; *Chemical Reviews*; 74 (1974), 279-314.
62. *Chemical abstracts*; 14430w, V. 76, (1972).
63. *Chemical abstracts*; 105096t, V. 68, (1972).
64. Joseph, R.; Pallan, P. S.; Sudalai, A.; Ravindranathan, T.; Direct conversion of alcohols into the corresponding iodides; *Tetrahedron letters*; 36 (1995); 609-612.
65. Kammerer, C.; Amiri, B.; Cho, A.K.; Inhibition of uptake of catecholamines by benzylamine derivatives; *Journal of Medicinal Chemistry*; 22 (1979), 352-355.
66. Chen, P.; Suh D.; Smith, M.; Synthesis of N-aminethylpyrrolidin-2-ones; *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions I*, (1995), 1317-1322.
67. Mäntylä, A.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Keski-Rahkonen, P.; Vepsäläinen, J.; Järvinen, T.; Design, synthesis and in vitro evaluation of novel water-soluble prodrugs of buparvaquone; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23 (2004), 151-158.
68. Basado en la NOM-073-SSA1-1993 "Estabilidad de medicamentos".

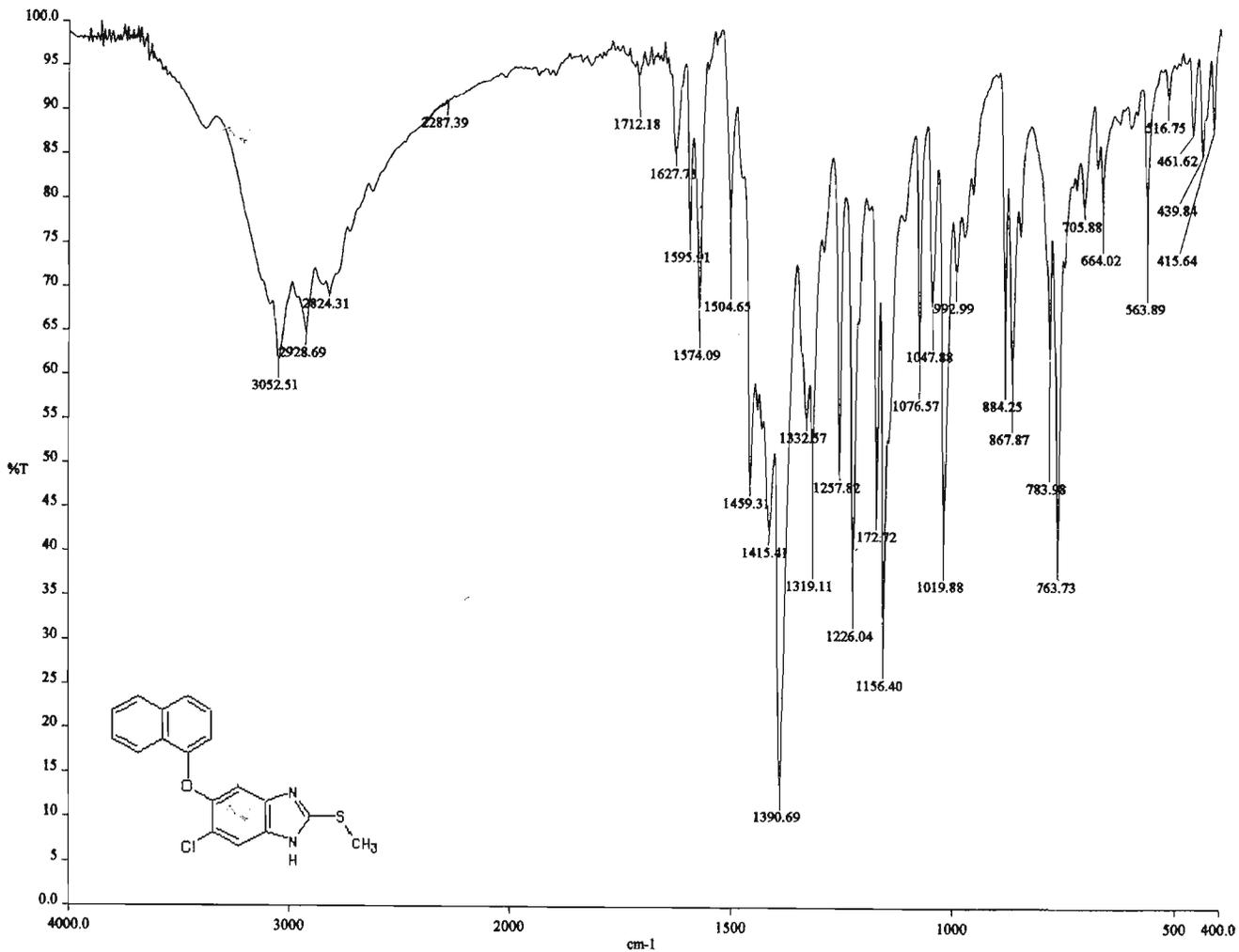


8. Apéndice.

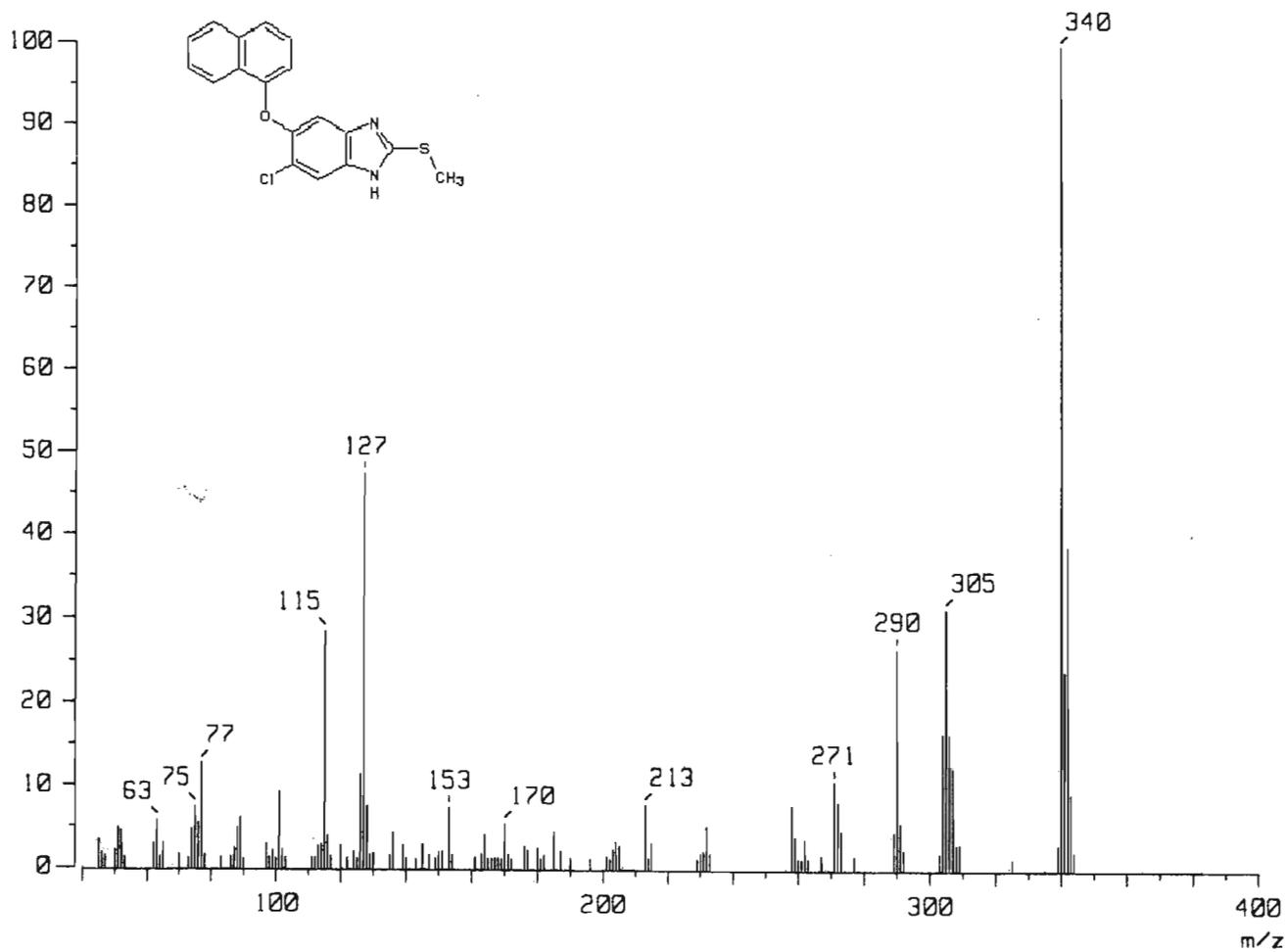
ÍNDICE		Pag.
A.1. Identificación espectrométrica y espectroscópica de los compuestos Compuesto Alfa y ARM-1 a 10		
A.1.1 Espectro IR compuesto Alfa		75
A.1.2 Espectrometría de masas compuesto Alfa		76
A.1.3 Espectro RMN ¹ H compuesto Alfa		77
A.1.4 Espectro RMN ¹ H compuesto Alfa intercambio D ₂ O		78
A.1.5 Espectro IR ARM-1		79
A.1.6 Espectrometría de masas ARM-1		80
A.1.7 Espectro ¹ H-RMN ARM-1		81
A.1.8 Espectro IR ARM-2 – Alfa acetilado		82
A.1.9 Espectrometría de masas ARM-2 – Alfa acetilado		83
A.1.10 Espectro RMN ¹ H ARM-2 – Alfa acetilado		84
A.1.11 Espectro IR ARM-3		85
A.1.12 Espectrometría de masas ARM-3		86
A.1.13 Espectro RMN ¹ H ARM-3		87
A.1.14 Espectro RMN ¹ H ARM-3 intercambio D ₂ O		88
A.1.15 Espectrometría de masas ARM-4		89
A.1.16 Espectrometría de masas ARM-5		90
A.1.17 Espectrometría de masas ARM-5 <i>ter</i> boc		91
A.1.18 Espectro IR ARM-7		92
A.1.19 Espectrometría de masas ARM-7		93
A.1.20 Espectro IR ARM-8		94
A.1.21 Espectrometría de masas ARM-8		95
A.1.22 Espectro RMN ¹ H ARM-8		96
A.1.23 Espectro RMN ¹ H ARM-8 intercambio D ₂ O		97
A.1.24 Espectrometría de masas ARM-9		98
A.1.25 Espectrometría de masas dímero de compuesto Alfa		99
A.1.26 Espectro IR ARM-10		100
A.1.27 Espectrometría de masas ARM-10		101
A.1.28 Espectro RMN ¹ H ARM-10		102
A.1.29 Espectrometría de masas reacción modelo. Benzoato de clorometilo		103
A.1.30 Espectrometría de masas formilación de ARM-8		104
A.1.31 Espectro RMN ¹ H formilación de ARM-8		105
A.2. Evaluación de la estabilidad y solubilidad de los compuestos ARM-1 a 7		
A.2.1 Cromatograma representativo compuesto Alfa		106
A.2.2 Cromatograma representativo ARM-1		106
A.2.3 Cromatograma representativo ARM-2		107
A.2.4 Cromatograma representativo ARM-3		107
A.2.5 Cromatograma representativo ARM-7		108
A.2.6 Espectro UV compuesto Alfa		108
A.2.7 Espectro UV compuesto Alfa acetilado		109
A.2.8 Espectro UV ARM-2		109



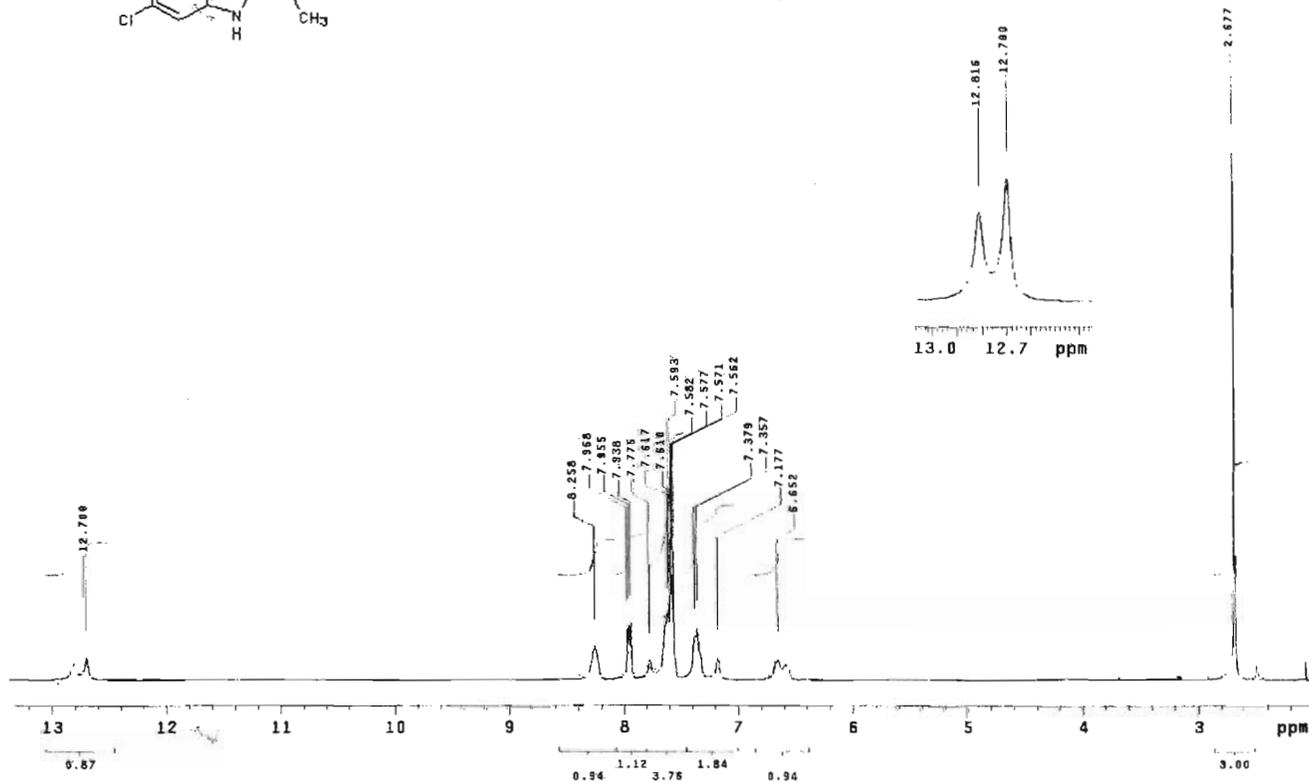
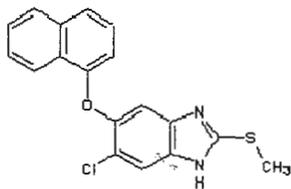
A.1. Identificación espectrométrica y espectroscópica de los compuestos Compuesto Alfa y ARM-1 a 10



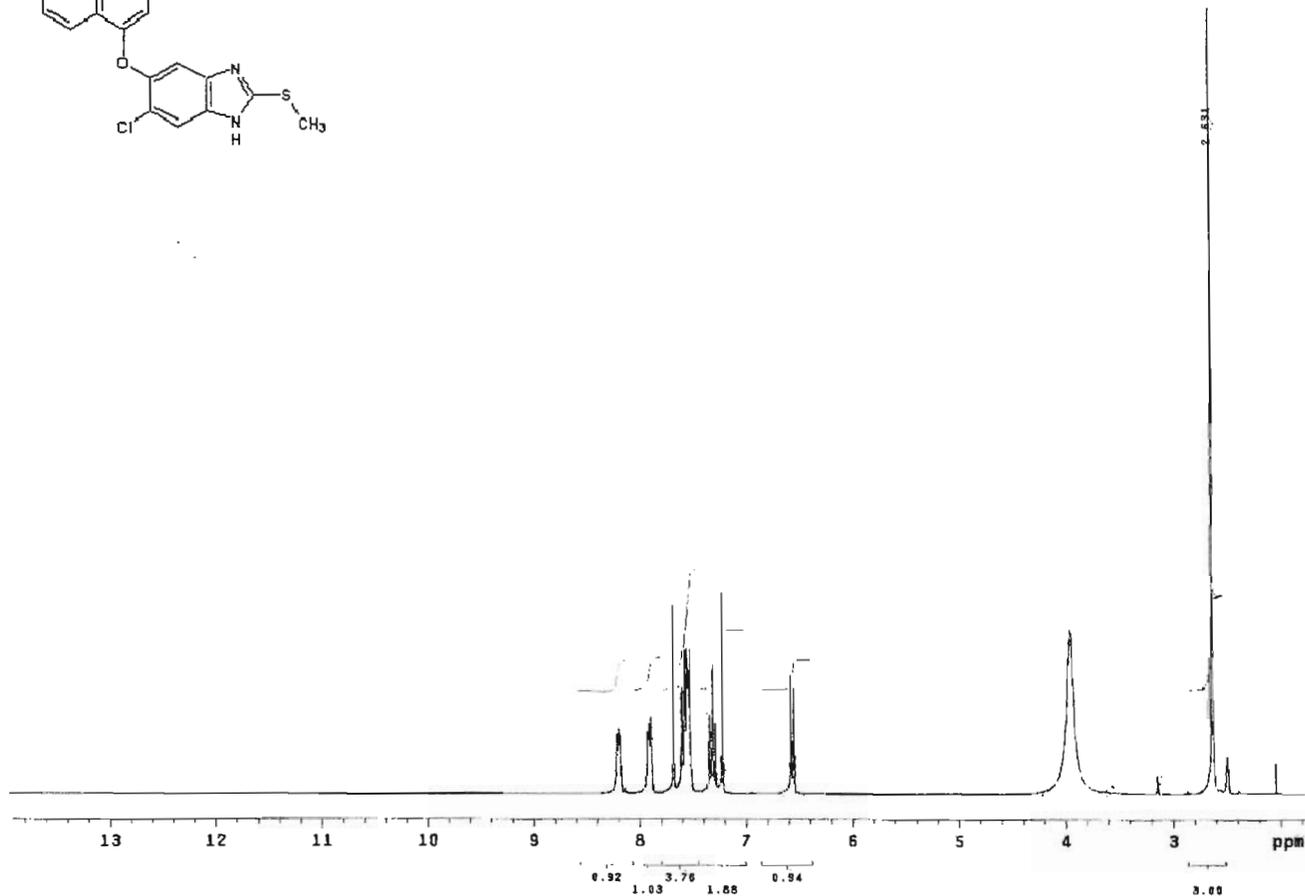
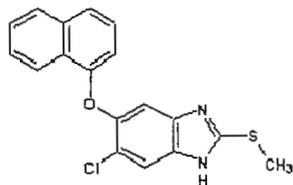
A.1.1 Espectro IR compuesto Alfa (KBr, cm⁻¹)



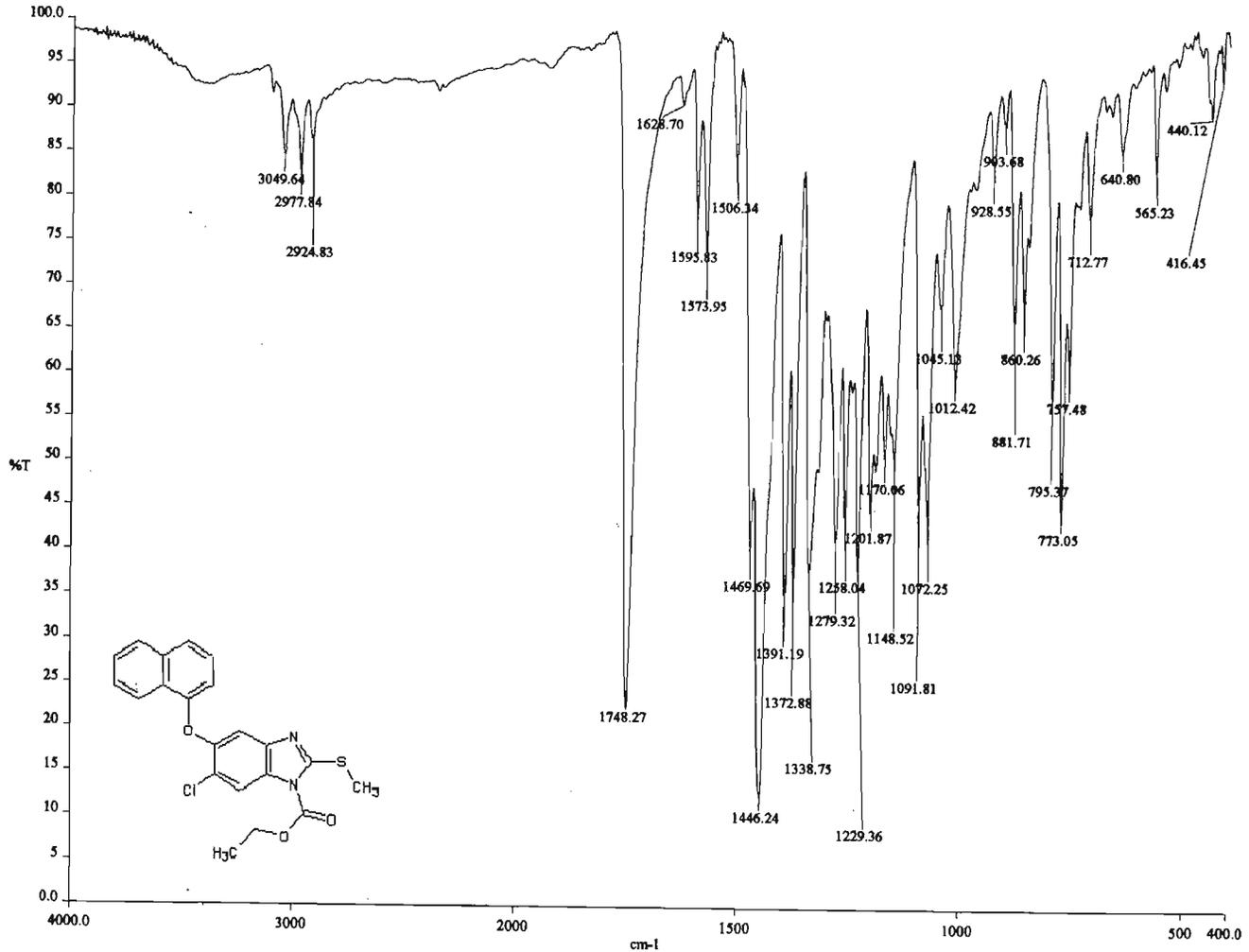
A.1.2 Espectrometría de masas compuesto Alfa (IE/ID; m/z)



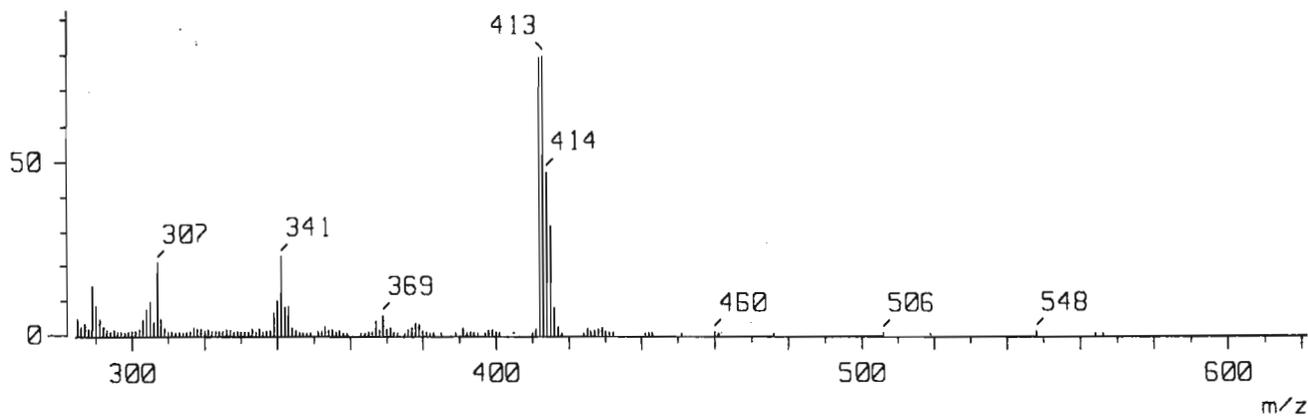
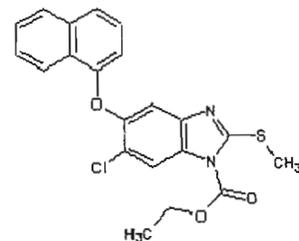
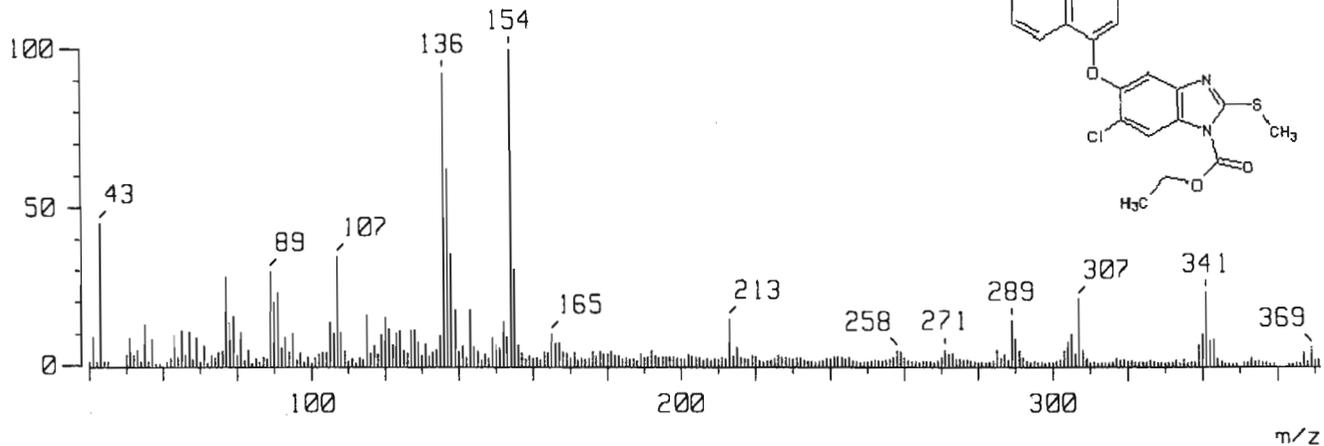
A.1.3 Espectro RMN ¹H compuesto Alfa (TMS, DMSO-d₆; ppm)



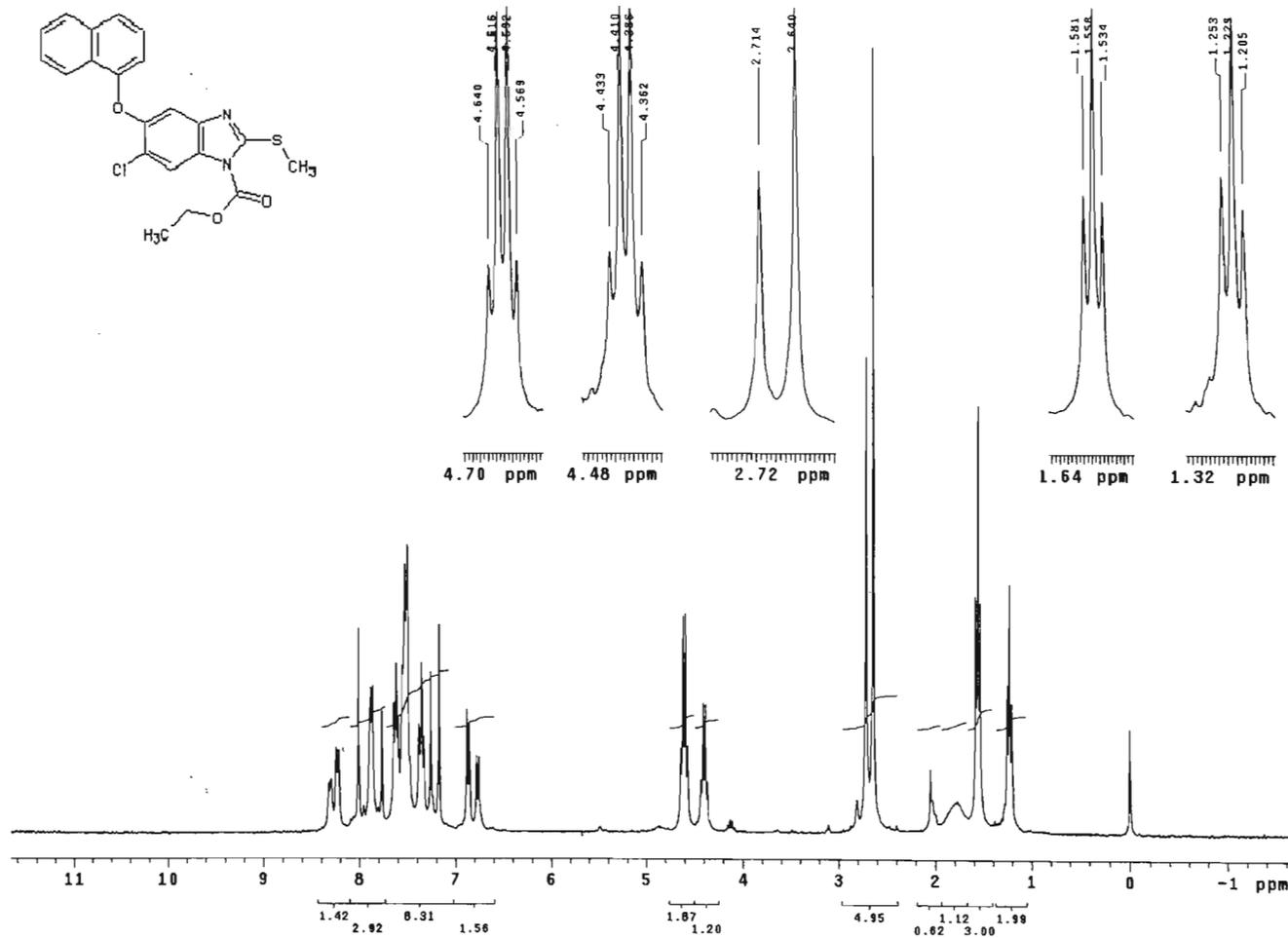
A.1.4 Espectro RMN ¹H compuesto Alfa intercambio D₂O (TMS, DMSO-d₆; ppm)



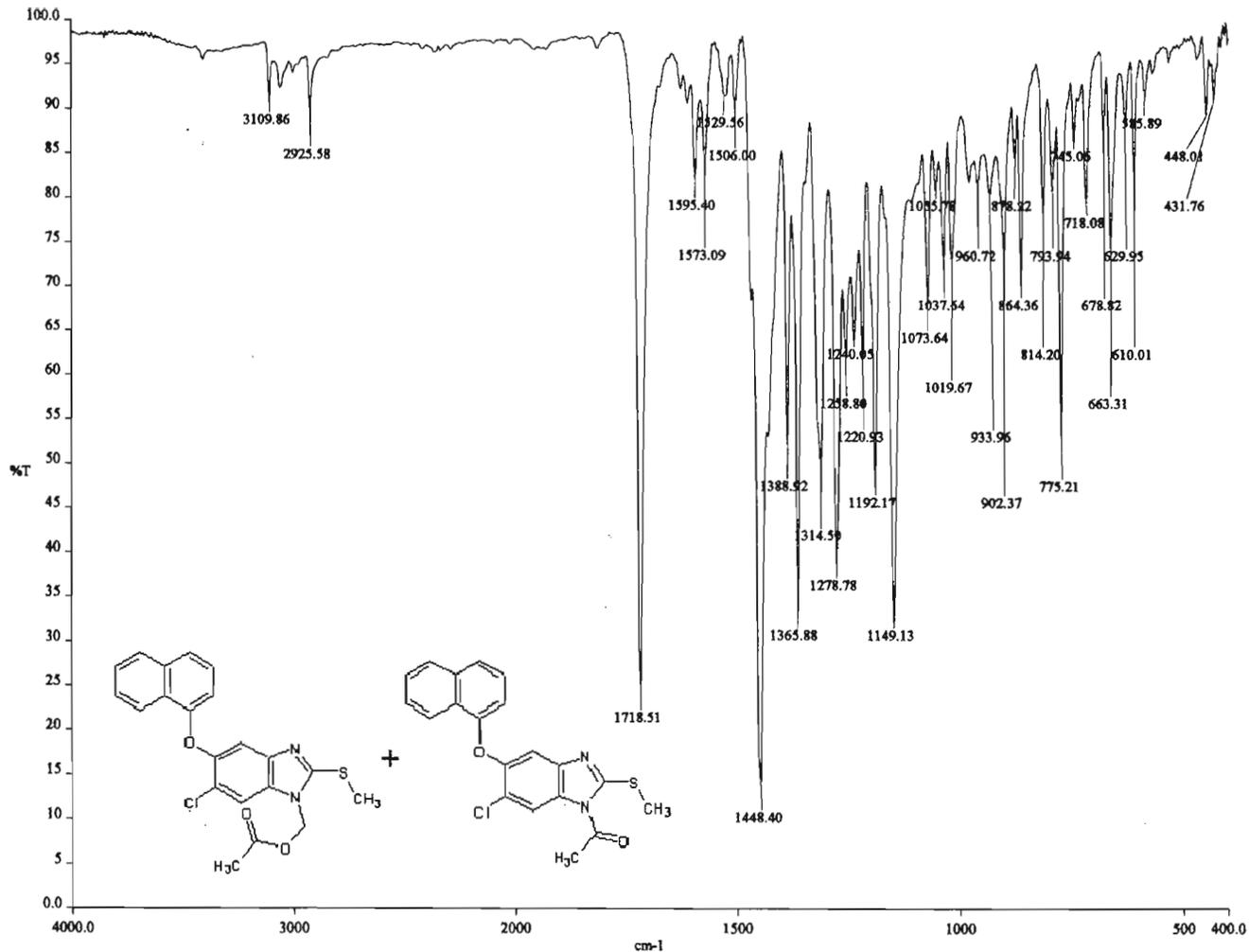
A.1.5 Espectro IR ARM-1(KBr, cm⁻¹)



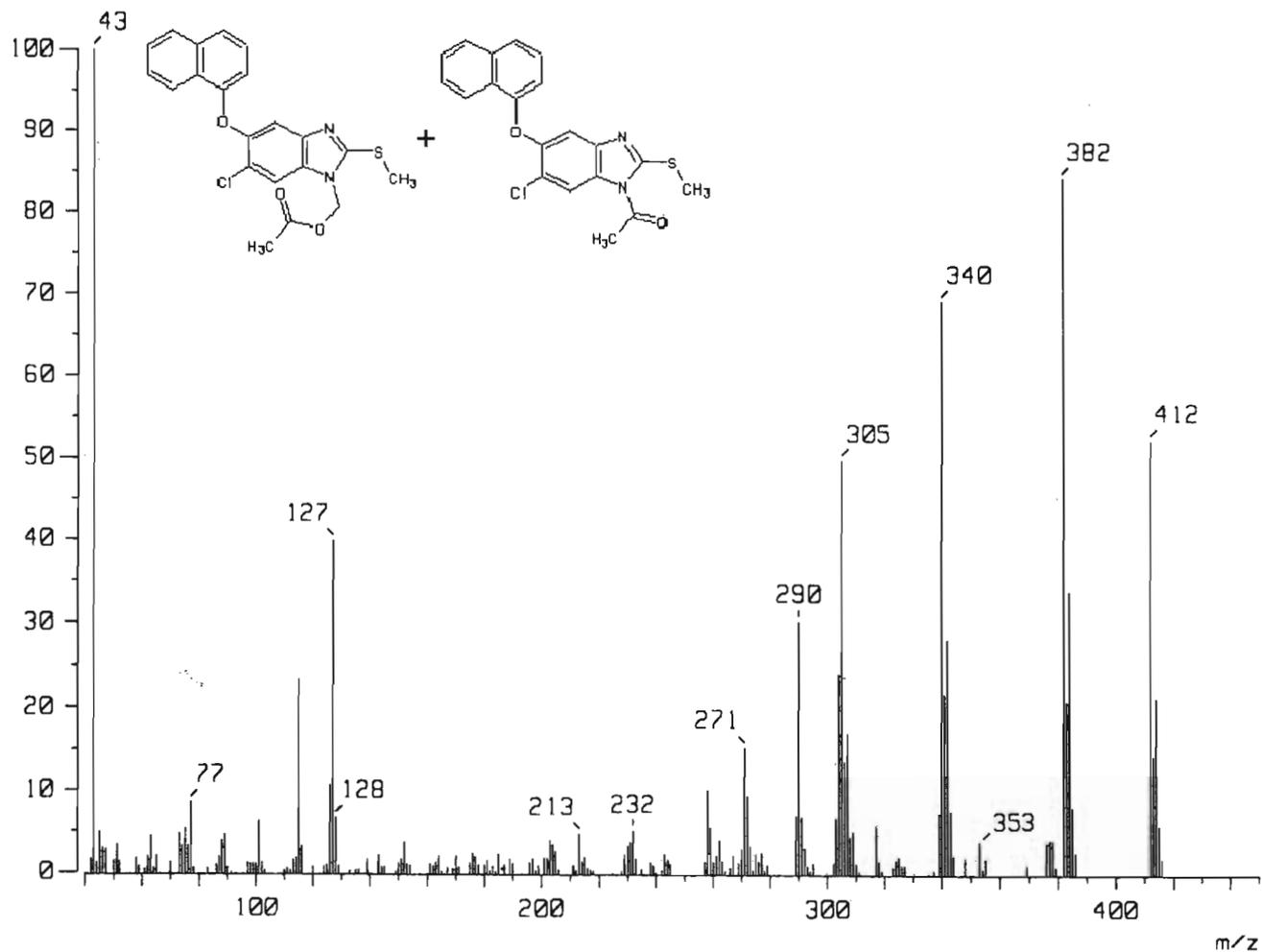
A.1.6 Espectrometría de masas **ARM-1** (FAB; m/z)



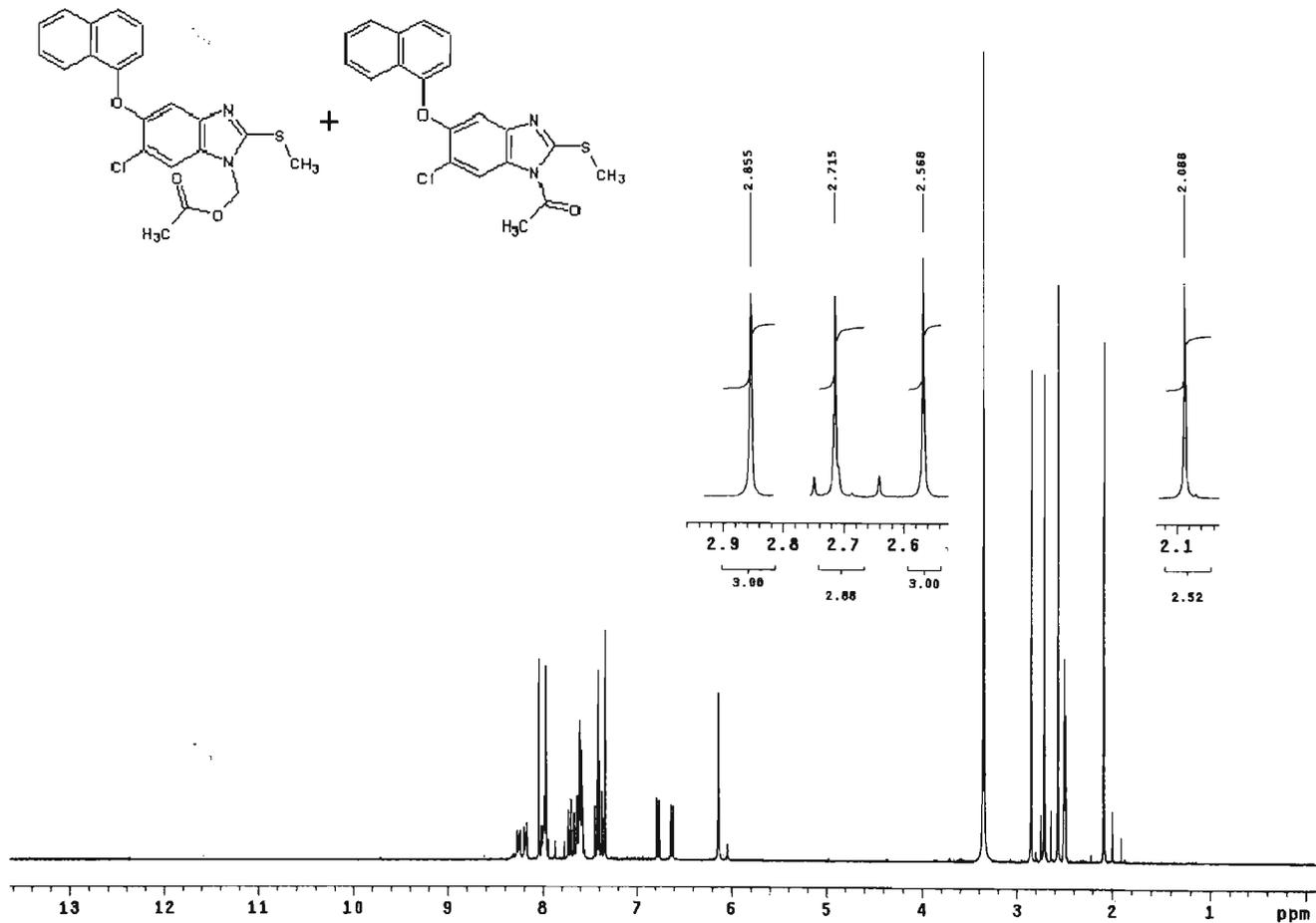
A.1.7 Espectro RMN ¹H ARM-1 (TMS, CDCl₃; ppm)



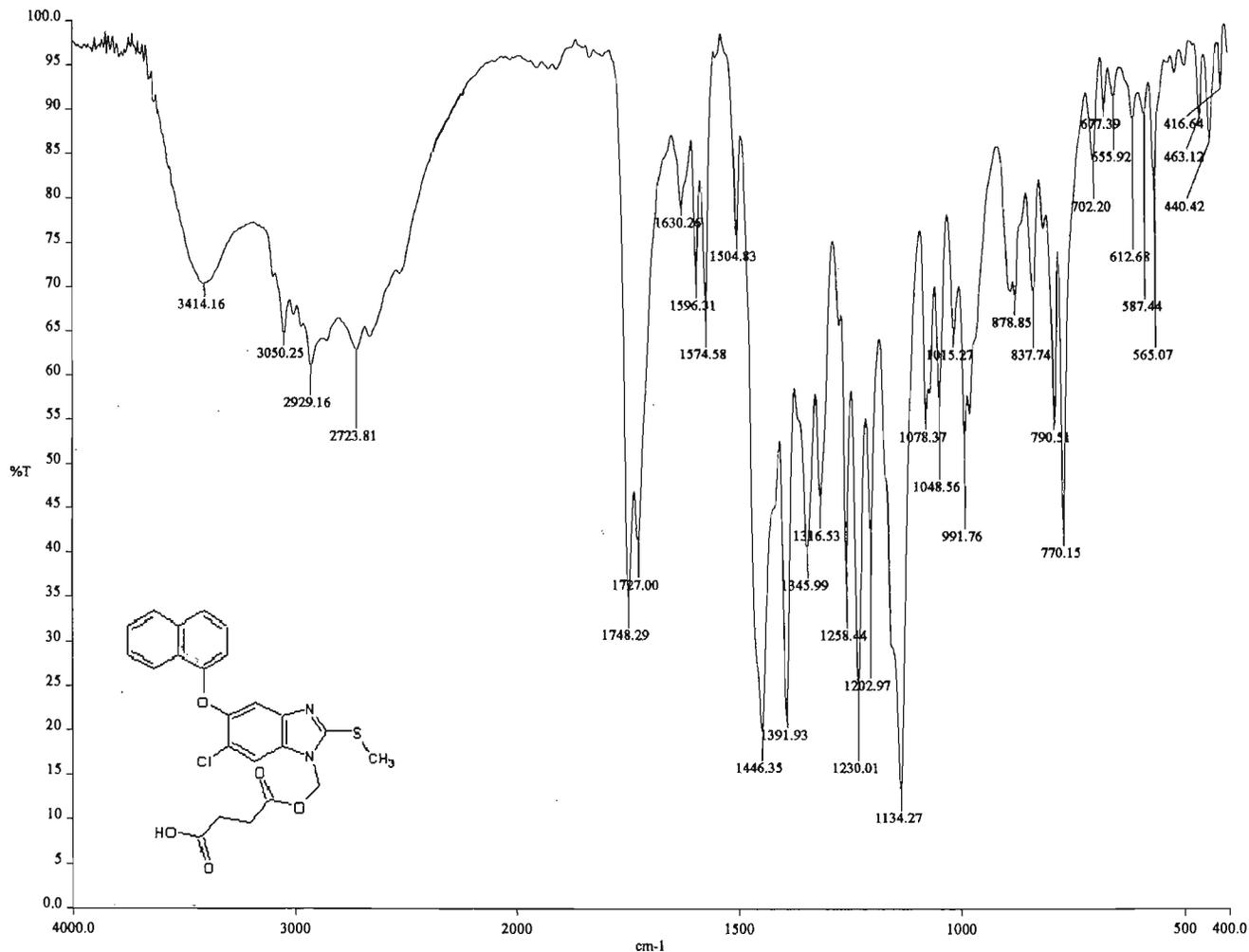
A.1.8 Espectro IR **ARM-2** – Alfa acetilado (KBr, cm⁻¹)



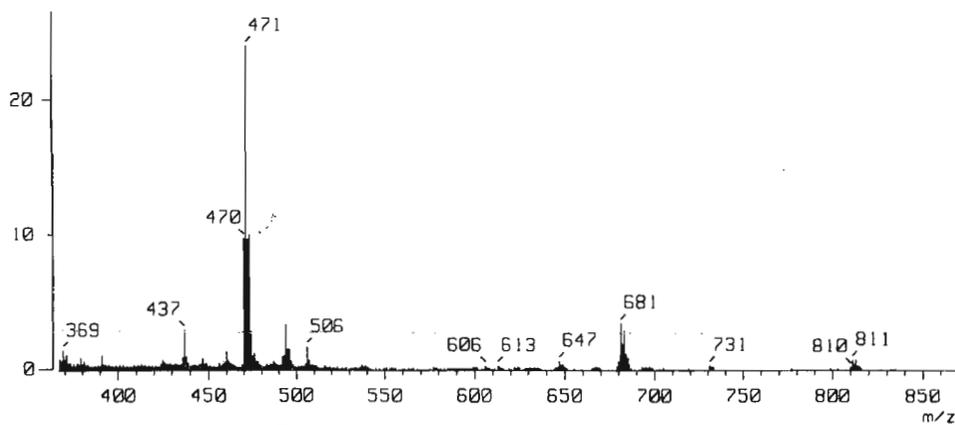
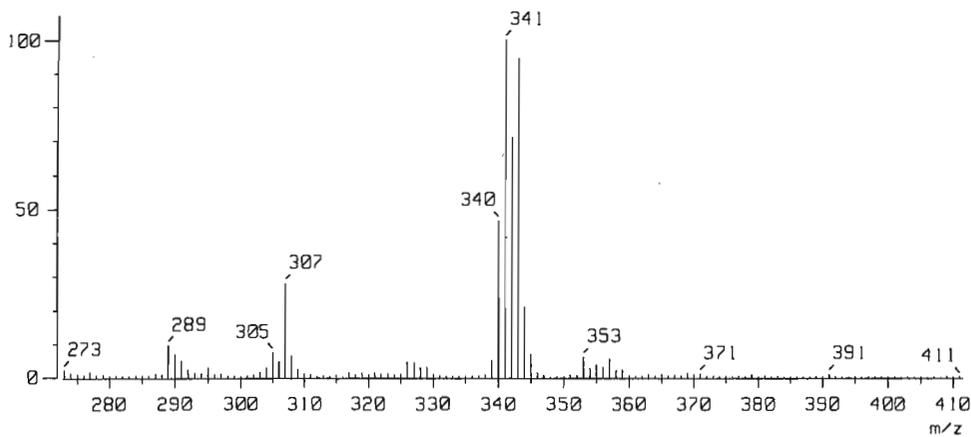
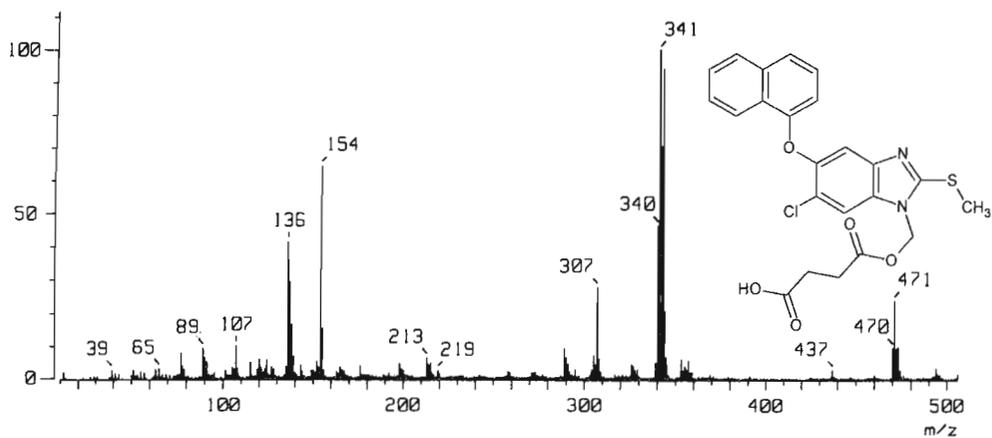
A.1.9 Espectrometría de masas **ARM-2** – Alfa acetilado (IE/ID; m/z)



A.1.10 Espectro RMN ¹H **ARM-2** – Alfa acetilado (TMS, DMSO-d₆; ppm)

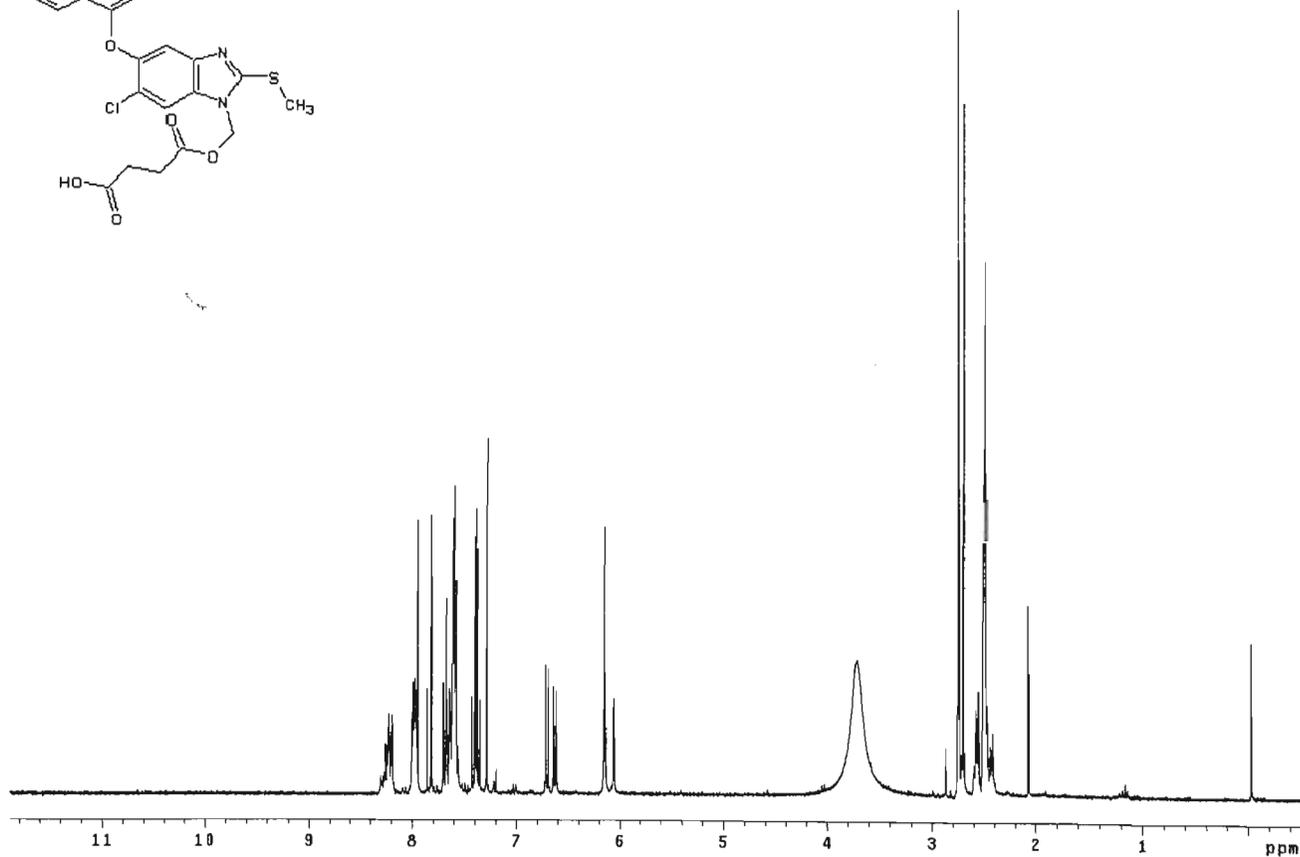
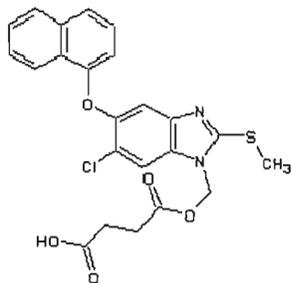


A.1.11 Espectro IR **ARM-3** (KBr, cm^{-1})

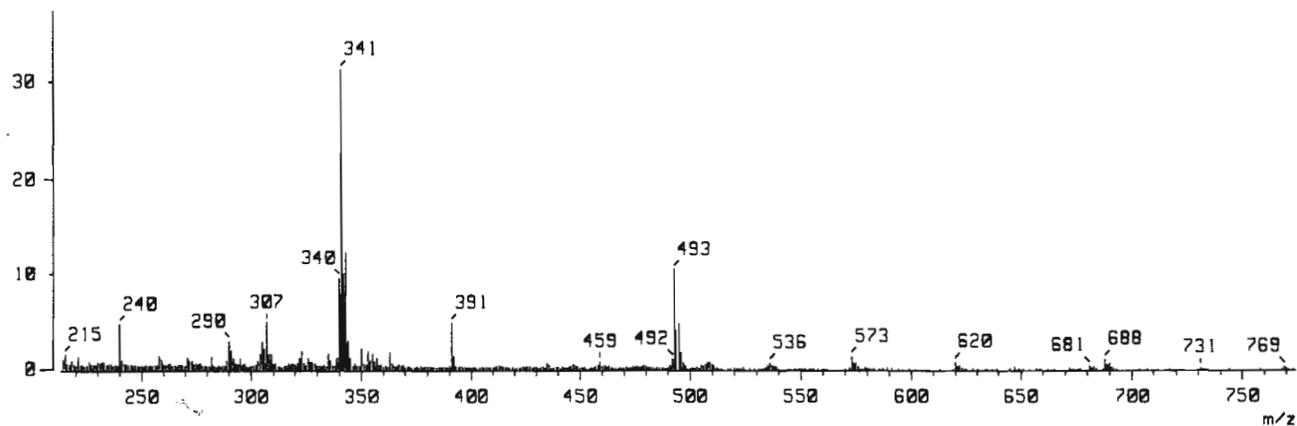
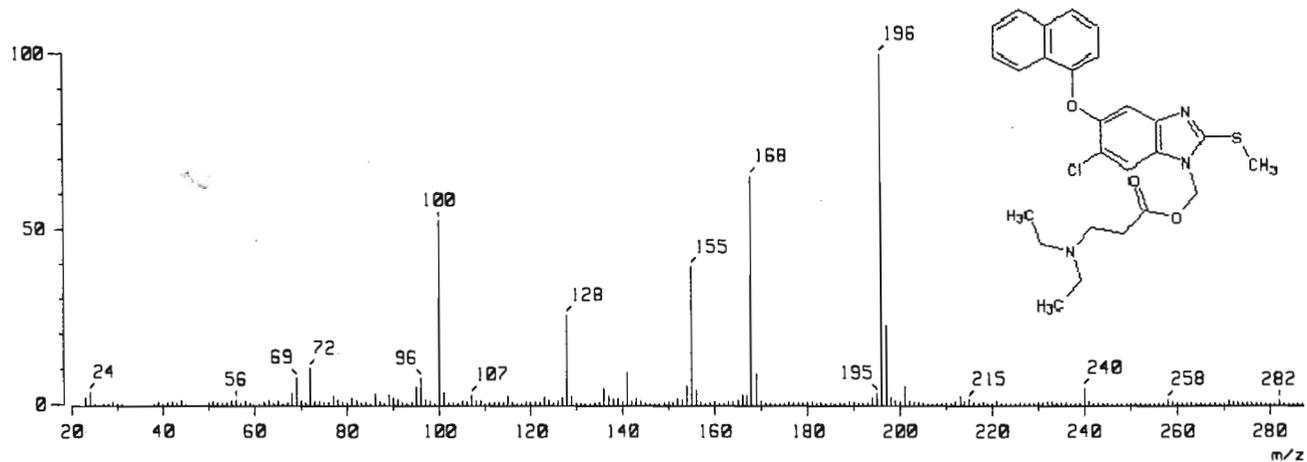


A.1.12 Espectrometría de masas ARM-3 (FAB; m/z)

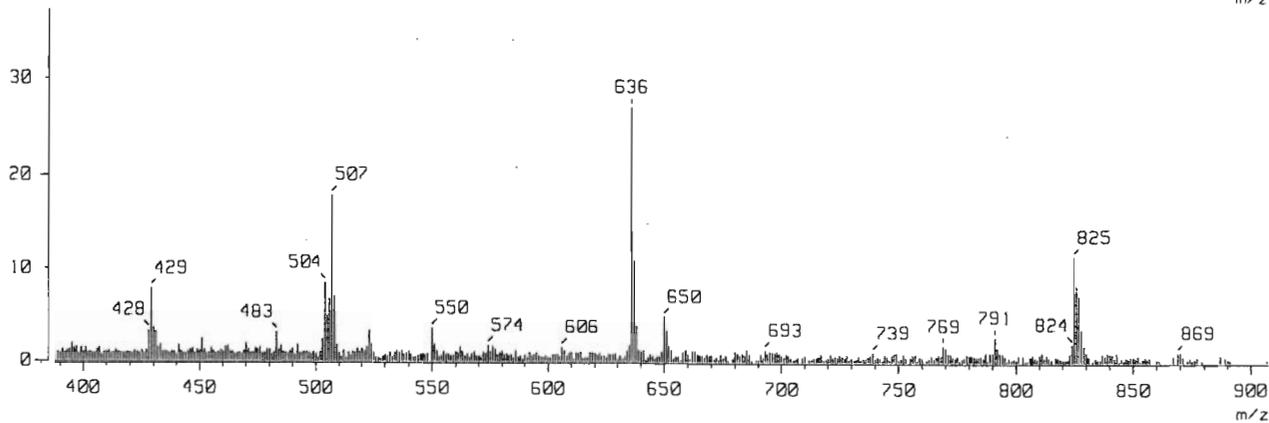
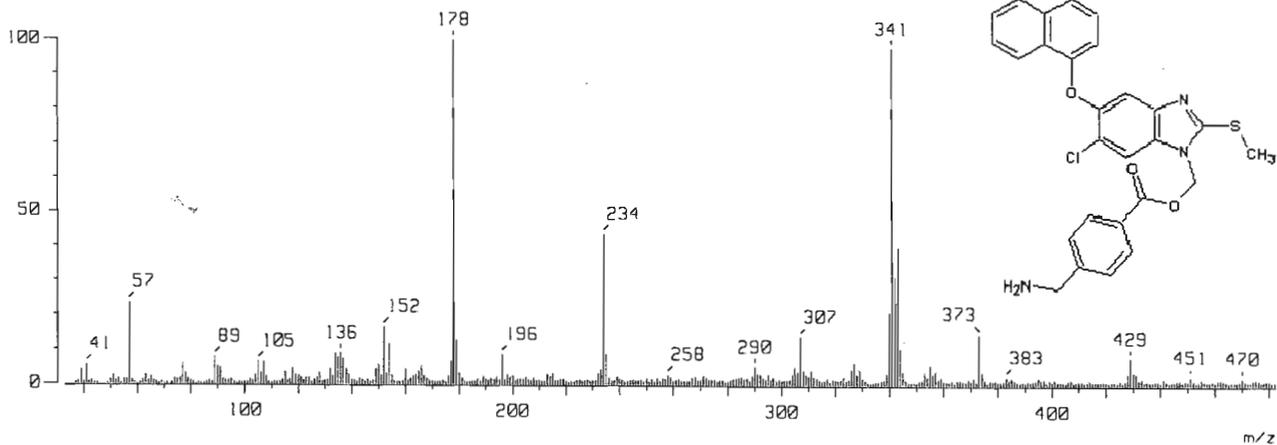




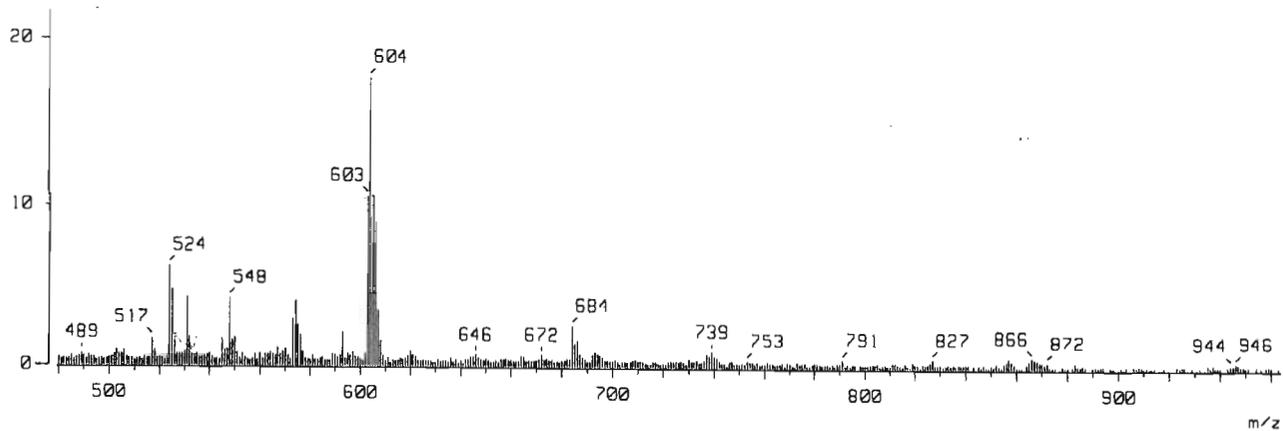
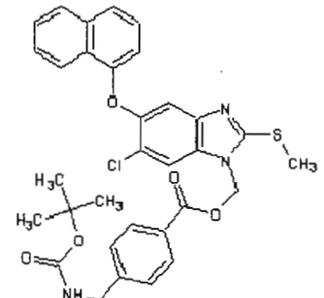
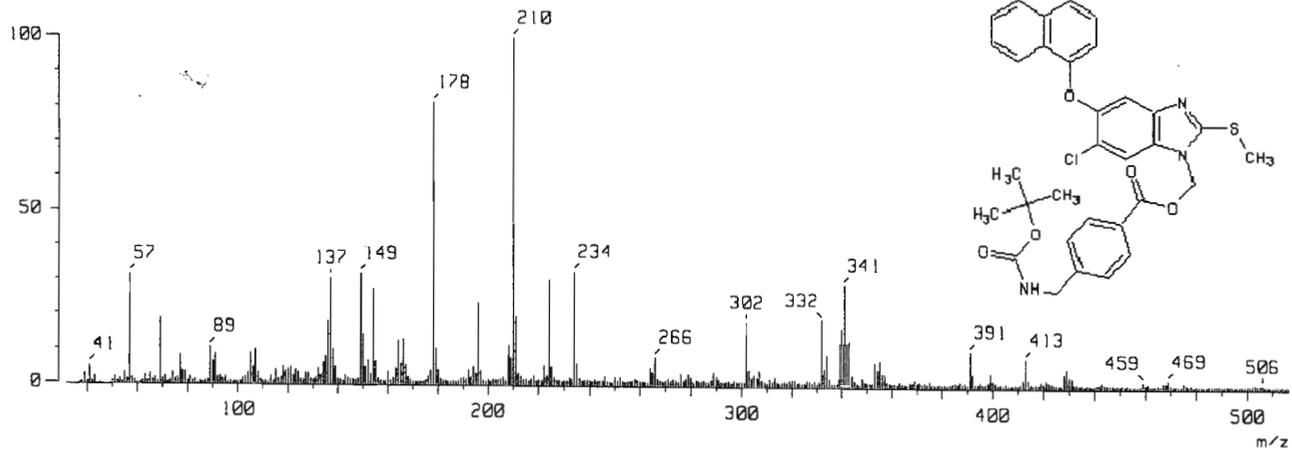
A.1.14 Espectro RMN ¹H **ARM-3** intercambio D₂O (TMS, DMSO-d₆; ppm)



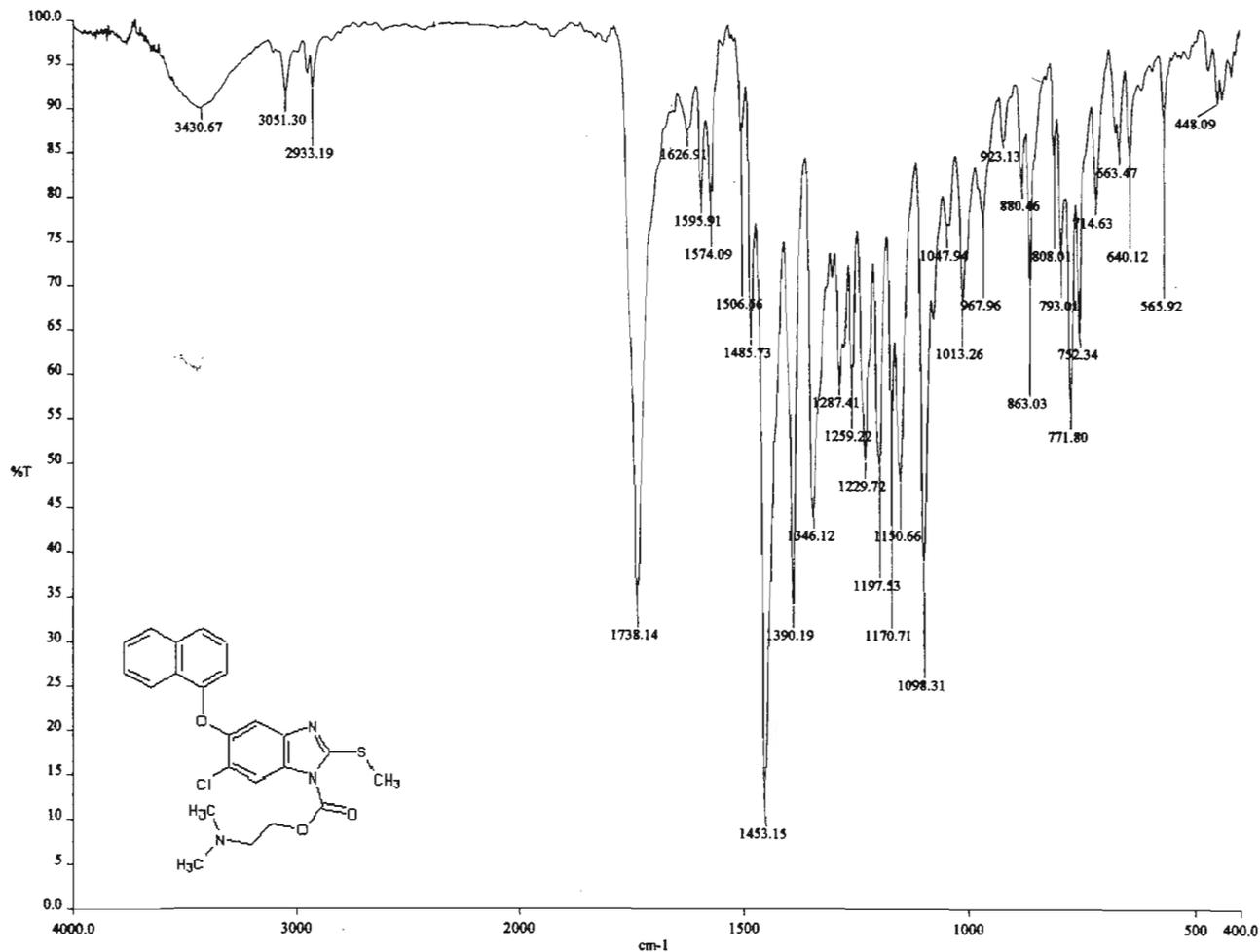
A.1.15 Espectrometría de masas **ARM-4** (FAB m/z)



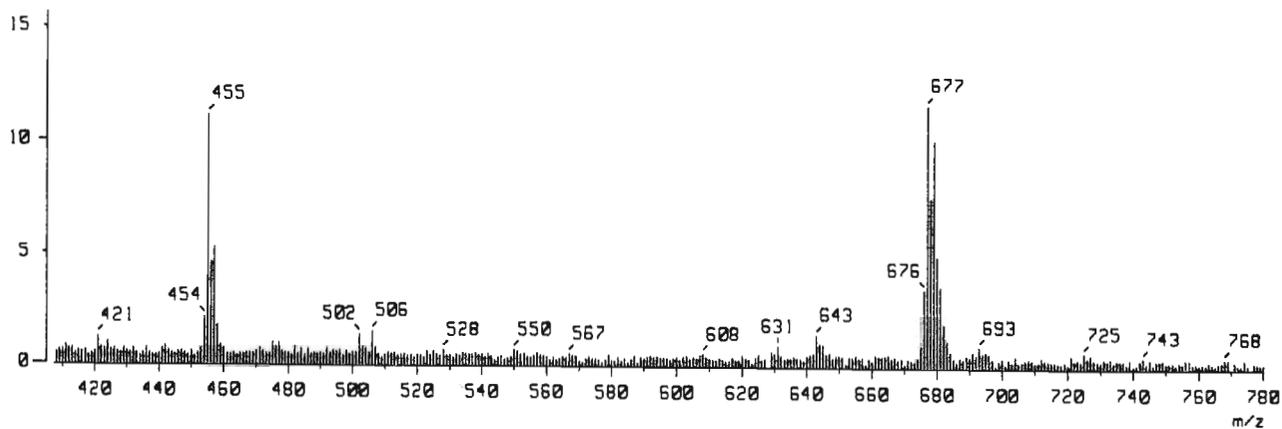
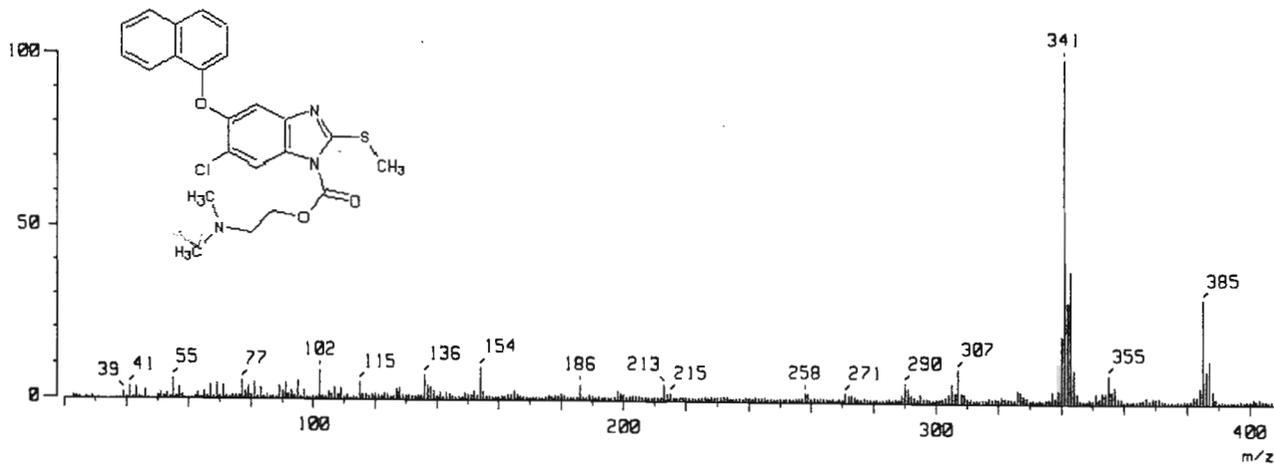
A.1.16 Espectrometría de masas **ARM-5** (FAB m/z)



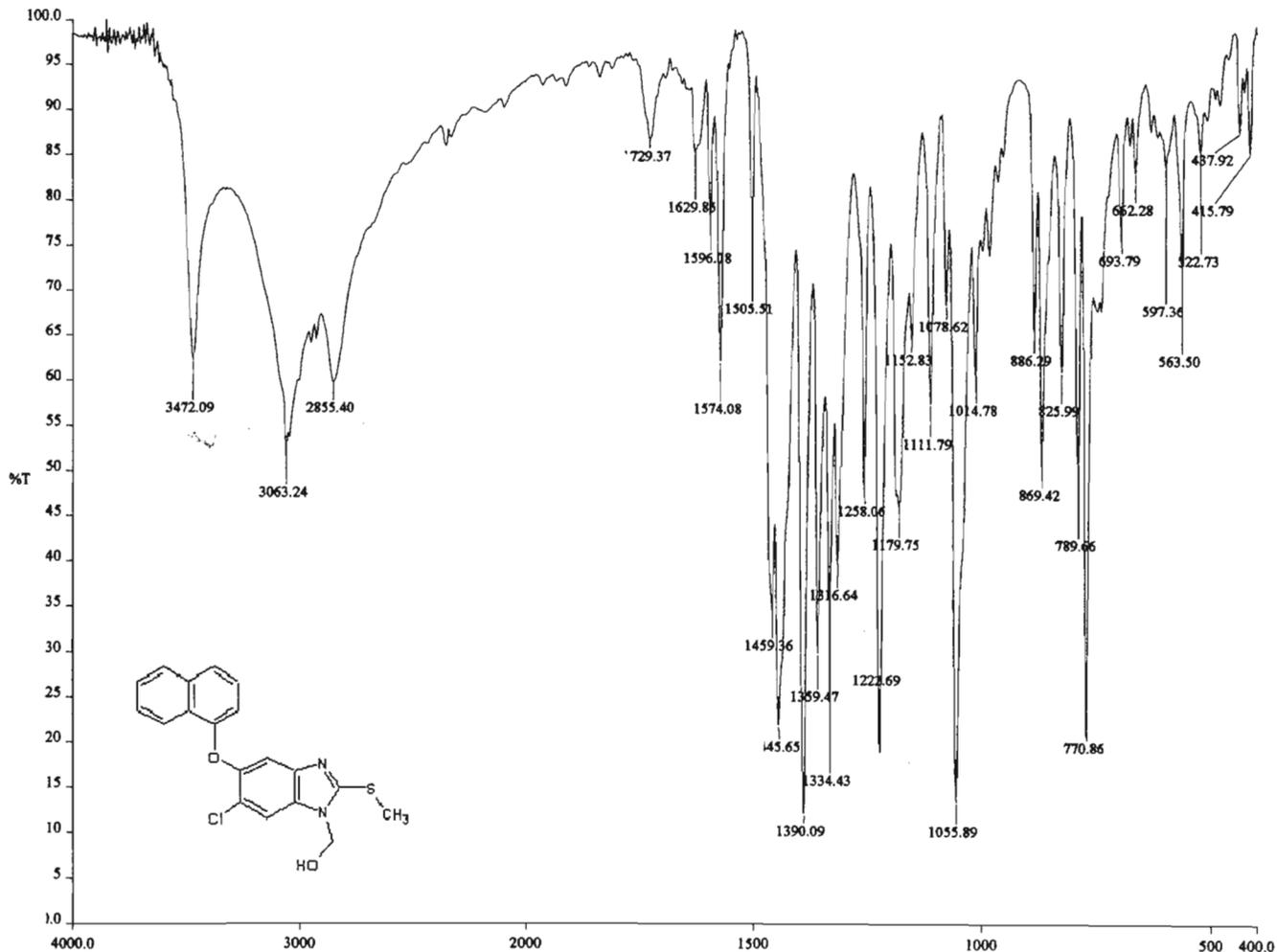
A.1.17 Espectrometría de masas **ARM-5ferboc** (FAB; m/z)



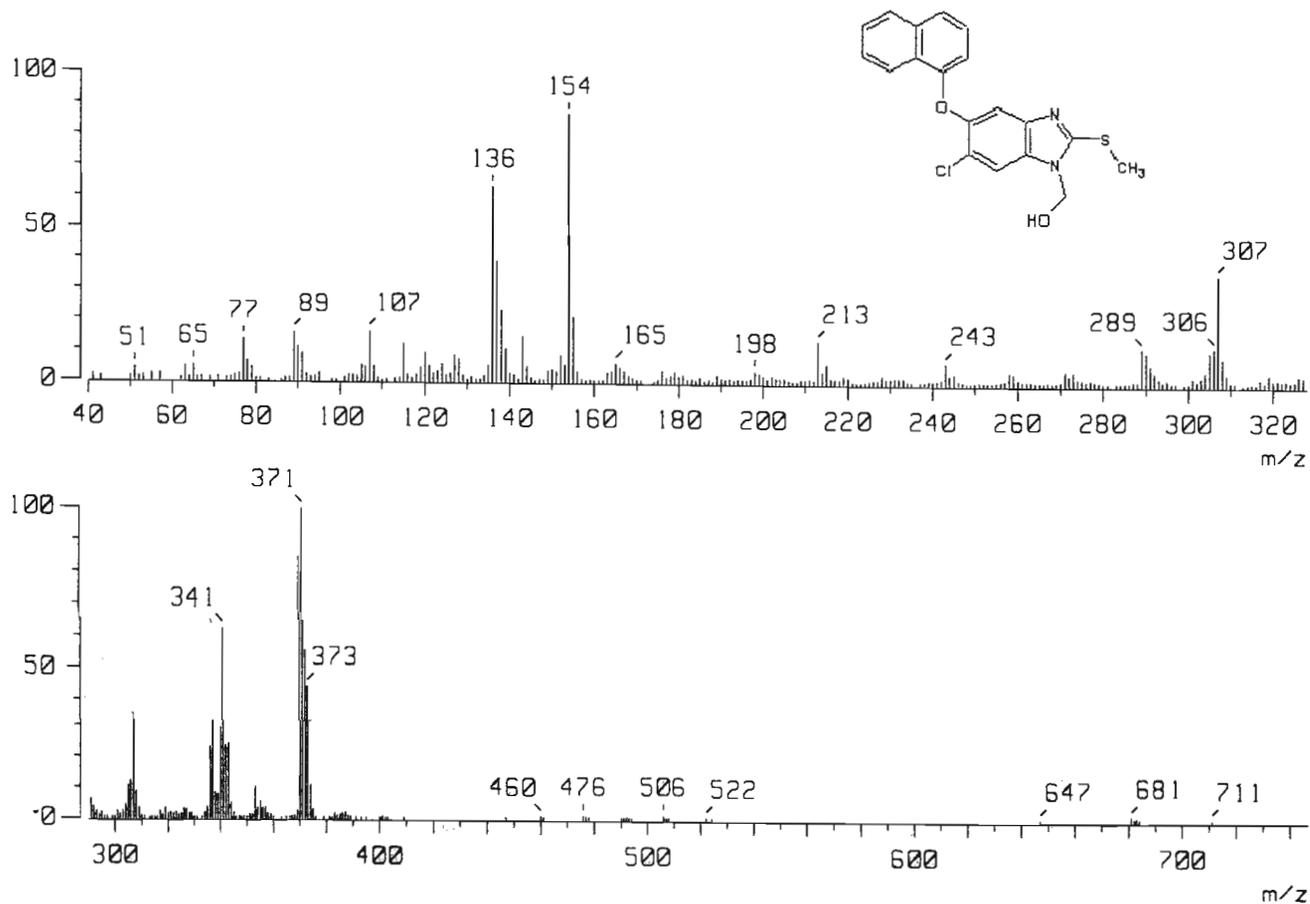
A.1.18 Espectro IR **ARM-7** (KBr, cm⁻¹)



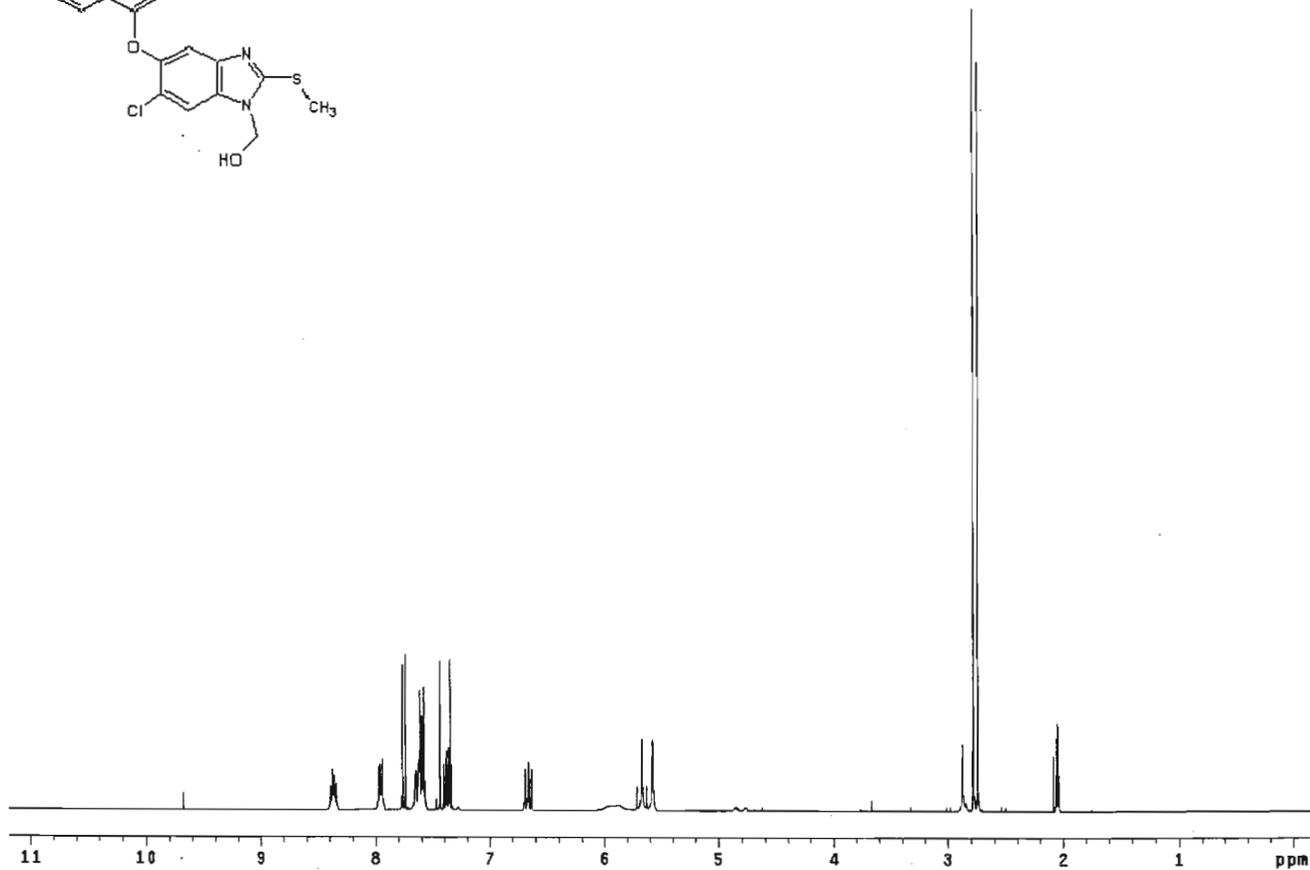
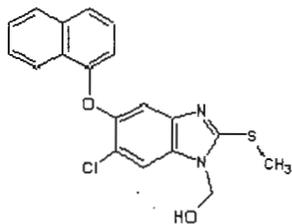
A.1.19 Espectrometría de masas **ARM-7** (FAB m/z)



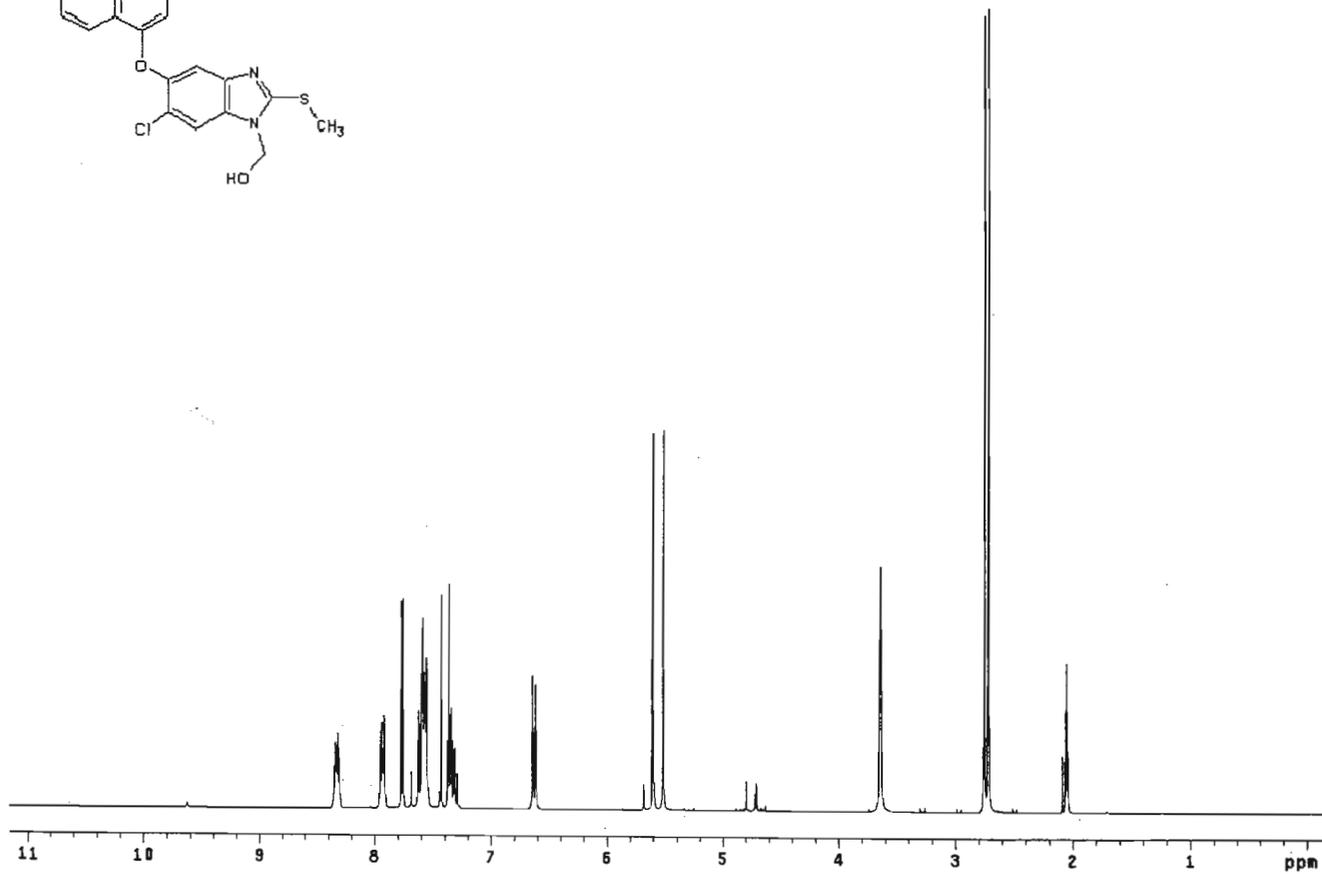
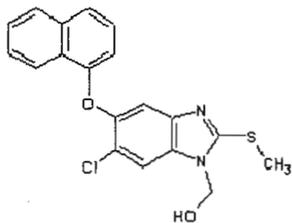
A.1.20 Espectro IR **ARM-8** (KBr, cm⁻¹)



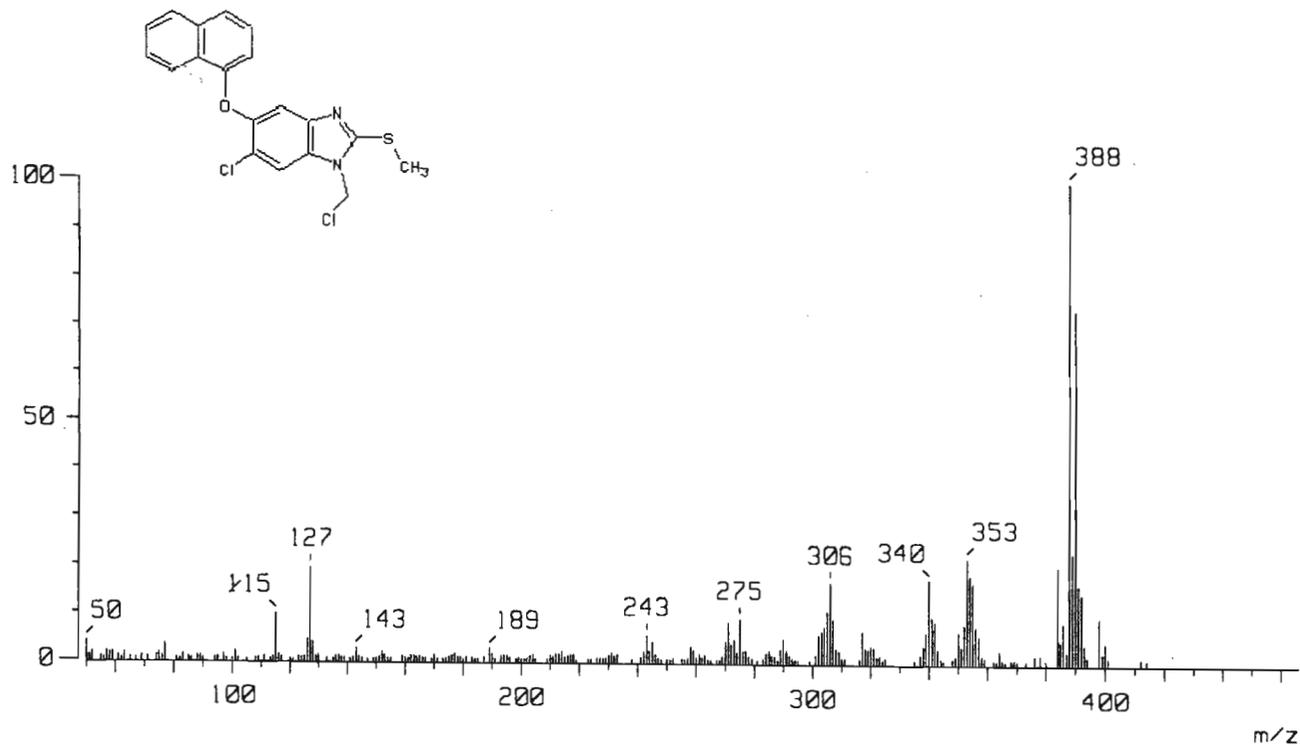
A.1.21 Espectrometría de masas **ARM-8** (FAB m/z).

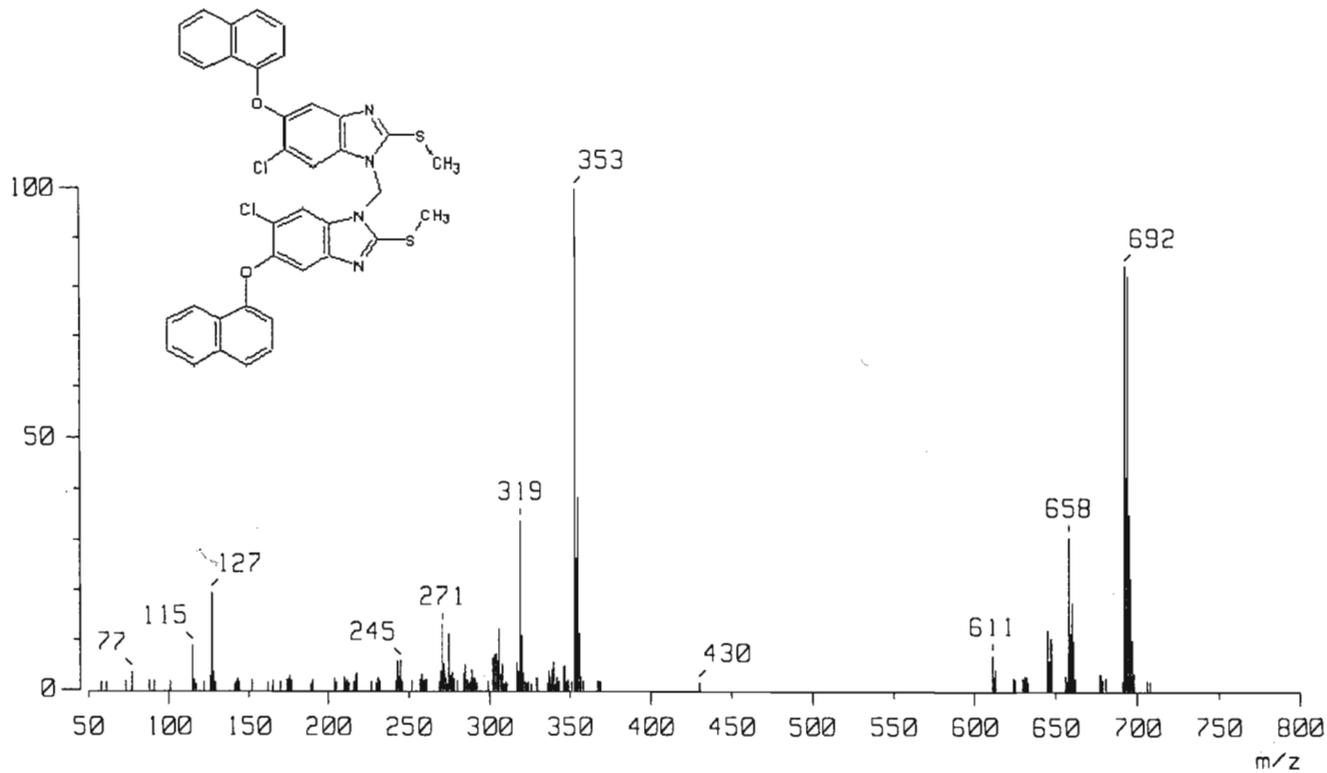


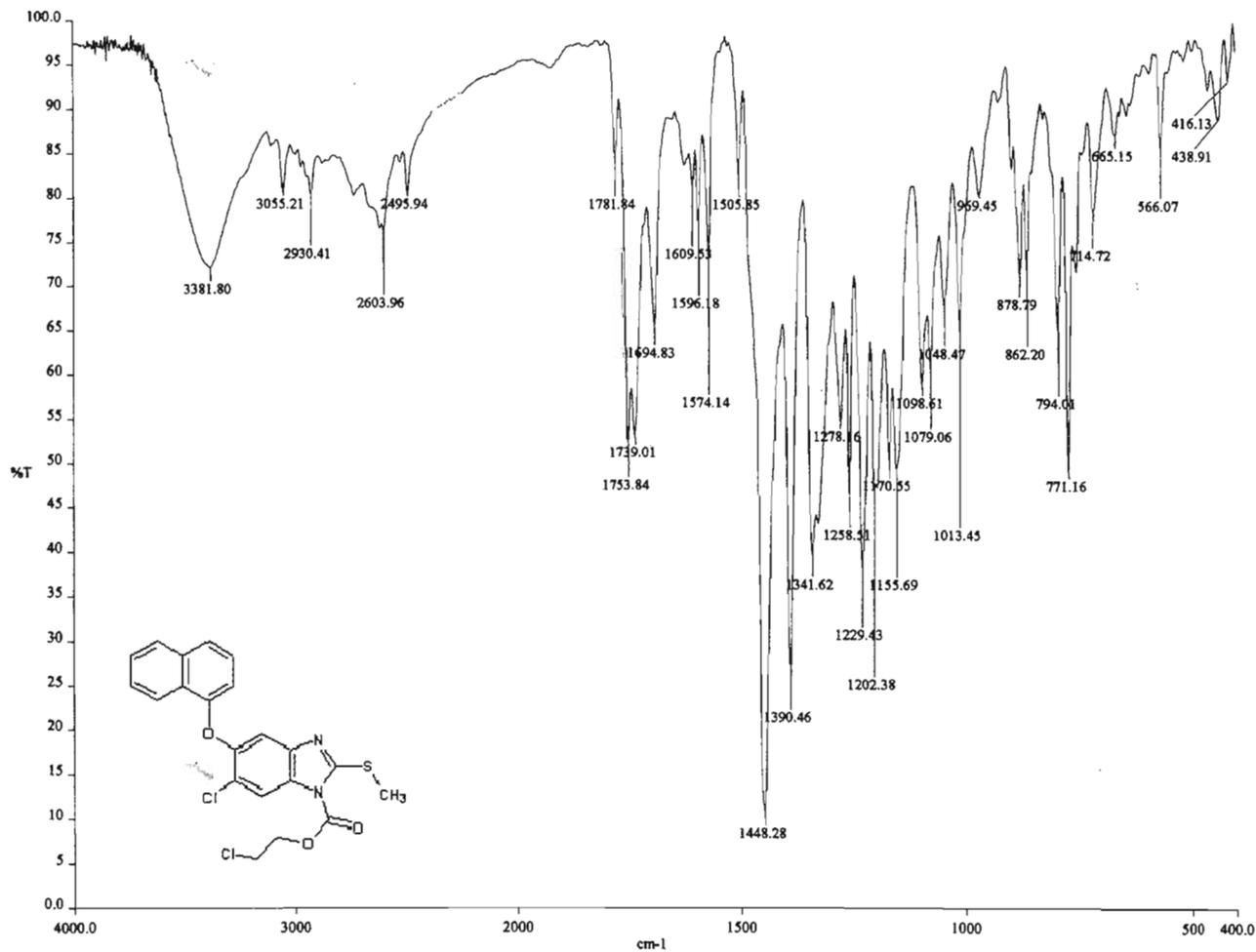
A.1.22 Espectro RMN ¹H **ARM-8** (TMS, Acetona-d₆; ppm)



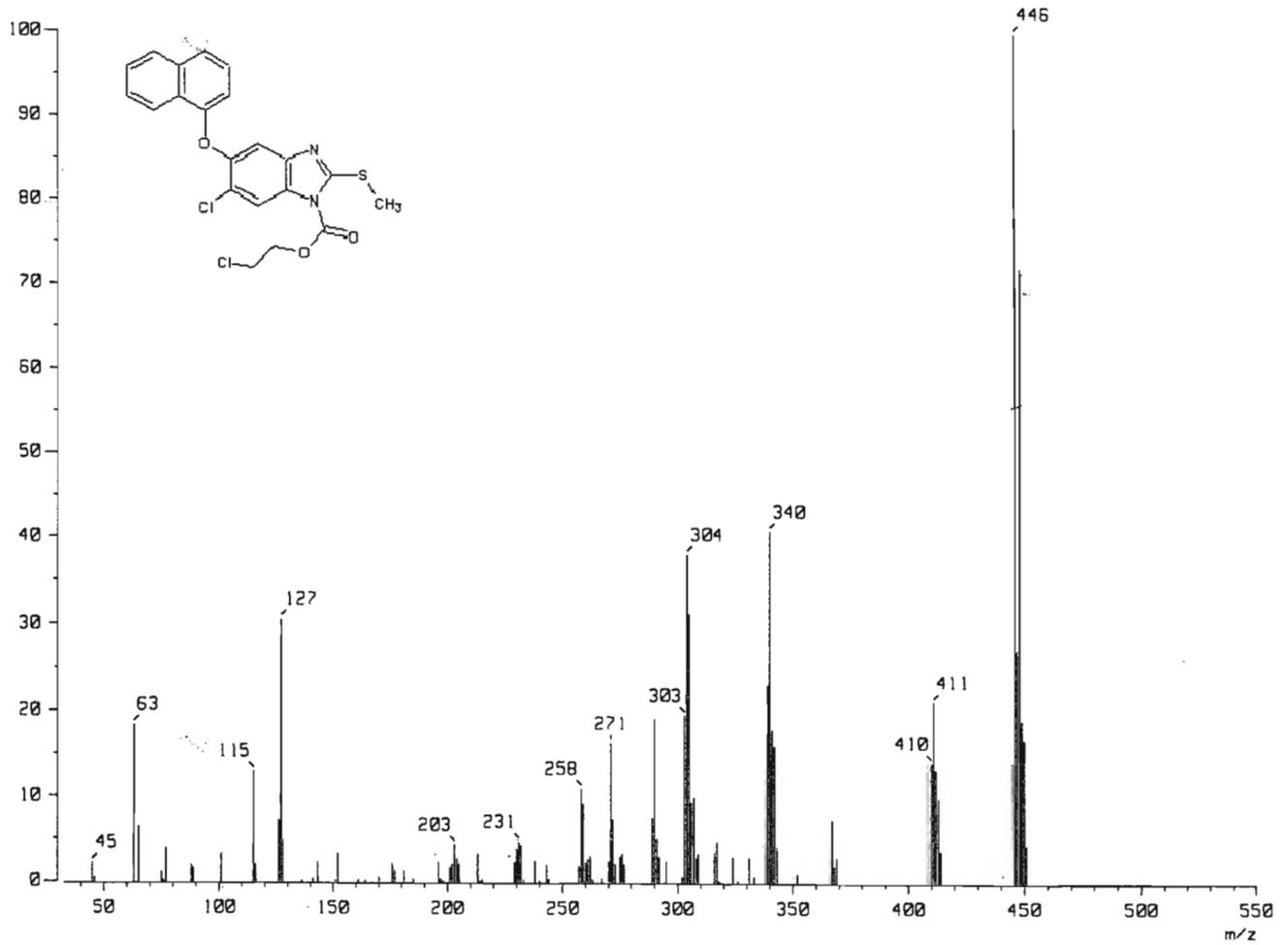
A.1.23 Espectro RMN ^1H **ARM-8** intercambio D_2O (TMS, Acetona- d_6 ; ppm)



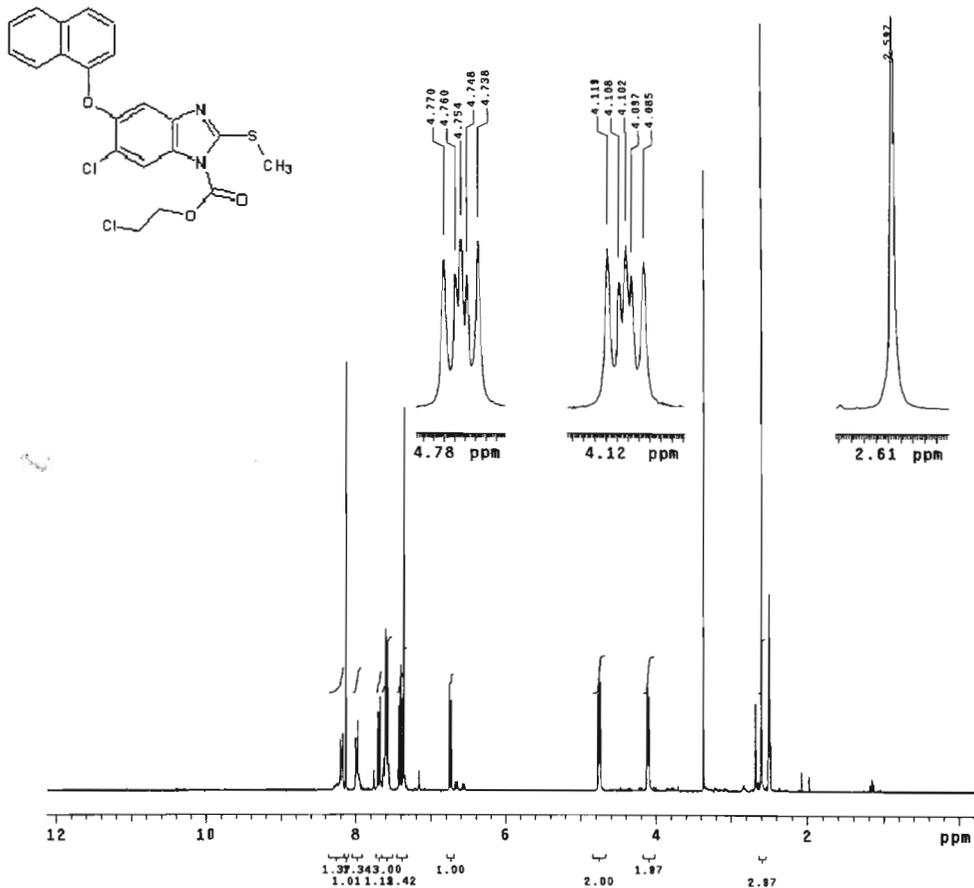




A.1.26 Espectro IR **ARM-10** (KBr, cm⁻¹)

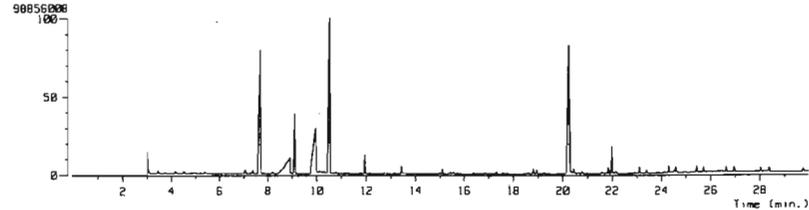


A.1.27 Espectrometría de masas **ARM-10** (IE/ID; m/z)

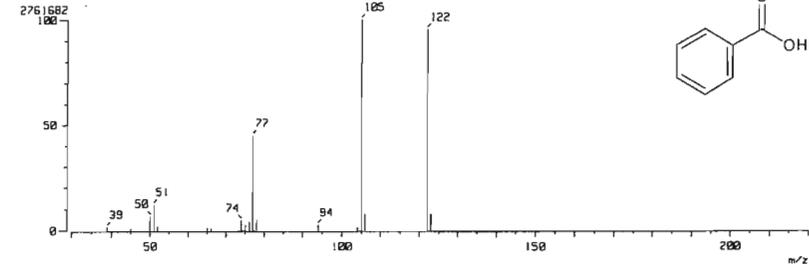


A.1.28 Espectro $^1\text{H-RMN}$ **ARM-10** (TMS, DMSO-d_6 ; ppm).

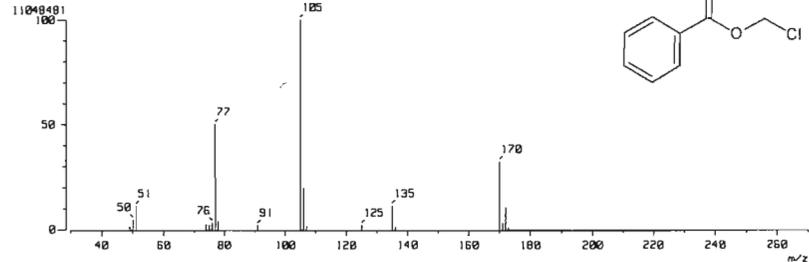
[TIC]
 Data : 07873_MEZ-EST_002
 Sample :
 Note :
 Inlet : GC Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 29.99 min



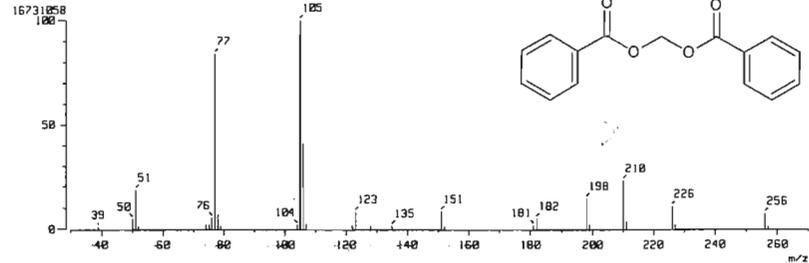
[Mass Spectrum]
 RT : 8.85 min Scan# : (623,630)-k((573,585))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 263.37



[Mass Spectrum]
 RT : 10.46 min Scan# : (739,742)-k((719,727)+(761,773))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 1053.67

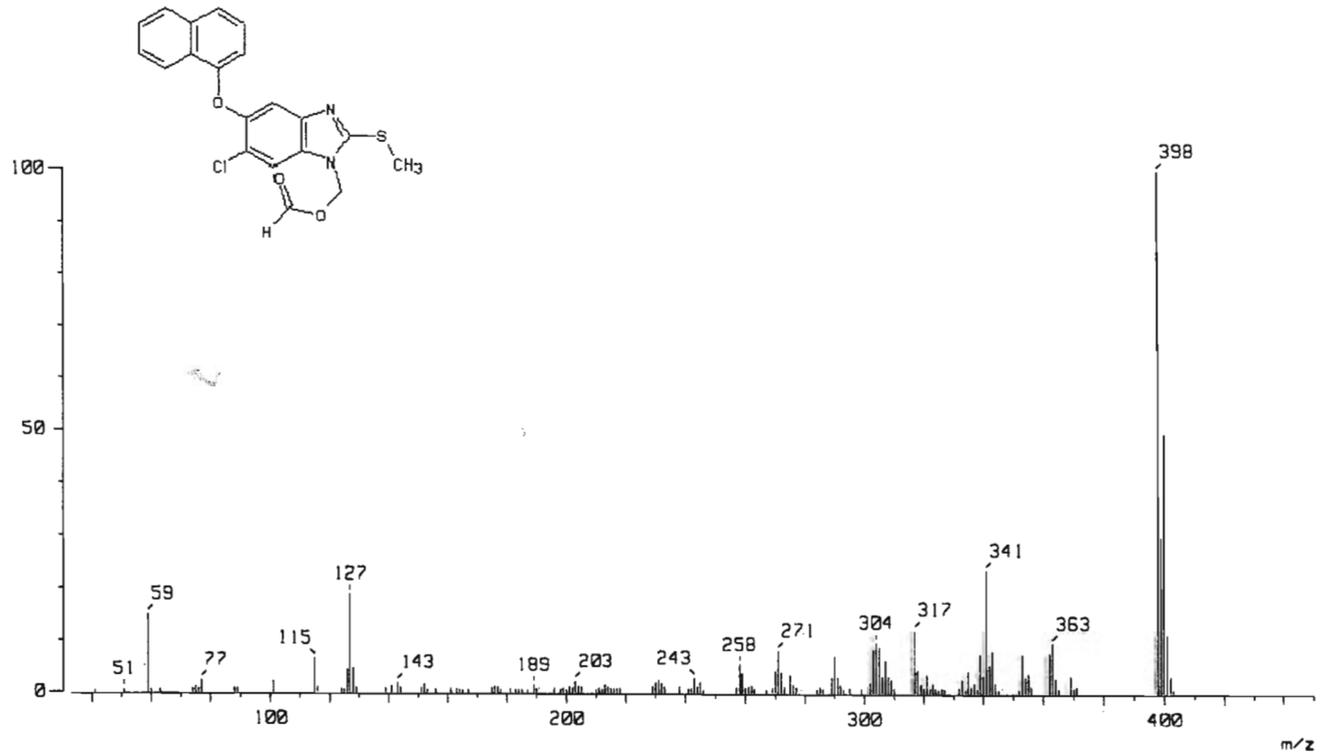


[Mass Spectrum]
 RT : 20.22 min Scan# : (1428,1433)-k((1343,1394)+(1486,1518...
 Ion Mode : EI+ Int. : 1595.60

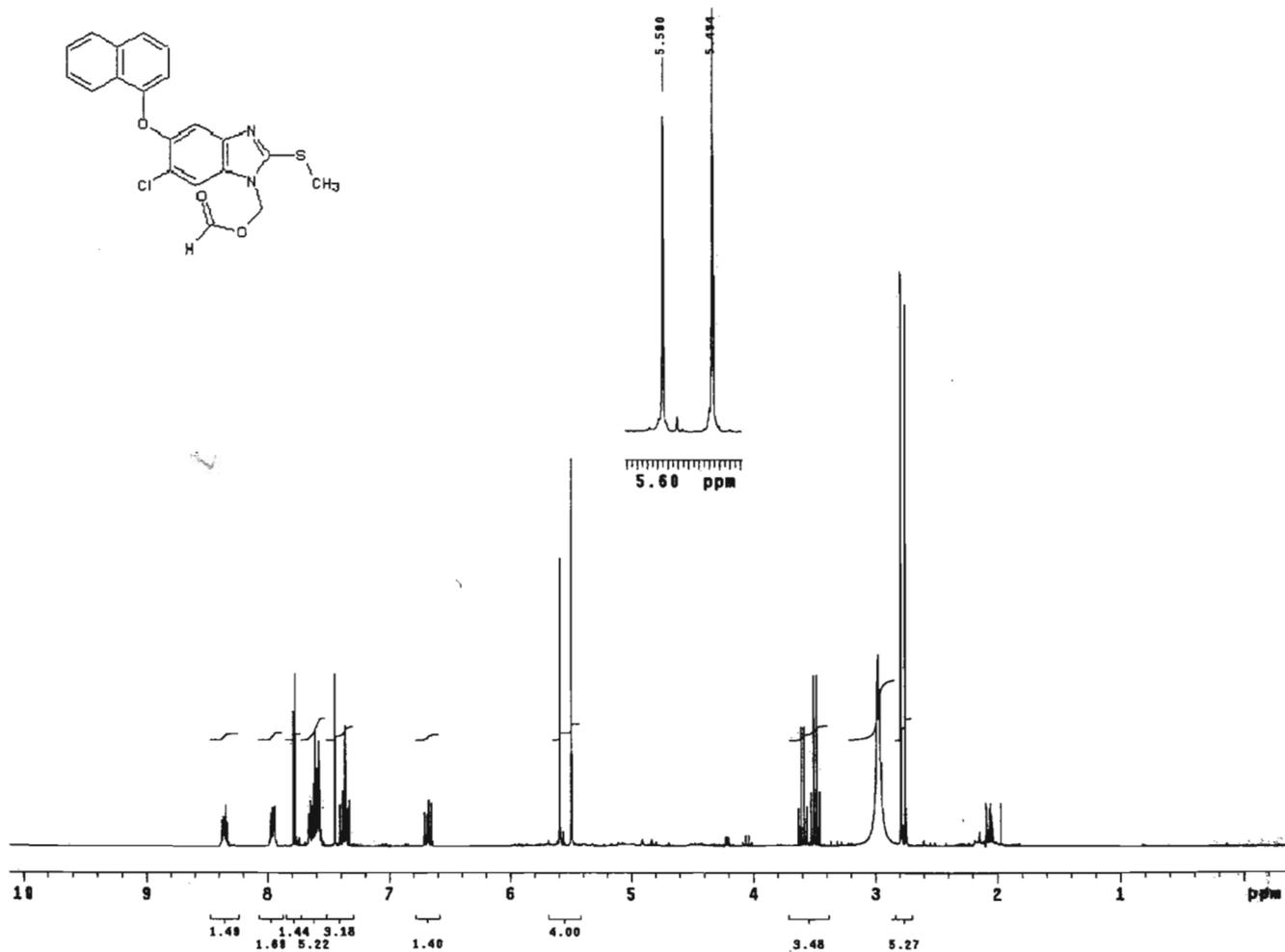
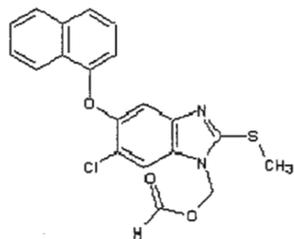


A.1.29 Espectrometría de masas reacción modelo. Benzoato de clorometilo (IE/CG; m/z).





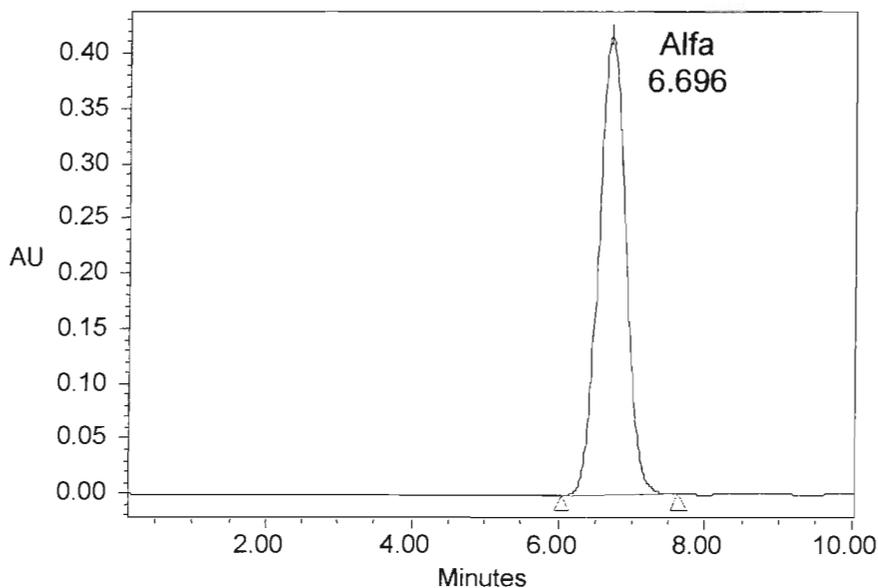
A.1.30 Espectrometría de masas formilación de **ARM-8** (IE/CG; m/z)



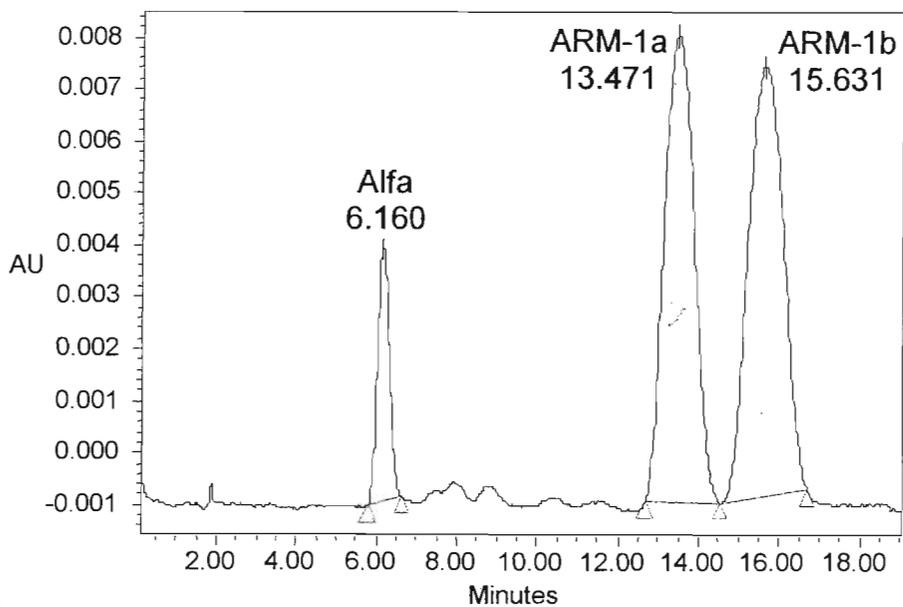
A.1.31 Espectro RMN ^1H formilación de **ARM-8** (TMS, Acetona- d_6 , ppm).

A.2. Evaluación de la estabilidad y solubilidad de los compuestos ARM-1 a 7

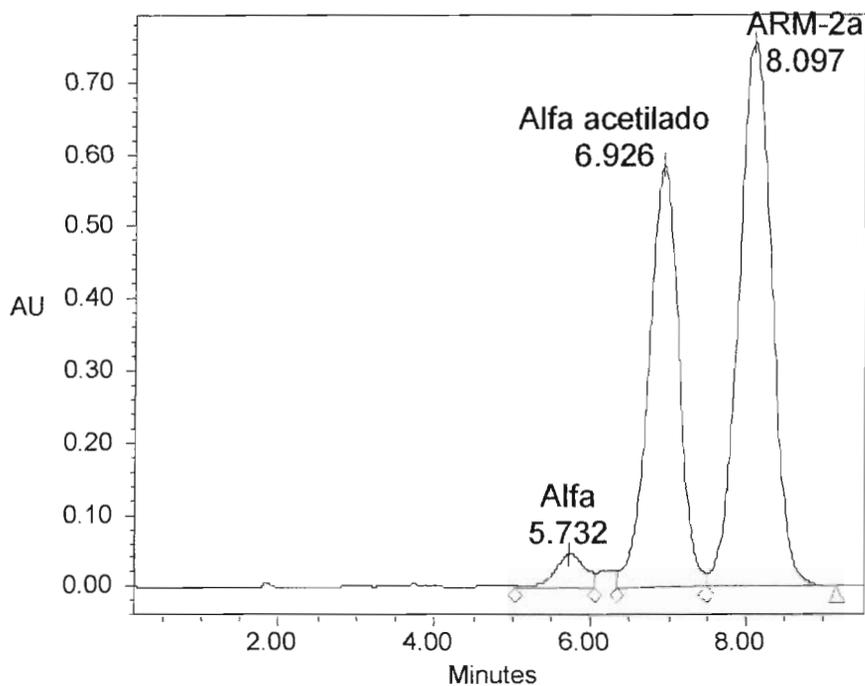
A.2.1 Cromatograma representativo compuesto Alfa



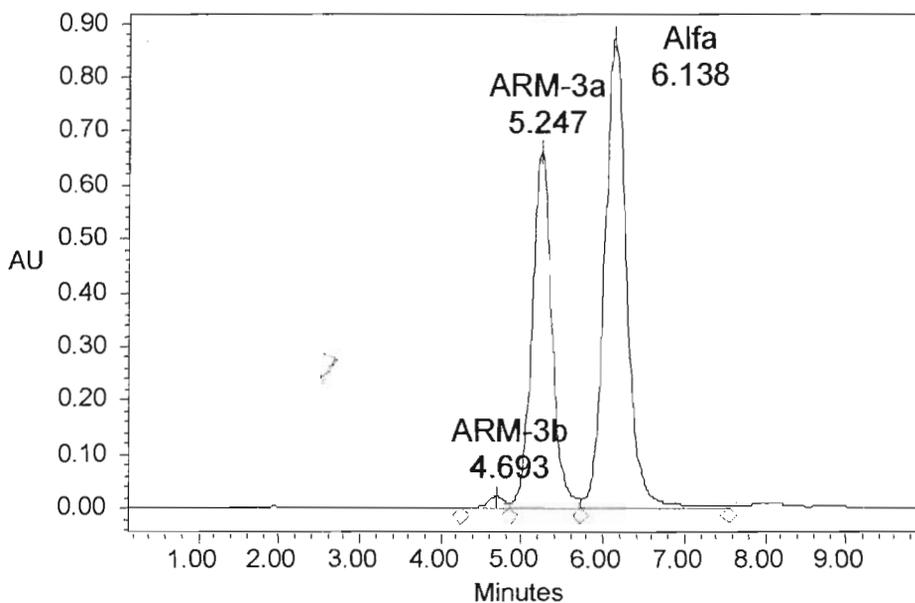
A.2.2 Cromatograma representativo ARM-1



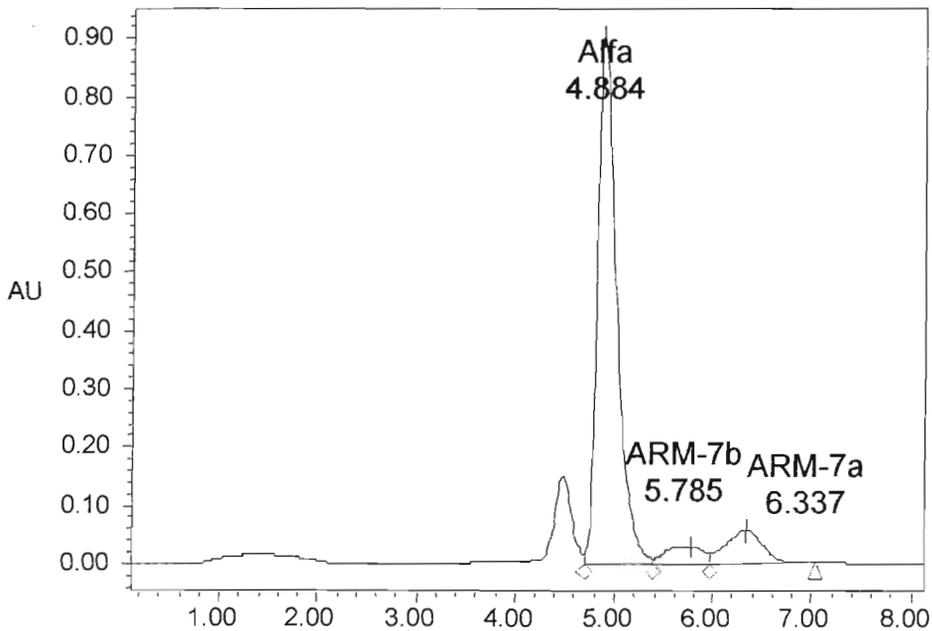
A.2.3 Cromatograma representativo **ARM-2**



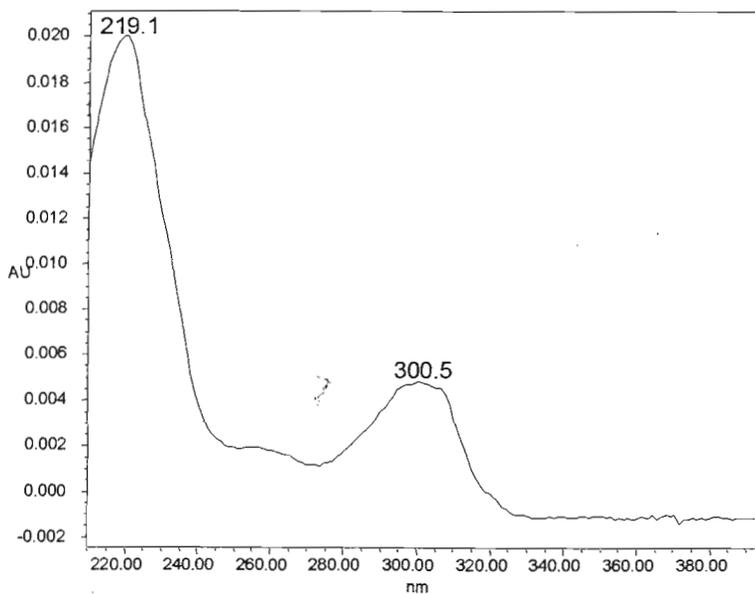
A.2.4 Cromatograma representativo **ARM-3**



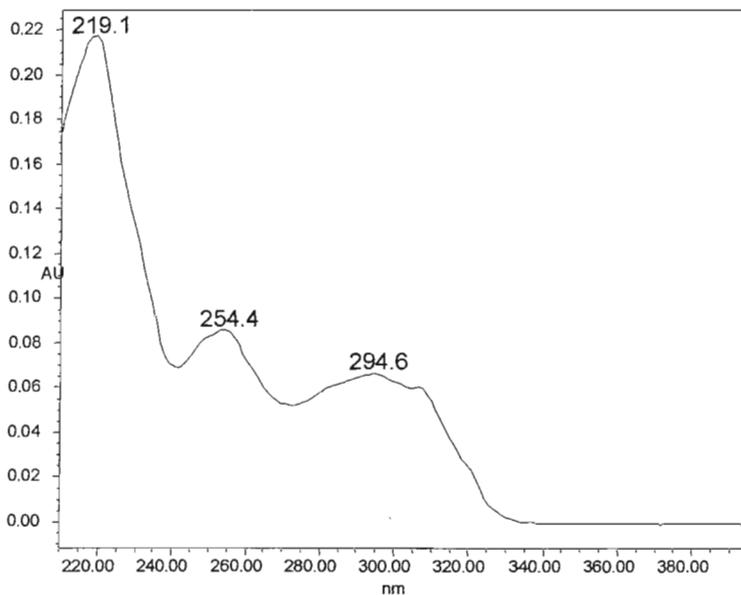
A.2.5 Cromatograma representativo **ARM-7**



A.2.6 Espectro UV compuesto Alfa



A.2.7 Espectro UV compuesto Alfa acetilado



A.2.8 Espectro UV **ARM-2**

