



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD TAENIACIDA DE UN DERIVADO HIDROSOLUBLE FOSFONOOXIMETIL
BENCIMIDAZÓLICO**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB JOSÉ LUIS ZAVALA SALGADO

DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

CDMX, OCTUBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD TAENIACIDA DE UN DERIVADO HIDROSOLUBLE FOSFONOOXIMETIL
BENCIMIDAZÓLICO**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB JOSÉ LUIS ZAVALA SALGADO



Ciudad de México, octubre 2018

JURADO DESIGNADO

Presidente	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Lilián Yepez Mulia	IMSS-Centro Médico Siglo XXI
Vocal	Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha	Facultad de Química, UNAM

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

La mayor parte del presente trabajo se realizó en el laboratorio 122 (L-122). Conjunto E. Departamento de Farmacia. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra. Adicionalmente, los estudios analíticos se realizaron en este mismo departamento, laboratorio 112 (L-112), bajo la dirección de la Dra. Helgi Jung Cook.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la excelencia en formación de profesionales y ciudadanos que impulsen el desarrollo científico, tecnológico, económico y social de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría. Número de becario: 604079.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por adoptar el papel de tutor y líder. Su amplia experiencia, profesionalismo, sabiduría y entusiasmo por formar profesionales de la química contribuyó extensamente en la conclusión de la tesis.

A los apreciables miembros del Jurado por sus honorables juicios y valiosas recomendaciones para enriquecer este trabajo.

A la Dra. María Alicia Hernández Campos por colaborar activamente en el desarrollo del proyecto y por fungir como actor intelectual de la serie de compuestos híbridos de praziquantel con bencimidazol. Sus consejos a lo largo de mi trayectoria académica y profesional fueron claves para el éxito.

A la DGAPA-PAPIIT por el financiamiento del proyecto “Síntesis y actividad antiparasitaria de derivados hidrosolubles de bencimidazoles activos” (IN221416). Esta tesis forma parte de los objetivos de este proyecto.

A la Dra. Helgi Helene Francisca Jung Cook por facilitar el uso de las instalaciones de su laboratorio (L-112) para la determinación de la solubilidad termodinámica.

A la Dra. Francisca Palomares Alonso; miembro del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por la realización de las pruebas de actividad biológica en ratones.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación: Marisela Gutiérrez Franco y Margarita Guzmán Villanueva por la obtención de los espectros de infrarrojo y el análisis de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría masas. A Nayeli López Balbiaux y Rosa Isela del Villar por la determinación de los espectros de resonancia magnética nuclear a temperatura variable.

Al personal técnico del Instituto de Química Luis Velasco Ibarra, Carmen García González y Javier Pérez Flores por la realización de la espectrometría de masas.

A la Facultad de Química por adentrarme en el maravilloso mundo de la ciencia y darme las bases sobre las que construiré mi futuro profesional.

Al Dr. Miguel Flores Ramos por colaborar y compartir su experiencia en la síntesis de derivados fosfonooximetilo, también por su amistad y apoyo.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Jorge Victoria, Elkin Sanabria, Diego Cruz, Jaime Martínez, Francisco Barrera, Diana Prado, Sebastián Huerta, Gustavo Rico, Lucía Cano y Pedro Trejo. Por compartir experiencias y consejos que amenizaban el ambiente laboral.

A Marisol Ramírez Yautentzi por ser uno de los pilares más importantes de mi vida personal y profesional.

A mis amigos Pablo González, Teodoro Ortiz, Braulio Fitz, Abraham Castro, Jaqueline Pérez, Sol Castrejón, Daniela Ramírez, Roberto Saenz, Emilia Schneider, Daniela Vidals, Rubí Mireles y Alejandra Puerto, por el apoyo incondicional en todos estos años y cada uno acontecimientos que hemos compartido y me han hecho crecer como ser humano.

DEDICATORIA

A Carmen Salgado Gutiérrez

Cuando un hijo impulsa el motor de la vida, el amor y sabiduría de una madre trascienden más allá de la existencia.

Te amo

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
M^+	Ion molecular radical catión
$[M+H]^+$	Aducto ion molecular más hidrógeno
$[M-H]^-$	Aducto ion molecular menos hidrógeno
~	Aproximadamente
°C	Grado Celsius
1D	Unidimensional
1x, 2x, ..., nx	Una vez, dos veces, ... n veces
2D	Bidimensional
ABZ	Albendazol
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
Ar	Aromático
AR	Abundancia relativa
CCF	Cromatografía analítica de capa fina
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CMC	Carboximetilcelulosa
CV%	Porcentaje del coeficiente de variación
Cy	Ciclohexano
d	Señal doble
DART	<i>Direct analysis in real time</i> (Análisis Directo en Tiempo Real)
DBLTA	Ácido di-benzoil-L-tartárico
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución

ej.	Por ejemplo, ejemplo
eq.	Equivalentes químicos
FAB	<i>Fast atom bombardment</i> (Bombardeo de átomos rápidos)
FT-IR	Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier
g	Gramo
h	Hora
HPLC-MS	<i>High performance liquid chromatography-mass spectrometry</i> (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas)
Hz	Hertz
IE	Impacto electrónico
in ²	Pulgada cuadrada
IR	Infrarrojo
IV	Intravenosa
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litro
lb	Libra
m	Señal múltiple
M	Molar
m/v	Relación masa/volumen
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
N	Normal
NA	No aplica
NCC	Neurocisticercosis
ND	No determinado
Ni-Raney	Níquel Raney

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

NM	Masa nominal
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
NMM	N-metilmorfolina
P.eb.	Punto de ebullición
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction-Restriction fragment lenght polymorphism</i> (Reacción en cadena de la polimerasa-Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción)
PEG	Polietilenglicol
Pf.	Punto de fusión
pH	Potencial hidrógeno
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
PVP	Polivinilpirrolidona
PyBOP®	Benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato
PZQN	Praziquanamina
PZQtel	Praziquantel
q	Señal cuádruple
r ²	Coefficiente de correlación al cuadrado
Redox	Óxido-reducción

R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple
SA	Solución (es) amortiguadora (s)
SAB	Solución amortiguadora de boratos
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos
SCB	Sistema de clasificación biofarmacéutico
S _N 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
t	Señal triple
T	Temperatura
T.a	Temperatura ambiente
TCBZ	Triclabendazol
t _r	Tiempo de retención
tx.	Tratamiento
v/v	Relación volumen/volumen
VS	Contra
w/w	Relación peso/peso
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μ	Micro [1x10 ⁻⁶]-
μg, μL	Microgramo, microlitro

TABLA DE CONTENIDO GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES	14
<i>2.1. Epidemiología de la taeniasis y la cisticercosis</i>	<i>14</i>
<i>2.2. Taeniasis y cisticercosis. Fisiopatología.....</i>	<i>15</i>
<i>2.3. T. crassiceps como modelo animal para evaluación de fármacos</i>	<i>18</i>
<i>2.4. Tratamiento farmacológico.....</i>	<i>18</i>
2.4.1. Vacunas para tratar cisticercosis porcina.....	20
<i>2.5. Praziquantel</i>	<i>20</i>
2.5.1.1. Mecanismo de acción.....	20
2.5.1.2. Solubilidad y sistema de clasificación biofarmacéutico	22
2.5.1.3. Síntesis.....	23
<i>2.6. Requerimientos estructurales de los bencimidazoles como antiparasitarios</i>	<i>25</i>
2.6.1. Híbridos de PZQtel con bencimidazoles como una alternativa de tratamiento contra parasitosis tisulares.....	26
<i>2.7. Estrategias para aumentar la solubilidad acuosa.....</i>	<i>29</i>
2.7.1. Profármacos	30
2.7.1.1. Derivados hidrosolubles tipo fosfonooximetil bencimidazólicos como profármacos biorreversibles .	30
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVO	35
<i>5.1. Objetivos particulares</i>	<i>35</i>
6. METODOLOGÍA	36
<i>6.1. Parte química.....</i>	<i>36</i>
<i>6.2. Determinación de la solubilidad acuosa de (R)-PZQ-BZ y JOULZ-PRO.....</i>	<i>39</i>
<i>6.3. Evaluación de la actividad cisticida in vivo.....</i>	<i>40</i>
6.3.1. Análisis estadístico	41
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
<i>7.1. Parte química.....</i>	<i>42</i>
7.1.1. Síntesis del ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10).....	42

7.1.2.	Síntesis de (11b <i>R</i>)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((<i>R</i>)-PZQN).....	45
7.1.3.	Síntesis de JOULZ-PRO	52
7.1.3.1.	Síntesis de fosfato de di- <i>terc</i> -butilclorometilo (20)	52
7.1.3.2.	Síntesis de (<i>R</i>)-PZQ-BZ.....	54
7.1.3.3.	Síntesis de los compuestos fosfonooximetilo	61
7.2.	Solubilidad termodinámica de (<i>R</i>)-PZQ-BZ y JOULZ-PRO.....	67
7.3.	Actividad cisticida in vivo de JOULZ-PRO.....	71
8.	CONCLUSIONES.....	74
9.	REFERENCIAS	75
10.	APÉNDICE A. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	81
10.1.	INSTRUMENTACIÓN	81
10.2.	SÍNTESIS QUÍMICA.....	83
10.2.1.	2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).....	83
10.2.2.	4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3).....	83
10.2.3.	4-Acetilamino-2-clorobenzoato de metilo (4).....	84
10.2.4.	4-Acetilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).....	84
10.2.5.	4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6). Hidrólisis básica.....	85
10.2.6.	4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6). Hidrólisis ácida	86
10.2.7.	4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (7).....	86
10.2.8.	6-Cloro-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (8).....	87
10.2.9.	6-Cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9).....	87
10.2.10.	Ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10)	88
10.2.11.	2-Cloro- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (13).....	88
10.2.12.	2-[(2,2-Dimetoxietil)amino]- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (15)	89
10.2.13.	Clorhidrato de 2,2-dimetoxi- <i>N</i> -{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamonio (16)	90
10.2.14.	(<i>R/S</i>)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((<i>R/S</i>)-PZQN).....	90
10.2.15.	Resolución racémica de la praziquanamina. (11b <i>R</i>)-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-2-ilo (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-bis(benzoiloxi)-3-carboxipropanoato ((<i>R</i>)-PZQN-DBLTA).....	91
10.2.16.	Formación de la base libre ((<i>R</i>)-PZQN).....	92
10.2.17.	Fosfato monoácido de di- <i>terc</i> -butilo (18)	92
10.2.18.	Di- <i>terc</i> -butilfosfato de tetrametilamonio (19)	93
10.2.19.	Fosfato de di- <i>terc</i> -butilclorometilo (20).....	93
10.2.20.	(11b <i>R</i>)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((<i>R</i>)-PZQ-BZ).....	94
10.2.21.	Fosfato de (11b <i>R</i>)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-2-carbonil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il)metil) di- <i>terc</i> -butilo (JZ-21a) y fosfato de (11b <i>R</i>)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-2-carbonil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il)metil) di- <i>terc</i> -butilo (JZ-21b)	95

10.2.22. Fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1- α]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (JZ-22a) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1- α]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (JZ-22b).....	96
10.2.23. Fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1- α]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1- α]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (JOULZ-PRO).....	97
10.3. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA DE (R)-PZQ-BZ Y JOULZ-PRO	98
10.3.1. Preparación de las soluciones amortiguadoras.....	98
10.3.2. Ensayo de solubilidad cinética de JOULZ-PRO	98
10.3.3. Curva patrón del precursor (R)- PZQ-BZ	99
10.3.4. Curva patrón del profármaco JOULZ-PRO	101
10.3.5. Determinación de la solubilidad termodinámica por el método de <i>Shake Flask</i>	102
11. APÉNDICE B. ESPECTROS	104

TABLA DE CONTENIDO DE FIGURAS, TABLAS, ESQUEMAS Y ESPECTROS

TABLAS

Tabla 2.1. Diferencias morfológicas entre *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* 16

Tabla 2.2. Argumentos a favor y en contra del uso de quimioterapia para la NCC..... 19

Tabla 2.3. Actividad de los compuestos **VIII-XI** contra la larva muscular de *T. spiralis* 27

Tabla 2.4. Actividad cisticida *in vitro* de compuestos híbridos de PZQtel con bencimidazoles..... 28

Tabla 2.5. Actividad antiprotozoaria de compuestos híbridos de PZQtel con 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazoles... 28

Tabla 7.1. Resultados de la síntesis del ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**)..... 43

Tabla 7.2. Resultados de la síntesis de la (**R**)-PZQN..... 46

Tabla 7.3. Constantes de acoplamiento de los hidrógenos de la posición 11b y 1 de (**R**)-PZQN 50

Tabla 7.4. Constantes de acoplamiento de los hidrógenos de la posición 6 y 7 de (**R**)-PZQN 50

Tabla 7.5. Optimización de las condiciones de reacción para obtener **JZ-21ab** 62

Tabla 7.6. Resumen de desplazamientos químicos en ppm de (**R**)-PZQ-BZ, **JZ-21ab**, **JZ-22ab** y **JOULZ-PRO** 66

Tabla 7.7. Resultados de la solubilidad al equilibrio de (**R**)-PZQ-BZ y **JOULZ-PRO** 70

Tabla 7.8. Actividad cisticida de **JOULZ-PRO**, **PZQtel** y **ABZ** 72

Tabla 10.1. Sistemas de elución para CCF..... 82

Tabla 10.2. Estudio de solubilidad cinética de **JOULZ-PRO**..... 98

Tabla 10.3. Preparación de la curva patrón de (**R**)-PZQ-BZ 99

Tabla 10.4. Curva patrón de (**R**)-PZQ-BZ en SAF..... 99

Tabla 10.5. Curva patrón de (**R**)-PZQ-BZ en SAB..... 100

Tabla 10.6. Preparación de la curva patrón de **JOULZ-PRO**..... 101

Tabla 10.7. Curva patrón de **JOULZ-PRO** en SAF..... 101

Tabla 10.8. Curva patrón de **JOULZ-PRO** en SAB 102

Tabla 10.9. Solubilidad termodinámica de (**R**)-PZQ-BZ..... 103

Tabla 10.10. Solubilidad termodinámica de **JOULZ-PRO** 103

FIGURAS

Figura 2.1. Prevalencia geográfica de *Taenia*..... 14

Figura 2.2. Anatomía de los cestodos. 15

Figura 2.3. Fases de crecimiento y anatomía de *T. solium*. 16

Figura 2.4. Ciclo de vida de *Taenia*..... 17

Figura 2.5. Fármacos taeniácidas. 19

Figura 2.6. Estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje y su función. 21

Figura 2.7. Bencimidazol como estructura privilegiada. 26

Figura 2.8. Profármacos tipo fosfonooximetilo. 31

Figura 2.9. Mecanismo de liberación de los ésteres de fosfato bencimidazólicos 32

Figura 5.1. Precursor (**R**)-PZQ-BZ y profármaco propuesto **JOULZ-PRO**..... 35

Figura 7.1. Regioisómeros derivados de la reacción 10.2.4 (Apéndice A) para obtener **5**. 44

Figura 7.2. Equilibrio tiourea-tiol.	44
Figura 7.3. Isómeros de rotación del compuesto 15	47
Figura 7.4. Secuencia de reacción para la formación de (R/S)-PZQN	48
Figura 7.5. Espectro HSQC de (R)-PZQN	49
Figura 7.6. Espectro COSY de (R)-PZQN	50
Figura 7.7. Resumen de desplazamientos químicos en ppm de (R)-PZQN	51
Figura 7.8. Fragmento más estable de (R)-PZQN en espectrometría de masas por IE.	52
Figura 7.9. Estructura del PyBOP.	55
Figura 7.10. Experimento de resonancia magnética nuclear de ¹ H a temperatura variable.	59
Figura 7.11. Espectro HSQC de (R)-PZQ-BZ a 26 °C.	60
Figura 7.12. Espectro COSY de (R)-PZQ-BZ a 170 °C.	60
Figura 7.13. Intermediario reactivo de Et ₃ N con el fosfato de di- <i>terc</i> -butilclorometilo (20).	61
Figura 7.14. Mezcla de regioisómeros JZ-22ab	64
Figura 7.15. Valores de pK _a para (R)-PZQ-BZ y JOULZ-PRO	68
Figura 7.16. Diagrama de distribución de especies en función del pH de JOULZ-PRO	69
Figura 7.17. Otros profármacos fosfonooximetil bencimidazólicos con aumento en la solubilidad acuosa.	71
Figura 7.18. Reducción del número de parásitos en ratones infectados con cisticercos de <i>T. crassiceps</i> después de 7 días de tratamiento con JOULZ-PRO , PZQtel y ABZ	72

ESQUEMAS

Esquema 2.1. Síntesis de praziquantel de Bayer-Merck (azul) y de Shin Poong (cian).	23
Esquema 2.2. Resolución de (R/S)-PZQtel vía la formación de carboxamidas.	24
Esquema 2.3. Transferencia de quiralidad en la síntesis de (R)-(-)-PZQtel	25
Esquema 6.1. Ruta de síntesis para obtener el ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10).	36
Esquema 6.2. Síntesis convergente de JOULZ-PRO	37
Esquema 6.3. Síntesis de la (R/S)-PZQN como mezcla racémica.	38
Esquema 6.4. Enriquecimiento del enantiómero (R)-PZQN	39
Esquema 7.1. Síntesis de 18 reportada por Zheng.	53
Esquema 7.2. Secuencia de reacción para la formación de amidas utilizando PyBOP.	56
Esquema 7.3. Paso limitante para maximizar la eficiencia de la ruta sintética para obtener JOULZ-PRO	61
Esquema 7.4. Equilibrio ácido-base que se presenta durante el análisis HPLC de JOULZ-PRO	64

CROMATOGRAMAS

Cromatograma 7.1. HPLC-MS del sólido aislado como (R)-PZQ-BZ	55
Cromatograma 7.2. HPLC-MS de (R)-PZQ-BZ	56
Cromatograma 7.3. HPLC-MS de JZ-21ab	63
Cromatograma 7.4. HPLC-MS de JOULZ-PRO	65

GRÁFICOS

Gráfico 10.1. Curva patrón de (R)-PZQ-BZ en SAF.....	99
Gráfico 10.2. Curva patrón de (R)-PZQ-BZ en SAB.....	100
Gráfico 10.3. Curva patrón de JOULZ-PRO en SAF.....	101
Gráfico 10.4. Curva patrón de JOULZ-PRO en SAB.....	102

ESPECTROS

Espectro 11.1. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).....	104
Espectro 11.2. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).....	105
Espectro 11.3. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3).....	106
Espectro 11.4. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3).....	107
Espectro 11.5. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) de compuesto 4-acetilamino-2-clorobenzoato de metilo (4).....	108
Espectro 11.6. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 4-acetilamino-2-clorobenzoato de metilo (4).....	109
Espectro 11.7. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) de compuesto 4-acetilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).....	110
Espectro 11.8. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 4-acetilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).....	111
Espectro 11.9. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) de compuesto 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).....	112
Espectro 11.10. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).....	113
Espectro 11.11. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) de compuesto 6-cloro-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (8).....	114
Espectro 11.12. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 6-cloro-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (8).....	115
Espectro 11.13. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) de compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9).....	116
Espectro 11.14. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9).....	117
Espectro 11.15. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) de compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10).....	118
Espectro 11.16. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10).....	119
Espectro 11.17. EM (IE, <i>m/z</i>) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10)...	120
Espectro 11.18. RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto 2-cloro- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (13)....	121

Espectro 11.19. RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto 2-cloro- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (13)...	122
Espectro 11.20. EM (IE, <i>m/z</i>) del compuesto 2-cloro- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (13)	123
Espectro 11.21. RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto 2-[(2,2-dimetoxietil)amino]- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (15)	124
Espectro 11.22. RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto 2-[(2,2-dimetoxietil)amino]- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (15)	125
Espectro 11.23. EM (DART ⁺ , <i>m/z</i>) del compuesto 2-[(2,2-dimetoxietil)amino]- <i>N</i> -(2-feniletil)acetamida (15)...	126
Espectro 11.24. RMN ¹ H (600 MHz, D ₂ O, δ en ppm) del compuesto clorhidrato de 2,2-dimetoxi- <i>N</i> -{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamonio (16).....	127
Espectro 11.25. RMN ¹³ C (150 MHz, D ₂ O, δ en ppm) del compuesto clorhidrato de 2,2-dimetoxi- <i>N</i> -{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamonio (16).....	128
Espectro 11.26. EM (IE, <i>m/z</i>) del compuesto clorhidrato de 2,2-dimetoxi- <i>N</i> -{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamonio (16).....	129
Espectro 11.27. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto (11 <i>bR</i>)-1,2,3,6,7,11 <i>b</i> -hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((R)- PZQN)	130
Espectro 11.28. RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto (11 <i>bR</i>)-1,2,3,6,7,11 <i>b</i> -hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((R)- PZQN)	131
Espectro 11.29. EM (IE, <i>m/z</i>) del compuesto (11 <i>bR</i>)-1,2,3,6,7,11 <i>b</i> -hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((R)- PZQN)	132
Espectro 11.30. IR (ATR-FT, cm ⁻¹) del compuesto (11 <i>bR</i>)-1,2,3,6,7,11 <i>b</i> -hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((R)- PZQN)	133
Espectro 11.31. IR (ATR-FT, cm ⁻¹) del compuesto (<i>R/S</i>)-1,2,3,6,7,11 <i>b</i> -hexahidro-4 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-4-ona ((R/S)- PZQN)	134
Espectro 11.32. RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto (<i>R</i>)-4-oxo-1,3,4,6,7,11 <i>b</i> -hexahidro-2 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-2- <i>io</i> (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-bis(benzoiloxi)-3-carboxipropanoato ((R)- PZQN-DBLTA)	135
Espectro 11.33. RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto (<i>R</i>)-4-oxo-1,3,4,6,7,11 <i>b</i> -hexahidro-2 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>a</i>]isoquinolin-2- <i>io</i> (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-bis(benzoiloxi)-3-carboxipropanoato ((R)- PZQN-DBLTA)	136
Espectro 11.34. RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto fosfato monoácido de di- <i>terc</i> -butilo (18).....	137
Espectro 11.35. RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto fosfato monoácido de di- <i>terc</i> -butilo (18).....	138
Espectro 11.36. RMN ³¹ P (273 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ en ppm) del compuesto fosfato monoácido de di- <i>terc</i> -butilo (18).....	139
Espectro 11.37. RMN ¹ H (400 MHz, D ₂ O, δ en ppm) del compuesto di- <i>terc</i> -butilfosfato de tetrametilamonio (19)	140
Espectro 11.38. RMN ¹³ C (100 MHz, D ₂ O, δ en ppm) del compuesto di- <i>terc</i> -butilfosfato de tetrametilamonio (19).....	141
Espectro 11.39. RMN ³¹ P (273 MHz, D ₂ O, δ en ppm) del compuesto di- <i>terc</i> -butilfosfato de tetrametilamonio (19).....	142
Espectro 11.40. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto fosfato de di- <i>terc</i> -butilclorometilo (20)	143
Espectro 11.41. RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto fosfato de di- <i>terc</i> -butilclorometilo (20)	144
Espectro 11.42. RMN ³¹ P (273 MHz, CDCl ₃ , δ en ppm) del compuesto fosfato de di- <i>terc</i> -butilclorometilo (20)	145

Espectro 11.43. RMN ¹H (170 °C, 400 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)..... 146

Espectro 11.44. RMN ¹H (26 °C, 400 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)..... 147

Espectro 11.45. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ) 148

Espectro 11.46. HPLC-MS (ESI⁺) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)..... 149

Espectro 11.47. EMAR (FAB⁺, *m/z*) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)..... 150

Espectro 11.48. IR (ATR-FT, cm⁻¹) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)..... 151

Espectro 11.49. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21a) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21b)..... 152

Espectro 11.50. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21a) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21b) 153

Espectro 11.51. RMN ³¹P (243 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21a) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21b) 154

Espectro 11.52. HPLC-MS (ESI⁺) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21a) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21b) 155

Espectro 11.53. EMAR (FAB⁺, *m/z*) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21a) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21b) 156

Espectro 11.54. IR (ATR-FT, cm⁻¹) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21a) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21b) 157

Espectro 11.55. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (JZ-22a) y fosfato diácido de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (JZ-22b) 158

Espectro 11.56. RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-

il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**) 159

Espectro 11.57. RMN ³¹P (243 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**) 160

Espectro 11.58. EM (FAB⁺, *m/z*) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**) 161

Espectro 11.59. EMAR (FAB⁺, *m/z*) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**) 162

Espectro 11.60. IR (ATR-FT, cm⁻¹) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**) 163

Espectro 11.61. RMN ¹H (600 MHz, D₂O, δ en ppm) del compuesto fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**) 164

Espectro 11.62. RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, δ en ppm) del compuesto fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**) 165

Espectro 11.63. RMN ³¹P (243 MHz, D₂O, δ en ppm) del compuesto fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**) 166

Espectro 11.64. HPLC-MS (ESI⁺) del compuesto fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)..... 167

Espectro 11.65. HPLC-MS (ESI⁻) del compuesto fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)..... 168

Espectro 11.66. EM (FAB⁺, *m/z*) del compuesto fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)..... 169

Espectro 11.67. EMAR (FAB⁺, *m/z*) del compuesto fosfato disódico de (11*bR*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11*bR*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)..... 170

Espectro 11.68. IR (ATR-FT, cm⁻¹) del compuesto fosfato disódico de (11*bR*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11*bR*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)..... 171

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias causadas por helmintos son un problema de salud pública en México y también a nivel mundial. Las opciones de tratamiento quimioterapéutico se enfocan a enfermedades del tracto gastrointestinal, y tienen poca o nula eficacia contra los parásitos o estadios de vida del mismo que se desarrollan en otros tejidos u órganos.

Particularmente, la neurocisticercosis y la cisticercosis, enfermedades causadas por el parásito *Taenia solium*, son parasitosis extraintestinales endémicas de poblaciones de Latinoamérica, África y Asia. La mayoría de los países con alta morbilidad y mortalidad se encuentran en vías de desarrollo económico y con servicios sanitarios deficientes. A pesar de los intentos de establecer medidas de prevención sanitarias y el uso de vacunas, los eventos de infección todavía mantienen cifras alarmantes. Actualmente, las opciones de tratamiento disponibles para el tratamiento de la cisticercosis y neurocisticercosis se limitan al albendazol (ABZ) y al praziquantel (PZQtel), ambos carecen de buena solubilidad acuosa lo que propicia periodos largos de tratamiento, dosis altas y baja eficacia; precisamente por su poca biodisponibilidad en el organismo.

Los derivados bencimidazólicos han demostrado ser efectivos contra distintos tipos de parásitos. Nuestro equipo de investigación ha desarrollado cientos de estos derivados y se han podido identificar los requerimientos estructurales para potenciar la actividad antihelmíntica. Recientemente, las carboxamidas bencimidazólicas han tomado popularidad, ya que presentan mayor solubilidad en agua que los derivados tipo carbamato (ABZ). Dentro de estas carboxamidas, está una nueva molécula resultado de la hibridación de la praziquanamina (farmacóforo del PZQtel) y un derivado 2-(metiltio)-bencimidazólico; **(R)-PZQ-BZ**. Desafortunadamente, carece de un buen perfil biofarmacéutico, lo que provocó baja eficacia en un estudio *in vitro* contra cisticercos de *T. crassiceps*.

Este trabajo contempla la síntesis de un profármaco biorreversible altamente hidrosoluble con actividad cisticida, lo anterior se logró después de derivar el compuesto **(R)-PZQ-BZ** introduciendo un grupo fosfonooximetilo en forma de sal disódica (**JOULZ-PRO**). Los resultados demostraron un aumento en la solubilidad de 1410 veces (1410x) respecto a su precursor (de 97.4 µg/mL a 137.3 mg/mL) y una eficacia cisticida de 27.41% en 7 días de tratamiento con una dosis de 10 mg/kg administrada por vía intramuscular, superando así la eficacia de los fármacos comerciales ABZ y PZQtel.

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología de la taeniasis y la cisticercosis

Los seres humanos son los únicos huéspedes definitivos de *Taenia solium*, *Taenia saginata* y *Taenia asiatica*; es decir, donde se desarrolla la fase adulta del parásito. A su vez, el cerdo es el principal huésped intermediario (donde se desarrolla la fase de metacestodo/larvaria) de *T. solium* y *T. asiatica*. Los metacestodos de estas especies además de alojarse en las vísceras (taeniasis), poseen tropismo por los tejidos muscular, ocular y subcutáneo (cisticercosis), además del tejido nervioso (neurocisticercosis).¹

La taeniasis y la cisticercosis son enfermedades endémicas en la mayor parte de Latinoamérica, África y algunos países asiáticos (**Figura 2.1**), la mayoría de estos se encuentra en vías de desarrollo económico y poseen insuficiencia de sus servicios sanitarios, a su vez, las malas costumbres en la crianza de ganado porcino, aumentan el riesgo de consumir carne u órganos infectados por *Taenia*.²

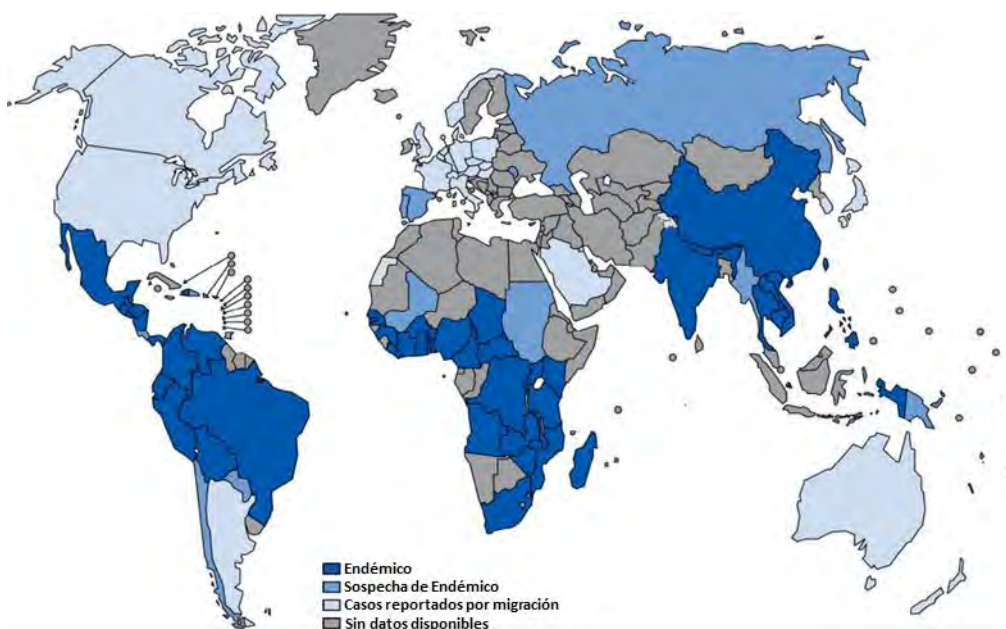


Figura 2.1. Prevalencia geográfica de *Taenia*.³

Aunque se sabe que los gusanos de la familia de Taeniidae están ampliamente distribuidos en todo el mundo, se estima que *T. solium* es el parásito de mayor prevalencia a nivel mundial. En el 2010, la encuesta hecha por el *Global Burden of Disease* (GBD) estimó que la cisticercosis causada por *T. solium* es responsable de 503,000 DALY (*Disability-Adjusted Life Year* -año perdido de vida saludable⁴), donde el 30% de estos, son casos de epilepsia atribuidos a neurocisticercosis. Anualmente, este parásito es responsable de aproximadamente 28,000 muertes en todo el mundo. En lo que respecta a las zonas endémicas, existe un intervalo de prevalencia entre un 0-13.9% para el continente africano, un 0.24-17.25% en Latinoamérica y un 0-3.02% en Asia.⁵

En México el panorama no es muy distinto, solo en lo que va del año 2018 se han reportado 37,667 eventos de enfermedades causadas por helmintos y en lo que respecta al 2017 se informaron 141,696 casos; donde al menos 32% de las infecciones por *Taenia* son casos de neurocisticercosis. Aunque no todos los eventos de morbilidad y mortalidad son reportados, los datos aquí expuestos son suficientes para afirmar que se trata de un problema de salud pública, por lo tanto es indispensable que nuestro sistema de salud ponga en marcha medidas para disminuir las incidencias.⁶⁻⁸

2.2. Taeniasis y cisticercosis. Fisiopatología

Los cestodos o gusanos planos, pertenecen a la clase Cestoidea del filo Platelmino. Su morfología consiste en un escólex o cabeza con el cual se anclan al intestino del huésped. A esta, le sigue el cuello y detrás, crecen los segmentos del cuerpo (proglótidos). El estróbilo o cuerpo, está formado por eslabones de proglótidos. Cada proglótido posee órganos sexuales masculinos y femeninos (hermafrodita); sin embargo, la fecundación ocurre más frecuente entre proglótidos adyacentes que dentro de un mismo proglótido. (Figura 2.2). Los proglótidos más viejos se encuentran alejados de la cabeza y contienen huevecillos, estos al desprenderse del gusano se liberan en las heces y pueden propagarse a otro individuo. Este tipo de parásitos no posee sistema digestivo ni circulatorio, por lo que absorben los nutrientes del lumen intestinal a través de microvellosidades, solo poseen un sistema nervioso rudimentario que consiste en un ganglio en el escólex y nervios entre los proglótidos.

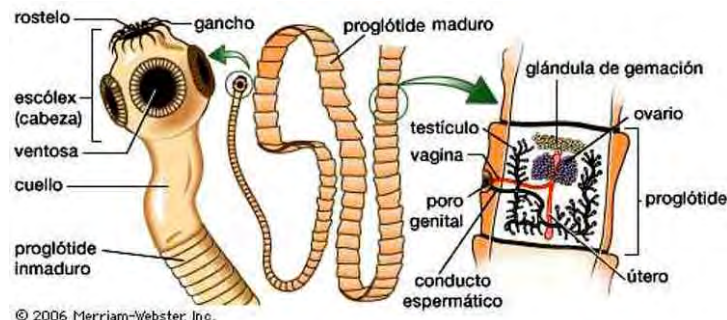


Figura 2.2. Anatomía de los cestodos.

La especie *Taenia spp.* es un cestodo de alerta sanitaria. Las especies que causan enfermedad al ser humano son *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*; no obstante, se considera que *T. solium* es la única que puede causar cisticercosis humana. Cuando la infección es intestinal se denomina taeniasis; por otro lado, cuando los huevos del parásito logran migrar a través del intestino y desarrollarse en otros tejidos, como el subcutáneo o muscular, se denomina cisticercosis; para el caso particular de que se aloje en el cerebro se denomina neurocisticercosis (NCC). La NCC, a su vez, se clasifica en 2 grupos generales dependiendo de la localización de los cisticercos: parenquimal (neuronas, células gliales y vasos sanguíneos) y extraparenquimal (espacio subaracnoideo de la convexidad de hemisferios cerebrales, cisura de Silvio, cisternas basales y cavidades ventriculares).⁹

2. ANTECEDENTES

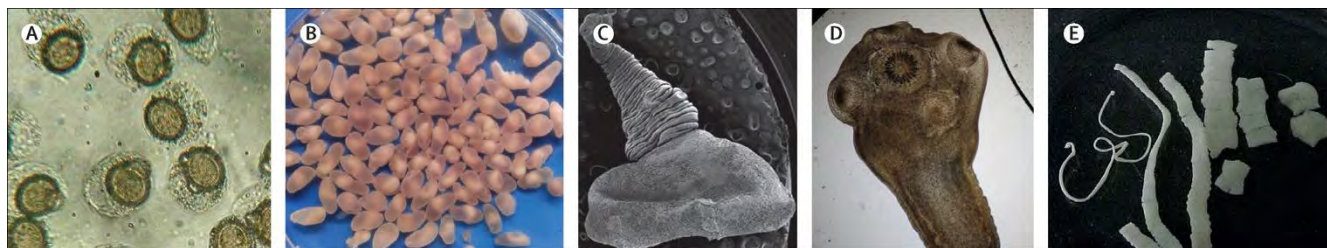


Figura 2.3. Fases de crecimiento y anatomía de *T. solium*. (A) Huevo, (B) metacestodo/cisticerco, (C) cisticerco evaginado, (D) escólex de gusano adulto, (E) estróbilo de gusano adulto.¹⁰

El ciclo de vida de *Taenia*, como el de varios cestodos, requiere de dos huéspedes para desarrollarse en sus diferentes estadios (**Figura 2.3**). En general, el ciclo comienza cuando el huésped intermediario, que puede ser un cerdo u algún otro tipo de ganado, ingiere huevos o proglótidos grávidos de *Taenia* al alimentarse de vegetación contaminada. Los huevos se desarrollan en oncoesferas y son capaces de atravesar la pared intestinal del animal. Una vez que alcanzaron establecerse en el tejido muscular maduran hacia el estado de metacestodo o larva enquistada, también conocida como cisticerco. Si el ser humano que ingiere esta carne infectada, generalmente, porque no fue sometida a una cocción al menos entre 65-75 °C durante 3 min, puede desarrollar taeniasis debido a la maduración del parásito hasta su forma adulta en el intestino del huésped.

Una vez que los parásitos adultos se alojan en el intestino delgado, los proglótidos más viejos o maduros se desprenden del cuerpo de la *Taenia* y cuando el ser humano defeca al aire libre, los huevos y los proglótidos grávidos pasan al medio ambiente. Si los huevos son ingeridos por alguna persona, al igual que como sucede en el cerdo, estos eclosionan, las oncoesferas atraviesan la pared intestinal y migran hacia otro órgano donde se desarrollan como cisticercos. Si el tejido donde se desarrollan es muscular se denomina cisticercosis, por otro lado, si se establecen en sistema nervioso central se conoce como neurocisticercosis. Cada tipo de cisticercosis tiene sus manifestaciones clínicas particulares las cuales se describen más adelante. Cabe destacar, que los huevos que se liberan al medio ambiente pueden sobrevivir durante meses hasta que sean ingeridas por el huésped (**Figura 2.4**).¹¹⁻¹³

Tabla 2.1. Diferencias morfológicas entre *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*

	<i>T. solium</i>	<i>T. saginata</i>	<i>T. asiatica</i>
Huésped intermediario	Cerdo	Bovino	Cerdo
Patología en el ser humano	Taeniasis y cisticercosis	Taeniasis	Taeniasis
Rostelo	Doble fila de ganchos	Desarmado	Rudimentario "parece verruga"
Estróbilo (# de proglótidos)	≤1000	>1000	<1000
Ramificaciones uterinas por lado	7-13	15-20	12-30
Esfínter vaginal	Ausente	Presente	Presente
Ovario	Unilobulado	Bilobulado	Bilobulado
Tamaño cisticerco	0.5-1.5 cm	7-10 mm	2 mm

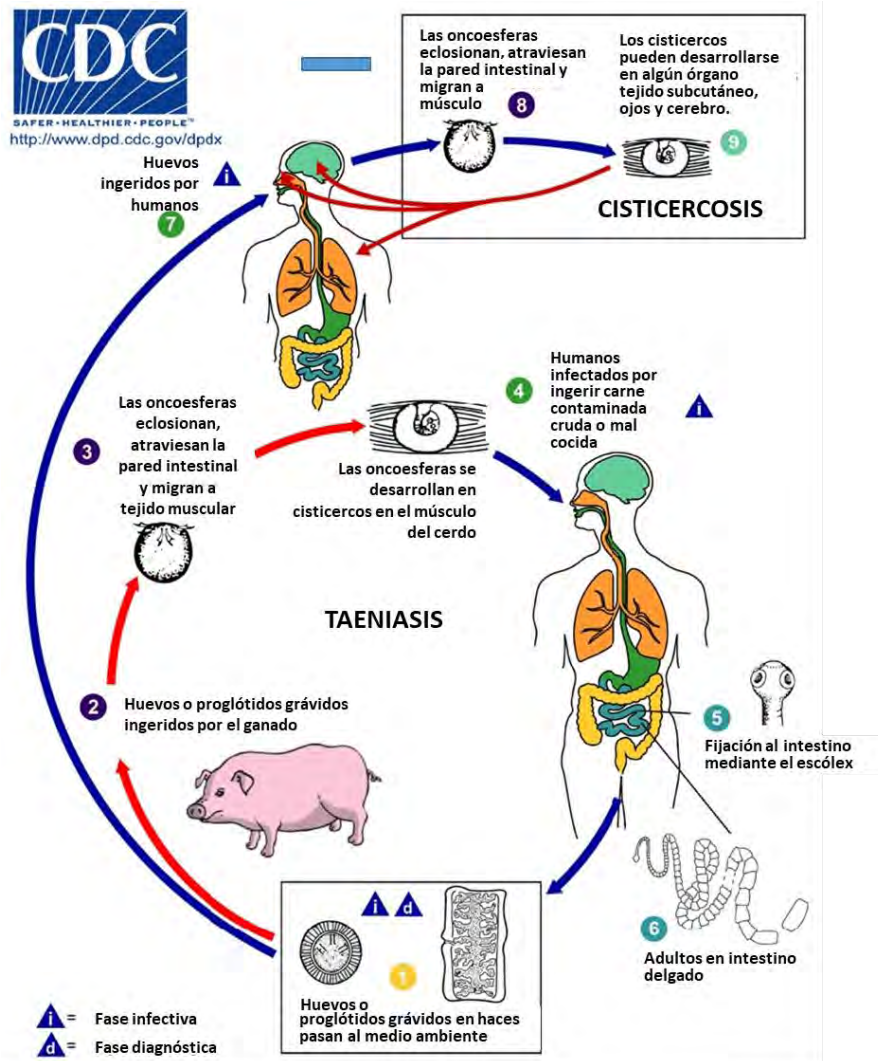


Figura 2.4. Ciclo de vida de *Taenia*.¹⁴

Las diferencias morfológicas de las 3 especies de *Taenia* son visibles por microscopía, en la **Tabla 2.1** se resumen estas características. Además, es posible usar PCR con enzimas de restricción (PCR-RFLP) para distinguir entre especies. Por otro lado, los huevos son iguales entre las tres especies y es imposible diferenciarlos por microscopía; son esféricos entre 31-43 μm de diámetro con una coraza café fácil de reconocer; dentro contienen una oncosfera o larva.¹²

Las manifestaciones clínicas para el caso de la taeniasis son usualmente asintomáticas, pero ocasionalmente, causan dolor gástrico, diarrea, sensación de hambre y pérdida de peso. En contraste, la cisticercosis en la piel o músculo esquelético rara vez ocasiona síntomas (en la piel pueden aparecer bultos); sin embargo, en caso de que los cisticercos se establezcan en los ojos y en el cerebro (neurocisticercosis) los síntomas pueden ser más graves. En el cerebro puede asemejarse a un tumor, causar meningitis y convulsiones. En lo que respecta a las manifestaciones oftálmicas, pueden ir desde deterioro de la visión hasta pérdida por completo de la misma.

2. ANTECEDENTES

Para el diagnóstico de la infección intestinal, la microscopía es una herramienta fundamental; suelen realizarse coprocultivos; no obstante, la diferenciación de los huevos entre las especies de *Taenia*, incluso entre otros tipos de parásitos como *Echinococcus* no es posible, por lo que se recurre a PCR y pruebas serológicas. Por otro lado, para la cisticercosis el diagnóstico no es lineal y se utilizan una batería de pruebas de laboratorio entre las que se incluyen: radiología, resonancia magnética nuclear, serología, exámenes de fluido cerebro-espinal, perfil inmunológico, etc.¹²

2.3. *T. crassiceps* como modelo animal para evaluación de fármacos

T. crassiceps es un cestodo que naturalmente infecta a varias especies del género *Canis*; zorros, lobos y perros, además, diversas especies de roedores. En estos últimos, los cisticercos se desarrollan en el tejido subcutáneo, en el peritoneo y en las cavidades pleurales; en el ser humano rara vez causa infección. *T. crassiceps* posee una alta capacidad reproductiva¹⁵ y comparte alta similitud antigénica con *T. solium*,¹⁶ por lo que estas características pueden aprovecharse para utilizar a *T. crassiceps* para el desarrollo de vacunas y modelos murinos de cisticercosis que pueden extrapolarse a *T. solium*.

Los modelos animales sacan ventaja de que los cisticercos pueden inocularse en la cavidad peritoneal y mantenerse indefinidamente mediante una serie de inoculaciones,¹⁷ de esta manera se puede evaluar la eficacia cisticida de diversos fármacos; la cepa ORF de *T. crassiceps* ha sido ampliamente utilizada con estos fines.¹⁸

2.4. Tratamiento farmacológico

La niclosamida, el praziquantel (PZQtel) y albendazol (ABZ) son los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones intestinales por *Taenia* en humanos. Una sola dosis, ya sea: 2 g de niclosamida, 5-10 mg/kg de praziquantel o 200 mg de albendazol, es suficiente para controlar la infección. Cabe destacar, que como la niclosamida no se absorbe en todo el tracto gastrointestinal, se usa exclusivamente para tratar la taeniasis.¹²

Por otro lado, el tratamiento de la neurocisticercosis es sumamente complicado y debe ser personalizado. Los fármacos de primera línea son el PZQtel y el ABZ (**Figura 2.5**), ambos requieren periodos largos y dosis elevadas. Para infecciones parenquimatosas con un solo cisticerco o con conteo bajo de los mismos, suele utilizarse el esquema ultracorto con PZQtel, el cual consiste en un solo día de tratamiento con tres dosis de 25 mg/kg distribuidas en intervalos de administración de 2 h.¹⁹ Para infecciones parenquimatosas graves se utiliza una dosis de praziquantel de 50 mg/kg/día, vía oral, divididos en 3 dosis al día, durante 15 días. El ABZ, se utiliza a una dosis de 15 mg/kg/día, durante 2 semanas.¹⁰

A pesar del beneficio que se obtiene con la quimioterapia cisticida, el uso de fármacos antiparasitarios es controversial, ya que, su efecto cisticida genera inflamación en el sitio de muerte del parásito y como reacción adversa se observan convulsiones. Por eso, suele acompañarse el uso de antiepilépticos de primera línea (carbamazepina, gabapentina, valproato) y esteroides (dexametasona 0.1 mg/kg/día) con la finalidad de disminuir la inflamación local.^{12,19} Respecto a esta controversia,

existen argumentos a favor y en contra del uso de la quimioterapia (**Tabla 2.2**); sin embargo, el análisis estadístico de la eficacia cisticida, la seguridad y el impacto de la muerte del cisticerco en disminuir las convulsiones, permite concluir que el tratamiento farmacológico supera los riesgos que esto conlleva, por lo tanto, la terapia antiparasitaria debe ser considerada la primera opción en el manejo de la NCC.²⁰

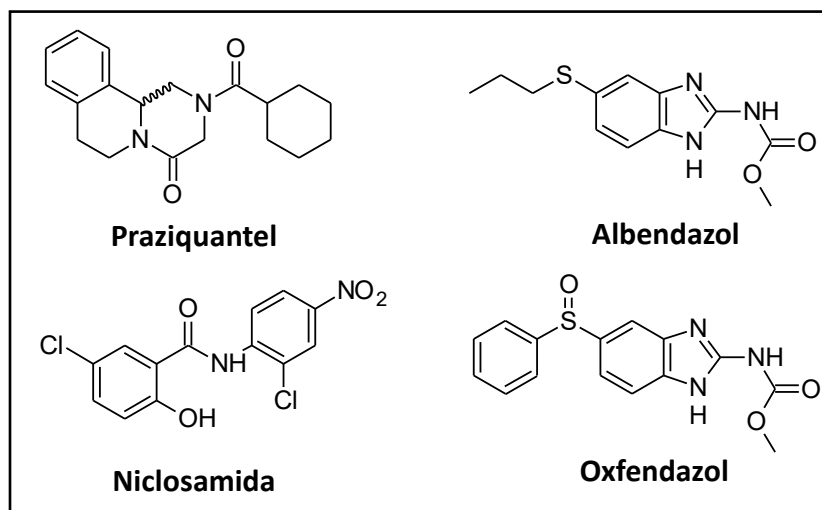


Figura 2.5. Fármacos taeniácidas.

En el caso de la cisticercosis porcina, también se utilizan multidosas de ABZ y PZQtel por vía oral; no obstante, si se tiene en consideración la cantidad de individuos por ganado y la cantidad de medicamento administrado, lo vuelve poco práctico y económicamente desfavorable, además, el tratamiento con ABZ ha manifestado efectos adversos como anorexia y letargo. Como una alternativa, se usa sulfóxido de albendazol por vía subcutánea (15 mg/kg/día x 8 días) y ha demostrado 100% de eficacia cisticida en músculo, no así para la NCC. En contraste, el uso de oxfendazol, un bencimidazol más barato que el anterior pero con un 95% de eficacia (30 mg/kg, unidosis), mantiene un periodo de al menos 3 meses sin reinfección, para la NCC se tiene el mismo inconveniente de falta de eficacia.¹⁹

Tabla 2.2. Argumentos a favor y en contra del uso de quimioterapia para la NCC²⁰

<i>A favor</i>	<i>En contra</i>
✓ Rápida desaparición de los cisticercos	✗ El tratamiento antiparasitario causa inflamación severa e innecesaria en el sitio de muerte del parásito.
✓ Los pacientes que reciben tx. con ABZ y PZQtel tienen mejor evolución clínica (disminuyen las convulsiones).	✗ La inflamación puede provocar un accidente cerebrovascular que puede resultar fatal.
✓ Disminuye el número de casos severos.	✗ No es necesario; los síntomas de la NCC aparecen años después de que el parásito ha muerto naturalmente.

2.4.1. Vacunas para tratar cisticercosis porcina

El uso de vacunas aparece como el mejor método de prevención y control para combatir la cisticercosis; sin embargo, solo se utiliza en cerdos y se encuentra en fase experimental. La inmunidad que proveen las vacunas bloquea la infección por *Taenia* en el huésped intermediario (cerdo), consecuentemente, se evita la propagación hacia el ser humano. Cabe destacar, que la misma vacuna podría ser efectiva en humanos, pero el desarrollo está obstaculizado por la falta de estudios que justifiquen el costo involucrado para realizar los ensayos clínicos.¹⁹

El desarrollo de vacunas para tratar la cisticercosis porcina, consiste en la utilización de antígenos de oncoesferas de *T. solium*. Se ha identificado que los antígenos más prometedores son los denominados como TSOL 18 y TSOL 45 (proteínas de adhesión²¹), estos han sido evaluados por varios grupos de investigación en Latinoamérica y se ha demostrado que inducen una protección contra la infección por cisticercos entre 97-99.9% en cerdos infectados experimentalmente.^{22,23}

En México, el grupo de investigación de Scuitto *et al.* desarrolló una vacuna sintética para proteger a cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*. Se aprovechó la inmunidad cruzada que presenta con *T. crassiceps* para identificar y aislar los tres péptidos de esta especie, que presentaron la mayor protección contra la infección por *T. solium* (GK1, KETc1, KETc12). Dichos péptidos se expresaron en bacteriófagos filamentosos, plantas transgénicas (callo de papaya) y *Salmonella*. Los avances se presentan como una futura alternativa para la implementación del uso de vacunas en cerdos, con la finalidad de evitar la propagación de la enfermedad hacia el ser humano.²⁴

2.5. Praziquantel

El praziquantel (PZQtel) es un derivado tipo pirazinoisoquinolina, cuyo nombre IUPAC es 2-(ciclohexanocarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona; posee un centro quiral en la posición 11b. Inicialmente, el PZQtel fue sintetizado en 1970 por E. Merck KG Company en Alemania como un tranquilizante; al poco tiempo Bayer A.G. demostró su actividad antiparasitaria. En un principio, surgió como tratamiento veterinario para infecciones por *Schistosoma* y después se extrapoló a los humanos. En 1970 se demostró su eficacia contra varios platelmintos que infectan al hombre; entre ellos *Taenia*.²⁵ Oficialmente Bayer lo lanzó al mercado en 1979. Actualmente, la preparación comercial está compuesta por la mezcla racémica; no obstante, los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que ambos enantiómeros presentan la misma toxicidad y solo el isómero levógiro ((*R*)-(-)-PZQtel) es el responsable de la actividad.²⁶

2.5.1.1. Mecanismo de acción

El mecanismo preciso de cómo ejerce su acción aún es desconocido, las hipótesis sostienen que su actividad antiparasitaria está relacionada en perturbar la homeostasis del calcio del parásito. La evidencia indica que en los gusanos planos adultos expuestos al PZQtel, a los pocos segundos, manifiestan contracción sostenida de los músculos, vacuolización y disrupción del tegumento, y subsecuente exposición de los antígenos del parásito en la superficie (activación de respuesta inmune del huésped).

Una de las hipótesis sostiene que el PZQtel ejerce su acción modificando la estructura de los fosfolípidos y/o la fluidez de la membrana celular, lo que influye directamente en la permeabilidad de Ca^{2+} a través la misma. Siendo este un mensajero intracelular cuya concentración es menor en el interior (3 mM) que en el exterior (145 mM), las variaciones ocasionadas por un flujo excesivo desde el exterior desencadenan una serie de efectos dentro de las células excitables (musculares, neuronales, endócrinas) como: despolarización, contracción, liberación de neurotransmisores, expresión génica, entre otras.^{26,27}

Otra propuesta interesante, es que el PZQtel sea ligando de los canales de calcio dependiente de voltaje (**Figura 2.6**). Estos consisten en un poro transmembranal formado por una subunidad $\alpha 1$, la cual es modulada por dos subunidades, β y $\alpha 2\delta$. Cuando β y $\alpha 1$ interactúan, se abre el canal, permitiendo la entrada de calcio y desencadenando la serie de funciones celulares antes mencionadas. Particularmente, *Schistosoma* expresa dos tipos de subunidades β : una de ellas similar a la de otros vertebrados e invertebrados y una nueva isoforma, diferente en estructura y función. Lo anterior indica que la variante de la subunidad β de los Platelminetos, es responsable de la sensibilidad al PZQtel.^{26,28}

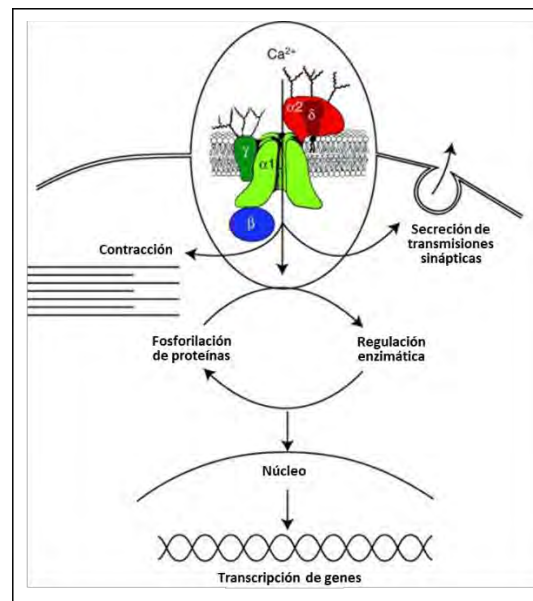


Figura 2.6. Estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje y su función.²⁸

Continuando con la hipótesis de que el mecanismo sea vía canales de Ca^{2+} , se encontró que al coadministrarse praziquantel con nicardipino y nifedipino (compuestos que bloquean el canal de calcio) permite al 50% de los gusanos de *S. mansoni* sobrevivir a una concentración que normalmente es letal. Adicionalmente, la citocalasina D, que igualmente bloquea la función de estos canales, presenta resultados similares, volviendo a los parásitos completamente resistentes frente al PZQtel.^{29,30}

2.5.1.2. Solubilidad y sistema de clasificación biofarmacéutico

La solubilidad acuosa del PZQtel reportada por Merck[®] es de 0.4 g/L y un log P de 2.5;³¹ no obstante, este valor determinado para la mezcla racémica. Por otro lado, Silvia Kocova y Hans Leuenberger en 1998³² demostraron que la solubilidad de (±)-PZQtel en agua destilada era de 0.3 g/L; en contraste, reportan la solubilidad del (R)-(-)-PZQtel 0.59 g/L y del (S)-(+)-PZQtel 0.52 g/L, es decir, ambos enantiómeros poseen ligeramente mayor solubilidad que la mezcla racémica (2.07 y 1.78 veces más, respectivamente).

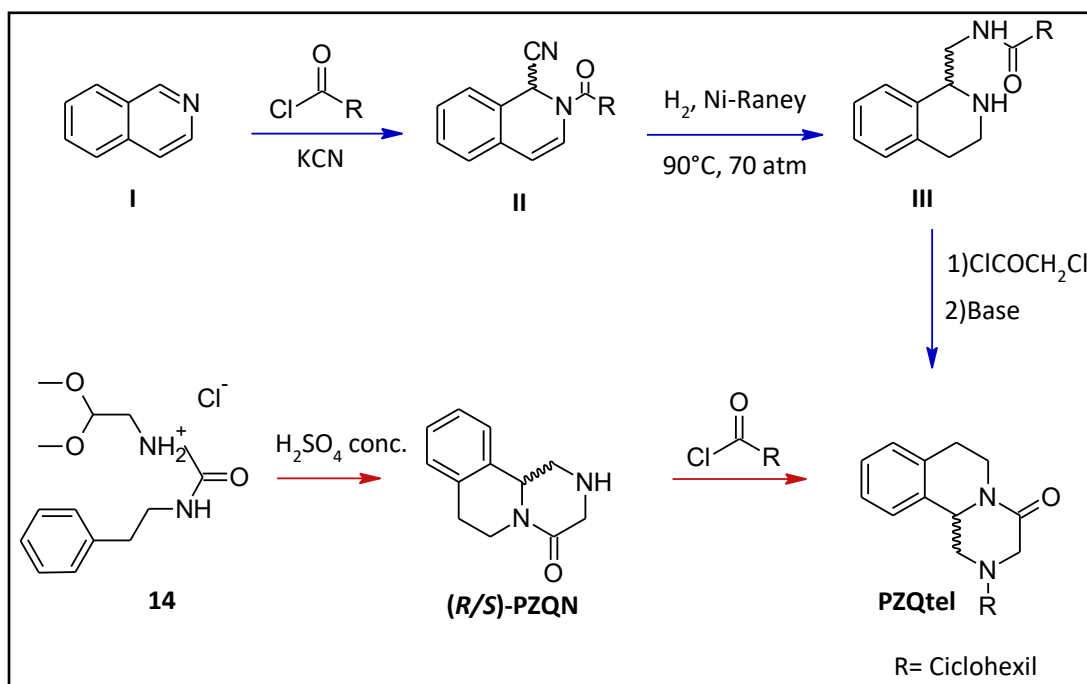
El ejemplo anterior constata que una mezcla racémica difiere en propiedades fisicoquímicas con la de sus respectivos enantiómeros puros; la solubilidad y punto de fusión son particularmente propiedades muy evidentes de este efecto. Tomando como analogía, el empaquetamiento que posee una caja de guantes con pares de guantes y otra rellena solo con guantes diestros, se asemeja a lo que sucede con la mezcla racémica y los enantiómeros puros; la densidad o empaquetamiento que ocurre entre las moléculas aisladas, es diferente a cuando coexisten con su imagen especular, por lo tanto, la energía que cada uno posee es diferente. Visto de este modo es de esperar que la solubilidad y el punto de fusión, propiedades relacionadas al ordenamiento de un cristal, sean diferentes entre los enantiómeros y la mezcla racémica.^{32,33}

Siguiendo con la idea anterior, cabe destacar que generalmente las formas racémicas pueden describirse de dos maneras: como conglomerado o como compuesto racémico. Los conglomerados, se forman cuando existe preferencia en la formación por uno de los enantiómeros, estos siempre tienen punto de fusión menor al de los enantiómeros puros. Los compuestos racémicos (90% de los casos), la preferencia en la formación es 1:1 y pueden fundir a una temperatura mayor, menor o igual a la de los enantiómeros puros. Para distinguir un compuesto racémico de un conglomerado, basta con adicionar uno de los enantiómeros y se observará disminución en el punto de fusión, en contraste, el conglomerado aumenta en punto de fusión. Algunas veces los compuestos racémicos presentan diferencias marcadas en el espectro de IR con respecto al de los enantiómeros.³³

Según la solubilidad que poseen los fármacos y de la facilidad que tienen para atravesar las membranas (permeabilidad) del tracto gastrointestinal, se han agrupado en un sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB), el cual fue propuesto por Gordon Amidon en 1995.³⁴ Existen 4 grupos: Grupo 1. Alta solubilidad y alta permeabilidad, Grupo 2. Baja solubilidad y alta permeabilidad, Grupo 3. Alta solubilidad y baja permeabilidad, Grupo 4. Baja solubilidad y baja permeabilidad. La finalidad de esta clasificación es relacionar la solubilidad *in vitro* y la biodisponibilidad *in vivo* con la absorción del fármaco en el sistema gastrointestinal. El PZQtel se ubica en el Grupo 2,³⁵ por lo que el paso que delimita su absorción es la solubilidad. Es importante mencionar que los criterios que se adoptan para poder clasificar un fármaco por vía oral y de liberación inmediata se establecieron por la FDA-. De manera general, para considerar un fármaco como de alta solubilidad la dosis más alta usada en la clínica debe disolverse en 250 mL de un medio con pH 1-6.8 a 37°C, después de 30 min. Para ser considerado de alta permeabilidad, el fármaco debe alcanzar una biodisponibilidad en humanos del 80% o más respecto a la administración intravenosa.^{34,36}

2.5.1.3. Síntesis

En 1977 J. Seubert, que pertenecía a *Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien, E. Merck* reportó por primera vez la síntesis del PZQtel a partir de la *N*-[1,2,3,4-tetrahydroisoquinolil-1-metil]-carboxamida (III), seguida de una acilación con cloruro de cloro acetilo y una ciclación en presencia de una base fuerte (**Esquema 2.1-azul**).³⁷ Sin embargo, la formación del intermediario III requería una reducción catalítica a 70 atm y 100 °C,³⁸ por lo que la convertía en una síntesis costosa para Merck®.³⁹⁻⁴³ Por otro lado, en 1983 debido a la crisis de esquistosomiasis que aquejaba a Corea del Sur, el *Korea Institute of Science and Technology* y la compañía farmacéutica Shin Poong se involucraron en la producción de PZQtel y desarrollaron una síntesis más barata, esta a diferencia de la de Seubert, omitía la hidrogenación catalítica y realizaba la ciclación en un solo paso con un ácido de Bronsted (**Esquema 2.1-cian**).⁴⁴ Shin Poong® aprovechó esta ventaja para competir con Bayer-Merck y apoderarse del monopolio del PZQtel. Actualmente, la patente ha expirado, China y Corea comercializan muchas de las materias primas asociadas al praziquantel, por lo que el costo de producción ha disminuido notablemente; en 1980 una tableta de 600 mg de PZQtel costaba \$1 US, actualmente solo cuesta \$0.07 US.²⁶



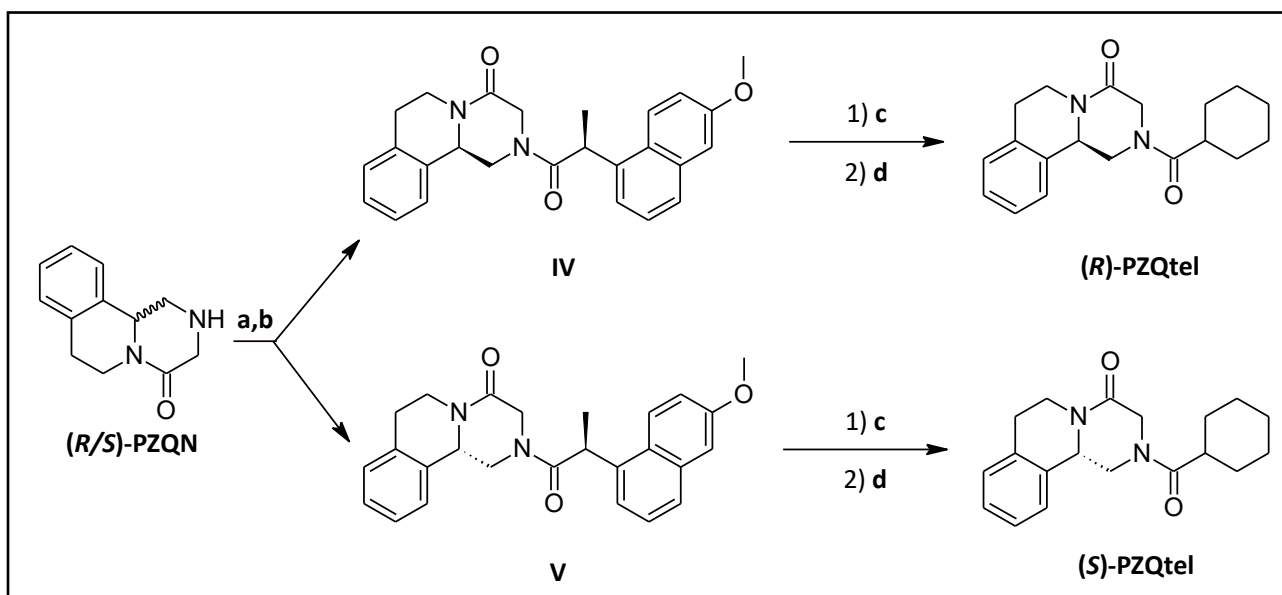
Esquema 2.1. Síntesis de praziquantel de Bayer-Merck (azul) y de Shin Poong (cian).

Los métodos de síntesis antes mencionados involucran la formación de una mezcla racémica, lo anterior, aunado a que se ha demostrado que el enantiómero levógiro del PZQtel ((*R*)-(-)-PZQtel) es el responsable de la actividad biológica, motivó a los investigadores para implementar métodos de resolución quiral del racemato ((*R/S*)-PZQN). Una vez que se aísla la (*R*)-PZQN, se hace reaccionar con cloruro de ciclohexilcarbonil (CyCl) y se obtiene el PZQtel. Muchos de estos métodos de resolución

2. ANTECEDENTES

involucran la formación de sales diastereoméricas y su recrystalización. Para estos fines, se han utilizado el (*S*)-naproxeno⁴⁵ o el ácido di-benzoil-L-tartárico (**DBLTA**).⁴⁶

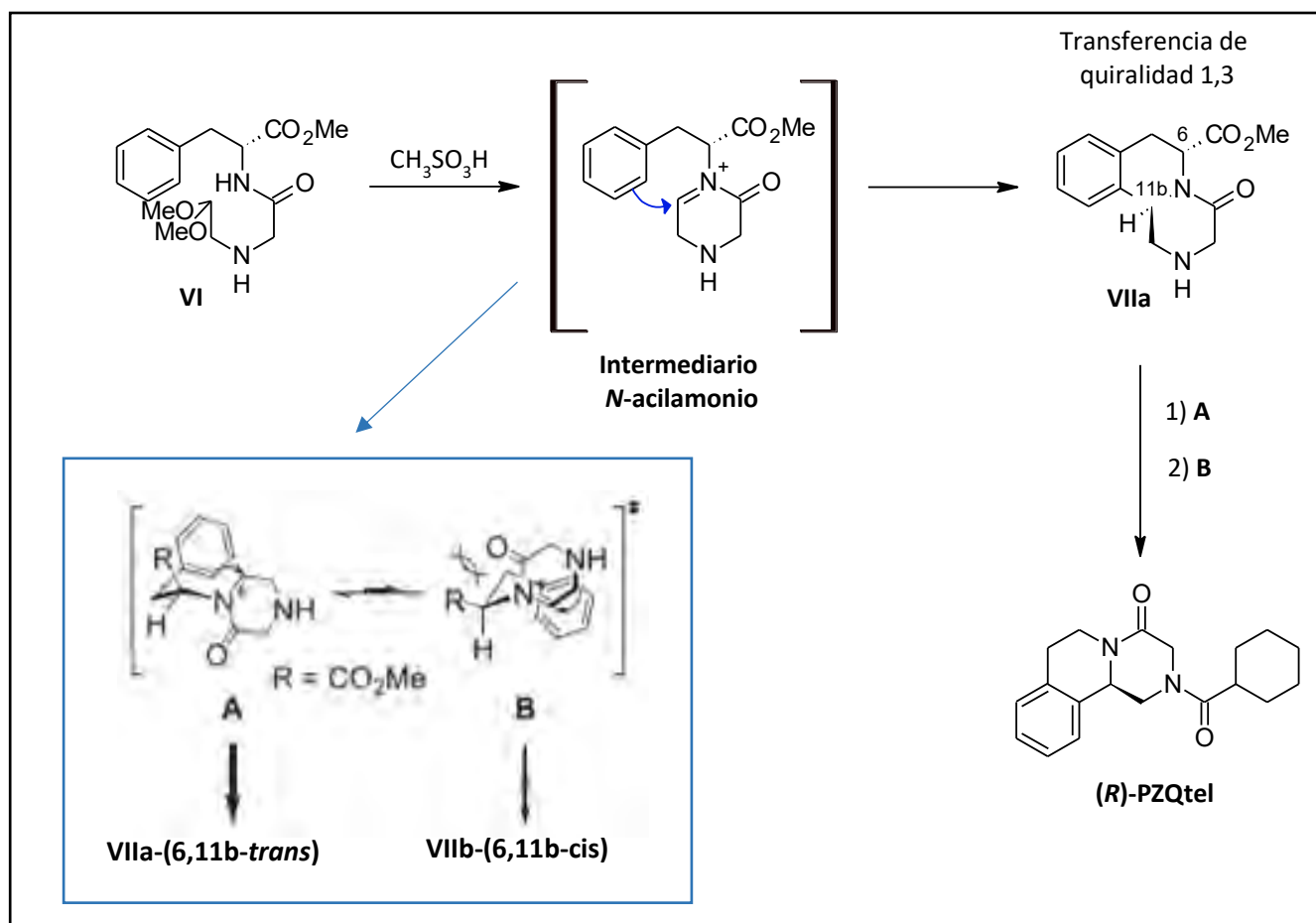
Otra metodología interesante, es vía la formación de carboxamidas diastereoméricas derivadas del (*S*)-(+)-naproxeno (**IV** y **V**), seguida de su separación por cromatografía, después, la hidrólisis asistida por microondas para liberar la (***R***)-PZQN y por último, esta se acopla con CyCl para obtener el (***R***)-PZQtel (**Esquema 2.2**).⁴⁷



Esquema 2.2. Resolución de (*R/S*)-PZQtel vía la formación de carboxamidas. **(a)** cloruro de acilo del (*S*)-naproxeno, NMM, T.a, 4h. **(b)** Cromatografía flash. **(c)** 85% H₃PO₄, MW, 150 °C, 20 min, después, 5 M de NaOH. **(d)** Na₂CO₃, CyCl, CH₂Cl₂, 0-25 °C.

Mientras que la síntesis racémica seguida de la resolución quiral es una buena opción para obtener compuestos enantioméricamente puros, no deja de tener como desventaja los bajos rendimientos a causa de la pérdida del distómero. Aquí es donde gana ventaja la síntesis enantioselectiva o diastereoselectiva. Pocos son los ejemplos de construcción de anillos pirazinoisoquinolínicos ópticamente activos,⁴⁸ entre los que destacan: la ciclación de Pictet-Spengler empleando auxiliares quirales,⁴⁹ aminoácidos como inductores quirales⁵⁰ e hidrogenación por transferencia de protón de dihidroisoquinolinas usando un catalizador quiral de Rutenio.⁵¹

Específicamente, el método de transferencia de quiralidad que utiliza Maki Seki⁵⁰ resulta atractivo, ya que mediante derivados comerciales de la fenilalanina (**VI**) es posible controlar la estereoquímica de la reacción de Pictet-Spengler; mediante una transferencia de quiralidad 1,3. Lo anterior, es resultado de la diferencia energética entre los estados de transición cíclicos (**VIIa** y **VIIb**) que originan los productos *cis* o *trans* de esta reacción. Mediante esta ruta se logra un rendimiento global para la obtención del (*R*)-(-)-PZQtel del 20% y un exceso enantiomérico del $\geq 99.5\%$. (**Esquema 2.3**).



Esquema 2.3. Transferencia de quiralidad en la síntesis de (R)-(-)-PZQtel. (A) 1. HCl 6 M. 100 °C; 2. CyCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0 °C. (B) Descarboxilación de Barton: 1. NMM, isobutilcloroformiato, THF, -15 °C; después *N*-hidroxi-2-tiopiridona, Et_3N , THF, -15°C. 2. 2-metil-propanotiol-THF-hv, T.a.

2.6. Requerimientos estructurales de los bencimidazoles como antiparasitarios

El sistema heterocíclico de dos anillos fusionados benceno-imidazol; bencimidazol, se considera una estructura versátil, ya que variando los sustituyentes en las posiciones 1, 2, 5 y 6 permite obtener compuestos con diferente actividad biológica: antiviral (enviroxima), anticancerígeno (bendamustina), antihelmíntico (ABZ), antiulceroso (pantoprazol), antihistamínico (astemizol), antihipertensivo (telmisartán), entre otras áreas de explotación clínica (Figura 2.7).⁵²

Nuestro equipo de trabajo, motivado por la buena actividad antihelmíntica de los derivados del bencimidazol, ha sintetizado y evaluado una gran cantidad de derivados. Como fruto de las investigaciones, se ha podido establecer una relación estructura actividad (SAR) que ha permitido conocer los requerimientos estructurales fundamentales para ejercer la actividad antiparasitaria.⁵³ En particular, la actividad antihelmíntica vía inhibición de la β -tubulina, está dada por el grupo carbamato de metilo en la posición 2 y grupos aceptores de puente de hidrógeno en la posición 5/6 como sulfonas, sulfóxidos (ej. metabolitos activos del albendazol),⁵⁴ también, que la posición 1H carezca de sustituyentes favorece la actividad antihelmíntica.

2. ANTECEDENTES

Más recientemente, se evaluó la eficacia antiparasitaria de más de 100 carboxamidas bencimidazólicas. Estructuralmente, poseen en la posición 5 o 6 cloro, hidrógeno y/o amidas con sustituyentes alifáticos, aromáticos y heterocíclicos. Además, en la posición 1 metilo o hidrógeno y la posición 2 está ocupada por carbamato de metilo, tiol, metiltio, trifluorometilo, metilo o hidrógeno. La potencia de estas carboxamidas está en el intervalo de nM a μM .^{53,55,56}

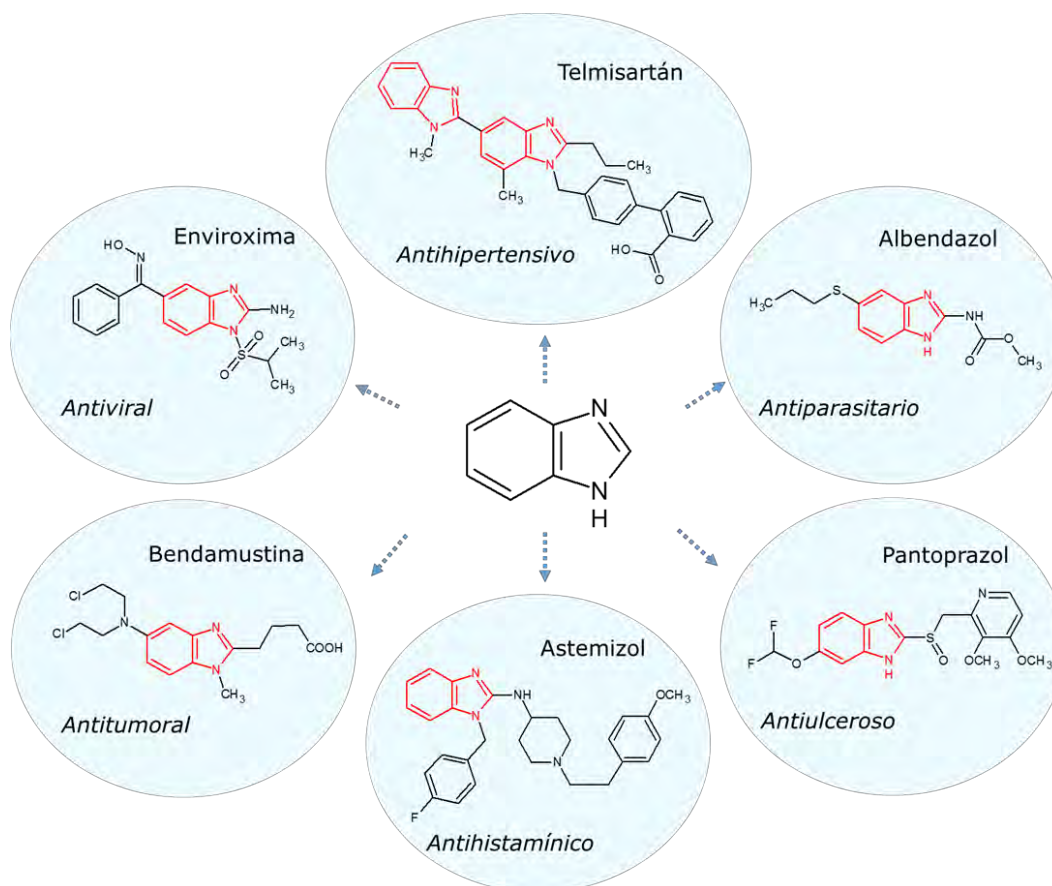


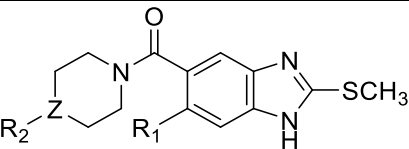
Figura 2.7. Bencimidazol como estructura privilegiada.

2.6.1. Híbridos de PZQtel con bencimidazoles como una alternativa de tratamiento contra parasitosis tisulares

Con el propósito de modificar la pobre solubilidad de los carbamatos bencimidazólicos, se han sintetizado compuestos con grupos distintos al metoxicarbonilamino en la posición 2; sin embargo, la actividad antihelmíntica se ve disminuida. Un caso excepcional es el triclabendazol (TCBZ),⁵⁷ que a pesar de tener en esta posición un grupo metiltio (-SCH₃), sustituyente que comúnmente potencia la actividad antiprotozoaria y no la antihelmíntica,^{53,56} es capaz de absorberse y actuar contra helmintos tisulares como *Fasciola hepática*. Siguiendo con el tema de las carboxamidas, también hemos explorado el espacio químico en busca de carboxamidas que puedan utilizarse en el tratamiento de helmintos extraintestinales, como son: *Taenia spp.*, *Schistosoma sp.*, *F. hepática* y *Trichinella spiralis*. De esta investigación, surgió una serie de carboxamidas (**Tabla 2.3**) que mantienen en la posición 2 el

sustituyente SCH₃ y en la posición 5/6 piperidincarbonilo o piperazincarbonilo; los cuales mostraron buena actividad *in vitro* contra *T. spiralis*.⁵⁸

Tabla 2.3. Actividad de los compuestos VIII-XI contra la larva muscular de *T. spiralis*

				
Compuesto	R ₁	R ₂	Z	%Inhibición <i>in vitro</i> VS <i>T. spiralis</i> a 3.7 μM
VIII	H	H	CH	61
IX	Cl	H	CH	48
X	H	H	N	45
XI	Cl	H	N	40
ABZ	-	-	-	46

Con los resultados de la actividad biológica VS *T. spiralis*, se hizo evidente que las carboxamidas 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazólicas conservan la actividad antihelmíntica aún contra el pronóstico del SAR. Por lo que se dio a la tarea de diseñar nuevos compuestos aminocarbonílicos derivados del bencimidazol, enfocándose en atacar parásitos extraintestinales. Como se expuso en la **Sección 2.5**, el PZQtel, además de ser un compuesto pirazinoisoquinolincarbonílico (similar en estructura a la serie VIII-XI) posee características fisicoquímicas que le confieren buena biodisponibilidad para tratar infecciones tisulares causadas por parásitos. En ese sentido, recurriendo a la hibridación molecular como un método racional del desarrollo de fármacos,⁵⁹ se propuso la serie de carboxamidas XII-XVI y (R)-PZQ-BZ (Tabla 2.4) tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- Utilizar como plantilla el farmacóforo del PZQtel; la praziquanamina (PZQN), eso incluye solo el isómero levógiro (R)-(-)-PZQN.
- Usar como *linker* (conector) el grupo funcional amida para unir el 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol, el cual posee mejor características de solubilidad acuosa que los derivados metoxicarbonilamino, con la (R)-PZQN.
- Explorar la sustitución en 1, 2 y 5/6.

Como se puede observar en la **Tabla 2.4**, después de evaluar la eficacia cisticida, ninguno de los híbridos superó la potencia del PZQtel. Esto se atribuye a la baja solubilidad acuosa, intrínseca del núcleo de bencimidazol; en especial de los carbamatos. Por ejemplo, el compuesto XIII; un derivado metoxicarbonilamino que es soluble a 55 °C en DMSO (condiciones de temperatura y medio distintas a las de la realización del estudio)⁶⁰ presentó problemas de solubilidad (precipitación), esta misma situación se repitió en toda la serie de compuestos. Por lo que al momento de interpretar los resultados de la Cl₅₀ hay que considerar que este valor pudo haberse alterado debido a que los compuestos no alcanzaron un 100% en disolución.

2. ANTECEDENTES

Tabla 2.4. Actividad cisticida *in vitro* de compuestos híbridos de PZQtel con bencimidazoles

Compuesto	PM	R ₁	R ₂	R ₃	Soluble en:	Cl ₅₀ en cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF
XII	392	H	SCH ₃	H	DMSO	SA
(R)-PZQ-BZ	426	H	SCH ₃	Cl	MeOH, DMSO, CHCl ₃	30% de inhibición a 4.69 μM
XIII	419	H	NHCOCH ₃	H	DMSO a 55 °C	SA
XIV	467	CH ₃	NHCOCH ₃	Cl	DMSO a 55 °C	2.76 μM
XV	414	H	CF ₃	H	DMSO	5.67 μM
XVI	448	H	CF ₃	Cl	DMSO	4.96 μM
PZQtel	312	-	-	-	MeOH, DMSO, CHCl ₃	0.074 μM ⁶⁰

SA= Sin actividad

Por otro lado, para explorar más sobre estos híbridos, se evaluó la actividad antiprotozoaria de los derivados 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazoles (**Tabla 2.5**). Como era de esperarse, fueron muy buenos antiprotozoarios en comparación con el ABZ, siendo **(R)-PZQ-BZ** el mejor. Lo cual confirma los hallazgos respecto a los requerimientos estructurales de nuestro grupo de investigación. No hay que olvidar, que *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, también son parásitos tisulares (amebiasis hepática y vaginitis por *Trichomonas*).

Tabla 2.5. Actividad antiprotozoaria de compuestos híbridos de PZQtel con 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazoles

Compuesto	<i>Giardia intestinalis</i> [μM]	<i>E. histolytica</i> [μM]	<i>T. vaginalis</i> [μM]
(R)-PZQ-BZ	0.0408	0.0331	0.0586
XII	0.0152	0.0223	0.0316
ABZ	0.0370	56.5334	1.5905

2.7. Estrategias para aumentar la solubilidad acuosa

Según la IUPAC, la solubilidad se define como “la composición analítica de una solución saturada, se expresa en cantidad de soluto en un determinado disolvente (M, N, kg/L, mg/mL, etc.)”. Esta propiedad fisicoquímica es de las más importantes a considerar durante el diseño de fármacos; sin embargo, más del 40% de las nuevas entidades químicas desarrolladas por la industria son prácticamente insolubles en agua. Esto resulta un verdadero problema para todas las vías de administración donde interviene el fenómeno de absorción; porque para que un compuesto se absorba, ya sea por vía oral o parenteral (excepción de la intravenosa (IV)), primero debe estar en disolución.⁶¹

Las formas farmacéuticas orales son las más utilizadas por las compañías farmacéuticas, ya que son de fácil administración, baratas, composición flexible en la fórmula, amigables con el paciente y no requieren esterilidad. Los compuestos con pobre solubilidad, sobre todo los del grupo II y IV del SCB, tienen problemas de biodisponibilidad cuando se administran por vía oral, por lo tanto, implica un reto en la formulación, dosificación más alta y como consecuencia, manifestación más probable de los efectos adversos. Más importante aún, para las formas parenterales, la solubilidad juega un muy rol importante, el compuesto debe estar en disolución en el máximo volumen permitido a administrar para evitar inflamación o trombosis, solo en el caso de la administración intramuscular se pueden administrar suspensiones.^{61,62}

En general, existen tres técnicas para mejorar la solubilidad:

- ✓ *Métodos físicos*: Reducción de tamaño de partícula (micronización), modificación de la forma cristalina (polimorfos), dispersiones sólidas, mezclas eutécticas con excipientes acarreadores.
- ✓ *Modificaciones químicas*: Cambios en el pH, formación de complejos y sales, derivación (profármacos).
- ✓ *Metodologías varias de la tecnología farmacéutica*: microemulsiones, liposomas, nanopartículas, surfactantes, cosolventes, complejos de inclusión (ciclodextrinas), etc.

Los bencimidazoles son un grupo de moléculas que poseen baja solubilidad. Por ejemplo, el ABZ; un carbamato bencimidazólico, suele clasificarse dentro del grupo IV del SCB (baja solubilidad y baja permeabilidad), aunque debido a la evidencia de que es capaz de permear a través de la barrera hematoencefálica también puede ser considerado como del grupo II (baja solubilidad, alta permeabilidad).⁶³ Posee una solubilidad de 0.376, 0.016, 0.0014 mg/mL en solución amortiguadora pH 1.2, 6.0 y 7.4, respectivamente.^{35,64,65} Por su parte, el PZQtel también posee problemas de solubilidad como se expuso a detalle en la **Sección 2.5.1.2**. Particularmente, para mejorar la solubilidad del PZQtel se han reportado metodologías como: dispersiones sólidas, formación de complejos de inclusión con β -ciclodextrinas y microesferas de metacrilato; siendo las dispersiones sólidas las de uso más frecuente. Utilizando diferentes polímeros naturales o sintéticos (PVP, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, PEG) se ha logrado obtener formulaciones para mejorar la solubilidad

del PZQtel hasta 3.2 mg/mL y también su biodisponibilidad;⁶⁶ sin embargo, estas aún presentan limitaciones para tratar parasitosis sistémicas.⁶⁶⁻⁶⁹

2.7.1. Profármacos

El término profármaco fue introducido en 1958 por Adrien Albert, quien los describió como “compuestos que necesitan una biotransformación antes de manifestar su efecto farmacológico”. Actualmente, el término profármaco hace referencia a un agente poco o nada activo biológicamente, que después de ser metabolizado *in vivo* se vuelve un compuesto terapéuticamente activo. Este enfoque surge con el objetivo de mejorar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y/o farmacocinéticas para que el fármaco llegue al sitio donde ejerce su acción sin comprometer la integridad del mismo. Idealmente un profármaco permite atravesar las barreras biológicas y una vez que se logra esto, mediante una biotransformación liberar al fármaco para que interactúe con su receptor.⁷⁰⁻⁷²

Su clasificación química es la siguiente:⁷³

- *Derivados biorreversibles*: Moléculas compuestas por el fármaco unido a un acarreador, los cuales después de reacciones químicas y/o enzimáticas liberan al fármaco. A su vez se clasifican como:
 - Bipartita: Fármaco unido directamente al acarreador.
 - Tripartita: Fármaco unido al acarreador mediante un *linker* (conector).
 - Cofármacos (profármaco mutuo): Compuesto por dos fármacos unidos directamente entre sí. Ambos fármacos funcionan como acarreadores.
- *Bioprecursores*: Requieren de metabolismo Fase I o reacciones de bioactivación para generar el fármaco.
- *Conjugados fármaco-polímero*: El acarreador es una macromolécula (PEG).
- *Conjugados fármaco-anticuerpo*: Fármaco unido a un anticuerpo que se libera al contacto con su epítipo.

2.7.1.1. Derivados hidrosolubles tipo fosfonooximetil bencimidazólicos como profármacos biorreversibles

Para el diseño de derivados biorreversibles es necesario tener en consideración los grupos funcionales que son susceptibles a derivar en un fármaco, después, seleccionar un acarreador que solucione el problema, tenga bajo riesgo toxicológico y se libere fácilmente *in vivo*. Además, hay que tener en cuenta que el proceso de preparación debe ser eficiente y barato. Tomando en cuenta la primera consideración, algunos de los bencimidazoles que hasta ahora se han presentado **VIII-XVI** (**Tabla 2.3** y **Tabla 2.4**), son susceptibles a una derivación en el imidazol (amina) con el fin de formar profármacos biorreversibles que mejoren la solubilidad acuosa del compuesto original.

Dentro de las alternativas que se tienen para derivar una amina (amidas, fosfatos, carbamatos, bases de *N*-Mannich, oximas e iminas), los ésteres de fosfato resultan una opción atractiva por varias razones: la carga dianiónica aumenta en varios órdenes de magnitud la solubilidad acuosa; facilitando

la formulación y mejorando la biodisponibilidad, son fácilmente hidrolizables por las fosfatasa del hígado o del epitelio intestinal.⁷¹ Esta estrategia ya ha sido utilizada para introducir un grupo fosfonooximetilo en la posición 1*H* de antiparasitarios comerciales como el albendazol, fenbendazol, oxfendazol y mebendazol (**Figura 2.8**).⁷⁴ Adicionalmente, nuestro grupo de investigación ha implementado el uso del mismo acarreador para derivar el triclabendazol y el compuesto alfa (**Figura 2.8**);^{75,76} ambos compuestos aumentaron su solubilidad en varios órdenes de magnitud y mejoraron su eficacia. En adición, se demostró la acción de la fosfatasa alcalina y su estabilidad. Recientemente, se derivaron los compuestos **CMC12** y **RCB20** (**Figura 2.8**); sin embargo, se demostró que el compuesto **RCB20** (2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol) no es candidato para este tipo de derivaciones, ya que la capacidad electroattractora del grupo CF₃ torna más lábil el enlace N-CH₂-O, provocando su descomposición espontánea.⁷⁷

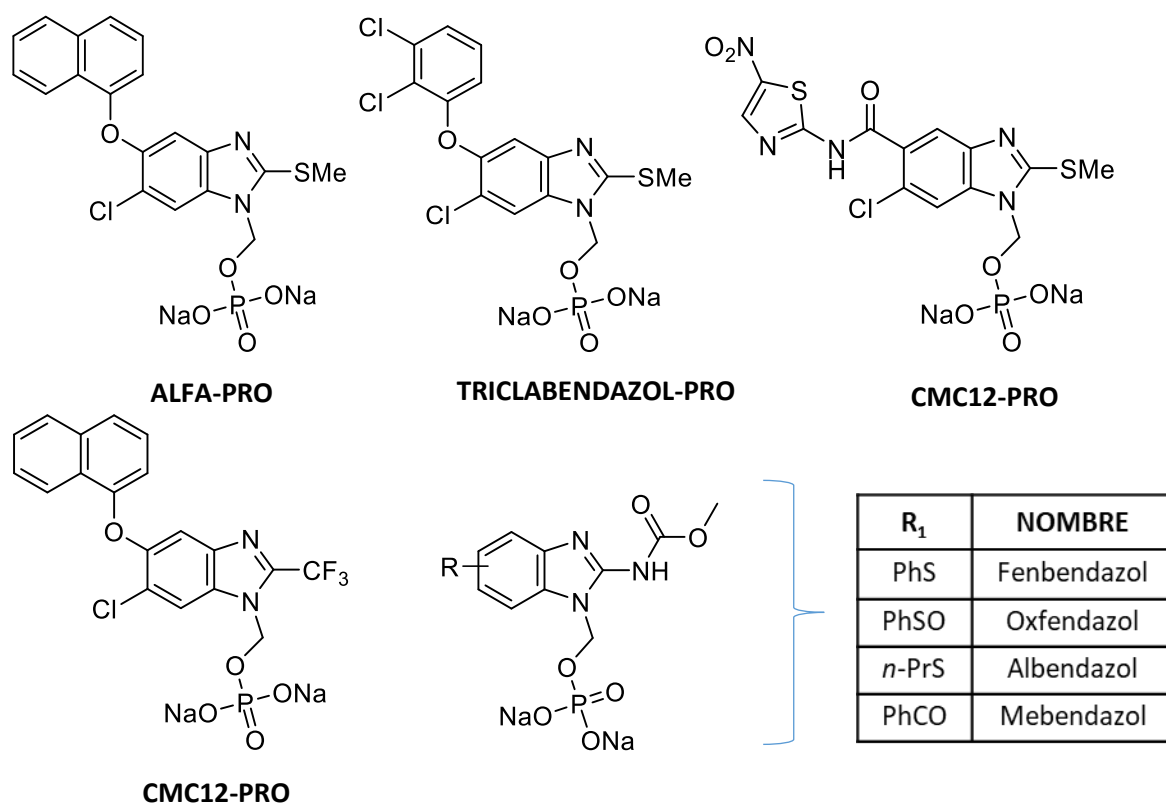


Figura 2.8. Profármacos tipo fosfonooximetilo.

La farmacocinética de los profármacos bencimidazólicos tipo fosfonooximetilo, se ilustra en la **Figura 2.9**. El derivado hidrosoluble que se administra por vía parenteral, se distribuye en el organismo hasta llegar al hígado, ahí se hidroliza el fosfato orgánico por acción de las fosfatasa alcalinas; el hidroximetilbencimidazol resultante (**XVII**) sufre una descomposición espontánea liberando el fármaco y como subproducto el formaldehído. Nótese que este subproducto es moderadamente tóxico (DL_{50oral}: 800 mg/kg, DL_{50i.v.}: 87 mg/kg); no obstante, los reportes de toxicidad de estos profármacos asociados al formaldehído, mencionan que no existe riesgo de seguridad debido

2. ANTECEDENTES

a que la dosis administrada conlleva a una liberación de formaldehído mucho menor a la dosis letal, además, no es un fármaco de uso crónico y el periodo de tratamiento es corto.⁷⁸

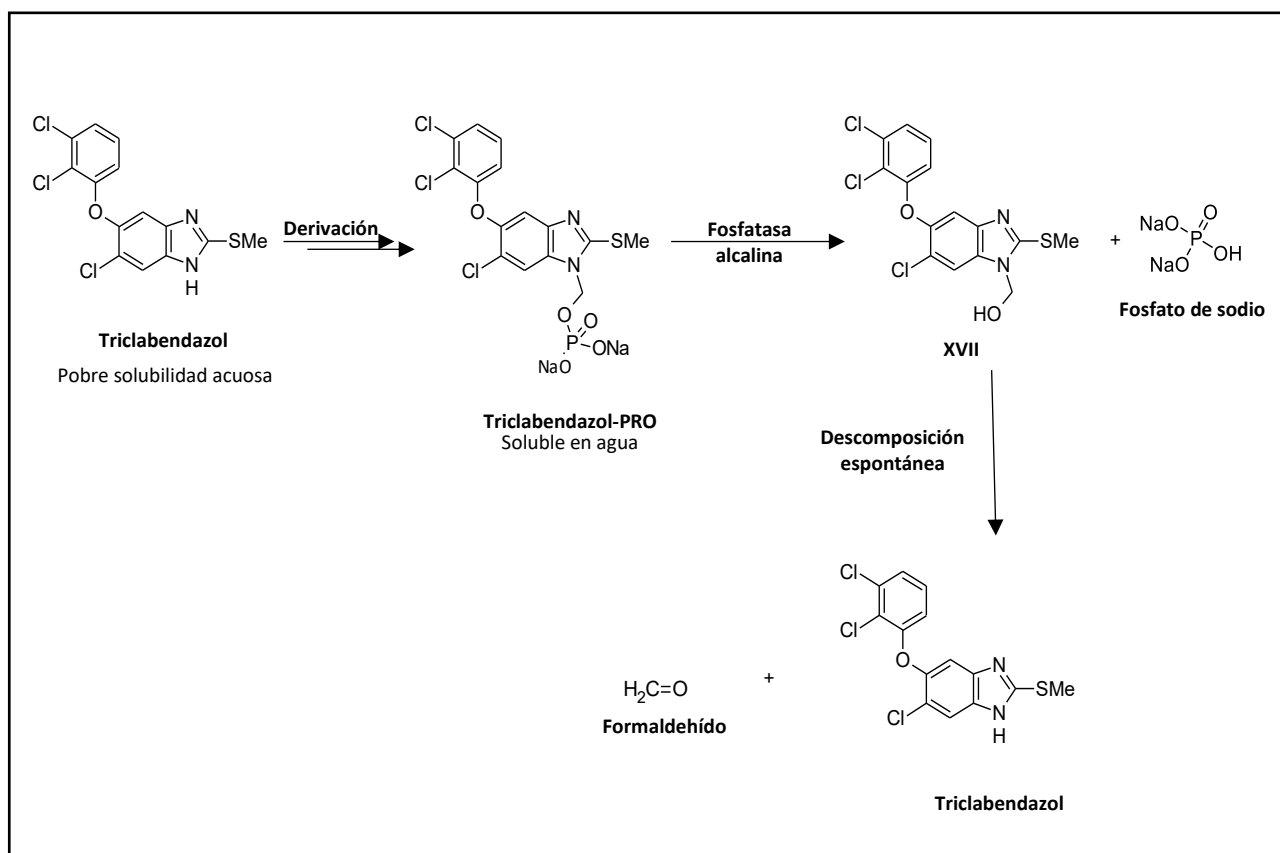


Figura 2.9. Mecanismo de liberación de los ésteres de fosfato bencimidazólicos.⁷⁶

Como ya se mencionó, de la serie mostrada en la **Tabla 2.4** es posible resaltar el hecho de que los híbridos **(R)-PZQ-BZ, XIV, XV y XVI**, tuvieron una Cl_{50} alrededor de $2 \mu g/mL$ (menos potentes que el PZQtel) y como desventaja en común su baja solubilidad acuosa. Por lo que es posible recurrir a la derivación expuesta en esta sección con el fin de mejorarla; sin embargo, observando las estructuras químicas, solo el compuesto **(R)-PZQ-BZ** es susceptible para la formación de un profármaco biorreversible derivado como éster de fosfato, ya que, cuenta con la posición **1H** desocupada y no posee el grupo CF_3 en la posición **2** que le confiere inestabilidad.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias extraintestinales causadas por helmintos como *Taenia spp.*, *Schistosoma sp.*, *F. hepática* y *T. spiralis*, son un problema de salud pública en México y también a nivel mundial. Aunado a la falta de opciones quimioterapéuticas para tratar eficientemente este tipo de parasitosis y a las cepas resistentes que han aparecido en los últimos años, surge la necesidad de desarrollar nuevas moléculas con propiedades fisicoquímicas favorables, cuya biodisponibilidad sea la suficiente para llegar al tejido donde necesita ejercer su actividad. Por otro lado, la cisticercosis, causada por cisticercos de *T. solium*, es una enfermedad que prevalece en la población mexicana, así como en el ganado porcino (también causada en este por *T. saginata*). A pesar de que ya existen opciones de prevención como las vacunas (fase experimental) y tratamiento farmacológico como el PZQtel y el ABZ, estos últimos presentan muy baja solubilidad acuosa, lo que conlleva dosis más elevadas y periodos de tratamiento más largos, pudiendo llegar a manifestarse toxicidad. Además, nuestro grupo de investigación ha explorado el núcleo de bencimidazol como una alternativa para el tratamiento de las infecciones causadas por helmintos. Recientemente, se evaluó la eficacia de una serie de carboxamidas (**Tabla 2.4**); híbridos de PZQtel y bencimidazoles sustituidos en la posición 1,2, 5/6 que tuvieron potencia moderada respecto al fármaco de elección; no obstante, su pobre solubilidad es una fuerte limitante en el desarrollo del ensayo biológico, lo que no permite concluir deliberadamente acerca de su eficiencia. En ese sentido, se recurrió a la estrategia de derivación a profármaco biorreversible del compuesto **(R)-PZQ-BZ**, usando como grupo acarreador un grupo fosfonooximetilo en su forma de sal disódica, lo cual ha demostrado aumentar en varios órdenes de magnitud la solubilidad en agua, trayendo consigo una mejora en la eficacia y la biodisponibilidad; por lo que es una opción atractiva y novedosa para el tratamiento de las helmintiasis tisulares como la cisticercosis.

4. HIPÓTESIS

Al derivar el compuesto **(R)-PZQ-BZ (Figura 5.1)** introduciendo un grupo fosfonooximetilo en forma de sal disódica (**JOULZ-PRO**), se obtendrá un profármaco biorreversible que aumentará la solubilidad acuosa en varios órdenes de magnitud. Lo anterior, permitirá administrar **JOULZ-PRO** por vía parenteral en un modelo *in vivo* y mejorar la eficacia cisticida comparado con los fármacos de primera línea; PZQtel y ABZ.

5. OBJETIVO

Derivar el compuesto **(R)-PZQ-BZ** introduciendo un grupo fosfonooximetilo en su forma de sal disódica para obtener el profármaco **JOULZ-PRO**, determinar su solubilidad y evaluar su eficacia cisticida.

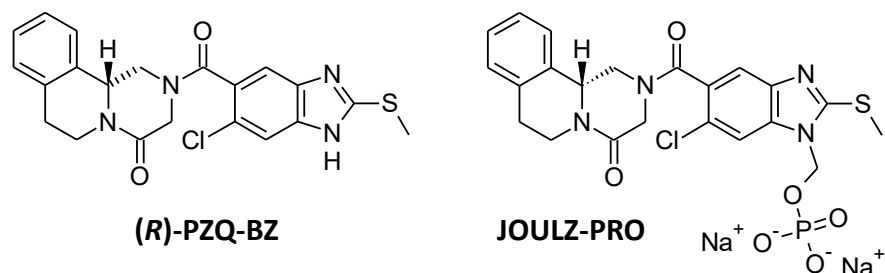


Figura 5.1. Precursor **(R)-PZQ-BZ** y profármaco propuesto **JOULZ-PRO**.

5.1. Objetivos particulares

- ✓ Desarrollar una metodología de síntesis para obtener los compuestos **(R)-PZQ-BZ** y **JOULZ-PRO** (**Figura 5.1**).
- ✓ Determinar las propiedades fisicoquímicas de los intermediarios y productos finales.
- ✓ Elucidar la estructura de los compuestos sintetizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- ✓ Determinar la solubilidad termodinámica en agua, tanto del precursor como el profármaco, en dos disoluciones amortiguadoras.
- ✓ Evaluar la eficacia cisticida de **JOULZ-PRO** en un modelo *in vivo* y compararla con la de ABZ y PZQtel.

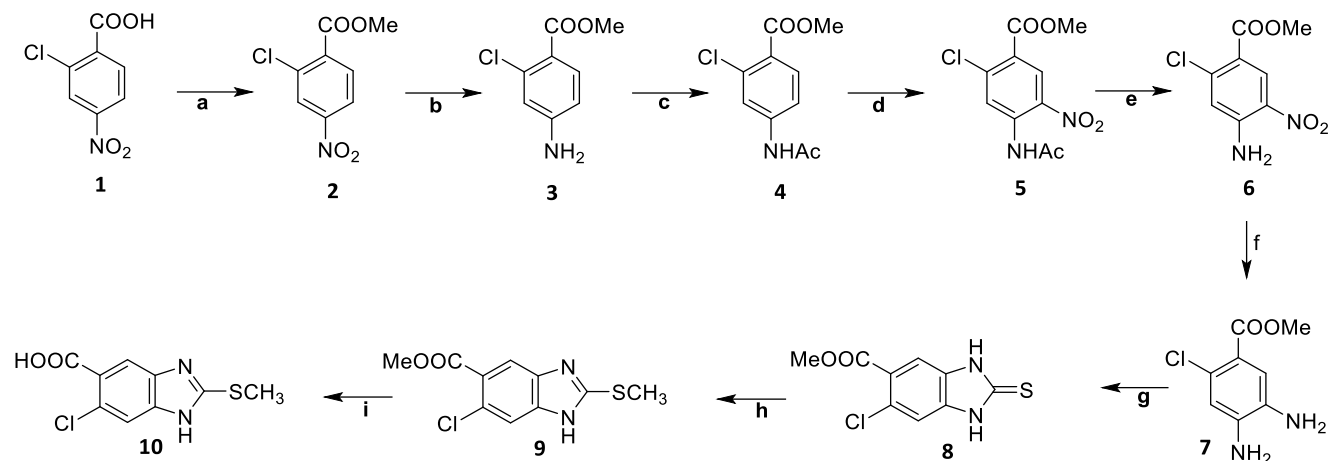
6. METODOLOGÍA

Este apartado en su primera parte comprende la secuencia de pasos para la obtención de **JOULZ-PRO**. En la segunda parte se describe la metodología que se llevó a cabo para determinar la solubilidad acuosa y por último se presenta el ensayo biológico que demuestra la eficacia cisticida.

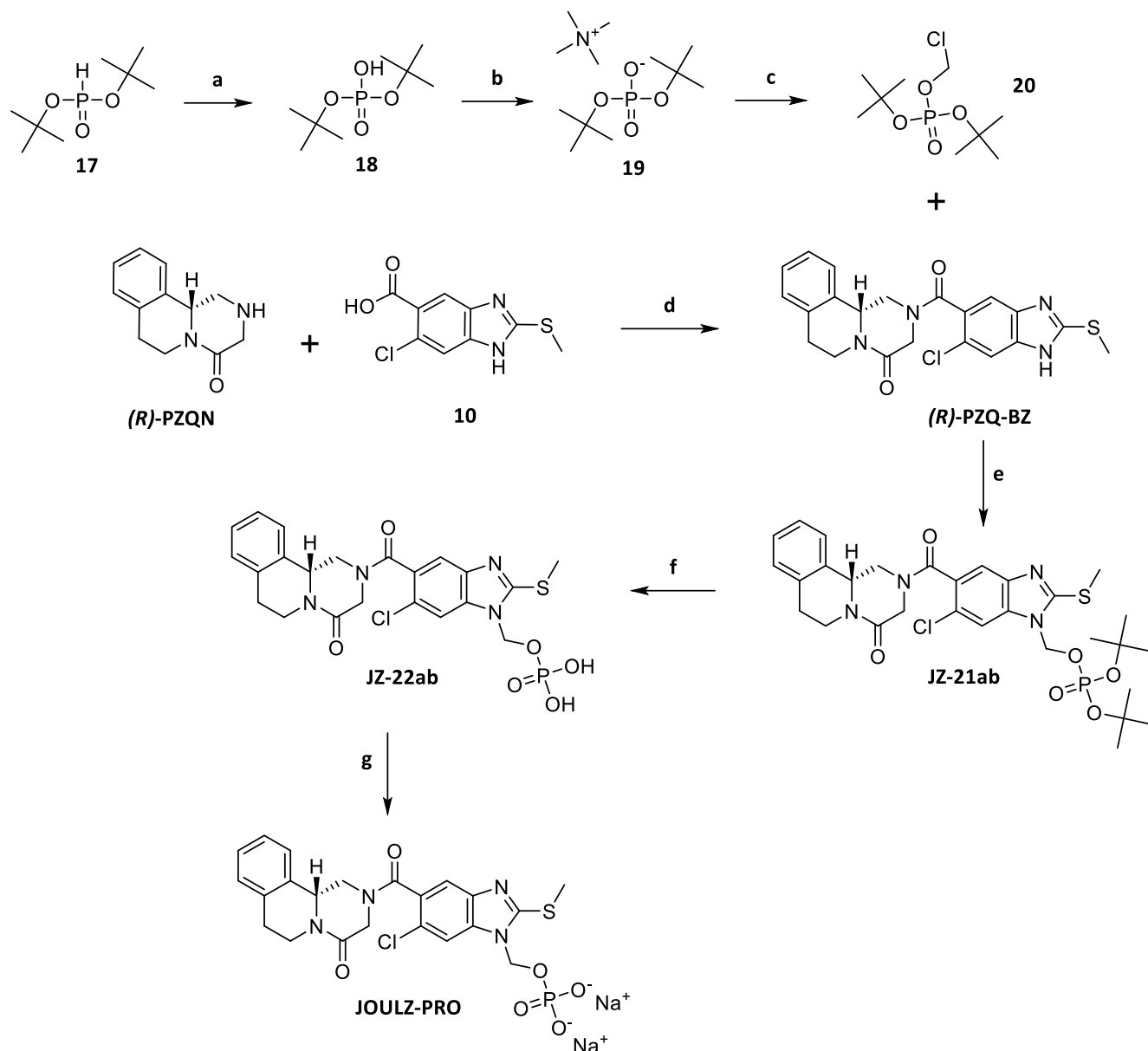
6.1. Parte química

Se realizó una ruta sintética convergente (**Esquema 6.2**) que involucró la formación de tres intermediarios clave (**10**, **20** y **(R)-PZQN**) para la obtención del profármaco hidrosoluble **JOULZ-PRO** como la mezcla de regioisómeros.

En primer lugar, el ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**), precursor para la síntesis de **(R)-PZQ-BZ**, se sintetizó mediante una ruta de 9 pasos (**Esquema 6.1**). Partiendo del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**1**) se llevó a cabo la formación del 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**) utilizando sulfato de dimetilo en condiciones básicas. Después, mediante una reducción catalítica con H₂ y Ni-Raney se obtuvo el 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**), el cual se acetiló con anhídrido acético para dar el 4-(acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo (**4**). Con una mezcla sulfonítrica se nitró la posición 5 de compuesto **4**, permitiendo aislar el 4-(acetilamino)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**), que se hidrolizó en medio básico para obtener el 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**), este se redujo con H₂ y Ni-Raney, lo que generó el 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**7**), el cual inmediatamente se cicló con etilxantato de potasio y dio lugar al 6-cloro-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**). La tiourea **8** se sometió a una *S*-metilación con yodometano en medio básico y generó el 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**). Finalmente, la hidrólisis de **9** con KOH en metanol llevó al ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**).



Esquema 6.1. Ruta de síntesis para obtener el ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**). (a) (CH₃)₂SO₄, NaHCO₃, DMF, 75 °C; (b) H₂, Ni-Raney, AcOEt:MeOH (4:1); (c) Ac₂O; (d) H₂SO₄/HNO₃, 0-8 °C; (e) NaOH, MeOH; (f) H₂, Ni-Raney, AcOEt:MeOH (4:1); (g) CS₂, EtOH, KOH; (h) CH₃I, Acetona, 0 °C; (i) KOH, MeOH.

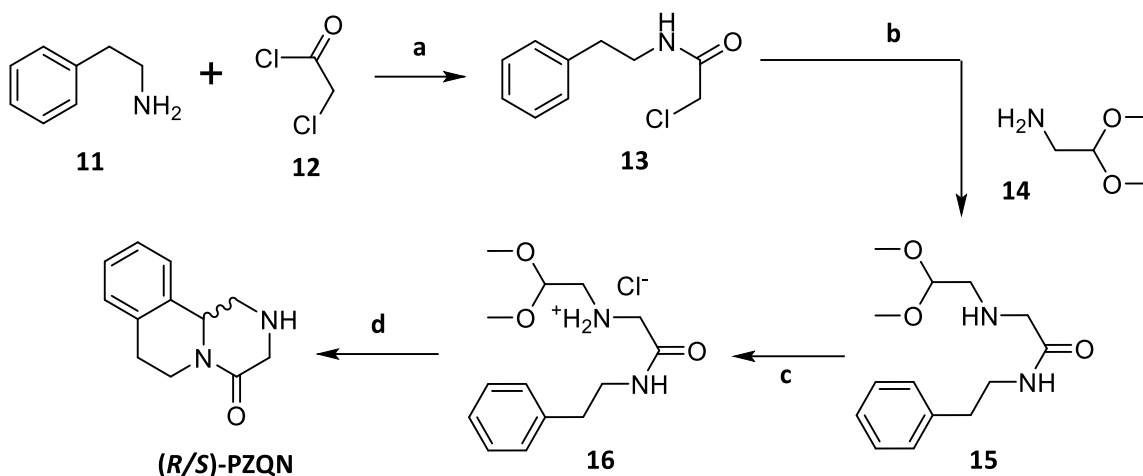


Esquema 6.2. Síntesis convergente de **JOULZ-PRO**. (a) 1. KMnO_4 , NaHCO_3 , H_2O , $0-5\text{ }^\circ\text{C}$, 2. HCl , $0-5\text{ }^\circ\text{C}$. (b) $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$, Acetona; (c) NaHCO_3 , $n\text{-Bu}_4\text{NHSO}_4$, $\text{ClCH}_2\text{OSO}_2\text{Cl}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, $0-20\text{ }^\circ\text{C}$; (d) PyBOP, NMM, DMF; (e) Cs_2CO_3 , DMF, Et_3N , $25\text{ }^\circ\text{C}$; (f) HCl 4 M en dioxano, $20\text{ }^\circ\text{C}$; (g) Na_2CO_3 , MeOH, $20\text{ }^\circ\text{C}$. NOTA: En las reacciones e, f y g se obtiene mezcla de regioisómeros; sin embargo, por cuestiones prácticas solo se muestra uno de ellos.

El segundo intermediario principal, la **(R)-PZQN**, se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Kim, J (**Esquema 6.3**).⁴⁴ Partiendo de la feniletilamina (**11**), esta se hizo reaccionar con cloruro de cloroacetilo (**12**) en condiciones básicas para formar la 2-cloro-*N*-(2-feniletil)acetamida (**13**). Posteriormente, la acetamida **13** se hizo reaccionar con el aminoacetaldehído dimetil acetal (**15**) en tolueno a temperatura de reflujo para obtener la 2((2,2-dimetoxietil)amino)-*N*-fenetilacetamida (**15**); la cual, haciéndola reaccionar con HCl en diclorometano se aisló en forma de clorhidrato (cloruro de

N-(2,2-dimetoxietil)-2-oxo-2-(feniletilamino)etanamionio (**16**). Por último se realizó la ciclación de Pictet-Spengler utilizando H₂SO₄ concentrado, lo que generó la (*R/S*)-PZQN (1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona). La resolución de la mezcla racémica se realizó mediante el enriquecimiento del enantiómero *R*, vía recristalización de la sal diastereomérica (*R*)-PZQN-DBLTA (Esquema 6.4).

Una vez obtenidos los compuestos (*R*)-PZQN y **10** se hicieron reaccionar utilizando PyBOP como agente acoplante, NMM como base en DMF a 25 °C (Esquema 6.2), para formar la carboxamida híbrida (*R*)-PZQ-BZ ((11*bR*)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona).

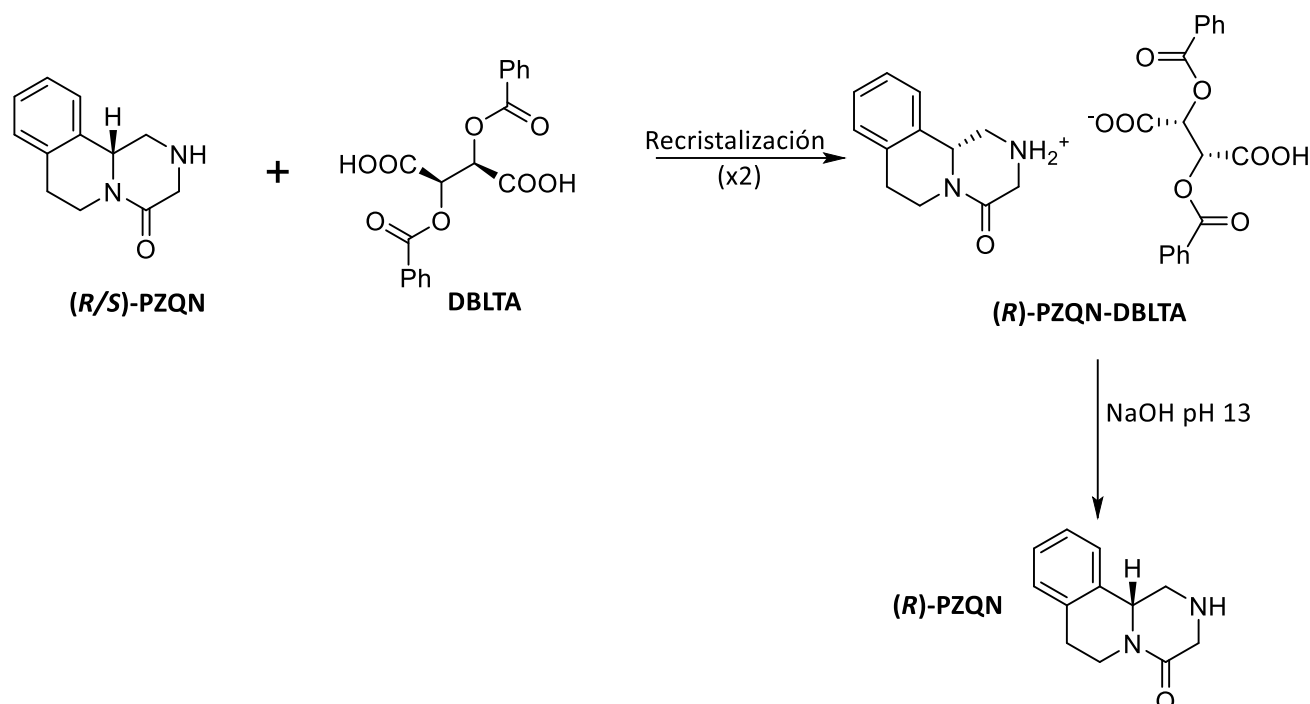


Esquema 6.3. Síntesis de la (*R/S*)-PZQN como mezcla racémica. (a) NaHCO₃, CH₂Cl₂; (b) Tolueno, reflujo; (c) HCl, CH₂Cl₂; (d) H₂SO₄ concentrado.

Por otro lado, se sintetizó el fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**20**) como se muestra en el Esquema 6.2, utilizando como materia prima el fosfonato de di-*tert*-butilo (**17**). Este se oxidó con KMnO₄ en presencia de bicarbonato de sodio y generó el fosfato monoácido de di-*tert*-butilo (**18**). Después, se formó el di-*tert*-butilfosfato de tetrametilamonio (**19**) e inmediatamente se trató con clorosulfato de clorometilo mediante una reacción de fase heterogénea, utilizando como catalizador de transferencia de fase sulfato monoácido de tetrabutilamonio, lo que permitió aislar el intermediario **20**.

Una vez que se confirmó la pureza de los intermediarios (*R*)-PZQ-BZ y **20** por sus propiedades fisicoquímicas de R_f en CCF y P_f., además de realizar la elucidación estructural por RMN de ¹H, ¹³C, ³¹P y espectrometría de masas. Los compuestos (*R*)-PZQ-BZ y **20** se acoplaron mediante una reacción S_N2; utilizando trietilamina (Et₃N) como catalizador, Cs₂CO₃ como base y DMF como disolvente en condiciones anhidras, se logró obtener el derivado triéster de fosfato como mezcla de regioisómeros **JZ-21ab** (fosfato de (11*bR*)-((5/6-cloro-2-(metiltio)-5/6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metil) di-*tert*-butilo). Posteriormente, se efectuó la desprotección del grupo fosfato utilizando HCl para generar el fosfato diácido **JZ-22ab**

(fosfato diácido de (11b*R*)-(5/6-cloro-2-(metiltio)-5/6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo; nuevamente como mezcla de regioisómeros). La mezcla anterior se convirtió a sal disódica realizando un tratamiento básico con Na₂CO₃ en metanol, dando lugar al profármaco **JOULZ-PRO** (fosfato disódico de (11b*R*)-(5/6-cloro-2-(metiltio)-5/6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo) (**Esquema 6.2**).



Esquema 6.4. Enriquecimiento del enantiómero (*R*)-PZQN.

6.2. Determinación de la solubilidad acuosa de (*R*)-PZQ-BZ y JOULZ-PRO

La solubilidad en agua de los compuestos (*R*)-PZQ-BZ y **JOULZ-PRO** se determinaron por el método de *Shake Flask* como ya había sido reportado por Baka⁷⁹ con algunas modificaciones. Se evaluaron dos soluciones amortiguadoras (SA), fosfatos pH 7.4 (SAF) y boratos pH 9.0 (SAB), ambas a una concentración 0.05 M. Lo anterior, con la finalidad de evaluar la solubilidad en función del pH, ya que es un estudio fundamental para moléculas que poseen grupos funcionales ionizables,⁸⁰ como la sal disódica de fosfato **JOULZ-PRO**.

Para comenzar, se prepararon las SA de fosfato y borato como lo indica la **Sección 10.3.1**. Posteriormente, se realizó un barrido de longitud de onda en el espectrofotómetro para determinar la longitud de máxima absorción tanto del precursor ((*R*)-PZQ-BZ) como del profármaco (**JOULZ-PRO**), siendo 303.0 y 303.5 nm, respectivamente. Después, se realizó un estudio preliminar de solubilidad cinética como lo indica la **Sección 10.3.2**, con la finalidad de conocer las condiciones de saturación antes de realizar el ensayo de solubilidad termodinámica.

Después, se realizó la curva patrón por triplicado, de cada compuesto, en cada SA (**Sección 0 y 0**). Se midieron cinco niveles: 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/mL para (**R**)-PZQ-BZ y 5, 10, 20, 30, 40 µg/mL para **JOULZ-PRO**.

Por último, las muestras a evaluar se prepararon bajo condiciones de saturación en 500 µL de SA, según los resultados de la solubilidad cinética ((**R**)-PZQ-BZ: 10 mg en SAF y SAB. **JOULZ-PRO**: 70 mg SAF, 100 mg SAB). Se determinó por triplicado la solubilidad termodinámica por el método de *Shake Flask* en ambas SA, el cual consistió en agitar a temperatura constante (25 °C) durante 24 h a 300 rpm en un *Shaker*. Terminado el tiempo de agitación centrifugar a 4000 rpm, tomar una alícuota del sobrenadante y realizar las diluciones pertinentes para poder interpolar en las curvas patrón. Con los datos de absorbencia se calculó la solubilidad termodinámica del precursor y del profármaco (**Sección 10.3.5**).

6.3. Evaluación de la actividad cisticida *in vivo*

Este experimento se realizó con la finalidad de evaluar la eficacia cisticida de **JOULZ-PRO**. Se realizó bajo el protocolo reportado por Palomares *et al.*¹⁸ El modelo animal utilizado empleó ratones hembra BALB/c y cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Para la infección, 32 ratones hembras BALB/c entre 16-18 g fueron inoculados con 30 cisticercos de *T. crassiceps* suspendidos en 0.5 mL de solución salina estéril al 0.9% vía intraperitoneal. Antes de la inoculación se comprobó la integridad de los parásitos usando un microscopio estereoscópico. Durante todo el experimento los ratones se mantuvieron con libre acceso a comida y agua, 20 ± 2 °C, 55 ± 5% humedad y ciclos de 12 h luz/oscuridad. Se formaron 4 grupos de 8 ratones cada uno: control y tratamiento (**JOULZ-PRO**, PZQtel y ABZ). Los animales fueron manipulados acorde a la NOM-062-ZOO-1999.

Diez días post infección, los ratones ahora con un peso entre 20-23 g, fueron administrados vía intramuscular con agua inyectable (control) o tratamiento.

El compuesto **JOULZ-PRO** se preparó justo antes de la administración. Se utilizó una dosis de 13.6 mg **JOULZ-PRO**/kg, equivalente a 10 mg (**R**)-PZQ-BZ/kg; disolviendo la dosis para los 8 ratones en agua inyectable. La preparación resultó ser una solución sin precipitados. Cada ratón se administró con 0.05 mL. La duración del tratamiento fue de 7 días, alternando una inyección en cada pierna.

Otros dos grupos de 8 ratones cada uno, se administraron con PZQtel y ABZ vía oral a una dosis de 50 mg/kg. La suspensión se preparó inmediatamente utilizando como vehículo carboximetilcelulosa (CMC)/agua destilada, 0.5%. La duración del tratamiento fue de 7 días.

Durante el tratamiento los animales permanecieron bajo las condiciones antes mencionadas y no se observó ninguna anormalidad en cuanto a consumo de alimento o actividad. Al cabo del tratamiento los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, los parásitos se recuperaron del peritoneo y se contaron utilizando un microscopio estereoscópico.

6.3.1. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se representaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 7.00. Las diferencias entre los grupos se analizaron con un ANOVA de una vía, seguida de una prueba Post-Hoc *t*-Dunnett. El valor de $\alpha = 0.05$. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como criterio para la significancia estadística.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección se divide en: parte química, determinación de la solubilidad termodinámica y parte biológica con la finalidad de conceptualizar de manera concreta los resultados y poderlos analizar con facilidad. En la sección química se abordan los resultados de la parte sintética y la caracterización de los compuestos mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , RMN en dos dimensiones (COSY, NOESY, HMBC, HSQC), además espectrometría de masas (EM) de baja y alta resolución. Por otro lado, la sección analítica, contempla los hallazgos del incremento en la solubilidad del profármaco **JOULZ-PRO**. Por último, la parte biológica contiene los resultados y el análisis de actividad antihelmíntica, donde se pone en manifiesto la sensibilidad de *T. crassiceps* frente al profármaco.

7.1. Parte química

Los resultados correspondientes a la síntesis química se presentan considerando dos de los intermediarios más importantes; **10** y (**R**)-**PZQN** y por otro lado la síntesis de **JOULZ-PRO**. En los tres casos se incluyen los hallazgos interesantes respecto a la elucidación estructural por RMN y EM (**APÉNDICE B. ESPECTROS**). Las técnicas utilizadas y la descripción a detalle de la síntesis se encuentran más adelante (**Sección 10.2**).

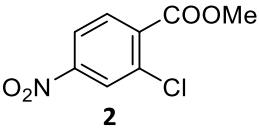
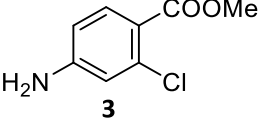
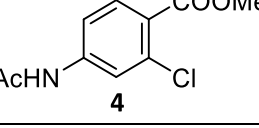
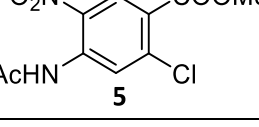
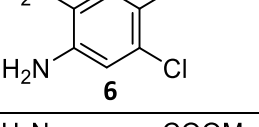
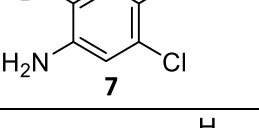
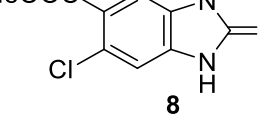
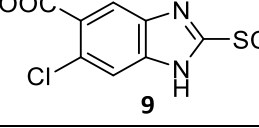
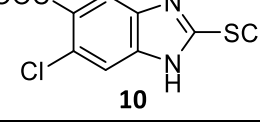
7.1.1. Síntesis del ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10)

La síntesis de este intermediario a partir del ácido 2-cloro-4-nitrocarboxílico ya ha sido ampliamente estudiada en nuestro grupo de investigación. Como se muestra en la **Tabla 7.1** los intermediarios se aislaron sin dificultad siguiendo la ruta del **Esquema 6.1** con algunas modificaciones a las técnicas antes reportadas.^{53,77} Los compuestos se caracterizaron por sus propiedades fisicoquímicas de R_f y P_f , además la elucidación estructural se realizó por RMN de ^1H y ^{13}C , los resultados son consistentes con la literatura.⁷⁷

Se decidió realizar la esterificación del ácido carboxílico **1**, utilizando sulfato de dimetilo a pesar de su toxicidad, porque en contraste con la esterificación de Fischer, los tiempos de reacción son más cortos y se utiliza menos disolvente. La hidrogenación catalítica de **2**, es una buena alternativa para evitar el laborioso trabajo de la reacción que conlleva la reducción química con sales de estaño. Se realizó la protección del grupo amino en **3** previo a la nitración, ya que las condiciones fuertemente ácidas de la mezcla sulfonítrica protonarían la amina, esta al ser un grupo fuertemente electroattractor dirigiría la nitración en la posición *meta*. Una vez obtenida la acetamida **4**, se llevó a cabo la reacción de nitración; sin embargo, se generó una mezcla de dos regioisómeros en una relación aproximadamente 7:3, mayoritariamente el compuesto como resultado la nitración en la posición 5 (**5**). Para aislar el compuesto de interés, se realizó una recristalización en MeOH/EtOH. El espectro de resonancia de ^1H confirma el sistema de acoplamiento aromático *para*, ya que se observan dos señales simples en 8.05 y 8.42 ppm que integran cada una a 1H; por el contrario, de

haber aislado el compuesto nitrado en la posición 3 se hubiera observado un señal doble, consecuencia del acoplamiento en *orto* con $J = 8$ Hz (**Figura 7.1**).

Tabla 7.1. Resultados de la síntesis del ácido 6-cloro-2-(metiltilio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**)

Compuesto	Rendimiento (%)	Pf. (°C)	R _f (Sistema de elución).
 2	92	76.1-77.1	0.7 (I + 2 gotas de NH ₄ OH)
 3	96	106.4-107.8	0.52 (I)
 4	99	108.7-109.6	0.44 (I)
 5	54	140.8-141.4	0.64 (I)
 6	88	220.8-221.5	0.62 (I)
 7	ND	ND	0.33 (I)
 8	94	250.6-251.8	0.44 (I)
 9	99	191.4-192.3	0.62 (II)
 10	89	220.1-221.0	0.20 (V)

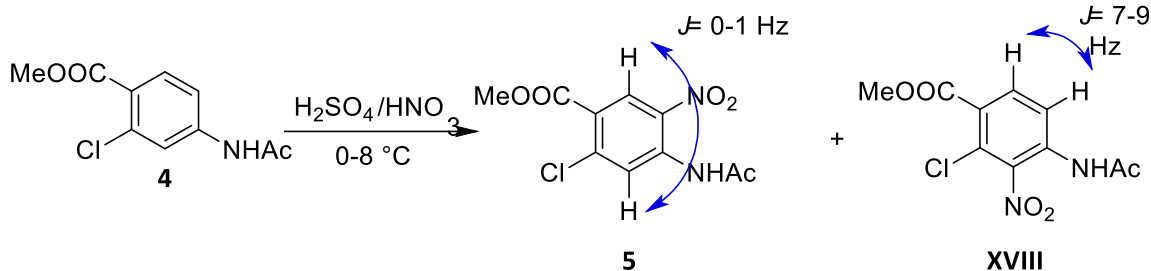


Figura 7.1. Regioisómeros derivados de la reacción 10.2.4 (Apéndice A) para obtener **5**.

Para obtener el compuesto **6**, se exploró la hidrólisis básica y la ácida. Ambas generaron el producto con el mismo rendimiento; no obstante, la hidrólisis básica fue más eficiente, puesto que lo hizo en menor tiempo y a temperatura ambiente. Esto se debe a que el grupo hidroxilo es mejor nucleófilo que el metanol o el agua, que son los responsables de la hidrólisis en la reacción ácida. Como consideración importante para la hidrólisis básica, no permitir que se eleve la temperatura más de $30\text{ }^\circ\text{C}$ para que la hidrólisis sea selectiva y no se hidrolice el éster. La RMN de ^1H demuestra que el grupo éster está intacto, ya que permanece la señal en 3.78 ppm que integra para 3H y la señal de ^{13}C en 52.2 ppm; correspondientes al metilo del éster.

La hidrogenación para obtener la *o*-fenilendiamina **7** es un poco más difícil que la del compuesto **2**, por lo que requirió calentamiento, esto debido a que el grupo amino mantiene ligeras interacciones con el Níquel y no lo deja 100% libre para interactuar con el grupo nitro. Cabe destacar que de haber preferido utilizado Pd/C, el catalizador se hubiera “envenenado” debido a la fuerte coordinación de las aminas con el Pd.⁸¹ Una vez llevada a cabo la hidrogenación, se sometió directamente a las condiciones de ciclación puesto que el producto tiende a descomponerse por oxidación.

Para obtener el bencimidazol **8**, la reacción se realizó vía la previa formación del xantato de etilo (EtOCS_2K) y después se hizo reaccionar con la diamina **7**. Particularmente, este intermediario manifestó tautomería tiourea-tiol (**Figura 7.2**). Con base en el desplazamiento químico en el espectro de RMN ^1H , se pudo afirmar que el equilibrio se encuentra desplazado a la formación de la tiourea, ya que se observó una señal simple y amplia a 12.90 ppm que integra para 2H, además de la señal en 165.14 ppm de ^{13}C , correspondiente al carbono de la tiourea.

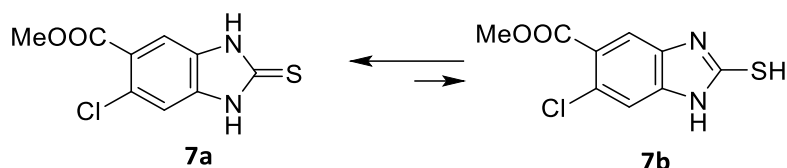


Figura 7.2. Equilibrio tiourea-tiol.

Después, la tiourea **8** se *S*-metiló utilizando yoduro de metilo y se aisló el compuesto **9**, la reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) procedió sin complicación y el producto se aisló sin dificultad. El uso de un disolvente aprótico favoreció la reacción, como es típico en las

sustituciones nucleofílicas bimoleculares. Una observación importante es que para evitar la dimetilación, es necesario asegurarse de medir con exactitud 1 eq. de yodometano. En caso de ser necesario, adicionar más agente alquilante, si solo si, al ajustar el pH a 10 con KOH la reacción no ha terminado. De encontrarse en esa situación, adicionar CH₃I por etapas de 0.1 eq.

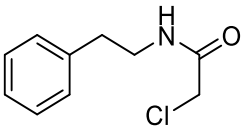
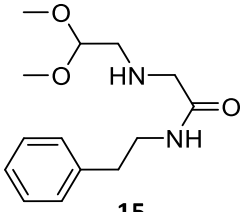
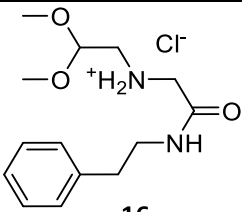
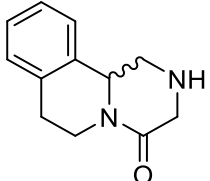
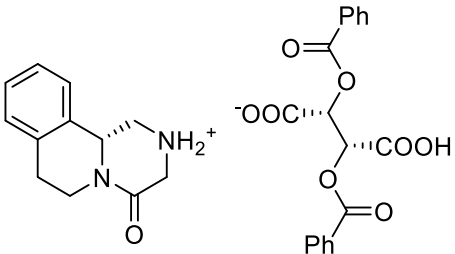
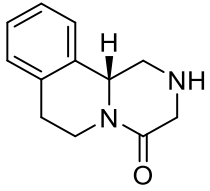
Por último, la hidrólisis del éster **9** se realizó en condiciones básicas a temperatura de reflujo en metanol obteniéndose buen rendimiento. La clave para poder aislar la mayor cantidad está en ajustar el pH del agua a 3 al momento de recuperar el sólido por filtración. Además, recuperarlo por etapas, es decir, luego de recuperar la primer fracción por filtración, las aguas madres someterlas al mismo tratamiento con el fin de precipitar más compuesto. Esto se debe que el ácido carboxílico **10** naturalmente es un *zwitterion* y manifiesta un equilibrio dinámico en disolución, alcanzando un 30% de máxima abundancia (según cálculos teóricos con el software Marvin Sketch) para la molécula neutra y al ir retirando el sólido por etapas se desplaza el equilibrio a la especie de interés.⁵³ La RMN confirma inequívocamente que se obtuvo el intermediario **10** (**Sección 10.2.10**) y en el espectro de masas se observó el ion molecular con un valor 242 *m/z* (100%). Además, aparece el pico isotópico del cloro en el [M + 2]⁺ con una abundancia relativa del 35%, lo cual confirma que después de la hidrogenación catalítica no ocurrió hidrogenólisis del enlace cloro-carbono.

7.1.2. Síntesis de (11bR)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-*σ*]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQN)

La síntesis utilizada para obtener- la PZQN fue la reportada por Kim⁴⁴ (**Esquema 6.3**) con ligeras modificaciones, esta se utiliza a nivel industrial para la síntesis de praziquantel. Adicionalmente, se realizó la resolución de la mezcla racémica para enriquecer el enantiómero *R* (**Esquema 6.4**). Nuevamente, como en la sección anterior se muestran los hallazgos más importantes de la síntesis y de la elucidación estructural por RMN de ¹H y ¹³C. El detalle de las técnicas puede consultarse en la **Sección 10.2**.

Como se puede ver en la **Tabla 7.2** los rendimientos van de moderados a buenos. Partiendo de la feniletilamina (**11**) se llevó a cabo una reacción de adición-eliminación sobre el carbonilo del cloruro de cloroacetilo (**12**) para generar el compuesto **13**. La temperatura resultó ser una variable importante, ya que mantener la temperatura por debajo de los 10 °C evita reacciones secundarias sobre el carbono sp³ de **13**. La quimioselectividad de la reacción es evidente ya que en el espectro de resonancia de ¹H se observó la señal simple en 4.00 ppm que integró para 2H correspondiente al metileno susceptible a una reacción colateral tipo S_N2. En adición, en el espectro de masas se observó el [M⁺]= 197 *m/z* con la isotopía característica del cloro en el [M + 2]⁺.

Tabla 7.2. Resultados de la síntesis de la (*R*)-PZQN

Compuesto	Rendimiento (%)	Pf. (°C)	R _f (Sistema de elución)
 <p>13</p>	94	59.0-60.3	0.53 (III)
 <p>15</p>	86	ND	0.35 (III)
 <p>16</p>	64	150.0-150.8	ND
 <p>(R/S)-PZQN</p>	77	117.4-119.1	0.30 (IV+1 gota de NH ₄ OH)
 <p>(R)-PZQN-DBLTA</p>	39 (global)	138.1-139.7	ND
 <p>(R)-PZQN</p>	85	123.1-123.7	0.18 (I) 0.31 (IV+1gota de NH ₄ OH)

El siguiente paso fue realizar una sustitución alifática bimolecular sobre **13** utilizando al aminoacetaldehído dimetil acetal (**14**) para formar la acetamida **15**; la reacción procedió sin dificultad. En los experimentos de RMN de ^1H se observó que el desplazamiento químico de los hidrógenos del metileno alfa al carbonilo, cambiaron de 4.00 ppm a 3.24 ppm; lo mismo sucedió con la señal de ^{13}C que pasó de 42.7 ppm a 51.1 ppm. Lo anterior es evidencia de que ocurrió la transformación y en conjunto con las demás señales, las cuales que coinciden con lo previamente reportado,⁴⁴ confirman la obtención del compuesto deseado (**Sección 10.2.12**). Cabe destacar que cuando se utiliza como disolvente CDCl_3 en la RMN, se observó que los hidrógenos bencílicos se ven como dos señales repetidas, pero no están en la misma proporción, lo que se puede atribuir a la presencia de isómeros de conformación (rotámeros) consecuencia de la rigidez del enlace C-N del grupo amida (**Figura 7.3**). Es importante mencionar que dichas señales pudiesen llegar a considerarse como restos de la materia prima **13**; no obstante, por la intensidad de las señales, debería aparecer también la señal del metileno en 4.00 ppm, lo cual no sucede. Adicionalmente, otro argumento a favor de la existencia de los rotámeros, es que en RMN ^{13}C también las señales en 35.8 y 40.1 ppm se desdoblán en dos de diferente intensidad. Por cuestiones prácticas, la elucidación estructural se llevó a cabo considerando solo el isómero en mayor proporción.

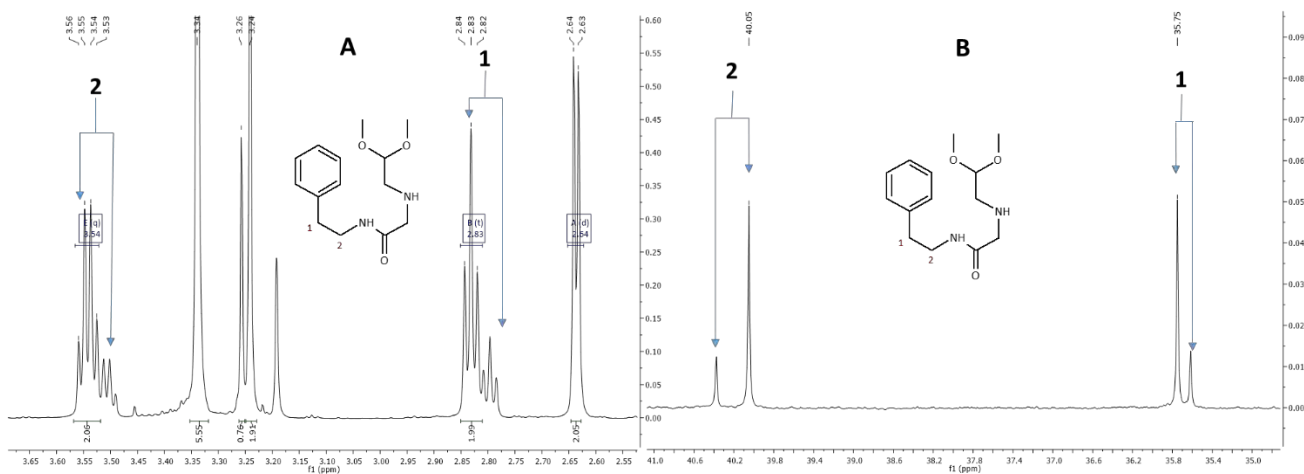


Figura 7.3. Isómeros de rotación del compuesto **15**. **A.** Espectro de ^1H de **15**; **B.** Espectro de ^{13}C de **15**.

Debido a que el producto de la reacción anterior se obtuvo como una resina oleosa, el compuesto **15** se trató con HCl para formar el clorhidrato **16** y de esta manera aislarlo. Se obtuvo un sólido blanco que en RMN ^1H , disuelto en D_2O generó un espectro más sencillo, con desplazamientos químicos muy similares a **15**. En esta parte de la ruta fue donde se obtuvo el menor rendimiento (64%), lo cual se atribuye a la conocida solubilidad de las sales de amonio en disolventes clorados (CH_2Cl_2).

Por último, se realizó la ciclación de Pictet-Spengler para la formación de la praziquanamina cuya secuencia de reacción cursa como se ilustra en la **Figura 7.4**. Para la elucidación estructural y la asignación de todos los hidrógenos se recurrió a experimentos de RMN en 2D.

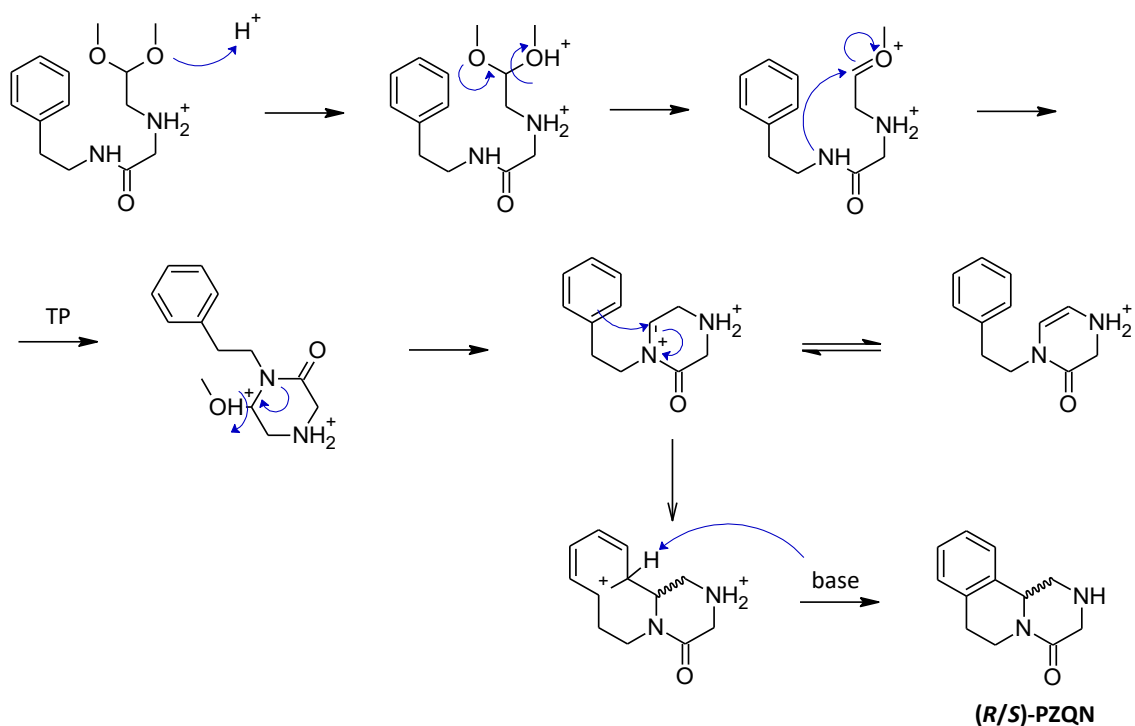


Figura 7.4. Secuencia de reacción para la formación de **(R/S)-PZQN**.

La serie de hallazgos que se siguieron para la elucidación estructural de **(R)-PZQN** fueron:

- 1) Se asignó a la señal del espectro de ¹³C con desplazamiento en 56.7 ppm como el centro quiral (C_{11b}), por ser el único carbono en el espectro de HSQC (**Figura 7.5**) que correlaciona con una señal de hidrógeno, dicha señal, está centrada en 4.84 ppm y corresponde al metino de la posición 11b (HC_{11b}). Cada una de las otras 4 señales de carbonos alifáticos, en el espectro HSQC correlaciona con dos señales de protón, por lo tanto son metilenos; cabe destacar, que estos hidrógenos alifáticos son diastereotópicos por lo tanto se observa una señal por cada uno.
- 2) En el espectro COSY (**Figura 7.6**), la señal de hidrógeno centrada en 4.84 ppm (HC_{11b}) tuvo correlación con las señales múltiples centradas en 2.90 y 3.75 ppm, por lo que se infirió que se trata de los hidrógenos de la posición 1 (HC₁). A su vez, estos correlacionan en el espectro HSQC con la señal de carbono en 49.7 ppm, por lo que dicha señal corresponde al carbono de la posición 1 (C₁).
- 3) Los hidrógenos de la posición 3 (HC₃) no tienen hidrógenos adyacentes con quién acoplarse (están entre el nitrógeno y el carbonilo), por lo que en el espectro COSY solo se ve el acoplamiento geminal de estos en (3.54, 3.68) ppm. Siguiendo la lógica del punto 2, debido a que estas señales de protón correlacionan en el espectro HSQC con la señal de ¹³C en 49.9 ppm, la señal corresponde al carbono de la posición 3 (C₃).
- 4) La señal ddd centrada en 4.86 ppm del espectro de ¹H debe corresponder al hidrógeno vecino al nitrógeno cabeza de puente (HC₆); en el espectro HSQC, dicha señal correlaciona con la señal de

carbono a 38.8 ppm, que corresponde a C₆. La señal de protón a 2.84 ppm (HC₆) también correlaciona con la señal de carbono antes mencionada (C₆), de lo que se postula que ambos hidrógenos son geminales.

- 5) Por último, resta el par de hidrógenos de la posición 7, cuyas señales se observan en 2.99 y 2.75 ppm (HC₇); el espectro HSQC ambas correlacionan con la señal de carbono a 28.8 ppm (C₇).

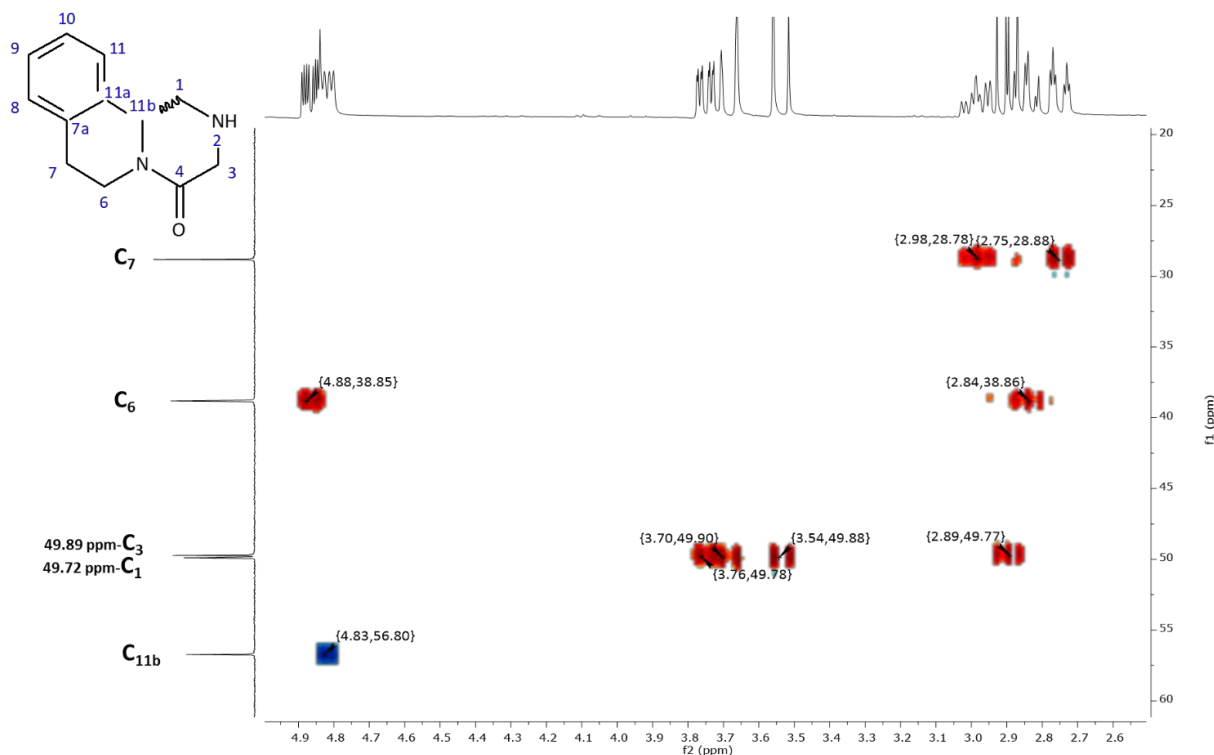


Figura 7.5. Espectro HSQC de (*R*)-PZQN.

Siguiendo con la elucidación estructural de (*R*)-PZQN, utilizando el valor de las constantes de acoplamiento (J) observados en el espectro de RMN ^1H , se infirió sobre la posición axial o ecuatorial de los hidrógenos. En la **Tabla 7.3** se resume el valor de las constantes de acoplamiento de los hidrógenos HC₁ y HC_{11b}, y a qué tipo de acoplamiento corresponden. Se sabe por la esteoquímica de la posición 11b (*R*) que el hidrógeno está en posición axial, este junto con el protón a 2.90 ppm tuvieron una $J=10$ Hz (valor que se considera posición axial), por lo tanto, se concluye que este último se encuentra en posición axial y *anti* al hidrógeno del centro quiral (posición 11b). Por otro lado, el hidrógeno con desplazamiento en 3.75 ppm, cuya J es de 4.68 Hz está en posición ecuatorial y *gauche* al hidrógeno de 11b.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

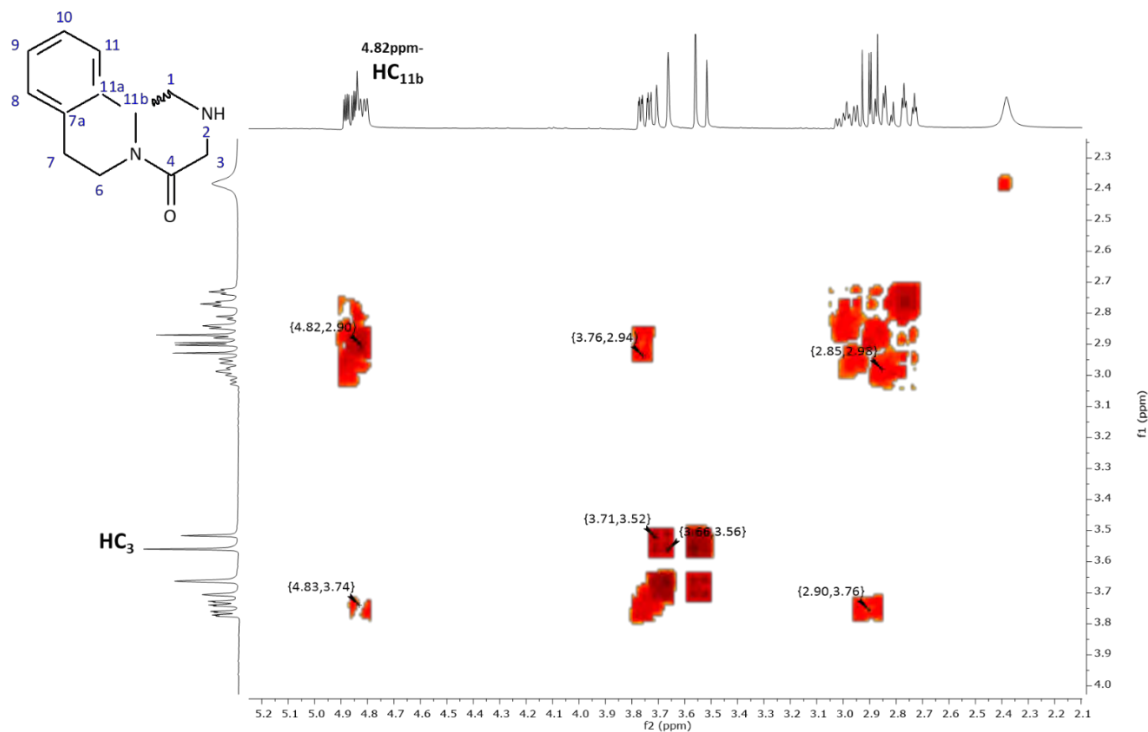


Figura 7.6. Espectro COSY de (*R*)-PZQN.

Tabla 7.3. Constantes de acoplamiento de los hidrógenos de la posición 11b y 1 de (*R*)-PZQN

	Constante de acoplamiento <i>J</i> en Hz		
δ [ppm]	4.82 (HC _{11b})	3.75 (HC ₁)	2.90 (HC ₁)
ax-ax	10	-	10
eq-ax	4.87	4.68	-
geminal	-	13	13

Análogamente al análisis anterior, en la **Tabla 7.4** se resumen las constantes de acoplamiento que sugieren la posición de los hidrógenos HC₆ y HC₇ en el anillo. Posición axial: hidrógenos con δ [ppm]= 2.84 (HC₆) y 2.99 (HC₇). Posición ecuatorial δ [ppm]= 2.75 (HC₇) y 4.86 (HC₆). En la **Figura 7.7** se presenta un resumen de la elucidación de (*R*)-PZQN.

Tabla 7.4. Constantes de acoplamiento de los hidrógenos de la posición 6 y 7 de (*R*)-PZQN

	Constante de acoplamiento <i>J</i> en Hz			
δ [ppm]	2.84 (HC ₆)	4.86 (HC ₆)	2.75 (HC ₇)	2.99 (HC ₇)
ax-ax	11.93	-	-	11.50
eq-ax	-	5.10	-	5.07
eq-eq	-	2.60	2.94	
geminal	-	-	15.64	15.80

En lo que respecta al par de hidrógenos diasterotópicos de la posición 3. Las J no permiten identificar su posición como en el caso anterior. En cambio, entre estos se observó un acoplamiento fuerte tipo ABq con $J_{AB} = 17.4$ Hz y $\Delta\delta_{AB} = 0.14$.

El espectro de masas evidencia el ion molecular con valor de 202 m/z (55% AR). El fragmento que corresponde al pico base se ilustra su formación en la **Figura 7.8**.

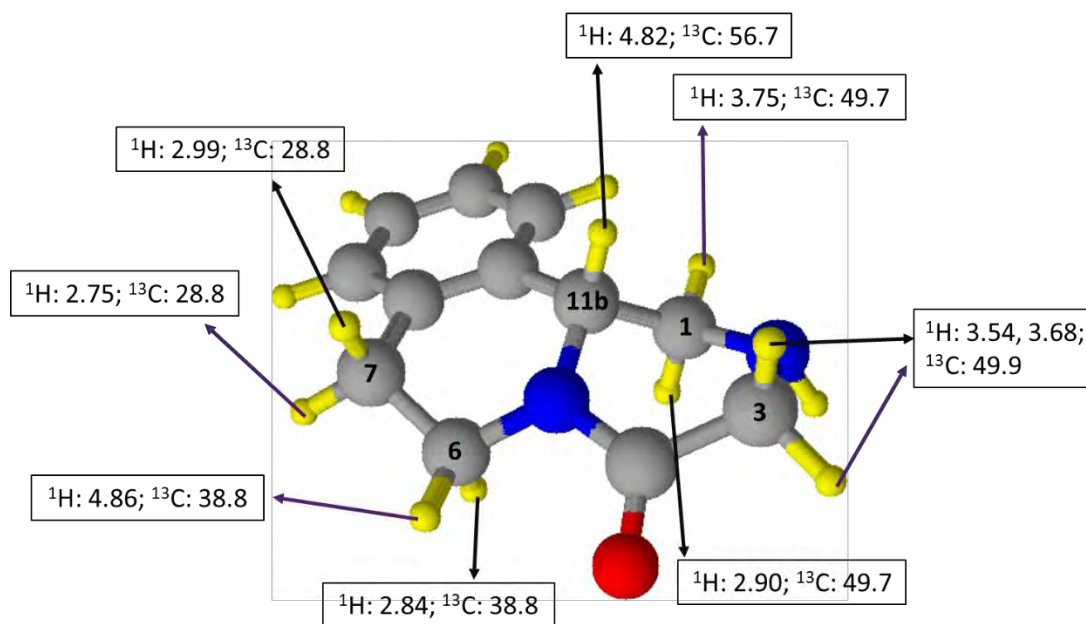


Figura 7.7. Resumen de desplazamientos químicos en ppm de **(R)-PZQN**.

Para la resolución racémica se recurrió al método de enriquecimiento vía formación de la sal diastereomérica con en el ácido dibenzoil-L-tartárico (**DBLTA**). Al cabo de dos recristalizaciones, el experimento de rotación óptica de la base libre, confirmó la obtención del enantiómero levógiro con un valor de $[\alpha]_D^{20} = -291.43$ [Disolvente: CH_2Cl_2 , [9.8 g/mL], $L = 1$ dm; α : -2.856 a 589 nm (Na)], que corresponde a un 95% *ee* respecto al valor reportado en la literatura $[\alpha]_D^{20} = -306$.⁸² Si se compara el punto de fusión del enantiómero **(R)-PZQN** (123.1-123.7 °C) con el de la mezcla racémica (117.4-119.1 °C), se observa un aumento, lo cual refleja un mayor empaquetamiento en la forma cristalina cuando el enantiómero está aislado. Tomando como referencia lo expuesto por Mislow respecto al tipo de racemato obtenido,³³ **(R/S)-PZQN** a primera vista podría tratarse de una forma racémica tipo conglomerado por tener *Pf.* menor al del enantiómero puro; no obstante, después de realizar una mezcla física de **(R/S)-PZQN** con **(R)-PZQN** en igual proporción, el punto de fusión se abate a 110.6-114.9 °C, lo cual concuerda con la definición de Mislow como “compuesto racémico”. Adicionalmente, se buscaron diferencias marcadas en los espectros de IR pero se obtuvo prácticamente el mismo espectro. A reserva de que en el espectro de **(R/S)-PZQN** (compuesto racémico) las bandas son más intensas en la región de 1497-409.03 cm^{-1} . Cabe destacar, que de haber resultado en un conglomerado, posiblemente se pudiera realizar la resolución de **(R/S)-PZQN** con una recristalización

simple después de adicionar un exceso del enantiómero *R*. Desafortunadamente, este compuesto se comporta igual que la mayoría de las formas racémicas.⁸³

El rendimiento global hasta este intermediario quiral (**(R)**-PZQN), utilizando como materia prima la feniletilamina (**11**) fue de 16%, en contraste con la metodología diastereoselectiva reportada por Seki, M.⁵⁰ que tuvo 20%, la metodología utilizada aquí tuvo menor rendimiento; sin embargo, es más barata y las materias primas para la síntesis a nivel industrial son de fácil acceso.

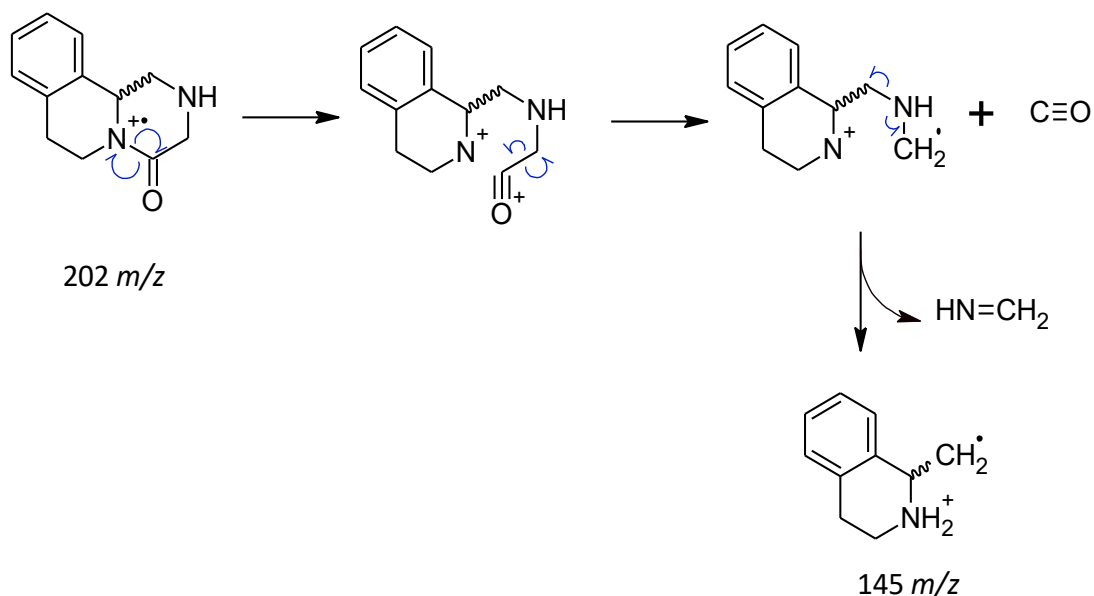


Figura 7.8. Fragmento más estable de (**R**)-PZQN en espectrometría de masas por IE.

7.1.3. Síntesis de JOULZ-PRO

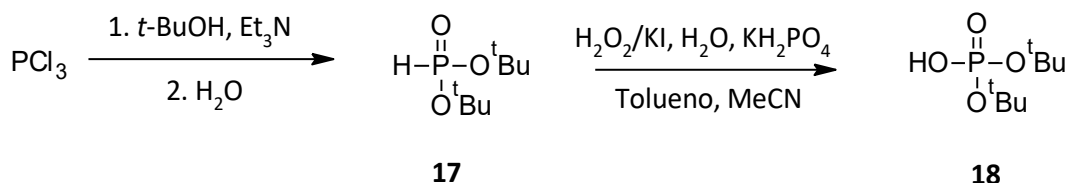
Nuevamente, el procedimiento a detalle de los resultados aquí analizados se puede consultar de la **Sección 10.2.17** a la **10.2.23**.

7.1.3.1. Síntesis de fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**20**)

El intermediario **20** ha sido ampliamente utilizado para introducir el grupo fosfonooximetilo en compuestos con aminas o alcoholes susceptibles a derivación, de esta manera, obtener profármacos biorreversibles; sin embargo, las metodologías que existen para preparar este reactivo son limitadas e involucran intermediarios costosos.⁸⁴⁻⁸⁶

Existen dos principales rutas para preparar el precursor que da lugar al fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (el fosfato monoácido **18**). La primera fue desarrollada por Zwiernak *et al.*,⁸⁵ partiendo del fosfonato de di-*terc*-butilo (**17**), el cual se oxida con KMnO_4 para obtener el compuesto **18**. Dicha metodología con algunas modificaciones,⁷⁵ fue la que se implementó en este proyecto de tesis. Una ruta alterna, no menos importante, fue la reportada por Zheng, B.⁸⁶ en 2014. A partir de PCl_3 y *ter*butanol se genera el fosfonato **17**, enseguida, una oxidación con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{KI}$ da lugar al fosfato **18** (**Esquema 7.1**).⁷⁷ Aunque esta ruta genera rendimientos modestos, las condiciones de reacción son

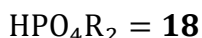
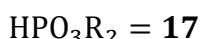
de mayor cuidado y el PCl_3 se ha vuelto un reactivo de difícil acceso en nuestro país debido a su regulación comercial.



Esquema 7.1. Síntesis de **18** reportada por Zheng.

Profundizando un poco sobre la reacción redox descrita en la **Sección 10.2.17** para la obtención de **20**, se puede balancear de la siguiente manera:

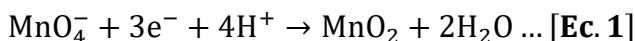
Siendo



La reacción sin balancear es:



Balanceando la reacción de reducción del permanganato por carga y masa:



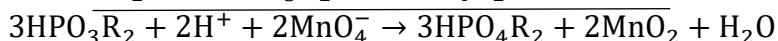
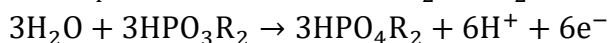
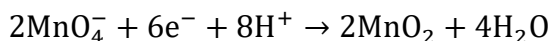
Balanceando la reacción de oxidación del fosfonato por masa:



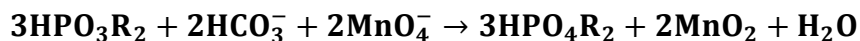
La Ecuación 2 puede reescribirse como:



Multiplicando la ecuación 1 x2 y la ecuación 3 x3, después sumando ambas ecuaciones:



Por lo tanto la ecuación balanceada con las especies que intervienen en la reacción es:



Según los coeficientes estequiométricos, se deben utilizar 2 mol de KMnO_4 y de HCO_3^- por cada 3 mol de HPO_3R_2 ; es decir, 0.6 mol de permanganato y de bicarbonato por cada mol de **17**. Lo anterior concuerda con los equivalentes usados por Zwierzak *et al.*;⁸⁵ sin embargo, en este trabajo se realizaron modificaciones a la técnica (0.9 eq. de permanganato y 1 eq. de NaHCO_3) con el objetivo de asegurar el consumo de la materia prima y obtener la especie de sal sódica para evitar su descomposición por el medio ácido.

La reacción de oxidación para obtener **18** procedió sin dificultad y se obtuvo un rendimiento casi cuantitativo. Se identificaron como variables críticas realizar extracciones sucesivas para recuperar el sólido por precipitación y utilizar la mínima cantidad de agua como disolvente (50 mL/25 g de **17**). En el espectro de RMN ^{31}P se observa la señal simple en -8.88 ppm, lo cual confirma la

obtención del fosfato. En suma, en el espectro de ^1H aparece la señal simple en 1.35 ppm que integra para 18H correspondiente a los *terc*-butilos. En el espectro de ^{13}C se observa una señal doble en 29.7 ppm que corresponde a los metilos y una señal doble en 79.6 ppm que pertenece al carbono cuaternario.

En lo que respecta a la obtención del fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**20**), la técnica reportada por Mäntylä;⁸⁴ que consiste en hacer reaccionar clorosulfato de clorometilo directamente con el fosfato **18**, resulta eficiente; sin embargo, se ha visto que si en lugar de esto, previamente se hace reaccionar el compuesto **18** con hidróxido de tetrametilamonio para obtener la sal de tetrametilamonio **19** se eleva considerablemente el rendimiento.⁷⁸ La reacción para la formación del di-*terc*-butilfosfato de tetrametilamonio (**19**) fue cuantitativa y se confirmó su obtención por la aparición de una señal simple en el espectro de RMN ^1H que integra para 12H y corresponde a los hidrógenos del tetrametilamonio, además de la señal triple en 54.31 ppm en el espectro de ^{13}C . Otro punto importante del por qué mantener el compuesto en forma de sal, es que, además del rendimiento se mejora su estabilidad a temperatura ambiente, ya que bajo condiciones ácidas sufre descomposición espontánea, es decir, los *terc*-butilos se desprotegen generando isobutileno.⁸⁵ Por esta misma razón, para conservar su vida útil en anaquel, al producto final (**20**) se le adicionó 10% mol de K_2CO_3 y se almacenó a -5°C .

Una vez aclarado el motivo de por qué utilizar la sal de tetrametilamonio **19**, esta se hizo reaccionar con $\text{ClCH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$ y bicarbonato de sodio como base en condiciones bifásicas ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) y utilizando un catalizador de transferencia de fase. La reacción generó un rendimiento moderado (60%). Los desplazamientos químicos en RMN están en concordancia con los previamente reportados, entre los que destacan: en el espectro de ^1H el metileno reactivo aparece como una señal simple a 5.59 ppm que integra para 2H, además, en el espectro de ^{13}C dicho metileno aparece en 84.0 ppm. En ^{31}P se observó una señal simple en -11.33 ppm, esto representa la existencia de un solo tipo de fósforo e indirectamente refleja una buena pureza.

Por último, es importante mencionar que las reacciones no se pudieron monitorizar por CCF ya que los compuestos no absorben la luz UV. Por ende, el seguimiento de las reacciones y la pureza se realizó directamente por RMN.

7.1.3.2. Síntesis de (*R*)-PZQ-BZ

El acoplamiento de (*R*)-PZQN con el ácido carboxílico **10** para la formación de la amida, se realizó utilizando como agente acoplante el benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfonio hexafluorofosfato (PyBOP®, Figura 7.9). El sólido obtenido, 90% crudo, contenía aparte del compuesto de interés, dos impurezas con R_f mayor a este.

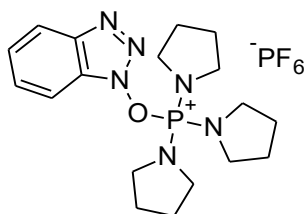
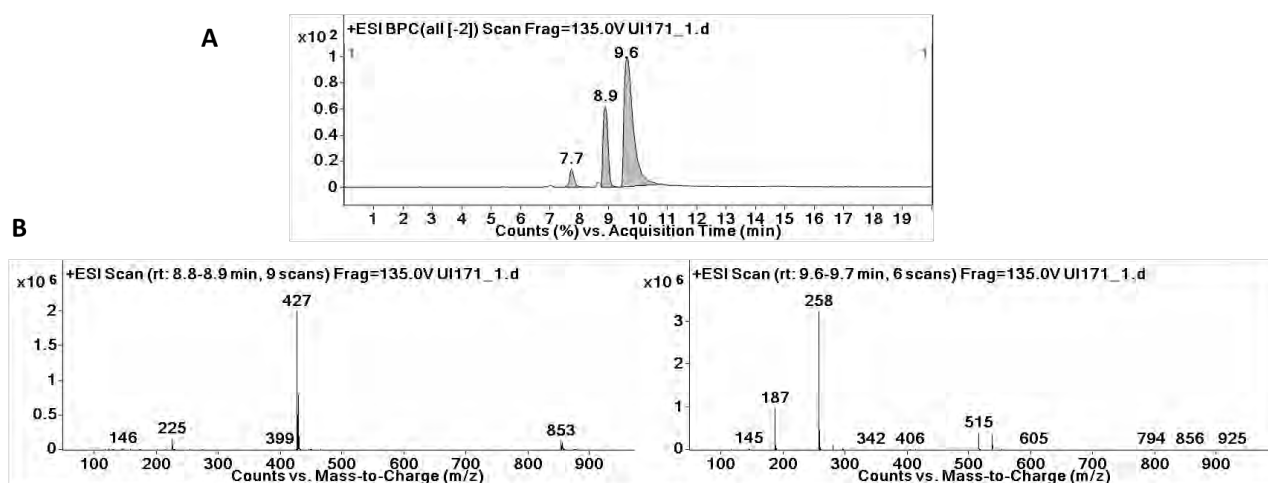


Figura 7.9. Estructura del PyBOP.

Un primer intento de purificación consistió en utilizar cromatografía en columna abierta usando como sistema de elución $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ -98:2. Después de realizar la separación se aisló un sólido cristalino, que en CCF revelaba como una sola mancha; sin embargo, al realizar un análisis de HPLC-MS (ESI^+) (**Cromatograma 7.1**), resultó que existía un compuesto con abundancia mayor al compuesto de interés, tiempo de retención (t_r)= 9.6 min, 258 m/z (confirmado con EM-DART⁺).



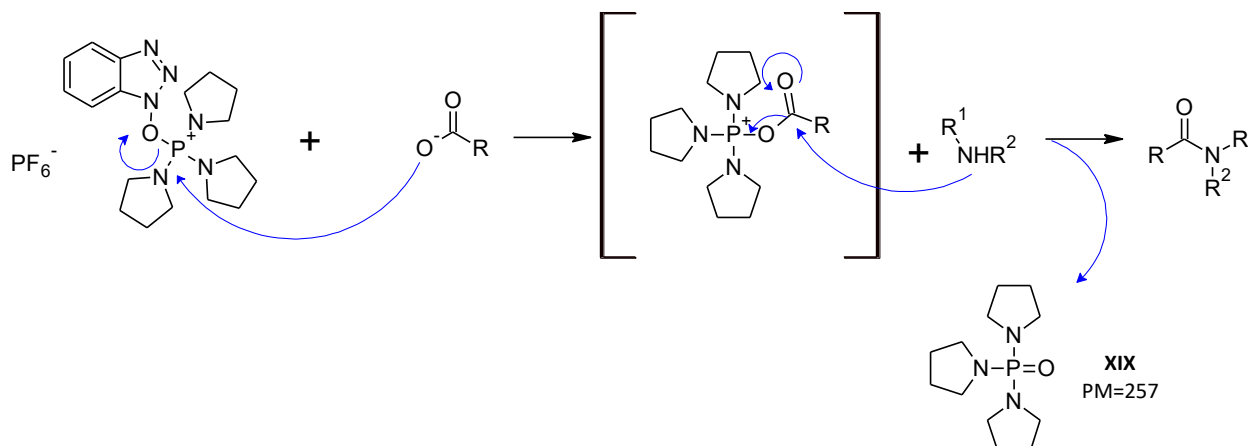
Cromatograma 7.1. HPLC-MS del sólido aislado como (*R*)-PZQ-BZ. **A.** Cromatograma, **B.** Espectro de masas ESI^+ .

Analizando la secuencia de reacción para la formación de la carboxamida (**Esquema 7.2**), el óxido de fosfina **XIX** es un subproducto cuya masa nominal concuerda con la impureza observada en el espectro de masas, además, el patrón de fragmentación evidencia la pérdida de una pirrolidina ($[\text{M}-71]^+ = 187 \text{ m/z}$). Es probable que bajo las condiciones de purificación, eluyó muy cerca de la carboxamida y por no revelar en el UV no se identificó durante la separación.

Una segunda estrategia de purificación fue separar el sólido obtenido de la reacción por cromatografía en columna, pero ahora con un sistema de cromatografía automatizado (Sepacore[®]). La ventaja de este equipo es que permite hacer cromatografía flash manejando presiones hasta de 10 bar y controlar más fácil el poder de elución de la fase móvil mediante un sistema de gradiente automático (bombas mezcladoras). Las condiciones óptimas se describen a detalle en la **Sección 10.2.20**. Después de la separación, se volvió a realizar un estudio de HPLC-MS (**Cromatograma 7.2**) y se observó un solo pico con $t_r = 14.37$ min y valor de 427 m/z , que corresponde a $[\text{M}+\text{H}]^+$. Lo anterior, confirma el elevado grado de pureza del compuesto, no sin antes aclarar, que se observó la presencia

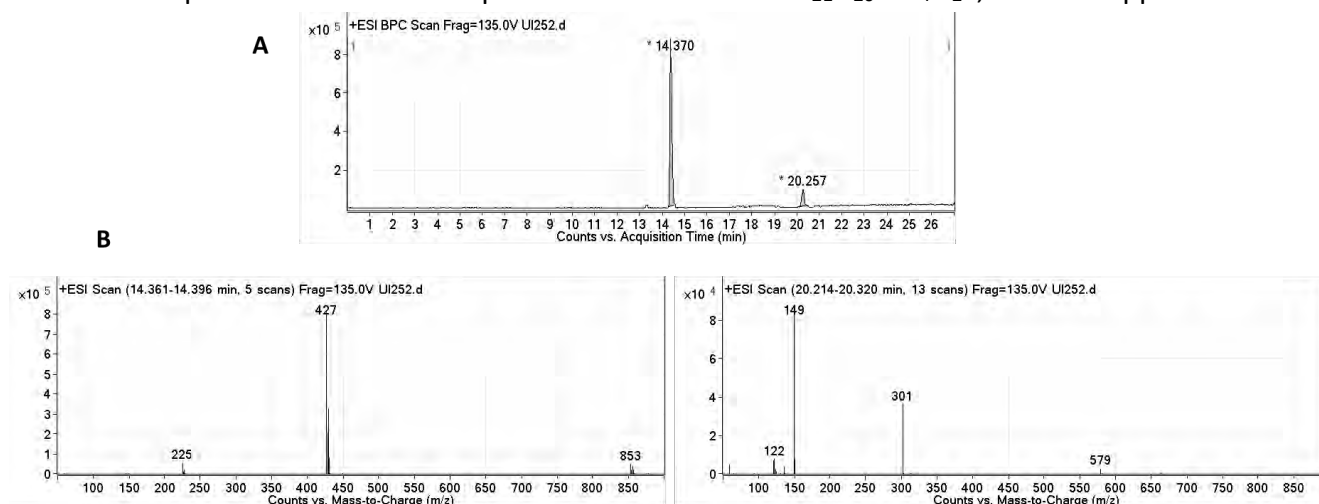
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de ftalato de dibutilo (PM=278) como un pico con $t_r=20.26$ min, $[M+Na]^+ = 301$ m/z ; este plastificante es comúnmente utilizado en contenedores plásticos y pudo arrastrarse del tubo de microcentrífuga donde se almacenó la muestra, de la columna de plástico del Sepacore o de algún disolvente durante la síntesis o el análisis.



Esquema 7.2. Secuencia de reacción para la formación de amidas utilizando PyBOP.

En suma, se realizó EMAR-FAB⁺ y se observó el $[M+H]^+ = 427.0993$ m/z , la fórmula condensada determinada por este análisis corresponde a la real más 1H: $C_{21}H_{20}ClN_4O_2S$, error=0.6 ppm.



Cromatograma 7.2. HPLC-MS de (R)-PZQ-BZ. A. Cromatograma, B. Espectro de masas ESI⁺.

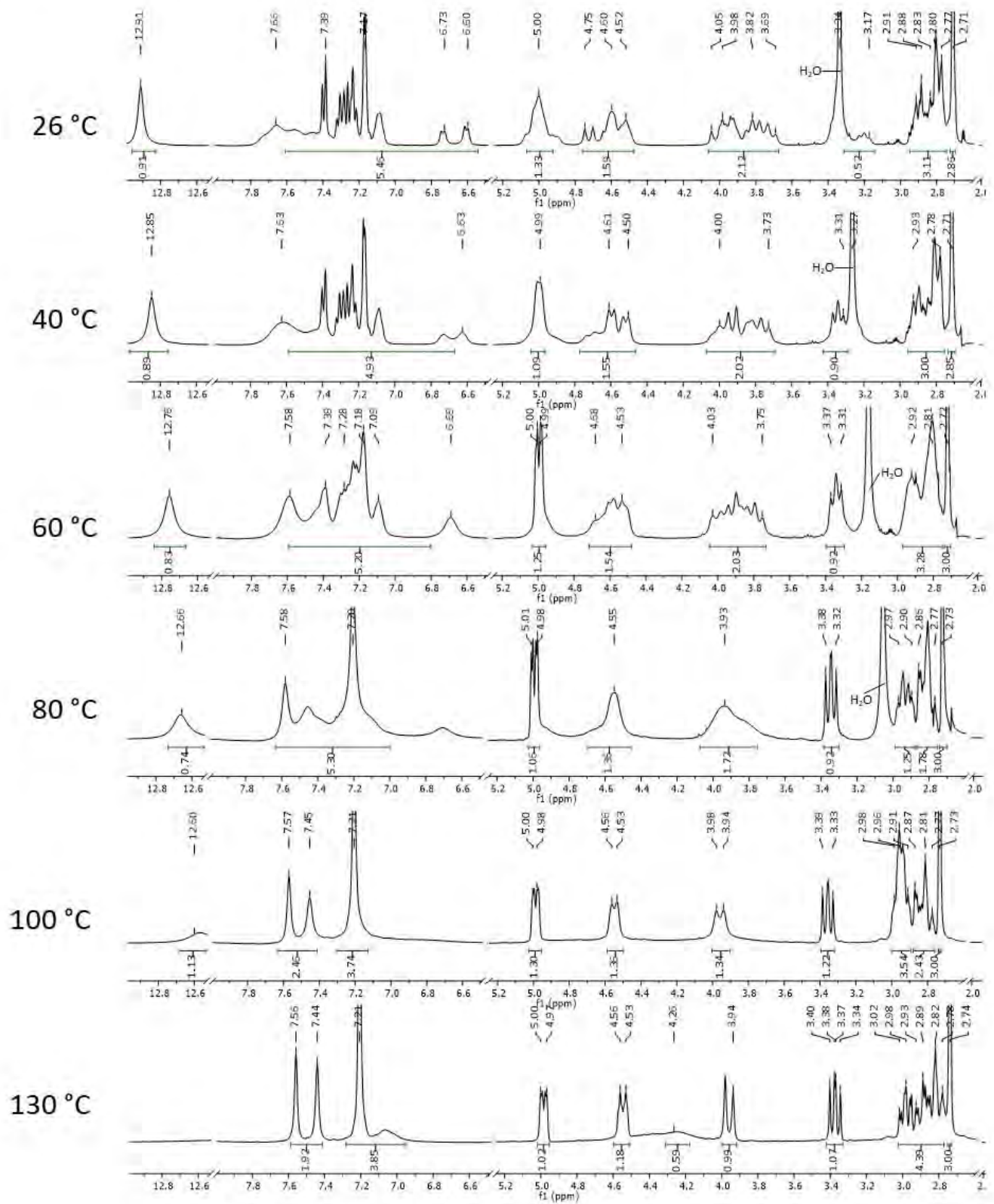
La elucidación estructural por RMN de este compuesto tuvo complicaciones muy particulares; debido a la rotación restringida del enlace que promueven los grupos amida presentes en la molécula se observaron rotámeros. En los espectros de resonancia a una determinada temperatura, cada uno de estos se comporta como una molécula independiente y por ende, se observan señales para un mismo átomo con desplazamiento químico distinto. Dicho fenómeno ya ha sido descrito antes en compuestos derivados de la praziquanamina;⁴⁷ no obstante, para el caso de (R)-PZQ-BZ cada hidrógeno de los n posibles rotámeros que coexisten a temperatura ambiente, poseen

desplazamientos químicos similares entre sí y ocasionan el empalme de las señales. Al verse limitada la resolución fue difícil realizar una asignación certera, sobre todo porque algunas señales cuando se empalmaban alteraban el área bajo la curva. Cabe destacar que independientemente del núcleo analizado (^1H , ^{13}C o ^{31}P), las señales que se observan son más de las que se esperarían y se “parten” o se ensanchan por el intercambio lento entre un isómero y otro.

Con el fin de evidenciar la presencia de rotámeros se realizó un experimento de RMN ^1H a temperatura variable. La temperatura se fue elevando gradualmente desde 26 °C hasta 170 °C, siendo esta última donde se observó la coalescencia de las señales. Lo que sucede al elevar la temperatura, es que al suministrar energía al sistema es posible superar la barrera energética que separa a cada isómero conformacional. De esta manera la interconversión entre los rotámeros es rápida y el sistema se comporta como un solo isómero, por lo tanto las señales que se observan en el espectro es el promedio de interconversión entre los posibles rotámeros.^{87,88}

En la **Figura 7.10** se muestran los espectros de RMN ^1H a distintas temperaturas. A medida que esta va aumentando, se puede observar que las señales se simplifican; por ejemplo, en la región de hidrógenos aromáticos, a temperatura ambiente las señales en 6.60 y 6.73 ppm se separan del multiplete que abarca de 7.17-7.66 ppm. En contraste, a partir de los 80 °C se puede observar cómo se empiezan a definir solo 3 señales simples y las señales en 6.60 ppm comienzan a desaparecer. Además, la señal del NH del bencimidazol en 12 ppm desaparece a partir de 130 °C debido a que el intercambio entre los tautómeros ya es demasiado rápido.

En lo que respecta a los hidrógenos alifáticos (2.77-5.00 ppm) las señales comienzan a definirse mejor a partir de los 100 °C y mantienen una suma total de área bajo la curva igual a 9H, lo cual es consistente con el número de hidrógenos alifáticos presentes en la molécula. Otra observación importante es que hasta los 80 °C la integral en la región de 2.77-3.00 ppm era tres hidrógenos y a partir de los 100 °C cambió a cinco hidrógenos, también, el área entre 3.93 y 4.55 ppm bajó de dos hidrógenos a uno en este intervalo de temperatura. Lo anterior, es consecuencia de que un mismo hidrógeno de diferentes rotámeros tiene desplazamiento químico muy variable en función de la energía suministrada al sistema. Al continuar con el aumento de temperatura, cuando se alcanzan los 130 °C en la región de 4.26 ppm comienza a aparecer una señal amplia, ya para los 150 °C se desdobra en 2 (4.24 y 4.43 ppm), al mismo tiempo que las señales entre 2.78-3.03 ppm se definen bien y regresan a su valor inicial de área bajo la curva (un multiplete por cada hidrógeno, 3H). Por último, a 170 °C se puede considerar como el punto de coalescencia ya que no se observan cambios significativos en el espectro. No se exploraron temperaturas más altas debido a la limitante que impone el punto de ebullición del disolvente (DMSO-P.eb.: 189 °C).



(Figura 7.10. Continúa página siguiente)

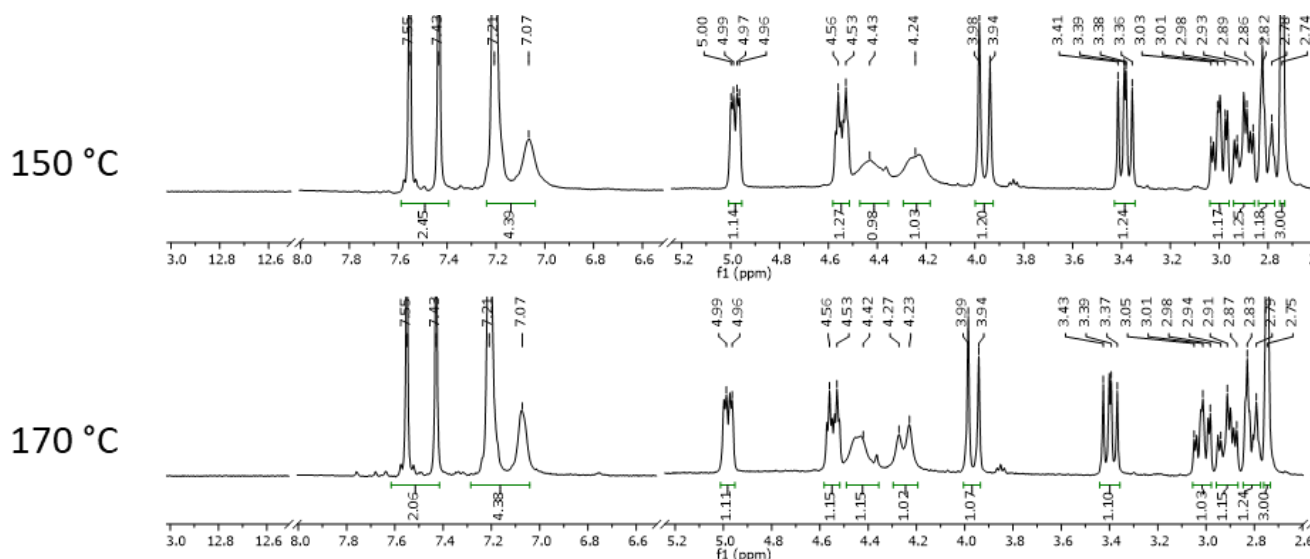


Figura 7.10. Experimento de resonancia magnética nuclear de ^1H a temperatura variable.

Adicionalmente, se realizó un espectro COSY a 170 °C (**Figura 7.12**), el cual, en conjunto con el espectro HSQC a 26 °C (**Figura 7.11**) permitió la elucidación estructural de (**R**)-PZQ-BZ. En el espectro HSQC se puede notar la correlación de la señal de carbono en 54.1 ppm ($\text{C}_{11\text{b}}$) con una señal de protón a 5.00 ppm, por lo tanto, como se infirió en el caso de la praziquanamina, se trata del hidrógeno del carbono cabeza de puente ($\text{HC}_{11\text{b}}$). Del espectro COSY, la correlación de la señal múltiple centrada en 5.00 ppm ($\text{HC}_{11\text{b}}$) con las señales múltiples a 3.39 y 4.40 ppm, demuestra que son hidrógenos adyacentes, los cuales corresponden a HC_1 , además, como se puede apreciar en el espectro HSQC estas dos correlacionan con la señal del metileno en 45.4 ppm (C_1). Por similitud estructural con el precursor (**R**)-PZQN, se puede seguir el orden de los desplazamientos en (**R**)-PZQ-BZ. Los hidrógenos que siguen a campo más bajo (4.27 y 3.99 ppm) están unidos al carbono que posee un desplazamiento a 48.6 ppm (C_3), además, estos mantienen solo la correlación geminal en el espectro COSY (4.25, 3.97) ppm, por lo tanto no tienen hidrógenos vecinos y se trata de los hidrógenos de la posición 3 ($2\times\text{HC}_3$). Retomando el espectro HSQC, la correlación de la señal de protón en 2.91 ppm con la señal de carbono en 38.3 ppm (C_6); junto con la relación en el espectro COSY que este protón mantiene con la señal de 4.55 ppm, confirma que se trata de los dos hidrógenos de la posición 6 (HC_6). Por último, las dos señales múltiples restantes entre 2.98-3.01 ppm y 2.79-2.83 ppm corresponden a los $2\times\text{HC}_7$, que correlacionan con la señal de carbono a 27.9 ppm (C_7).

Para el caso de los hidrógenos aromáticos, no se observó alguna correlación importante que permitiera su elucidación; sin embargo, del valor de la integral se puede deducir que las dos señales simples en 7.55 y 7.43 ppm, son los hidrógenos del bencimidazol (2H) y las otras dos que integran para cuatro hidrógenos, corresponden a la región estructural de la praziquanamina.

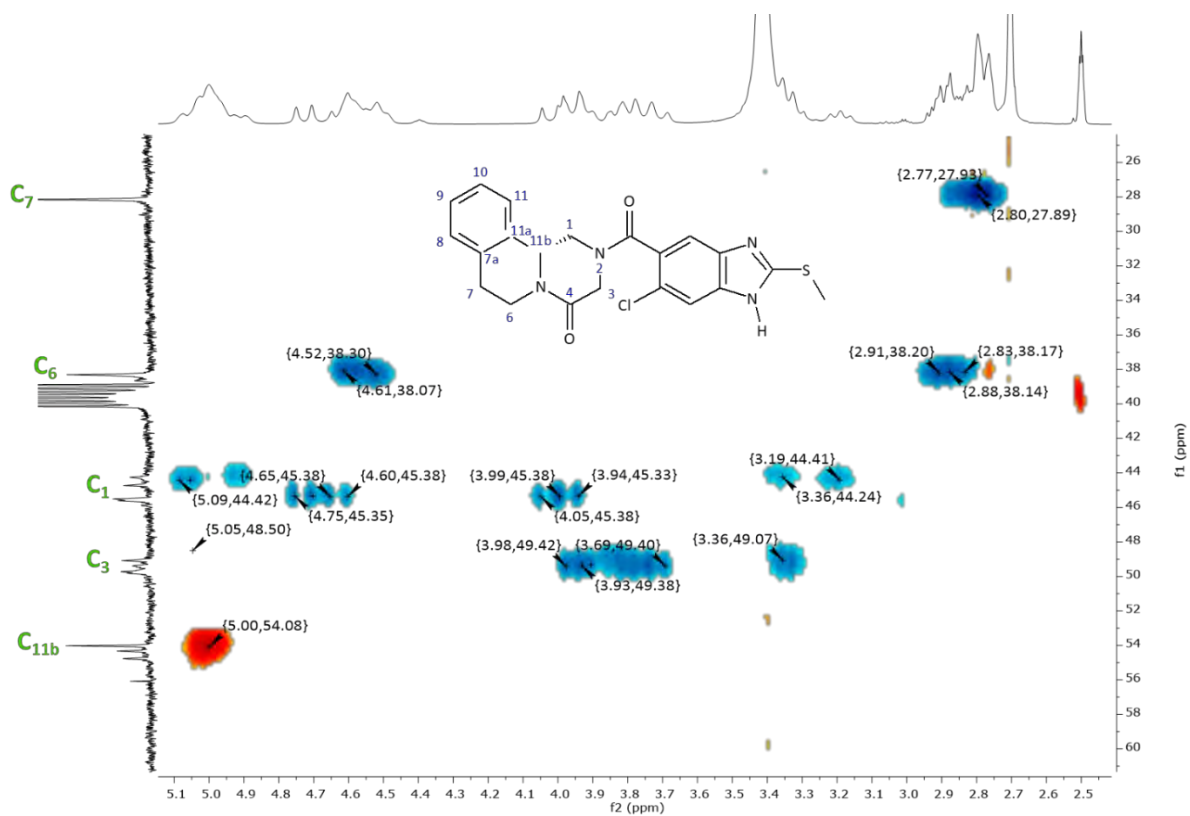


Figura 7.11. Espectro HSQC de **(R)**-PZQ-BZ a 26 °C.

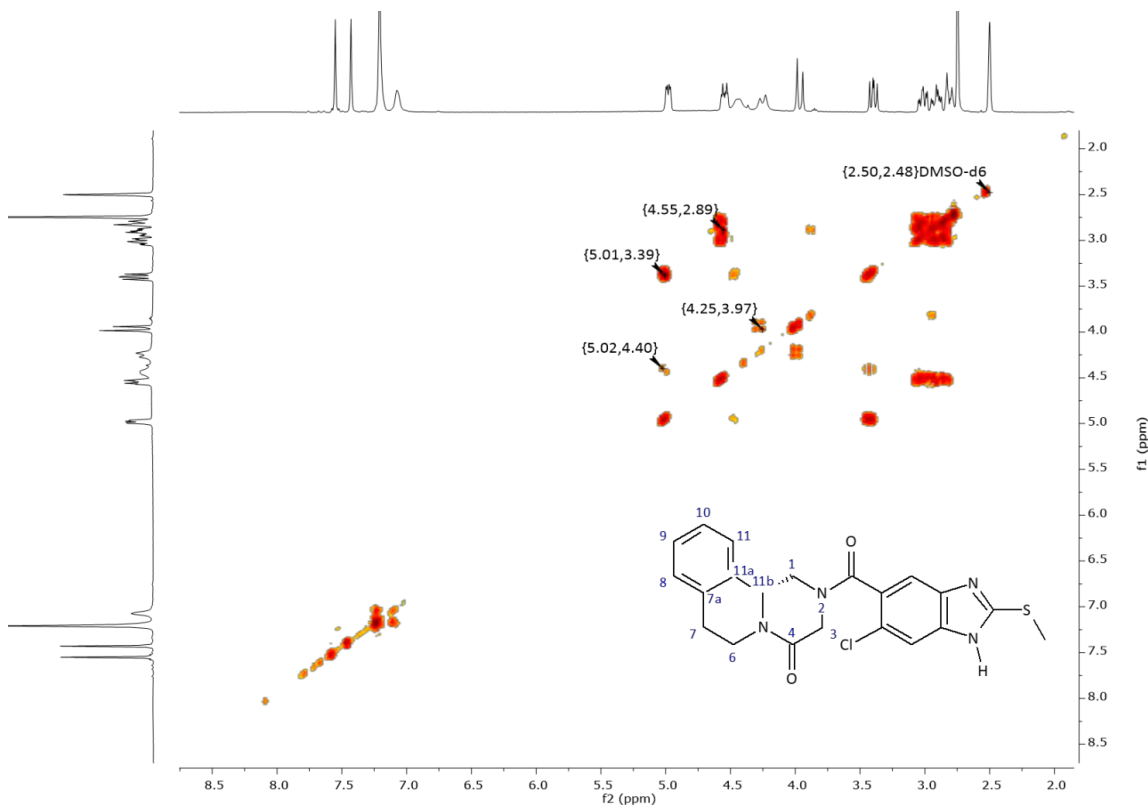
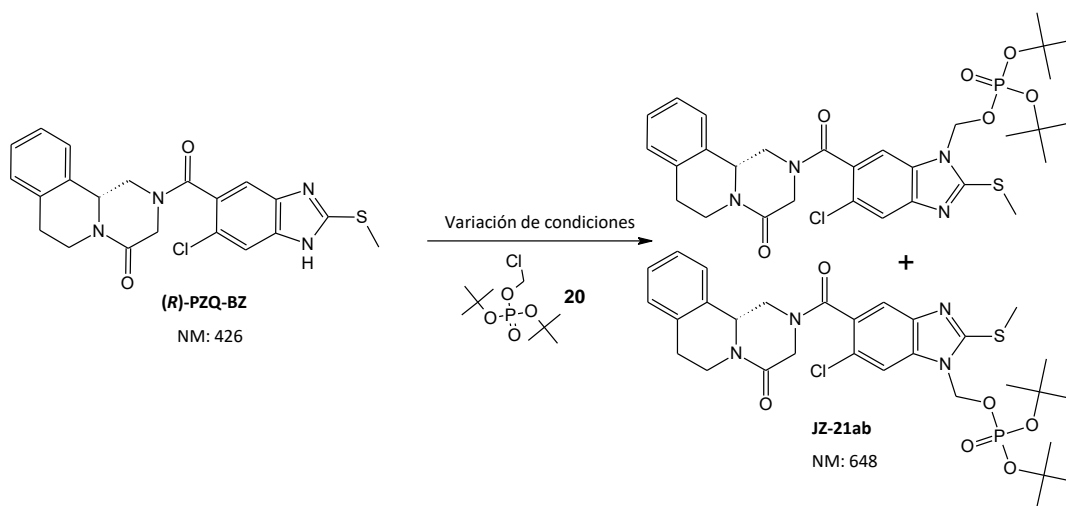


Figura 7.12. Espectro COSY de **(R)**-PZQ-BZ a 170 °C.

7.1.3.3. Síntesis de los compuestos fosfonooximetilo

La clave para poder obtener **JOULZ-PRO** más eficientemente fue optimizar la reacción de acoplamiento entre el intermediario de fósforo **20** y la carboxamida **(R)-PZQ-BZ** (**Esquema 7.3**). Lo anterior con la finalidad de obtener el rendimiento más alto y pocos o nulos subproductos, ya que si se acarreaban las impurezas hasta la reacción final, aislar el profármaco resultaba muy complicado. Para lograrlo se variaron las condiciones de reacción; manipulando la base, el disolvente, la temperatura y el uso de trietilamina como catalizador. En la **Tabla 7.5** se exponen los experimentos evaluados y los resultados; las condiciones del **Experimento 5** resultaron ser las más eficientes.



Esquema 7.3. Paso limitante para maximizar la eficiencia de la ruta sintética para obtener **JOULZ-PRO**.

La razón de que las condiciones de la **Prueba 5** fueran las óptimas son:

- ✓ Utilizar materia prima de alta pureza es fundamental para evitar problemas con la purificación; de lo contrario, la purificación se complica porque los productos secundarios y los regioisómeros **JZ-21ab** eluyen intercalados en la cromatografía.
- ✓ Usar un exceso de equivalentes del fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**20**) y de base influye en un consumo casi completo de la materia prima.
- ✓ La trietilamina, como catalizador, forma un intermediario más reactivo con el fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**20**) (**Figura 7.13**), que disminuye el tiempo de reacción y con ello evita la aparición de subproductos.

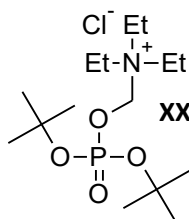


Figura 7.13. Intermediario reactivo de Et_3N con el fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**20**).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7.5. Optimización de las condiciones de reacción para obtener **JZ-21ab**

Prueba	Disolvente	20 (eq.)	BASE	Et ₃ N (eq.)	t (h)	T (°C)	Observaciones
1	DMF grado HPLC	2	NaH; 3 eq.	0.3	24	T.a	1.1) Cuando se utilizó la carboxamida sin purificación, provocó que se formaran impurezas en importante proporción. 1.2) Usando (R)-PZQ-BZ purificada por cromatografía en columna, la reacción procede pero no se consume por completo la materia prima (CCF).
2	CH ₂ Cl ₂ anhidro	2	NaH; 3 eq.	0.3	96	T.a	Mismas impurezas que en la prueba 1, la materia prima se consume aproximadamente en un 50% (CCF).
3	CH ₃ CN grado HPLC	1.3	Cs ₂ CO ₃ , 1.2 eq.	0	72	40	El CH ₃ CN y el CH ₂ Cl ₂ no solubilizan la sal que se forma después de la desprotonación del bencimidazol, por lo tanto la reacción tarda mucho tiempo, provocando que se formen en mayor proporción las impurezas y se descomponga el fosfato 20 .
4	DMF anhidra	1.5	Cs ₂ CO ₃ , 1.2 eq.	0	72	T.a	El avance de reacción llega aproximadamente hasta 70% (CCF). Se introdujo el trabajo de la reacción expuesto en la Sección 10.2.21 .
5	DMF anhidra	3	Cs ₂ CO ₃ , 2.5 eq.	1.5	24 y 72	25-30 °C	Se controló la temperatura en un baño de aceite y la reacción procedió en 24 h, de esta manera al disminuir el tiempo de reacción, se evita la formación de impurezas que aparecen con tiempos de reacción más prolongados. En ambos periodos (24 y 72 h), el consumo de materia prima es casi completa (95%-CCF). Utilizar (R)-PZQ-BZ con elevada pureza, asegura altos rendimientos.

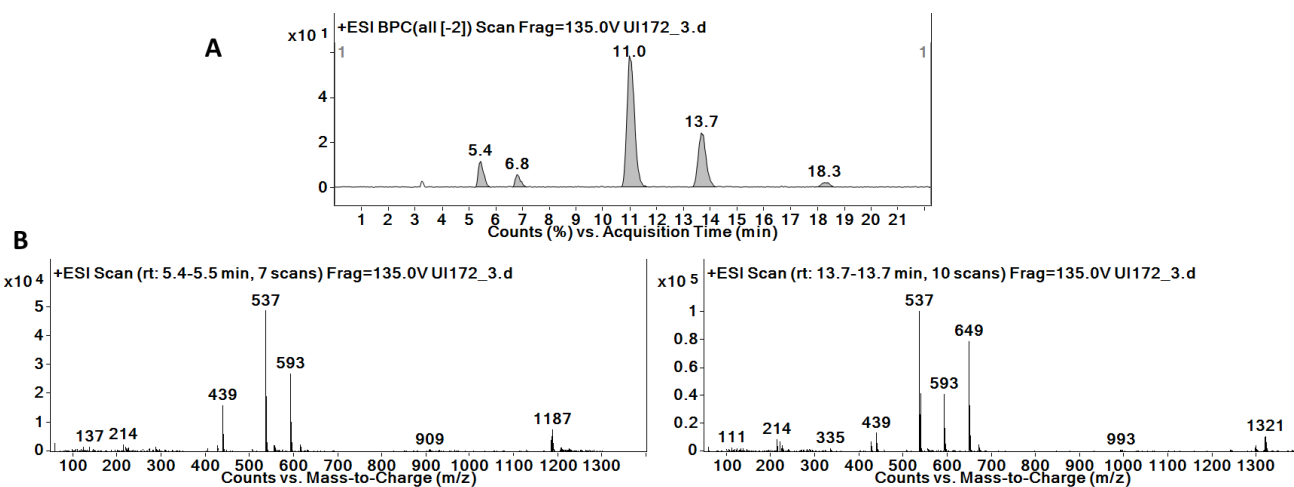
- ✓ La efectividad del carbonato de cesio recae en dos aspectos fundamentales: permite mantener por más tiempo un medio de reacción anhidro (carbonato de cesio es menos higroscópico que otras bases) y el denominado “efecto cesio”; mayor solubilidad del carbonato de cesio en disolventes polares apróticos como la DMF (0.12 g/mL) en comparación con el carbonato de potasio (0.008 g/mL), además, el cesio por ser catión altamente polarizable, permite una mejor solvatación por parte del disolvente y la disociación de los pares iónicos.^{89,90} Si se compara la fuerza básica del carbonato de cesio en DMF con la de otras bases como K₂CO₃ y la DBU, la del Cs₂CO₃ es mayor; una suspensión 5 mmol/100 mL de Cs₂CO₃ proporciona un pH arriba de 15, en contraste, las otras bases están por debajo de pH 14.^{91,92}
- ✓ Para evitar las variaciones de temperatura se utilizó el baño de aceite a 25°C, ya que en la CDMX durante la temporada otoño-invierno la temperatura oscila entre los 0-20 °C.
- ✓ Con esta metodología la única impureza que se obtiene es la materia prima que no reaccionó, la cual se puede retirar eficientemente por cromatografía en columna (**Sección 10.2.21**), o bien, se puede retirar al final de la ruta una vez formado el profármaco (**Ver adelante**).

Es pertinente mencionar que no se consideró necesario separar los regioisómeros **JZ-21ab**, ya que por tratarse de un profármaco biorreversible; después de la hidrólisis, ambos generarán el mismo compuesto precursor (**(R)-PZQ-BZ**).

Respecto a la elucidación estructural por RMN, nuevamente la presencia de rotámeros dificultó la asignación, en suma, por obtenerse como mezcla de regioisómeros la situación se

complicó al doble. La elucidación de la carboxamida precursor (**R**)-PZQ-BZ se extrapoló hacia estos derivados de fósforo. Las señales características que se conservaron de (**R**)-PZQ.BZ, en conjunto con la aparición de la señal múltiple entre 5.94-5.97 ppm que integró para 4H, la cual corresponde al metileno que mantiene enlazados al fosfato y al bencimidazol, la señal múltiple entre 1.22-1.43 ppm que integró para 36 H, perteneciente a los *terc*-butilos y la desaparición de la señal en 12.91 ppm, que corresponde al NH del bencimidazol, confirmaron la obtención del fosfato de di-*terc*-butilo; el valor de las integrales demostró que se obtuvo como mezcla de regioisómeros (**JZ-21ab**). En lo que respecta a la resonancia de ^{13}C , las señales en 29.3 y 82.9 ppm (metilo y metino, respectivamente) demuestran la integridad de los grupos protectores. La resonancia de ^{31}P evidencia la pureza del producto ya que se observan dos señales simples en -10.39 y -10.55 ppm, una por cada regioisómero.

Debido a las dificultades en la interpretación de los espectros de RMN de este intermediario, se complementó la elucidación realizando un análisis HPLC-MS. Como se observa en el **Cromatograma 7.3**, los picos con $t_r= 11.0$ y 13.7 min corresponden a la mezcla de regioisómeros **JZ-21 ab** (649 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$, 593 m/z $[\text{M}+\text{H}-t\text{Bu}]^+$, 537 m/z $[\text{M}+\text{H}-2t\text{Bu}]^+$). No es de extrañarse los picos que aparecen en $t_r= 5.4$ y 6.8 min, ya que dichos picos corresponden a la desprotección parcial (pérdida de un grupo protector) cuyo valor fue de 593 m/z $[\text{M}+\text{H}-t\text{Bu}]^+$. Esto sucede porque por conveniencia en el análisis se utilizó 0.1% de ácido fórmico en la fase móvil, lo que propició la desprotección del compuesto. Es importante mencionar que la relación de áreas guarda una proporción 6:4 entre los picos de los regioisómeros. Adicionalmente, la EMAR (FAB $^+$) confirmó la fórmula condensada del **JZ-21ab**; 649.2024 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{PS}$, error=1.2 ppm).



Cromatograma 7.3. HPLC-MS de **JZ-21ab**. **A.** Cromatograma, **B.** Espectro de masas ESI $^+$.

Una vez establecida la ruta óptima para la obtención del éster de fosfato **JZ-21ab**, este se desprotegió utilizando una solución comercial 4 M de HCl en dioxano para generar el fosfato diácido **JZ-22ab**. En esta reacción se utiliza un medio fuertemente ácido (10 eq.) para asegurar la completa desprotección, se obtuvo buen rendimiento (74%-global desde una reacción anterior). El espectro de RMN de ^1H confirmó la desprotección, ya que no se observó la señal que correspondía a los *terc*-butilos. La señal que pertenece al metileno de fosfonooximetilo (5.84 ppm, 4H) se conservó, lo que

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

demuestra integridad del grupo fosfato. En resonancia de ^{31}P no se observaron dos señales simples correspondientes al par de regioisómeros **JZ-22ab** (Figura 7.14), en su lugar, se observó una señal amplia (desplazamiento químico de ambos regioisómeros muy similar) en -1.75 ppm. Se realizó EMAR (FAB $^+$) para confirmar la fórmula deseada y los resultados evidenciaron la obtención del ácido fosfórico **JZ-22ab**: (FAB $^+$)= 537.0774 m/z ([M+H] $^+$, C₂₂H₂₃ClN₄O₆PS, error=1.8 ppm).

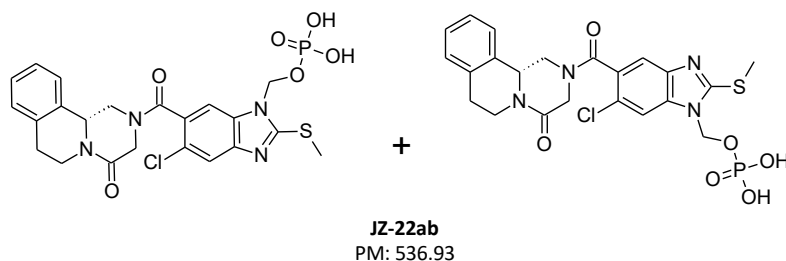
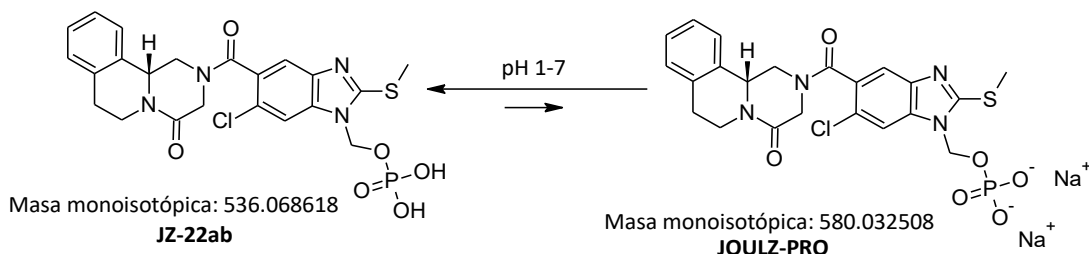


Figura 7.14. Mezcla de regioisómeros **JZ-22ab**.

Por último, para obtener un profármaco altamente hidrosoluble, el compuesto **JZ-22ab** se derivó a su forma de sal disódica (**JOULZ-PRO**) utilizando carbonato de sodio o NaOH, con ambos procedimientos se obtienen rendimientos similares; sin embargo, la reacción con sosa requiere condiciones de baja temperatura y nunca se evita la mínima descomposición de **JZ-22ab** debido al ataque nucleofílico del OH^- sobre el metileno del grupo fosfato. Por esta razón, se prefiere la formación de la sal con carbonato, el rendimiento fue alto (88.9%) y no se obtuvieron subproductos.

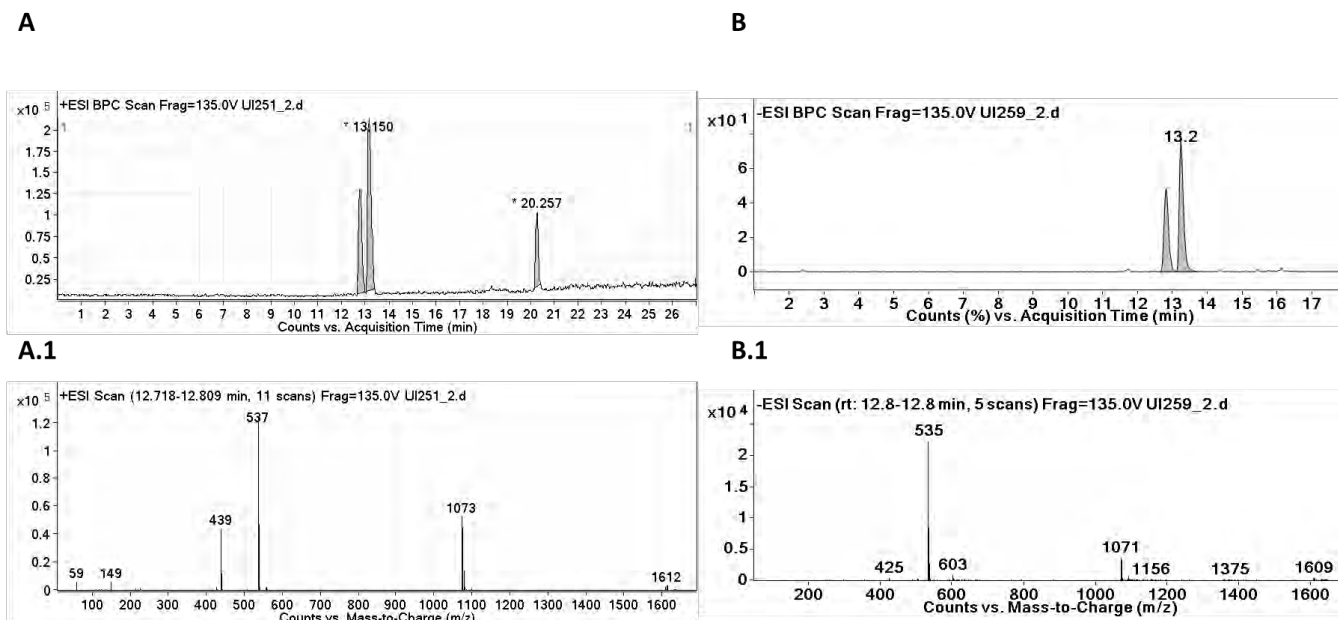


Esquema 7.4. Equilibrio ácido-base que se presenta durante el análisis HPLC de **JOULZ-PRO**.

Para confirmar la pureza del compuesto, se realizó HPLC-MS por ionización en electrospray modo positivo y negativo. Como ya se mencionó anteriormente la fase móvil posee 0.1 % de HCOOH pH 3 (condiciones estándar), se realizó un gradiente CH₃CN/H₂O y se utilizó una columna C₁₈.

Como se puede observar en el **Cromatograma 7.4**, por ambos modos de ionización, queda en evidencia la pureza del compuesto porque solo se ven dos picos en proporción 6:4 [t_r = 12.75 y 13.15 min (ESI $^+$); t_r = 12.80 y 13.20 (ESI $^-$)], cada uno corresponde a los dos regioisómeros de la mezcla **JOULZ-PRO**. Es importante aclarar que debido al pH de la fase móvil, la especie predominante con la que se está llevando a cabo la separación, no es la sal disódica, si no la diácida (**JZ-22ab**, **Esquema 7.4** y **Figura 7.16**). Por la razón anterior, el detector de masas registra en el espectro: (ESI $^+$)= 537 m/z [M+H] $^+$, 439 m/z [M-98(PO₄)+H] $^+$ y (ESI $^-$)= 536 m/z [M-H] $^-$; no obstante, al realizar las masas de baja y

alta resolución por la técnica de FAB⁺, se logró evidenciar la obtención de la sal disódica por la aparición del pico en 581 *m/z* ([M+H]⁺); EM (FAB⁺)= 581 *m/z* [M+H]⁺, 603 *m/z* [M+Na]⁺. EMAR (FAB⁺)= 581.0403 *m/z* ([M+H]⁺, C₂₂H₂₁ClN₄O₆PSNa₂, error=0.4 ppm).



Cromatograma 7.4. HPLC-MS de **JOULZ-PRO**. **A, A.1.** Cromatograma y espectro de masas ESI⁺; **B, B.1.** Cromatograma y espectro de masas ESI⁻.

Los espectros de RMN también confirman la obtención del derivado hidrosoluble, ya que las señales que se habían presentado anteriormente se mantuvieron; tanto las de (**R**)-**PZQ-BZ** como las del grupo fosfato, solo con un ligero cambio en el desplazamiento químico. En la **Tabla 7.6** se resumen los desplazamientos químicos de hidrógeno, carbono y fósforo desde la carboxamida hasta el profármaco **JOULZ-PRO**, algunas observaciones destacables son:

¹H: Entre 2.69-2.83 ppm aparece la señal de -SCH₃ y entre 5.69-5.89 ppm la señal correspondiente al metileno que une el grupo fosfato con la carboxamida precursora.

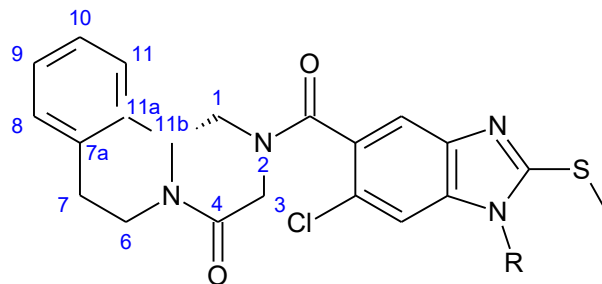
¹³C: El metilitio aparece entre 13.8-14.9 ppm, los 4 carbonos alifáticos de la parte estructural de la praziquanamina (C₇, C₆, C₁, C₃ y C_{11b}) entre 27-50 ppm. Los dos carbonilos, uno en ~164 ppm, que corresponde al *linker* y a campo más bajo, entre 166-169 ppm el carbonilo de la PZQN.

³¹P: Los desplazamientos químicos de los derivados fosfonooximetilo fueron cambiando de negativos ~-11.00 ppm (**JZ-21ab**) a positivos ~2.00 ppm (**JOULZ-PRO**).

Se realizó EMAR por FAB⁺ y los resultados confirman la obtención del fosfato disódico (**JOULZ-PRO**). Masa exacta de 581.0403 *m/z* ([M+H]⁺, C₂₂H₂₁ClN₄O₆PSNa₂, error=0.4 ppm).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7.6. Resumen de desplazamientos químicos en ppm de **(R)-PZQ-BZ**, **JZ-21ab**, **JZ-22ab** y **JOULZ-PRO**



R= **(R)-PZQ-BZ**: H, **JZ-21ab**: $\text{CH}_2\text{OPO}_3(\text{tBu})_2$, **JZ-22ab**: $\text{CH}_2\text{OPO}_2\text{H}_2$, **JOULZ-PRO**: $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{Na}_2$

RMN-¹H

	SCH ₃	2xHC ₇ , HC ₆	HC ₁	2xHC ₃	HC ₆ , HC ₁	HC _{11b}	CH ₂ -OP	Ar	Otro
(R)-PZQ-BZ	2.71	2.77- 2.91	3.17- 3.34	3.69- 4.05	4.52- 4.75	4.90- 5.07	NA	6.60- 7.66	12.91 (NH)
JZ-21ab	2.76	2.80- 2.97	3.16- 3.43	3.63- 4.09	4.52- 4.73	4.97- 5.03	5.94- 5.97	6.60- 7.97	1.22-1.43 (^t Bu)
JZ-22ab	2.73	2.78- 2.90	3.17- 3.38	3.68- 4.04	4.49- 4.73	5.01- 5.08	5.84	6.63- 7.81	-
JOULZ-PRO	2.69- 2.75	2.79- 3.04	3.14- 3.43	3.86- 4.20	4.42- 4.72	4.93- 5.08	5.69- 5.81	6.57- 7.94	-

RMN-¹³C

	SCH ₃	C ₇	C ₆	C ₁	C ₃	C _{11b}	CH ₂ -OP	C=O
(R)-PZQ-BZ	13.8	28.2	38.3	45.5	49.7	54.0	NA	164.0, 166.2
JZ-21ab	14.4	28.1, 29.3	38.3	45.5	50.0	53.1, 54.1	68.4	165.8
JZ-22ab	14.9	28.6	38.9	45.2, 46.1	49.6, 50.2	54.5, 54.8	66.9, 68.4	164.5, 166.7
JOULZ-PRO	14.2	27.8	39.9	45.7	49.4, 50.0	54.8, 55.2	68.2	166.8, 169.4

RMN-³¹P

	³¹ p
(R)-PZQ-BZ	NA
JZ-21ab	-10.39, -10.55
JZ-22ab	-1.75 (amplia)
JOULZ-PRO	1.88, 2.12

7.2. Solubilidad termodinámica de (R)-PZQ-BZ y JOULZ-PRO

La determinación de la solubilidad de un candidato a fármaco es muy importante en la investigación farmacéutica, además, esta propiedad fisicoquímica tiene un papel importante al momento del desarrollo de una forma farmacéutica. En la literatura, frecuentemente se utilizan dos términos para la solubilidad: 1) solubilidad cinética: la concentración de un compuesto en solución al tiempo en que aparece el primer precipitado; 2) solubilidad termodinámica (al equilibrio): concentración de un compuesto en una solución sobresaturada, donde la solución y el sólido están en equilibrio. Adicionalmente, un tercer término es la solubilidad intrínseca; equilibrio de solubilidad de un ácido o base libre que es capaz de ionizarse en el pH donde está completamente no ionizado.⁸⁰

Como ya se mencionó antes, los bencimidazoles se comportan como bases debido a los nitrógenos presentes en el núcleo aromático. Las fuertes interacciones intermoleculares de enlace de hidrógeno entre estos, le confieren una baja solubilidad intrínseca (del orden micromolar) y también puntos de fusión altos. Particularmente la carboxamida **(R)-PZQ-BZ** es un bencimidazol con problemas de solubilidad en agua por la razones antes dichas. En contraste con sus homólogos de la **Tabla 2.4**, posee grupos funcionales como el carbonilamino y el metilitio que favorecen interacciones hidrofílicas; no obstante, no es suficiente para alcanzar un valor de solubilidad que permita ejercer favorablemente su acción *in vitro* e *in vivo*. Por esta razón, se llevó a cabo la derivación introduciendo un grupo fosfonooximetilo en su forma de sal disódica (**JOULZ-PRO**), de esta forma, además de tener un compuesto iónico, anular las interacciones intermoleculares que tenía su precursor y obtener un compuesto soluble en agua y con mayor biodisponibilidad.

Para evidenciar que efectivamente se había logrado un aumento considerable en la solubilidad se utilizó el método de *Shake Flask*, el cual ha demostrado ser un método eficiente y rápido para la determinación de la solubilidad termodinámica.⁷⁹ Las condiciones de cada variable que interviene en el experimento se establecieron enfocándose al desarrollo farmacéutico, es decir, la formulación; la cual no es objetivo de esta tesis pero se presenta como una perspectiva.

Se sabe que el valor de solubilidad se ve influenciado por la temperatura, presión, composición de la solución amortiguadora, propiedades del compuesto como estructura cristalina, polimorfos y capacidad de ionizarse, adicionalmente, factores experimentales como el tiempo de agitación, sedimentación o centrifugación, cantidad de exceso de sólido, entre otras.^{80,93} En ese sentido, analizando las propiedades fisicoquímicas de ambos compuestos se tomó en cuenta las siguientes consideraciones:

- ✓ Se estableció la temperatura de 25 °C ya que es la temperatura a la que se prepara la solución inyectable previo a la administración.
- ✓ El uso de la solución amortiguadora es fundamental ya que ambas moléculas son capaces de ionizarse (**Figura 7.15**).

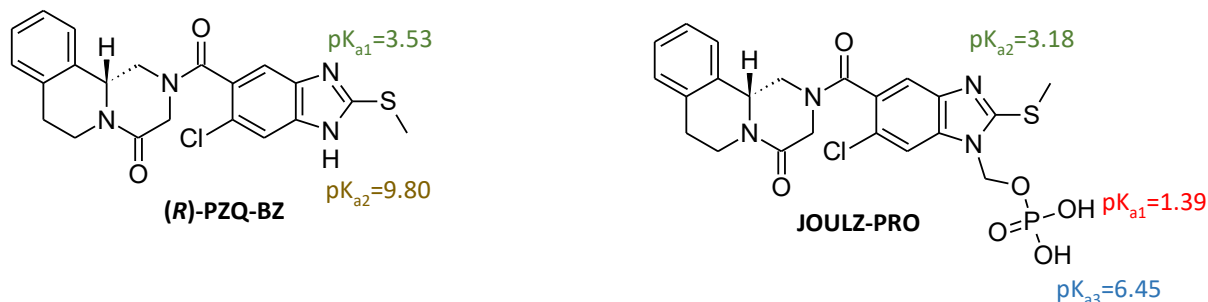


Figura 7.15. Valores de pK_a para (R)-PZQ-BZ y JOULZ-PRO.⁹⁴

- ✓ Se eligió como SA a pH 7.4 debido a la compatibilidad con el pH fisiológico.
- ✓ La SA a pH 9.0 se utilizó porque **JOULZ-PRO** es una sal de un ácido débil y es recomendable determinar la solubilidad por encima del pH donde exista una completa ionización (**d**, **Figura 7.16**), con la finalidad de evitar el error que se suma por la presencia de equilibrios simultáneos (contraión, ionización parcial).⁹³ Idealmente, se tendría que evaluar experimentalmente la solubilidad en función del pH, al menos en un intervalo de 1-14; sin embargo, se recurrió a herramientas computacionales para predecir la ionización de la molécula (**Figura 7.16**). Los resultados demostraron que a pH 9.0 se tenía un 99.72% de abundancia y el 100% se alcanzaba en 10.8, este último valor resulta ser agresivo para una administración parenteral, por lo que se prefirió evaluar pH 9.0.
- ✓ Se utilizó una concentración de 0.05 M para las SA, usualmente se utiliza entre 10-100 mM, se eligió una intermedia para evitar efecto de la fuerza iónica y del ion común en el valor de solubilidad.
- ✓ El tiempo de agitación necesario para alcanzar el equilibrio para moléculas altamente solubles como el caso del profármaco usualmente basta con agitar 6 h;⁷⁹ sin embargo, debido a que **(R)-PZQ-BZ** no alcanza el equilibrio tan fácilmente se extendió el tiempo hasta 24 h.
- ✓ No se utilizó sedimentación para separar las fases, en su lugar, se centrifugó. El tiempo de sedimentación frecuentemente es una variable que aporta más error en el valor de solubilidad, incluso mayor que el tiempo de agitación,⁷⁹ por lo que centrifugando se evita que el equilibrio se altere más fácilmente durante el transcurso de la sedimentación.
- ✓ Para determinar la cantidad mínima de sólido para alcanzar la saturación, cuya cantidad es con la que se inicia al tiempo 0, se realizó un estudio de solubilidad cinética como lo indica la **Sección 10.3.2**, es decir, se determinó la cantidad de sólido máxima que se puede disolver antes de que aparezca el primer precipitado.

Una vez definidos los parámetros, se realizó el experimento *Shake Flask*, los cálculos a detalle de las curvas patrón se pueden visualizar en la **Sección 10.3.5**, la linealidad de las curvas patrón fue satisfactoria, ya que se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) para el precursor de 0.9995-SAF y 0.9986-SAB; y para el profármaco de 0.9975-SAF y 0.9994-SAB. En la **Tabla 7.7** se resumen los resultados de la solubilidad al equilibrio de ambos compuestos.

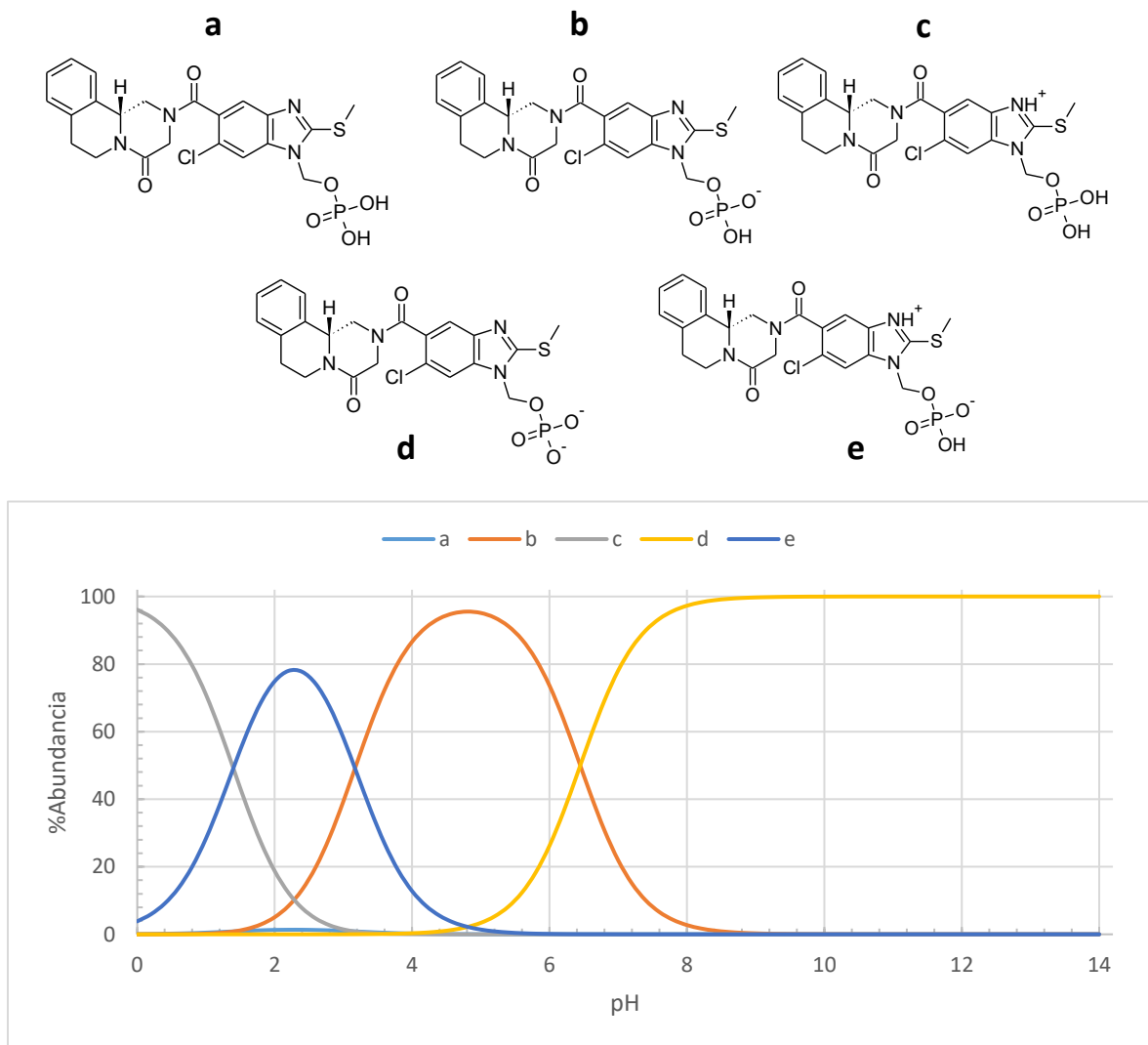


Figura 7.16. Diagrama de distribución de especies en función del pH de **JOULZ-PRO**.⁹⁴

Como se puede apreciar, se logró un aumento sustancial en la solubilidad de **JOULZ-PRO** en comparación con la de su precursor, alcanzándose un aumento de 1410 veces en la SAF (de 97.4 $\mu\text{g/mL}$ a 137.3 mg/mL) y de 1237 veces en SAB (de 137 $\mu\text{g/mL}$ a 169.4 mg/mL). Lo anterior, confirma que la derivación hacia sales tipo fosfonoximetilo es una buena estrategia para la obtención de profármacos hidrosolubles.

Contrastando entre las dos SA, la SAB promueve la solubilidad acuosa de ambos compuestos, esto se debe al efecto de formación de iones a ese pH. Como ya se mencionó, el efecto de la carga RPO_4^{2-} favorece la solvatación de la molécula en el agua, por lo tanto, si se favorece el predominio de esta especie, como ocurre en la SAB, es por ello que la solubilidad de **JOULZ-PRO** es mayor en esta que en la SAF. Por otro lado, la repetibilidad en SAF es mejor, porque se obtuvieron valores más bajos en el porcentaje del coeficiente de variación ($\text{CV}\% < 3$).

Tabla 7.7. Resultados de la solubilidad al equilibrio de **(R)-PZQ-BZ** y **JOULZ-PRO**

	(R)-PZQ-BZ (mg/mL)		JOULZ-PRO (mg/mL)	
	Fosfatos pH 7.4, 0.05 M	Boratos pH 9.0, 0.05 M	Fosfatos pH 7.4, 0.05 M	Boratos pH 9.0, 0.05 M
Promedio	0.0974	0.1370	137.3	169.4
DE	0.0016	0.0043	2.4172	4.4810
CV%	1.61	3.13	1.76	2.65

Con la información anterior y considerando el desarrollo de una formulación inyectable, se optaría por utilizar la SAF para la fórmula, aunque no tuvo más impacto en el aumento de la solubilidad (1410x), sí posee pH fisiológico, por lo que es menos probable que cause irritación del tejido; no obstante, si la dosis exige disolver mayor cantidad de fármaco y la solubilidad es una limitante en la formulación, la SAB en conjunto con cosolventes y/o excipientes (PVP, CMC, etc.) podría ser una buena estrategia, ya que un valor de pH=9 aún es permitido para formas farmacéuticas parenterales.⁹⁵

Otros compuestos también han demostrado un aumento en solubilidad después de la derivación a fosfonooximetilo; por ejemplo, el compuesto ALFA y el triclabendazol (**Figura 7.17**) mostraron un aumento de 79500x y 88000x, respectivamente. **JOULZ-PRO** respecto a su precursor tuvo un aumento menor (1410x); sin embargo, es más soluble en agua que el compuesto **ALFA-PRO** y **Triclabendazol-PRO** (**Figura 7.17**). Es probable que esto suceda porque la solubilidad intrínseca de **(R)-PZQ-BZ** es mayor que la de los otros precursores bencimidazólicos. Lo anterior, puede atribuirse a la parte estructural de la praziquanamina, que no es plana como el naftol (ALFA); las fuerzas de repulsión entre los anillos de PZQN anulan interacciones intermoleculares y el agua puede penetrar más fácil la red cristalina; en contraste, el grupo naftol del compuesto ALFA mantiene interacciones π - π que provocan que las moléculas se “apilen” y el agua no pueda disolverlo.

Más recientemente, apareció un derivado (((((isopropoxicarbonil)oxi)metoxi)-fosforil)oxi)metil del mebendazol (**XXI**) (**Figura 7.17**); sorprendentemente, resultó ser más soluble que el derivado fosfonooximetilo en su forma de sal disódica, esto porque no solo tiene influencia la carga del fosfato, también inhibe fuertemente las interacciones intermoleculares.⁹⁶

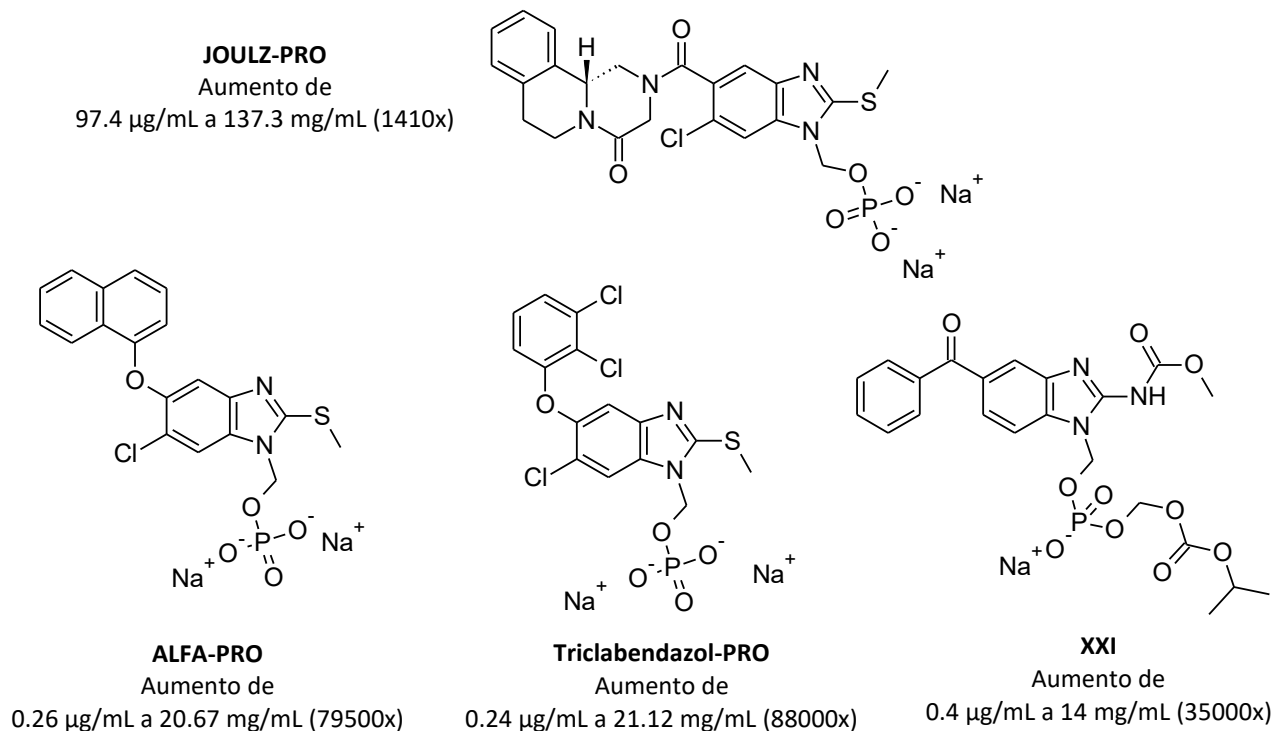


Figura 7.17. Otros profármacos fosfonooximetil bencimidazólicos con aumento en la solubilidad acuosa.^{75,76,96}

7.3. Actividad cisticida *in vivo* de JOULZ-PRO

Previamente ya se ha demostrado en modelos *in vitro* la acción de la fosfatasa alcalina sobre los derivados fosfonooximetilo,⁷⁶ es por ello que se decidió realizar directamente un ensayo *in vivo* asumiendo que el compuesto **JOULZ-PRO** se comportaría como un profármaco biorreversible dentro del organismo. Aunque *T. solium* es el verdadero responsable de la neurocisticercosis humana, desarrollar un modelo de infección intracraneal con *T. solium* resulta complejo, costoso y de baja reproducibilidad; en su lugar, debido a las similitudes antigénicas que comparten la cepa ORF de *T. crassiceps* y *T. solium*,¹⁸ se exploró la actividad cisticida de **JOULZ-PRO** en ratones infectados experimentalmente con cisticercos de *T. crassiceps*.

La molécula diseñada por nuestro equipo de investigación (**R**)-PZQ-BZ no tuvo buena eficacia cisticida en los ensayos *in vitro* (Sección 2.6.1); sin embargo, al derivarlo como profármaco hidrosoluble (**JOULZ-PRO**) su actividad biológica fue mucho mayor que la de los fármacos de referencia PZQtel y ABZ (Tabla 7.8). El derivado hidrosoluble al administrarse por vía parenteral durante 7 días a una dosis de 10 mg/kg tuvo una eficacia de 27.41%, en contraste con el PZQtel y ABZ, que en dicho periodo presentan una eficacia del 13.70% y 9.13%, respectivamente (Figura 7.18).

Es importante mencionar que la razón de haber elegido la vía de administración parenteral en vez de la vía oral, es porque la solubilidad acuosa que presenta **JOULZ-PRO** así lo permite, además, aunque la vía oral a primera vista pudiera ser la más atractiva porque no es invasiva y hay fosfatasa alcalina en el epitelio intestinal para liberar el precursor, se ha demostrado que una liberación previa a la absorción disminuye considerablemente la biodisponibilidad y por lo tanto la eficacia cisticida.⁷⁸

Tabla 7.8. Actividad cisticida de JOULZ-PRO, PZQtel y ABZ

Ratón	NÚMERO DE PARÁSITOS			
	Control	JOULZ-PRO	PZQtel	ABZ
1	108	88	88	105
2	145	77	102	100
3	110	86	110	110
4	102	79	90	97
5	116	89	88	98
6	103	78	100	120
7	120	88	115	106
8	99	82	100	99
Media ± DE	112.88 ± 14.80	83.38 ± 4.96	99.13 ± 10.08	104.38 ± 7.76
p (Dunnett)	-	0.0001	0.0286	0.2377
Eficacia%	-	27.41	13.70	9.13

El análisis estadístico de los resultados permite concluir que **JOULZ-PRO** ($p < 0.001$) y PZQtel ($p = 0.0286$) tienen significancia estadística; siendo el derivado hidrosoluble el que tiene más peso en la significancia, para el caso de ABZ no hay diferencia estadística.

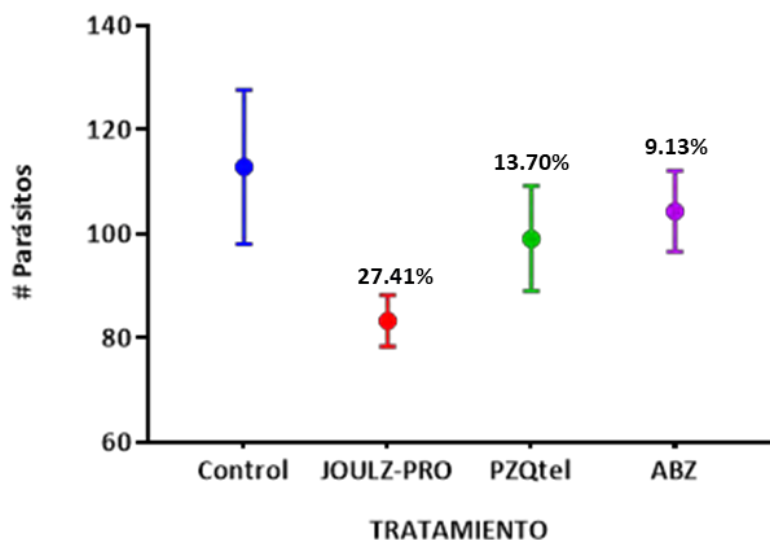


Figura 7.18. Reducción del número de parásitos en ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* después de 7 días de tratamiento con **JOULZ-PRO**, **PZQtel** y **ABZ**.

Con lo anterior, queda evidenciado que la estrategia de utilizar un profármaco biorreversible potencia la actividad cisticida. Es muy probable que después de la administración intramuscular, **JOULZ-PRO** se absorba y se distribuya en el organismo, después es hidrolizado por las fosfatasa alcalinas (lo cual hay que demostrarlo en estudios posteriores) propias del ratón o del parásito ⁹⁷ y entonces se libera el precursor **(R)-PZQ-BZ**; este último ejerce la actividad biológica. Cabe destacar, que estudios previos demuestran que después de la exposición de *T. crassiceps* a fármacos

antihelmínticos, la secreción de fosfatasa alcalina aumenta debido a daños en el tegumento,⁹⁷ lo que se traduciría en mayor concentración de la enzima en el lugar de la infección y por lo tanto hidrólisis de **JOULZ-PRO** en el sitio de acción.

No hay que olvidar que el esquema de tratamiento de los fármacos de referencia para observar la máxima eficacia es durante de 20 días, después de este periodo, PZQtel alcanza una eficacia máxima de 35% y ABZ de 38%,¹⁸ no así para **JOULZ-PRO**, que por tratarse de un compuesto administrado vía parenteral, no es viable extender más días. En general, aunque no se alcanzó mayor eficacia que la de los fármacos de referencia después de 20 días, disminuir la dosis 5x y obtener mayor eficacia disminuyendo el periodo de tratamiento (3x) trae como ventajas más eficiencia y disminución de los efectos adversos. Adicionalmente, si se utiliza como opción de tratamiento veterinario, puede tener beneficios económicos importantes. Por lo que **JOULZ-PRO** sirve de referencia para el desarrollo de nuevos compuestos antihelmínticos derivados de la praziquanamina y el bencimidazol.

Por último es importante presentar como perspectiva la posibilidad de explorar la actividad de **JOULZ-PRO** con más helmintos extraintestinales como son: *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* y/o *Trichinella spiralis*.

8. CONCLUSIONES

Se sintetizó el compuesto híbrido entre bencimidazol y praziquanamina; **(R)-PZQ-BZ**, también el derivado fosfonooximetilo de este en su forma de sal disódica (**JOULZ-PRO**). De manera general, los rendimientos para cada uno de los intermediarios involucrados son buenos y se logró escalar la metodología hasta 3 gramos de profármaco.

Los intermediarios y los productos finales se caracterizaron por sus propiedades fisicoquímicas de P_f y R_f . Se realizó la elucidación estructural por sus constantes espectroscópicas en RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P . Además, la espectrometría de masas de alta resolución y los análisis HPLC-MS apoyan la elucidación y confirman el alto grado de pureza de los compuestos.

La solubilidad termodinámica de **JOULZ-PRO** respecto a su precursor tuvo un aumento de 1410 veces en SAF (de 97.4 $\mu\text{g/mL}$ a 137.3 mg) y de 1237 veces en SAB (de 137 $\mu\text{g/mL}$ a 169.4 mg). Estos datos biofarmacéuticos servirán de apoyo durante el desarrollo de la formulación inyectable. Lo anterior, confirma la hipótesis de que la derivación hacia sales tipo fosfonooximetilo es una buena estrategia para la obtención de profármacos hidrosolubles.

En suma, la capacidad cisticida de este novedoso profármaco biorreversible apoya la hipótesis planteada. **JOULZ-PRO** tuvo una eficacia cisticida de 27.41% en 7 días de tratamiento, con una dosis de 10 mg/kg, administrada por vía intramuscular; superando la eficacia de los fármacos comerciales ABZ y PZQtel que no alcanzan esta actividad durante ese periodo. Este hecho permite predecir que **JOULZ-PRO** es sustrato de la fosfatasa alcalina y una vez superadas las barreras biológicas, este es hidrolizado y liberado como **(R)-PZQ-BZ** en el sitio de acción.

La nueva entidad química **JOULZ-PRO** demostró ser un profármaco antihelmíntico, de administración parenteral, altamente hidrosoluble y con un futuro prometedor. Esta investigación deja abierta la brecha hacia nuevas opciones quimioterapéuticas contra la cisticercosis humana y animal. Estudios posteriores demostrarán formalmente que efectivamente es sustrato de la fosfatasa alcalina; evaluarán su estabilidad acuosa y determinarán su actividad frente a otros helmintos extraintestinales.

9. REFERENCIAS

- 1 Sato, M. O. *et al.* *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia asiatica*, their hybrids and other helminthic infections occurring in a neglected tropical diseases' highly endemic area in Lao PDR. *PLoS neglected tropical diseases* **12**, 1-14, doi:10.1371/journal.pntd.0006260 (2018).
- 2 Rodríguez Canul, A. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **93**, 57-67, doi:10.1080/00034989958807 (1999).
- 3 WHO. *Neglected tropical diseases* (2009).
- 4 (WHO), W. H. O. *Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY)*, <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/> (
- 5 Okello, A. & Thomas, L. Human taeniasis: current insights into prevention and management strategies in endemic countries. *Risk Management and Healthcare Policy* **10**, 107-116, doi:10.2147/rmhp.s116545 (2017).
- 6 Fleury, A., Sciutto, E. & Larralde, C. Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Pública de México* **54**, 632-636 (2012).
- 7 Salud, S. d. Boletín epidemiológico. Semana 52. *Boletín epidemiológico* **34**, 20 (2017).
- 8 Salud, S. d. Boletín epidemiológico. Semana 16. *Boletín epidemiológico* **35**, 24 (2018).
- 9 Garcia, H. H., Del Brutto, O. H. & Nash, T. E. W. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* **32**, 3-9, doi:doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.3 (2005).
- 10 Garcia, H. H., Nash, T. E. & Del Brutto, O. H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology* **13**, 1202-1215, doi:10.1016/s1474-4422(14)70094-8 (2014).
- 11 CDC. *Prevention & Control*, <<https://www.cdc.gov/parasites/taeniasis/prevent.html>> (
- 12 Henderson-Frost, J. & H.-Gilma, R. *Foodborne Parasites*. 197-211 (Springer, 2006).
- 13 Bogitsh, B., Carter, C. & Oeltmann, T. *Human Parasitology*. 6th edn, 241-244 (Amsterdam: Academic Press., 2013).
- 14 Ndimubanzi, P., Carabin, H. & Budke, C. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **4**, e870, doi:10.1371/journal.pntd.0000870 (2010).
- 15 Willms, K. & Zurabian, R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology* **137**, 335-346, doi:10.1017/S0031182009991442 (2010).
- 16 Espíndola, N., De Gaspari, E., Nakamura, P. & Vaz, A. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. *Veterinary Parasitology* **89**, 321-326, doi:10.1016/S0304-4017(00)00208-9 (2000).
- 17 Freeman, R. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* **40**, 969-990, doi:10.1139/z62-086 (1962).
- 18 Palomares-Alonso, F., Palencia Hernandez, G., Rojas-Tome, I. S., Jung-Cook, H. & Pinzon-Estrada, E. Murine cysticercosis model: influence of the infection time and the time of treatment on the cysticidal efficacy of albendazole and praziquantel. *Experimental parasitology* **149**, 1-6, doi:10.1016/j.exppara.2014.12.002 (2015).
- 19 Willingham, A. L. & Engels, D. Control of *Taenia solium* Cysticercosis/Taeniosis. *Advances in Parasitology* **61**, 509-566, doi:10.1016/s0065-308x(05)61012-3 (2006).

9. REFERENCIAS

- 20 Garcia, H. H. & Del Brutto, O. H. Antiparasitic treatment of neurocysticercosis - The effect of cyst destruction in seizure evolution. *Epilepsy & behavior : E&B* **76**, 158-162, doi:10.1016/j.yebeh.2017.03.013 (2017).
- 21 Parkhouse, R. M. *et al.* TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. *Parasitology research* **102**, 921-926, doi:10.1007/s00436-007-0853-8 (2008).
- 22 Gonzalez, A. E. *et al.* Vaccination of Pigs to Control Human Neurocysticercosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 837-839, doi:10.4269/ajtmh.2005.72.837 (2005).
- 23 Flisser, A. *et al.* Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and immunity* **72**, 5292-5297, doi:10.1128/IAI.72.9.5292-5297.2004 (2004).
- 24 Scitutto, E., Fragoso, G. & Manoutcharian, K. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Archives of Medical Research* **33**, 371-378, doi:10.1016/S0188-4409(02)00376-4 (2002).
- 25 Pawtowsk, Z. S. Efficacy of low doses of praziquantel in taeniasis. *Acta Tropica* **48**, 83-88, doi:10.1016/0001-706X(90)90046-3 (1991).
- 26 Alsaqabi, S. M. & Wael., M.-L. Praziquantel: a Review. *Journal of Veterinary Science & Technology* **05**, 1-8, doi:10.4172/2157-7579.1000200 (2014).
- 27 Lima, S., Vieira, L., Harder, A. & Kusel, J. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **109**, 57-64, doi:10.1017/s0031182000077763 (1994).
- 28 Catterall, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a003947-a003947, doi:10.1101/cshperspect.a003947 (2011).
- 29 Pica-Mattocchia, L. *et al.* Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. *Experimental parasitology* **115**, 344-351, doi:10.1016/j.exppara.2006.09.017 (2007).
- 30 Doenhoff, M. J., Cioli, D. & Utzinger, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current opinion in infectious diseases* **21**, 659-667, doi:10.1097/QCO.0b013e328318978f (2008).
- 31 Bank, D. *Praziquantel*, <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01058>> (
- 32 el-Arini, S. K., Giron, D. & Leuenberger, H. Solubility properties of racemic praziquantel and its enantiomers. *Pharmaceutical development and technology* **3**, 557-564, doi:10.3109/10837459809028638 (1998).
- 33 Mislow, K. *Introduction to stereochemistry* 69 (Dover Publications, 2002).
- 34 Amidon, G., H., L., VP., S. & JR., C. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research* **12**, 413-420, doi:10.1023/A:1016212804288 (1995).
- 35 CENADIM. Bioequivalencia: Sistema de clasificación biofarmacéutica. *Boletín informativo DIGEMID* **1**, 1-6 (2006).
- 36 Services, U. S. D. o. H. a. H., Administration, F. a. D. & Research, C. f. D. E. a. *Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system guidance for industry*, <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf>> (2017).

- 37 Seubert, J., Pohlke, R. & Loebich, F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against Schistosomes and Cestodes. *Experientia* **33**, 1036, doi:10.1007/BF01945954 (1977).
- 38 Rupe, H. & Frey, W. Die katalytische Hydrierung des 1-Cyan-2-benzoyl-1,2-dihydroisochinolins (Reisserf'scher Körper aus Isochinolin). *Helvetica Chimica Acta* **22**, 673-683, doi:10.1002/hlca.19390220184 (1939).
- 39 Pohlke, R., Friedrich, L., Seubert, J., Thomas, H. & Andrews, P. Pyrazinoisochinolin-Derivat. Germany patent (1975).
- 40 Seubert, J. Tetrahydroisoquinoline Derivatives. Germany patent (1976).
- 41 Pohlke, R. Pyrazino-isochinolin-derivat und verfahren zu seiner Herstellung Germany patent (1974).
- 42 Pohlke, R. Verfahren zur Herstellung von 4-oxo-hexahydro-pyrazinoisochinolin Derivaten. Germany patent (1976).
- 43 Seubert, J., Thomas, H. & Andrews, P. 2-Acyl-4-oxo-pyrazino-isochinolinderivate und verfahren zu ihrer Herstellung Germany patent (1975).
- 44 Kim, J.-H. Formation of pyrazinoisoquinoline ring system by the tandem amidoalkylation and *N*-acyliminium ion cyclization: an efficient synthesis of Praziquantel. *Tetrahedron* **54**, 7395-7400, doi:10.1016/S0040-4020(98)00401-3 (1998).
- 45 Maillard, D., Waechterler, A., Maurin, J., Wakaresko, E. & Jasper, C. Method for the production of Praziquantel and precursors thereof. (2016).
- 46 Woelfle, M. Resolution of Praziquantel. *PLoS neglected tropical diseases* **5**, e1260, doi:10.1371/journal.pntd.0001260.g001 (2011).
- 47 Cedillo-Cruz, A., Aguilar, M. I., Flores-Alamo, M., Palomares-Alonso, F. & Jung-Cook, H. A straightforward and efficient synthesis of praziquantel enantiomers and their 4'-hydroxy derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **25**, 133-140, doi:10.1016/j.tetasy.2013.11.004 (2014).
- 48 Domling, A. & Khoury, K. Praziquantel and schistosomiasis. *ChemMedChem* **5**, 1420-1434, doi:10.1002/cmdc.201000202 (2010).
- 49 Ma, C., Zhang, Q.-F., Tana, Y.-B. & Wang, L. Total synthesis of (-)-Praziquantel: an anthelmintic drug. *Journal of chemical research* **2004**, 186-187, doi:10.3184/0308234041640564 (2004).
- 50 Seki, M. & Ogiku, T. A diastereoselective construction of pyrazinoisoquinoline skeletons via tandem cyclization of phenylalanine derivatives: a facile synthesis of optically active pyrazinoisoquinolines. *Tetrahedron* **70**, 3864-3870, doi:10.1016/j.tet.2014.04.045 (2014).
- 51 Roszkowski, P., Maurin, J. K. & Czarnocki, Z. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-praziquantel (PZQ). *Tetrahedron: Asymmetry* **17**, 1415-1419, doi:10.1016/j.tetasy.2006.04.023 (2006).
- 52 Yadav, G. & Ganguly, S. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *European journal of medicinal chemistry* **97**, 419-443, doi:10.1016/j.ejmech.2014.11.053 (2015).
- 53 Zavala Salgado, J. L. *Síntesis y evaluación de la actividad antiprotozoaria de nuevas carboxamidas 1H-bencimidazólicas, derivadas del 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida* Licenciatura thesis, UNAM, (2016).
- 54 Aguayo-Ortiz, R. *et al.* Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to beta-tubulin of *Trichinella spiralis*: insights from computational and experimental data. *J Mol Graph Model* **41**, 12-19, doi:10.1016/j.jmgm.2013.01.007 (2013).
- 55 Flores Carrillo, P. *Síntesis y actividad antiprotozoaria de derivados del 6-cloro-2-[[2-1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida* Maestría thesis, UNAM, (2015).

- 56 Flores-Carrillo, P. *et al.* Synthesis, antiprotozoal activity, and chemoinformatic analysis of 2-(methylthio)-1H-benzimidazole-5-carboxamide derivatives: Identification of new selective giardicidal and trichomonocidal compounds. *European journal of medicinal chemistry* **137**, 211-220, doi:10.1016/j.ejmech.2017.05.058 (2017).
- 57 Keiser, J., Engels, D., Büscher, G. & Utzinger, J. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **14**, 1514-1526, doi:10.1517/13543784.14.12.1513 (2005).
- 58 Hernández Campos, A. *Síntesis y actividad biológica de análogos del triclabendazol* Doctorado thesis, UNAM, (2014).
- 59 Viegas-Junior, C., Danuello, A., Bolzani, V. d. S., Barreiro, E. J. & Manssour-Fraga, C. A. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry* **14**, 1829-1852, doi:10.2174/092986707781058805 (2007).
- 60 Palomares, F. *et al.* In vitro effects of albendazole sulfoxide and praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysts. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 2302-2304, doi:10.1128/AAC.48.6.2302-2304.2004 (2004).
- 61 Savjani, K. T., Gajjar, A. K. & Savjani, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN pharmaceuticals* **2012**, 1-10, doi:10.5402/2012/195727 (2012).
- 62 Brazeau, G. A., Klapa, J. & Gupta, P. in *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Vol. 3 (ed Informa healthcare) 136 (2010).
- 63 (WHO), W. H. O. *Annex 8. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms*, <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19640en/s19640en.pdf>> (2006).
- 64 Genomics, B. C. f. C. *Aqueous solubility from MLSMR stock solutions*, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1996#section=Data-Table>> (
- 65 Torrado, S. & Torrado, S. Formulation parameters of albendazole solution. *International Journal of Pharmaceutics* **140**, 45-50, doi:10.1016/0378-5173(96)04545-0 (1996).
- 66 De la Torre, P., Torrado, S. & Torrado, S. Preparation, dissolution and characterization of Praziquantel solid dispersions. *Chem. Pharm. Bull* **47**, 1629—1633, doi:10.1248/cpb.47.1629 (1999).
- 67 Cugovcan, M. Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **137**, 42-53, doi:10.1016/j.jpba.2017.01.025 (2017).
- 68 Liu, Y. Dissolution and oral bioavailability enhancement of praziquantel by solid dispersions. *Drug Delivery and Translational Research* **8**, 580-590, doi:10.1007/s13346-018-0487-7 (2018).
- 69 Bazzo, G. C. Evaluation of enhanced aqueous solubility of praziquantel incorporated in poly(3-hydroxybutyrate) and Eudragit E microspheres. *Acta Scientiarum, Health Science* **35**, 91-96, doi:10.4025/actascihealthsci.v35i1.10673 (2013).
- 70 Ferres, H. Prodrugs of β -lactam antibiotics. *Drugs of Today* **19**, 499-538 (1983).
- 71 Rautio, J. *et al.* Prodrugs: design and clinical applications. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 255-270, doi:10.1038/nrd2468 (2008).
- 72 Ettmayer, P., Amidon, G., Clement, B. & Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* **47**, 2393-2404, doi:10.1021/jm0303812 (2004).
- 73 Testa, B. Prodrug research: futile or fertile? *Biochemical pharmacology* **68**, 2097-2106, doi:10.1016/j.bcp.2004.07.005 (2004).

- 74 Chassaing, C. *et al.* Highly water-soluble prodrugs of anthelmintic benzimidazole carbamates: synthesis, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *J. Med. Chem.* **51**, 1111-1114, doi:10.1021/jm701456r (2008).
- 75 Flores-Ramos, M. *et al.* Novel triclabendazole prodrug: A highly water soluble alternative for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **27**, 616-619, doi:10.1016/j.bmcl.2016.12.004 (2017).
- 76 Flores-Ramos, M. *et al.* A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **24**, 5814-5817, doi:10.1016/j.bmcl.2014.10.017 (2014).
- 77 Victoria Miguel, J. *Síntesis de profármacos hidrosolubles de bencimidazoles antiparasitarios* Licenciatura thesis, UNAM, (2016).
- 78 Flores Ramos, M. *Síntesis y actividad fasciolicida de fosfonooximetil bencimidazoles* Doctorado thesis, UNAM, (2016).
- 79 Baka, E. C., E., J. & Takacs-Novak, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *J Pharm Biomed Anal* **46**, 335-341, doi:10.1016/j.jpba.2007.10.030 (2008).
- 80 Apley, M. *et al.* Determination of thermodynamic solubility of Active Pharmaceutical Ingredients for veterinary Species: a new USP general chapter. *Dissolution Technologies* **24**, 36-39, doi:10.14227/dt240117p36 (2017).
- 81 Lindlar, H. & Dubuis, R. Palladium Catalyst for Partial Reduction of Acetylenes. *Org. Synth.* **5**, 880, doi:10.1002/0471264180.os046.27 (1973).
- 82 Pohlke, R., Friedrich, L., Juergen, S., Herbert, T. & Peter, A. Pyrazinoisoquinolines as anthelmintic agents. Deutschland und USA patent (1976).
- 83 He, Q., Rohani, S., Zhu, J. & Gomaa, H. Crystallization of the racemic compound and conglomerate of (RS)-2-chloromandelic acid. *Crystal Growth & Design* **10**, 5136-5145, doi:10.1021/cg100879p (2010).
- 84 Mäntylä, A. A novel synthetic route for the preparation of alkyl and benzyl chloromethyl phosphates. *Tetrahedron* **43**, 3793-3794, doi:10.1016/S0040-4039(02)00707-4 (2002).
- 85 Zwiwwk, A. K., M. Organophosphorus esters. t-Butyl as protecting group in phosphorylation via nucleophilic displacement. *Tetrahedron* **27**, 3163-3170, doi:10.1016/S0040-4020(01)98109-8 (1971).
- 86 Zheng, B., Fox, R. J., Sugiyama, M., Fritz, A. & Eastgate, M. D. Development of efficient processes for the preparation of di-tert-butyl potassium phosphate and di-tert-butyl (chloromethyl) phosphate. *Organic Process Research & Development* **18**, 636-642, doi:10.1021/op500066f (2014).
- 87 Bazargani, M. & Tafazzoli, M. Dynamic NMR and Theoretical Study of Hindered Internal Rotation about the C-N Bond in 4-(phenyl) acetyl Morpholine *Mahdiye Bazargani and Mohsen Tafazzoli / APCBEE Procedia* **77**, 145-150, doi:10.1016/j.apcbee.2013.08.025 (2013).
- 88 P. Gasparro, F. & H. Kolodny, N. *NMR Determination of the Rotational Barrier in N,N-dimethylacetamide*, <<https://www.colby.edu/chemistry/PChem/lab/NMRrotBarrier.pdf>> (
- 89 Gisin, B. F. The preparation of Merrifield-Resins through total esterification with cesium salts. *Helv. Chim. Acta* **56**, 1476-1482, doi:10.1002/hlca.19730560503 (1973).
- 90 Gerard Dijkstra, W. H. K., and Richard M. Kellogg*. An Assessment of the Causes of the "Cesium Effect". *J. Org. Chem.* **52**, 4230-4234 (1987).
- 91 Adam, A. & TU, C. (2005).

9. REFERENCIAS

- 92 Steinmetz, A. *The Broad Scope of Cesium Salts in Organic Chemistry*, <<http://old.inno-chem.com.cn/pdf/4.pdf>> (
- 93 Serajuddin, A. T. Salt formation to improve drug solubility. *Advanced drug delivery reviews* **59**, 603-616, doi:10.1016/j.addr.2007.05.010 (2007).
- 94 MarvinSketch v. 16.2.29.0 (2016).
- 95 Strickley, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical Research* **21**, 201-230, doi:10.1023/B:PHAM.0000016235.32639.23 (2004).
- 96 Zimmermann, S. C. *et al.* N-Substituted prodrugs of mebendazole provide improved aqueous solubility and oral bioavailability in mice and dogs. *Journal of medicinal chemistry* **61**, 3918-3929, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01792 (2018).
- 97 Mahanty, S. Quantitative screening for anticestode drugs based on changes in baseline enzyme secretion by *Taenia crassiceps*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 990-995, doi:10.1128/AAC.01022-12 (2013).

10. APÉNDICE A. DESARROLLO EXPERIMENTAL

10.1. INSTRUMENTACIÓN

- El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria Scientech modelo SL600, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.
- Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo IKAMAG RCT básica con sensor de temperatura.
- La destilación a presión reducida se realizó con un rotaevaporador Büchi R-215 con condensador vertical de dedo frío, refrigerante de inmersión Thermo Electron modelo 002-4737 y baño B-490. Se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo MD 4C con regulador de vacío integrado CVC 211. Alternativamente, se utilizó un rotaevaporador IKA RV10 con condensador vertical de dedo frío, refrigerante de inmersión Brinkmann modelo IC-30 y baño IKA modelo HB-10. Para disminuir la presión del sistema, se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo MD 4C NT+AK+EK.
- La hidrogenación catalítica se realizó empleando un hidrogenador marca Parr modelo 3916 EG con 60 lb/in² y 250 cc como capacidad máxima. Tanque de hidrógeno marca PRAXAIR
- Los puntos de fusión (Pf.) se determinaron en un aparato Büchi B-450 utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.
- La purificación por cromatografía en columna automatizada se realizó en un equipo Sepacore[®] marca Büchi modelo C-660 con colector de fracciones C-660, controlador de las bombas modelo C-615, espectrofotómetro UV modelo C-635 y bombas modelo C-601; todos ellos marca Büchi.
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (¹H, ¹³C, ³¹P) se obtuvieron con un espectrómetro Varian 400-MR (400 MHz), o bien, en un equipo JEOL modelo ECZ600R (600 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) en referencia con DMSO-*d*₆, CDCl₃, D₂O y los valores de *J* en Hz. La simbología empleada es: s= señal simple, d= señal doble, t= señal triple, q= señal cuádruple, m = señal múltiple, dd= señal doble de dobles, ddd=señal doble de doble de dobles, ABq= señal cuádruple de acoplamiento fuerte AB. La asignación del desplazamiento químico de las señales se realizó apoyándose de experimentos en dos dimensiones (COSY, HSQC, HMBC, NOESY). Lo desplazamientos químicos de ¹³C se redondearon a una cifra con excepción de las señales que cuyo desplazamiento era muy similar.
- Los espectros de masas se realizaron por análisis directo en tiempo real (DART) o por ionización con electrospray (ESI) modo positivo (ESI⁺) o modo negativo (ESI⁻), impacto electrónico (IE) y bombardeo de átomos rápidos modo positivo (FAB⁺). La simbología utilizada es: *m/z*= masa/carga, M⁺= ion molecular, [M+H]⁺ = aducto de ion molecular más hidrógeno, [M-H]⁻ = aducto de ion molecular menos hidrógeno, [M-R]⁺= fragmentación.
- Los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) se realizaron mediante la técnica reflectancia de ATR. Se utilizó un equipo FTIR/FIR Spectrum 400.

- El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía analítica en capa fina (CCF), utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice malla 60, marca Merck. Los compuestos orgánicos se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta, modelo UVGL-25 Minerallight, o con exposición a vapores de yodo. Los sistemas de elución utilizados fueron los siguientes:

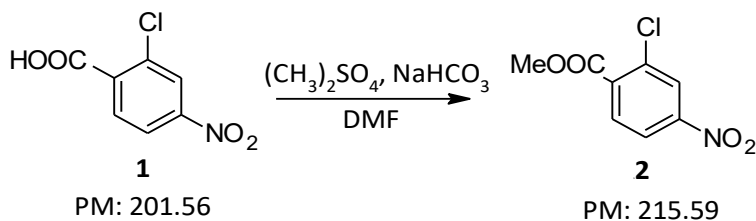
Tabla 10.1. Sistemas de elución para CCF

Sistema	Composición	Proporción
I	CHCl ₃ :Acetona	4:1
II	AcOEt:Hexano	7:3
III	Hexano:AcOEt:	3:2
IV	CHCl ₃ :MeOH	19:1
V	Tolueno, THF, AcOH	30:3:1

- La determinación de la solubilidad termodinámica se realizó con un agitador-incubadora (*Shaking-Incubator*) marca N-BIOTEK modelo NB205.
- La medición de las absorbencias se realizó con un espectrofotómetro Shimadzu UV 1601 con dos lámparas, una de deuterio (190-350 nm) y de tungsteno (350-1100 nm).
- Las mediciones de volúmenes analíticos se realizaron con micropipetas Eppendorf 100-1000 µL, 500-5000 µL y con micropipetas Sartorius 20-100 µL. También, matraces volumétricos de 10, 25, 100 y 1000 mL.
- El pH de las soluciones amortiguadoras se midió utilizando un potenciómetro Thermo Orion Star A211.
- Adicionalmente para la determinación de solubilidad se utilizó equipo de filtración Millipore, centrífuga Eppendorf 5416 y agitador Vortex MX-S de Science MED Finland Technology.

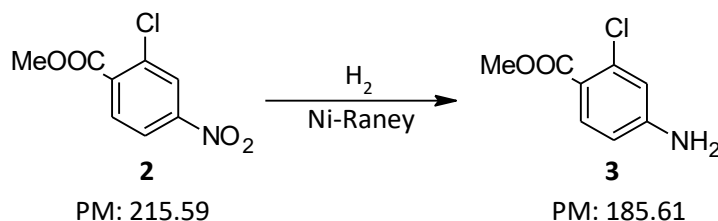
10.2. SÍNTESIS QUÍMICA

10.2.1. 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)



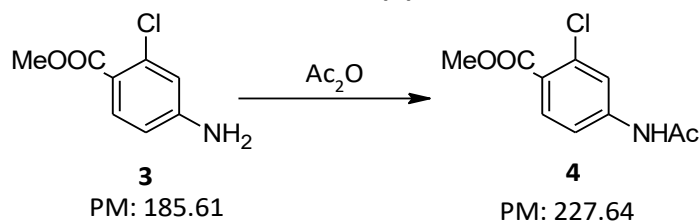
En un matraz de bola de 500 mL, equipado con embudo de adición y agitación magnética, se suspendieron 60.00 g (0.298 mol) de ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**1**) en 150 mL de DMF y se calentó hasta una temperatura de 75 °C. Posteriormente, se adicionaron lentamente 37.50 g (0.447 mol, 1.5 eq.) de NaHCO_3 ; al término de la adición se formó una disolución. Después se adicionaron gota a gota 28 mL (0.298 mol, 2 eq.) de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ y permaneció en agitación durante 1 h. El análisis por CCF mostró ausencia de materia prima, por lo que se procedió a concentrar el disolvente a presión reducida hasta obtener una resina. Dicha resina se vertió en 500 mL de agua helada, observando la precipitación de un sólido beige. La mezcla se filtró con vacío y se lavó con 2 L de agua. Se obtuvieron 60.82 g (0.282 mol, 92.3%) del compuesto **2**, el cual mostró un R_f de 0.7 (Sistema I + 2 gotas de NH_4OH) y un Pf. de 76.1-77.1 °C. RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ en ppm): 3.91 (s, 3H, CH_3OCO), 8.02 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, Ar), 8.25 (dd, 1H, $J=2.1, 8.5$ Hz, Ar), 8.34 (d, 1H, $J=2.1$, Ar). RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ en ppm): 53.1, 122.4, 125.4, 132.0, 132.6, 135.8, 149.3, 164.4.

10.2.2. 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)



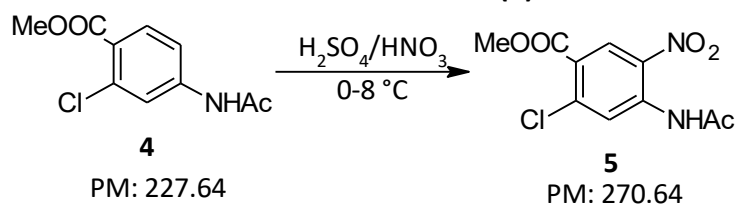
En una botella de hidrogenación de 500 mL, se suspendieron 15.00 g (0.070 mol) del compuesto **2** y 4.50 g (30% w/w) de catalizador Ni-Raney en 250 mL de $\text{AcOEt}:\text{MeOH}$ (4:1). La botella se montó en el equipo hidrogenador, se purgó el sistema con 3 cargas de 30 lb/in² de hidrógeno. Posteriormente, la botella se cargó con 60 lb/in² de hidrógeno y se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que no consumió más nitrógeno (1.5 h). Se consumieron 368 lb/in² de hidrógeno. Se realizó un análisis por CCF y reveló ausencia de materia prima. La mezcla de reacción se filtró con vacío usando una cama de celita para retener al catalizador, posteriormente, se concentró 90% del disolvente a presión reducida, se enfrió y permitió la cristalización. Se filtró al vacío y se obtuvieron 12.42 g (0.067 mol, 96.3%) de cristales blancos con un R_f de 0.52 (Sistema I) y un Pf. de 106.4-107.8 °C. RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ en ppm): 3.72 (s, 3H, CH_3CO), 6.16 (s, 2H, NHCO), 6.51 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, Ar), 6.64 (s, 1H, Ar), 7.64 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, Ar). RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ en ppm): 51.4, 111.6, 114.0, 114.6, 133.6, 134.8, 153.5, 164.8.

10.2.3. 4-Acetilamino-2-clorobenzoato de metilo (4)



En un matraz bola de 500 mL, provisto con agitación magnética, se colocaron 20.00 g (0.108 mol) del compuesto **3**. Posteriormente, se adicionó con agitación vigorosa, por goteo suave y a temperatura ambiente 15.4 mL (0.161 mol, 1.5 eq.) de anhídrido acético. Se formó una solución color ámbar. Un análisis por CCF mostró que la reacción procedió cuantitativamente. Se procedió a verter la mezcla de reacción en 500 mL de agua helada y se observó la precipitación de un sólido blanco, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con abundante agua hasta pH 7. El producto se secó con vacío por 3 días. Se obtuvieron 24.66 g (0.108 mol, 99.9%) de la acetamida **4**, la cual presentó un R_f de 0.44 (Sistema: I) y un Pf. de 108.7-109.6 °C. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 2.08 (s, 3H, NHCOCH_3), 3.81 (s, 3H, CH_3OCO), 7.54 (dd, 1H, $J= 8.6, 1.4$, Ar), 7.83 (d, 1H, $J= 8.6$ Hz, Ar), 7.89 (d, 1H, $J=1.4$ Hz, Ar). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 24.2, 52.2, 117.0, 120.0, 123.0, 132.5, 133.2, 143.4, 164.8, 169.3.

10.2.4. 4-Acetilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)

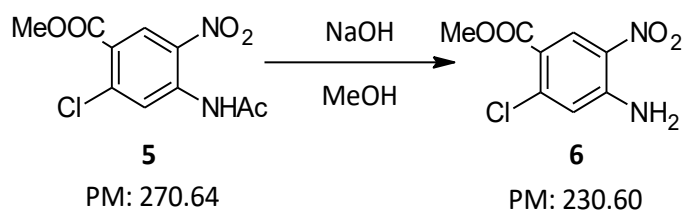


En un vaso de precipitados de 1 L, acondicionado con baño de hielo/sal/acetona y agitación magnética, se solubilizaron lentamente 40.00 g (0.176 mol) de la acetamida **4** con 100 mL (2.5 mL de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de **4**) de H_2SO_4 al 97.6%. De manera simultánea en un vaso de precipitados de 100 mL, adaptado con agitación magnética, termómetro, baño de hielo/sal/acetona y cubierto con papel aluminio, se colocaron 20 mL (0.352 mol, 4 eq.) de H_2SO_4 y se adicionó gota a gota 24 mL (0.352 mol, 2 eq.) de HNO_3 al 66%. Dicho procedimiento para preparar la mezcla sulfonítrica se realizó en 1 h. Una vez disuelta la materia prima y previa preparación de la mezcla sulfonítrica, esta se goteó lentamente por 10 min a la materia prima hasta alcanzar máximo una temperatura de 8 °C, seguido de un intervalo de 10 min para permitir el descenso de la temperatura hasta -5 °C. Se continuó la adición manteniendo la temperatura entre -5-8°C. Una vez adicionado un total de 35 mL de mezcla sulfonítrica, se observó que la temperatura permaneció constante (6 °C), después comenzó a descender. Lo anterior, indicó que la reacción había concluido. Se realizó un análisis de la mezcla de reacción por CCF, esta reveló el consumo total de **4** y la aparición de 2 productos con una proporción aproximadamente 7:3. El producto mayoritario presentó un R_f de 0.67 (Sistema I) el cual corresponde al compuesto **5** y el subproducto presentó un R_f de 0.5 (Sistema I), el cual representa al regioisómero

consecuencia de nitración en la posición 3. La mezcla de reacción se vertió en 500 mL de agua helada y precipitó un sólido amarillo que se separó por filtración. El sólido se lavó con abundante agua hasta obtener pH 7. Dicho compuesto se secó con vacío hasta peso constante; 45.25 g (0.167 mol, 95%).

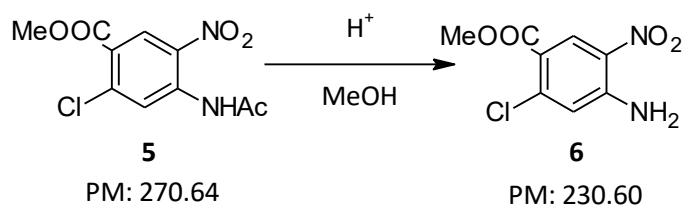
Para separar la mezcla de regioisómeros, el sólido anterior se recrystalizó con 1.2 L de una mezcla MeOH:EtOH (9:1) – 30 mL de la mezcla por cada gramo de mezcla de isómeros-. Después de 1 h de permitir la cristalización, se obtuvieron 25.73 g (0.095 mol, 54%) de unos cristales amarillos; R_f 0.64 (Sistema I), Pf. 140.8-141.4 °C. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 2.14 (s, 3H, NHCOCH₃), 3.87 (s, 3H, CH₃OCO), 8.05 (s, 1H, Ar), 8.42 (s, 1H, Ar), 10.52 (s, 1H, NHCO). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 24.0, 52.9, 124.2, 125.5, 128.6, 135.3, 137.7, 138.6, 163.1, 169.2.

10.2.5. 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6). Hidrólisis básica



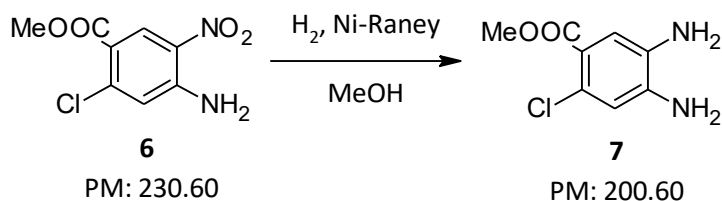
En un matraz bola de dos bocas de 500 mL, adaptado con termómetro, embudo de adición y trampa anhidra, se suspendieron 32.00 g (0.118 mol) de la acetamida **5** en 150 mL de metanol. Posteriormente, se goteó una disolución de NaOH preparada con 5.20 g (0.130 mol, 1.1 eq.) de sosa en 6 mL de agua. Manteniendo la temperatura por debajo de los 30 °C para evitar la hidrólisis del éster, se realizó la adición durante 45 min. Después la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1.5 h y el análisis por CCF reveló ausencia de materia prima. Se eliminó el disolvente y se vertió en 300 mL de hielo, precipitó un sólido (**6**) que se recuperó por filtración y se lavó con 3 L de agua hasta obtener pH 7. El sólido se secó al vacío por 3 días. Pesó 26.24 g (0.114 mol, 96%). Pf. 220.8-221.5 °C. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 3.78 (s, 3H, CH₃OCO), 7.10 (s, 1H, Ar), 7.95 (s, 2H, NH₂), 8.52 (s, 1H, Ar). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 52.2, 114.3, 120.2, 128.5, 131.0, 139.1, 148.0, 163.2.

10.2.6. 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6). Hidrólisis ácida

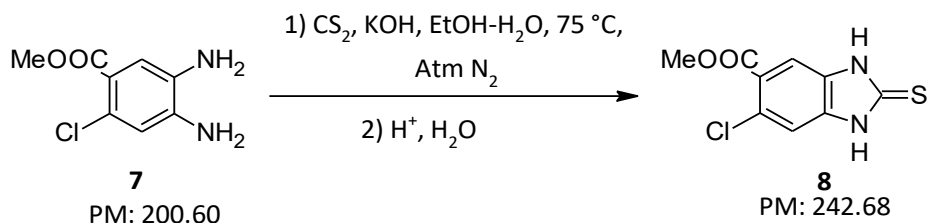


En un matraz bola de 500 mL, equipado con agitación magnética y condensador en posición de reflujo, se suspendieron 25.00 g (0.092 mol) del compuesto **5** en 100 mL de metanol. Después lentamente se adicionaron 15 mL (6 mL de H₂SO₄/g de **5**) de H₂SO₄. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 4 h a temperatura de reflujo del disolvente. Se analizó la mezcla de reacción por CCF y reveló completa transformación de la materia prima. Se vertió en 500 mL de agua helada con agitación vigorosa para extraer el producto y se aisló por filtración. Se obtuvo un sólido color amarillo brillante y se lavó con 1 L de agua helada hasta pH 7, después se separó por filtración y se secó con vacío. Se obtuvieron 18.59 g (0.080 mol, 87.6%) del compuesto **6**, el cual presentó un R_f de 0.62 (Sistema I) y un P_f. de 220.8-221.6 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 3.78 (s, 3H, CH₃OCO), 7.10 (s, 1H, Ar), 7.95 (s, 2H, NH₂), 8.52 (s, 1H, Ar). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 52.2, 114.3, 120.2, 128.5, 131.0, 139.1, 148.0, 163.2.

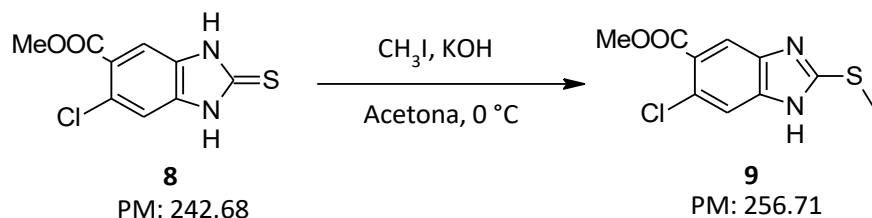
10.2.7. 4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (7)



En una botella de hidrogenación de 500 mL, se suspendieron 18.00 g (0.078 mol) del compuesto **6** y 5.40 g (30%) de catalizador Ni-Raney en 200 mL de metanol. La botella se acopló al equipo hidrogenador, purgando al sistema con 3 cargas de 30 lb/in² de hidrógeno. Posteriormente, la botella se cargó con 60 lb/in² de hidrógeno y se dejó en agitación a una temperatura de 60 °C hasta que no se consumió más hidrógeno (1.6 h). Se consumieron de 352 lb/in² de hidrógeno. Concluida la reacción, la mezcla de hidrogenación se filtró al vacío usando una cama de celita para retener al catalizador, se concentró el disolvente a presión reducida hasta obtener un sólido café que pesó 18 g (húmedo), con R_f de 0.33 (Sistema I), el cual se sometió inmediatamente a la siguiente reacción sin ningún tratamiento adicional.

10.2.8. 6-Cloro-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**)

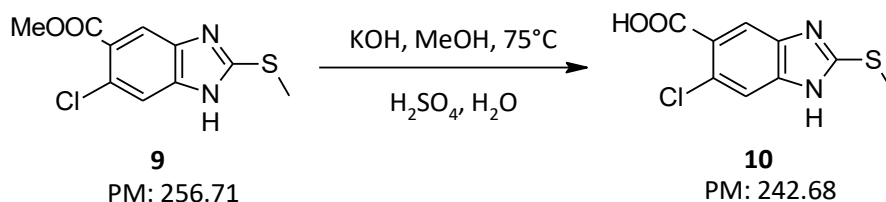
En un matraz bola de 500 mL, provisto con agitación magnética y condensador en posición de reflujo, se disolvieron a temperatura ambiente 15.65 g (0.078 mol) de la diamina **7** con 200 mL de EtOH 96°. De manera simultánea, en un matraz bola de 100 mL, acondicionado con baño de hielo, agitación magnética, embudo de adición y atmosfera de nitrógeno, se preparó el xantato de etilo adicionando 7.80 g (0.140 mol, 1.8 eq.) de KOH disueltos en 10 mL de agua a 50 mL (0.780 mol, 10 eq.) de etanol. Esta mezcla se mantuvo en agitación por 20 min, posteriormente, se adicionaron lentamente 11.30 mL (0.187 mol, 2.4 eq.) de CS₂. Una vez que se observó la formación del etilxantato (color naranja), este se goteó a la mezcla con el compuesto **7**. La mezcla de reacción permaneció en agitación, bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 h a una temperatura de 75 °C y bajo atmósfera de nitrógeno. Culminada la reacción, se procedió a verter la mezcla en 600 g de hielo-agua, se agitó con una varilla de teflón mientras se adicionaba ácido sulfúrico al 30% hasta pH 7. Se aciduló con ácido acético glacial al 20% hasta pH 5 y precipitó un sólido color salmón el cual se separó por filtración con vacío y se lavó con abundante agua hasta pH neutro. Se obtuvieron 17.93 g (0.074 mol, 93.6%) del compuesto **8**, el cual mostró un R_f de 0.44 (Sistema I) con un Pf. de 250.6-251.8 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 3.84 (s, 3H, CH₃OCO), 7.23 (s, 1H, Ar), 7.54 (s, 1H, Ar), 12.90 (s, 2H, NH-Benz). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 52.5, 111.1, 111.6, 123.0, 126.6, 131.1, 135.4, 165.1.

10.2.9. 6-Cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**)

En un matraz bola de dos bocas de 250 mL, equipado con termómetro, embudo de adición y acondicionado con un baño de hielo, se disolvieron 9.99 g (0.041 mol) del compuesto **8** en 100 mL de acetona. Después se agregaron 3.30 g (0.057 mol, 1.4 eq.) de KOH disueltos en 10 mL de agua. Se procedió a gotear lentamente 3.0 mL (0.049 mol, 1.2 eq.) de CH₃I evitando que se elevara la temperatura a más de 5 °C. Culminada la adición, permaneció en agitación a temperatura ambiente durante 1.5 h. Un análisis por CCF reveló ausencia de materia prima. El disolvente se concentró a presión reducida y se vertió sobre 1 L de hielo, se ajustó el pH hasta 5 con H₂SO₄ al 30% y precipitó un sólido café oscuro. Dicho sólido se separó por filtración y se lavó con abundante agua. Se obtuvieron 10.52 g (0.041 mol, 99%). Por último, el sólido obtenido se decoloró con 15% w/w de carbón activado

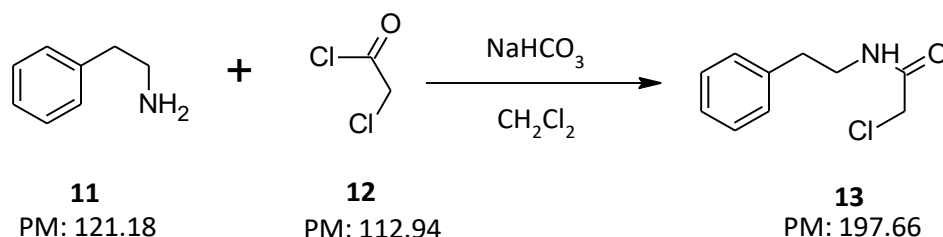
en EtOH:Tolueno (95:5), se retiró el carbón con cama de celita y retiró 80% del disolvente. Se obtuvo un sólido beige (**9**) que se recuperó por filtración, este presentó un R_f de 0.62 (Sistema II) y un Pf. de 191.4-192.3 °C. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 2.70 (s, 3H, SCH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃OCO), 7.58 (s, 1H, Ar), 7.87 (s, 1H, Ar), 12.93 (s, 1H, NH-Benz). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 13.8, 52.4, 112.3, 118.8, 122.4, 125.0, 135.4, 145.4, 156.2, 165.9.

10.2.10. Ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10)



En un matraz bola de 100 mL, adaptado con condensador en posición de reflujo, se suspendieron 6.93 g (0.027 mol) del éster **9** en 30 mL de metanol. Posteriormente, se adicionaron 3.01 g (0.054 mol, 2 eq.) de KOH disueltos en 10 mL de agua. Se dejó reaccionar toda una noche a temperatura de reflujo. Consumida la materia prima, se procedió a concentrar la mezcla de reacción y después se vertió en 200 mL de agua fría. Se acidificó el medio hasta pH 3 con H₂SO₄ al 30% y se formó una suspensión blanca. La mezcla fría se filtró al vacío y se obtuvo un sólido blanco (**10**) que pesó 5.82 g (0.024 mol, 88.8%) con un R_f de 0.20 (Sistema V) y un Pf. de 220.1-221.0 °C. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 2.70 (s, 3H, CH₃S), 7.56 (s, 1H, HC_{4Ar}), 7.88 (s, 1H, HC_{7Ar}), 12.96 (s, 1H, NH-Benz). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm): 13.8, 111.5, 119.9, 123.8, 125.1, 155.9, 167.1. EM (IE, m/z): 242 ([M⁺], 100%), 244 [M+2]⁺= 35%; isotopía de cloro).

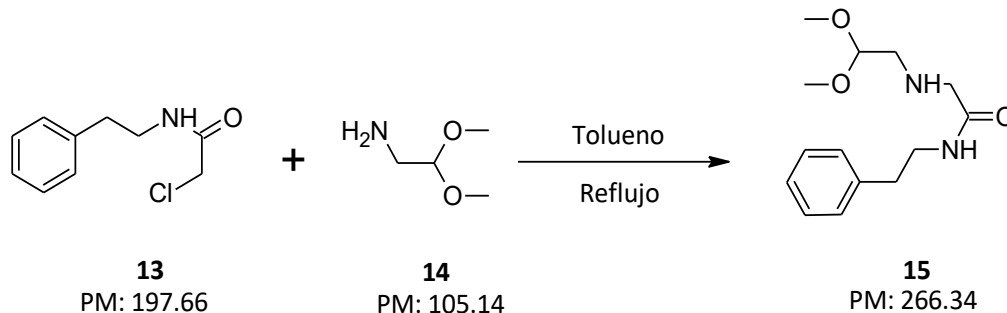
10.2.11. 2-Cloro-N-(2-feniletil)acetamida (13)



En un matraz de bola de dos bocas de 1 L, acondicionado con termómetro y embudo de adición, se suspendieron 50.00 g (0.420 mol) de 2-feniletilamina (**11**) en 500 mL de diclorometano. Posteriormente, se agregaron 53.00 g (0.630 mol, 1.5 eq.) de NaHCO₃, la suspensión se enfrió a 0 °C y se adicionaron 57.00 g (0.240 mol, 1.2 eq.) de cloruro de cloroacetilo (**12**); cuidando que la temperatura no rebasara los 10 °C. Una vez terminada la adición, la mezcla de reacción permaneció en agitación durante 2 h a esa misma temperatura. El análisis por CCF de la reacción indicó ausencia de materia prima (R_f 0.53, Sistema III). Se procedió a realizar una extracción con 400 mL de agua fría, después la fase orgánica se lavó dos veces con HCl al 10% (2 x 100 mL); la fase orgánica recuperada se trató con Na₂SO₄ anhidro. Por último, se concentró a sequedad y se observó la formación de cristales blancos (**13**), los cuales pesaron 78.09 g (0.395 mol, 94.1 %), Pf. 59.0-60.3 °C. RMN ^1H (600 MHz,

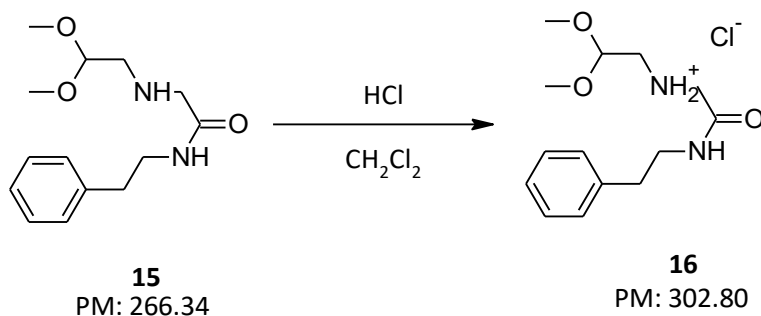
CDCl₃, δ en ppm): 2.84 (t, 2H, *J*= 7.06 Hz, PhCH₂), 3.56 (q, 2H, *J*= 7.00 Hz, PhCH₂CH₂), 4.00 (s, 2H, CH₂Cl), 7.19-7.33 (m, 5H, Ar). RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 35.5, 41.0, 42.7, 126.8, 128.8 (4C), 138.4, 165.9. EM (IE, *m/z*): 197 ([M⁺]), 104 ([M-93]⁺, 100%), 77 ([M-120]⁺).

10.2.12. 2-[(2,2-Dimetoxietil)amino]-*N*-(2-feniletil)acetamida (**15**)



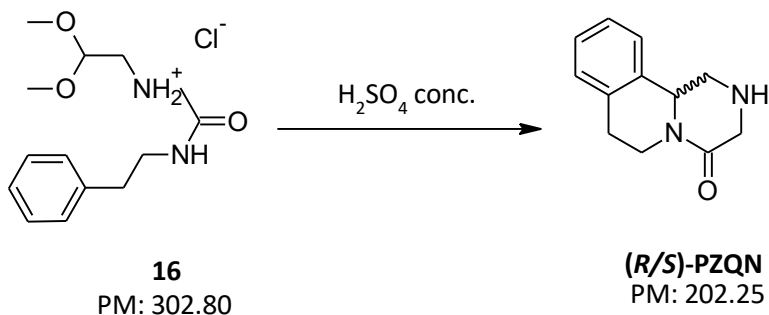
En un matraz de bola de 1 L, se suspendieron 77.60 g (0.390 mol) de la cloroacetamida **13** en 400 mL de tolueno, una vez disueltos, se gotearon a temperatura ambiente 85.1 mL (0.780 mol, 2 eq.) de aminoacetaldehído dimetil acetal (**14**). Terminada la adición, la mezcla se dejó reaccionar por 3 h a temperatura de reflujo; concluido el tiempo se realizó un análisis por CCF (*R_f* 0.35, Sistema III) y reveló ausencia de materia prima. Para el tratamiento de la reacción, la mezcla se enfrió hasta 0 °C por 30 min, observándose la formación de un precipitado color blanco que se recuperó por filtración (clorhidrato del aminoacetaldehído dimetil acetal). Este se separó por filtración y se destiló la mayor parte del disolvente con vacío. Se obtuvo un residuo oleoso café oscuro, el cual se solubilizó en 200 mL de diclorometano y después se realizaron 3 extracciones con 200 mL de agua. La fracción orgánica se trató con Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un sólido oleoso color naranja (**15**) que pesó 90.23 g (0.340 mol, 86%), el cual se utilizó inmediatamente en la siguiente reacción. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1.93 (s, 1H, NH), 2.64 (d, 2H, *J*= 5.20 Hz CH₂CH(OCH₃)₂), 2.83 (t, 2H, *J*= 7.06 Hz, PhCH₂), 3.24 (s, 2H, NHCH₂CO), 3.26 (s, 1H, NHCO), 3.34 (s, 6H, OCH₃), 3.54 (q, 2H, *J*= 7.00 Hz, PhCH₂CH₂), 4.30 (t, 1H, *J*=5.2 Hz, CH(OCH₃)₂), 7.18-7.23 (m, 3H Ar), 7.28-7.31 (m, 2H, Ar). RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 35.8, 40.1, 51.1, 52.3, 54.1 (2C), 103.4, 126.5, 128.6 (2C), 128.7 (2C), 139.1, 171.4. EM (DART⁺, *m/z*): 267 [M+H]⁺, 235 [M+H-32]⁺.

10.2.13. Clorhidrato de 2,2-dimetoxi-*N*-{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamionio (**16**)



En un matraz de bola de 1 L, se disolvieron 89.73 g (0.337 mol) del producto crudo obtenido en la **Reacción 10.2.12 (15)** en 300 mL de diclorometano. La suspensión se enfrió a 0 °C y después se adicionaron 76 mL (0.337 mol, 1 eq.) de una solución comercial de HCl en dioxano 4.0 M. La adición fue por goteo lento y duró 1.7 h. Se observó la formación de un sólido blanco el cual se recuperó por filtración y se lavó repetidamente con CH₂Cl₂ frío. Se obtuvieron 65.54 g (0.216 mol, 64.2%) de unos cristales blancos (**16**), Pf.150.0-150.8 °C. RMN ¹H (600 MHz, D₂O, δ en ppm): 2.87 (t, 2H, *J*= 6.75 Hz, PhCH₂), 3.09 (d, 2H, *J*= 4.70 Hz CH₂CH(OCH₃)₂), 3.50 (s, 6H, OCH₃), 3.56 (t, 2H, *J*= 6.75 Hz, PhCH₂CH₂), 3.82 (s, 2H, NHCH₂CO), 4.74 (t, 1H, *J*= 4.70 Hz, CH(OCH₃)₂), 7.32-7.33 (m, 3H Ar), 7.39-7.42 (m, 2H, Ar). RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, δ en ppm): 34.6, 40.7, 48.0, 48.1, 55.7 (2C), 100.2, 126.7, 128.8 (2C), 129.1 (2C), 139.2, 165.3.

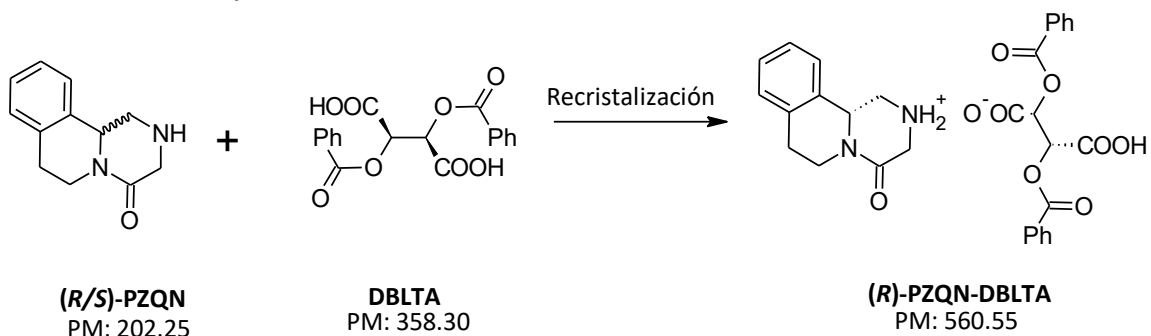
10.2.14. (*R/S*)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((*R/S*)-PZQN)



En un matraz de dos bocas de 1 L, adaptado con termómetro y baño de hielo, se colocaron 65 mL (1 mL H₂SO₄/g de **16**) de H₂SO₄ concentrado y se adicionaron lentamente 65 g (0.214 mol) del clorhidrato **16**; cuidando que la temperatura no sobrepasara los 5 °C. La mezcla de reacción permaneció en agitación a temperatura ambiente durante un periodo de 12 h (el matraz se cubrió con papel aluminio porque el producto es sensible a la luz). Transcurrido este tiempo, se realizó un análisis por CCF (*R_f* 0.3, Sistema IV+1 gota de NH₄OH) y reveló consumo completo de la materia prima, la mezcla de reacción se vertió a un vaso de precipitados con 2 L de hielo. Con ayuda de un baño de hielo se ajustó el pH a 12 con NaOH en escamas (mantener temperatura inferior a 25 °C). Finalmente se adicionaron 200 mL de solución saturada de NaCl y se extrajo con diclorometano (3 x 200 mL). La fase orgánica se trató con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad. Se obtuvo un sólido beige ((*R/S*)-PZQN) cuyo peso fue de 33.18 g (0.164 mol, 76.7%), Pf 117.4-119.1 °C. IR (ATR-FT, cm⁻¹): 3314.61 (NH), 3053.24 (C_{Ar}-H), 2895.64 (H-C_{sat}), 1632.34 (C=O), 1625.51 (C=O), 1463.86 (C=C). RMN ¹H

(400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2.38 (s, 1H, NH), 2.72-2.78 (m, 1H, HC₇), 2.81-2.88 (m, 1H, HC₆), 2.90 (dd, 1H, *J* = 13.01, 10.09 Hz, HC₁), 2.95-3.03 (m, 1H, HC₇), 3.61 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.14, *J*_{AB} = 17.40 Hz, 2x(HC₃)), 3.75 (ddd, 1H, *J* = 13.03, 4.68, 1.37 Hz, HC₁), 4.82 (dd, 1H, *J* = 10.36, 4.87 Hz, HC_{11b}), 4.86 (ddd, 1H, *J* = 12.57, 5.10, 2.63 Hz, HC₆), 7.13-7.27 (m, 4H, Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 28.8 (C₇), 38.8 (C₆), 49.7 (C₁), 49.9 (C₃), 56.7 (C_{11b}), 124.7 (C₁₁), 126.6 (C₁₀), 127.1 (C₉), 129.4 (C₈), 134.1 (C_{11a}), 134.9 (C_{7a}), 167.1 (C₄). EM (IE, *m/z*): 202 ([M⁺]), 145 ([M-57]⁺; 100%) 77 ([M-125]⁺).

10.2.15. Resolución racémica de la praziquanamina. (11b*R*)-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-ilo (2*R*,3*R*)-2,3-bis(benzoiloxi)-3-carboxipropanoato ((*R*)-PZQN-DBLTA)

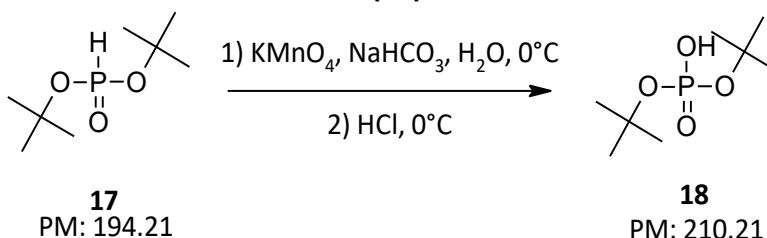


En un matraz de bola de 2 L, se suspendieron 30.70 g (0.152 mol) de (*R/S*)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((*R/S*)-PZQN) y 52.42 g (0.155 mol, 1 eq.) de ácido dibenzoil-L-tartárico (DBLTA) en 1657.8 mL de una mezcla isopropanol:agua (9:1); 54 mL de mezcla isopropanol:agua por cada gramo de (*R/S*)-PZQN. La mezcla se calentó a reflujo y se observó completa disolución, se filtró en caliente para retirar impurezas que no se disolvieron y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 h. Los cristales blancos que cristalizaron se recuperaron por filtración y se dejaron secar con vacío durante 12 h. Se obtuvieron 41.27 g (0.074 mol, 48.4%) de la sal diasteromérica enriquecida con el enantiómero (*R*)-PZQN. Nuevamente se realizó el procedimiento de recrystalización con la finalidad de enriquecer más dicho enantiómero, pero ahora con 928.6 mL de una mezcla isopropanol:agua (2:1); 22.5 mL de la mezcla isopropanol:agua por cada gramo de sal diasteromérica. El tiempo de reposo para la recrystalización fue de 2 h, el sólido recuperado se secó con vacío por 12 h. Se obtuvieron 33.00 g (0.059 mol, 79.5%) de la sal diasteromérica *R*. Pf. 138.1-139.7 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 2.68-2.75 (m, 3H, 2(HC₇), HC₆), 2.88 (dd, 1H, *J* = 12.54, 11.05 Hz, HC₁), 3.61 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.04, *J*_{AB} = 17 Hz, 2(HC₃)), 3.94 (dd, 1H, *J* = 12.60, 4.26 Hz, HC₁), 4.53-4.55 (m, 1H, HC_{11b}), 4.92 (dd, 1H, *J* = 10.83, 4.31 Hz, HC₆), 5.76 (s, 2H, CH-DBLTA), 7.17-7.23 (m, 5H, Ar-PZQN), 7.52-7.55 (m, 4H, Ar-DBLTA), 7.65-7.68 (m, 2H, Ar-DBLTA), 7.98 (dd, 4H, *J* = 8.27, 1.21 Hz, Ar-DBLTA). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 28.1 (HC₇), 37.9 (HC₆), 45.7 (HC₁), 46.1 (HC₃), 53.1 (HC_{11b}), 72.5 (CH-DBLTA), 125.2 (HC₁₁), 126.6 (HC₁₀), 127.1 (HC₉), 128.9 (HC₈), 129.1 (DBLTA), 129.2 (DBLTA), 129.4 (HC_{11a}), 133.1 (DBLTA), 133.7 (HC_{7a}), 134.6 (DBLTA), 163.1 (DBLTA), 164.9 (DBLTA), 168.2 (HC₄). EM (DART⁺, *m/z*): 203.13 [M+H]⁺.

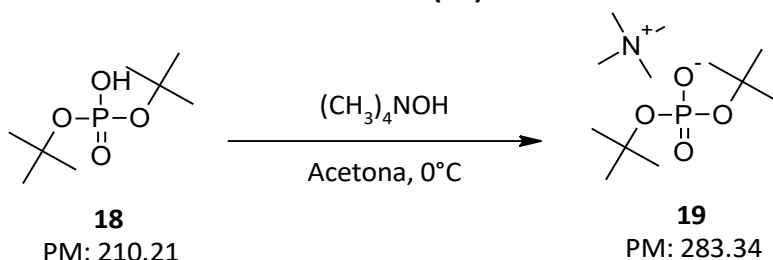
10.2.16. Formación de la base libre ((R)-PZQN).

La sal diastereomérica obtenida (2.80 g) se suspendió en 28 mL de agua desionizada (10 mL de agua/g sal diastereomérica). Se ajustó el pH a 13 con NaOH 2 N y la solución permaneció en agitación durante 10 min. Enseguida se adicionaron 5 mL de solución saturada de NaCl (Brine) y se extrajo con diclorometano (3 x 10 mL). La fase orgánica se trató con Na₂SO₄ anhidro y se destiló todo el disolvente. Se obtuvo un sólido blanco que pesó 0.859 g (4.25x10⁻³ mol, 85%). R_f 0.18 (Sistema I). R_f 0.31 (Sistema IV+1 gota de NH₄OH). Pf. 123.1-123.7 °C. $[\alpha]_D^{20} = -291.43$ [Disolvente: CH₂Cl₂; [9.8 g/mL], L= 1 dm; α : -2.856 a 589 nm (Na)]. 95% ee. IR (ATR-FT, cm⁻¹): 3316.82 (NH), 3014.54 (C_{Ar}-H), 2877.94 (H-C_{sat}), 1617.87 (C=O), 1460.59 (C=C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2.38 (s, 1H, NH), 2.72-2.78 (m, 1H, HC₇), 2.81-2.88 (m, 1H, HC₆), 2.90 (dd, 1H, J= 13.01, 10.09 Hz, HC₁), 2.95-3.03 (m, 1H, HC₇), 3.61 (ABq, 2H, $\Delta\delta_{AB} = 0.14$, J_{AB}= 17.40 Hz, 2x(HC₃)), 3.75 (ddd, 1H, J= 13.03, 4.68, 1.37 Hz, HC₁), 4.82 (dd, 1H, J= 10.36, 4.87 Hz, HC_{11b}), 4.86 (ddd, 1H, J= 12.57, 5.10, 2.63 Hz, HC₆), 7.13-7.27 (m, 4H, Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 28.8 (C₇), 38.8 (C₆), 49.7 (C₁), 49.9 (C₃), 56.7 (C_{11b}), 124.7 (C₁₁), 126.6 (C₁₀), 127.1 (C₉), 129.4 (C₈), 134.1 (C_{11a}), 135.0 (C_{7a}), 167.1 (C₄). EM (IE, m/z): 202 ([M⁺]), 145 ([M-57]⁺; 100%) 77 ([M-125]⁺).

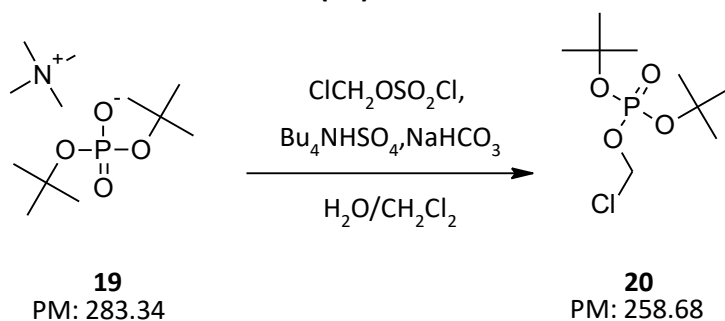
10.2.17. Fosfato monoácido de di-terc-butilo (18)



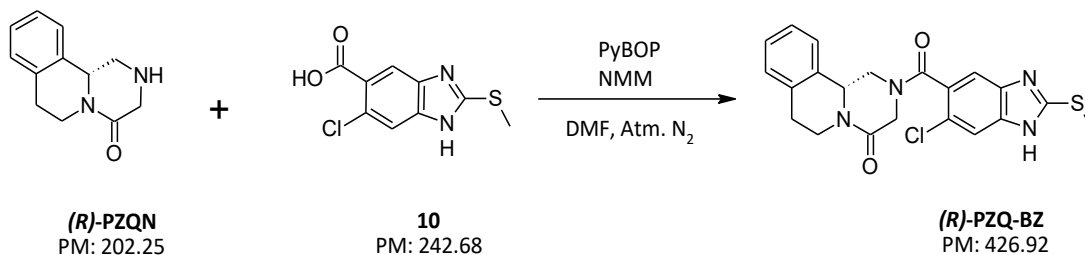
En un matraz de bola de 1 L, adaptado con embudo de adición y baño de hielo, se disolvieron 31.00 g (0.367 mol, 1 eq) de NaHCO₃ en 250 mL de agua desionizada. Posteriormente, se adicionó por goteo 75.00 g (0.367 mol) de fosfito di-terc-butilo (**17**). La mezcla de reacción permaneció en agitación durante 20 min, después se adicionaron 52.00 g (0.330 mol, 0.9 eq.) de KMnO₄, divididos en tres porciones con lapsos de 20 min entre cada una. Al cabo de la adición, se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h observándose la formación de un sólido color café (MnO₂). Este sólido se retiró por filtración sobre una cama de celita y el líquido filtrado se trató con carbón activado (10% w/w). Por último, manteniendo la disolución en un baño de hielo se ajustó el pH a 1 con HCl concentrado. Se obtuvo un sólido blanco que se recuperó vía filtración y se mantuvo en refrigeración. A las aguas madres se les ajustó el pH nuevamente a 10 con K₂CO₃ y se repitió el proceso de acidificación-basificación 3 veces más para aislar mayor cantidad de producto. En total se obtuvieron 76.82 g (0.365 mol, 99.6%) del fosfato **18**. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 1.35 (s, 18H, C(CH₃)₃). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 29.7 (d, J= 4.3 Hz), 79.6 (d, J= 6.9 Hz). RMN ³¹P (273 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): -8.88.

10.2.18. Di-*tert*-butilfosfato de tetrametilamonio (**19**)

En un matraz de bola de 500 mL, acondicionado con baño de hielo, se mezclaron 76.82 g (0.365 mol) del fosfato **18** en 150 mL de acetona. Después se adicionó gota a gota 160 mL (0.438 mol, 1.2 eq.) de una solución comercial de hidróxido de tetrametilamonio al 25% en agua, la reacción permaneció en agitación durante 1 h. Se retiró el disolvente por destilación a presión reducida y se obtuvo un sólido oleoso (**19**), el cual se mantuvo en refrigeración para ser utilizado en la siguiente reacción. RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ en ppm): 1.25 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.15 (s, 12H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_4$). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , δ en ppm): 30.3 (d, $J = 4.2$ Hz), 54.3 (t, $J = 3.9$ Hz), 72.8 (d, $J = 7.2$ Hz). RMN ^{31}P (273 MHz, D_2O , δ en ppm): -5.09.

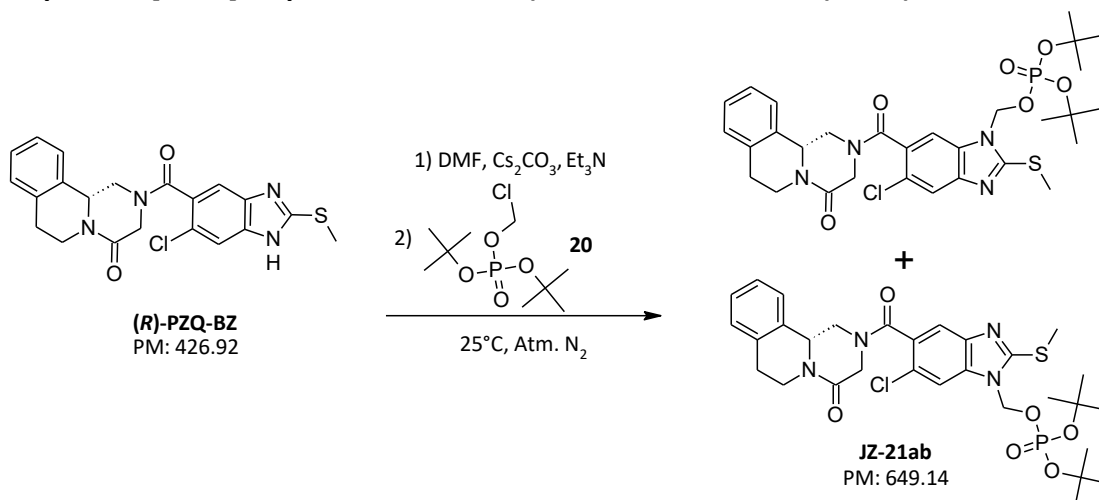
10.2.19. Fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**20**)

El producto crudo de la reacción anterior (0.365 mol) se disolvió en 300 mL de agua desionizada y se colocó en un matraz de bola de 1 L, acondicionado con baño de hielo, embudo de adición y columna Vigreux. Enseguida se agregaron 121.78 g (1.460 mol, 4 eq.) de NaHCO_3 , 300 mL de CH_2Cl_2 y 12.09 g (0.037 mol, 0.1 eq.) de sulfato monoácido de tetrabutilamonio (Bu_4NHSO_4). Después se goteó lentamente 48 mL (0.438 mol, 1.2 eq.) de clorosulfato de clorometilo ($\text{ClCH}_2\text{OSO}_2\text{Cl}$). La mezcla de reacción permaneció en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Concluido este periodo, se aisló la fase orgánica y se lavó con agua desionizada (5x 200 mL). La fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro y se destiló el disolvente a sequedad. Se obtuvo un líquido oleoso color amarillo (**20**) que pesó 55 g (0.213 mol, 58.2%). Para prolongar su vida útil en anaquel, se agregó K_2CO_3 (10% en mol por peso de producto) y se mantuvo en refrigeración bajo atmósfera inerte. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 1.49 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 5.59 (s, 1H, CH_2), 5.63 (s, 1H, CH_2). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 29.7 (d, $J = 4.3$ Hz), 73.2 (d, $J = 7.0$ Hz), 84.0 (d, $J = 7.8$ Hz). RMN ^{31}P (273 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): -11.33.

10.2.20. (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)


En un matraz de bola de 500 mL, acondicionado con atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 10.03 g (0.041 mol) del ácido carboxílico **10** en 100 mL de DMF anhidra. Después se adicionaron 9 mL (0.082 mol, 2 eq.) de *N*-metilmorfolina (NMM) y la solución permaneció en agitación a temperatura ambiente durante 10 min. Entonces se adicionaron 23.45 g (0.045 mol, 1.1 eq.) de PyBOP y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 min. Al cabo de ese periodo, se introdujeron 8.88 g (0.044 mol, 1 eq.) de **(R)-PZQN** (inmediatamente obtenido a partir de **(R)-PZQN-DBLTA**, como lo indica la **Sección 10.2.16**) disueltos en 10 mL de DMF y permaneció en agitación a 25 °C durante 23 h. Un análisis por CCF (R_f 0.25; Sistema IV) mostró conversión completa de la materia prima y la formación de dos subproductos con R_f mayor y en menor proporción al producto de interés (aproximadamente 9:1). Se procedió a verter la mezcla de reacción en 1 L de agua con hielo, precipitó un sólido blanco (mezcla de reacción pH 5) y permaneció en agitación por 30 min. El sólido blanco se recuperó por filtración, se lavó con abundante agua hasta obtener pH 7 y se secó con vacío por 4 días. El sólido pesó 15.71 g (0.037 mol-90% crudo). Pf. 163-192 °C. Para aislar el compuesto de interés, 5 g de sólido se soportó en 7 g de gel de sílice y se realizó una cromatografía en columna en un equipo automatizado (Sepacore) bajo las siguientes condiciones: Se utilizó una columna de polietileno de 4 cm de diámetro y 15 cm de alto. Fase estacionaria: 90 g de gel de sílice (0.015-0.040 mm). Fase móvil: CHCl_3 :MeOH. Elución por gradiente [%MeOH]: 80 min (5%), 30 min (8%), 30 min (10%). Flujo: 5 mL/min. Longitud de onda del detector: 305 nm. Periodo de lavado: 5 min (100% cloroformo). Periodo de la separación: 2.3 h. Tamaño de las fracciones. 1-5 (60 mL), 6-44 (10 mL). Número de fracciones: 44. Fracciones con compuesto puro: 18-42. Peso del compuesto puro: 3.84 g (77%). Pf. 170-175 °C. IR (ATR-FT, cm^{-1}): 3468 (NH-Benz), 3103.09 y 3051.19 ($\text{C}_{\text{Ar-H}}$), 2929.25 y 2856.20 (H- C_{sat}), 1622.74 (C=O), 1493.29 (C=C), 1411.40 (CH_3). RMN ^1H (170 °C, 400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm): 2.75 (s, 3H, SCH_3), 2.78-2.84 (m, 1H, HC_7), 2.87-2.95 (m, 1H, HC_6), 2.98-3.05 (m, 1H, HC_7), 3.37-3.43 (m, 1H, HC_1), 3.94-3.99 (m, 1H, HC_3), 4.23-4.27 (m, 1H, HC_3), 4.42 (sa, 1H, HC_1), 4.53-4.56 (m, 1H, HC_6), 4.96-5.00 (m, 1H, $\text{HC}_{11\text{b}}$), 7.07 (s, 1H, PZQN_{Ar}), 7.21 (s, 3H, PZQN_{Ar}), 7.43 (s, 1H, Benz_{Ar}), 7.55 (s, 1H, Benz_{Ar}). RMN ^1H (26 °C, 400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm): 2.71 (s, 3H, SCH_3), 2.77-2.91 (m, 3H, $2\times\text{HC}_7$, HC_6), 3.17-3.34 (m, 1H, HC_1), 3.69-4.05 (m, 2H, $2\times\text{HC}_3$), 4.52-4.75 (m, 2H, HC_1 , HC_6), 4.90-5.07 (m, 1H, $\text{HC}_{11\text{b}}$), 6.60-7.66 (m, 4H, Ar), 12.91 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm): 13.8 (SCH_3), 28.2 (C_7), 38.3 (C_6), 45.5 (C_1), 49.7 (C_3), 54.0 ($\text{C}_{11\text{b}}$), 121.9, 125.0 (C_{11}), 125.4, 126.6 (C_{10}), 126.7, 127.1, 127.7 (C_9), 129.1 (C_8), 132.6, 133.4 ($\text{C}_{11\text{a}}$), 135.0 ($\text{C}_{7\text{a}}$), 154.9 (N=C-S), 164.0 (CO), 166.2 (C_4). EM (HPLC/MS-ESI $^+$, m/z): 427. EMAR (FAB $^+$, m/z)= 427.0993 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$, error=0.6 ppm).

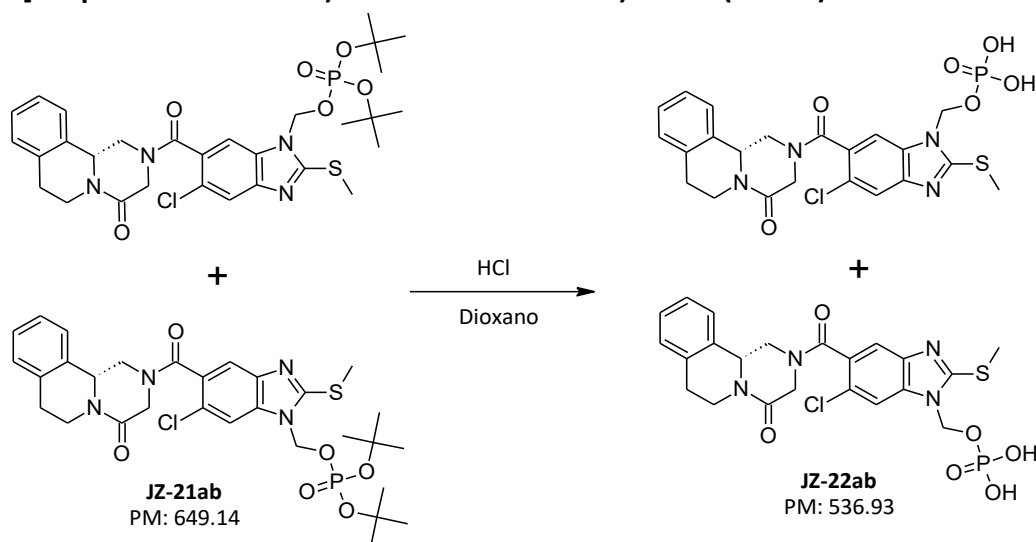
10.2.21. Fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21a) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (JZ-21b)



En un matraz de bola de 500 mL, acondicionado con baño de hielo y atmósfera de nitrógeno, se mezclaron 3.68 g (8.60×10^{-3} mol) de **(R)-PZQ-BZ** con 7.17 g (0.022 mol, 2.5 eq.) de Cs₂CO₃. Una vez que el sistema estaba acondicionado, se inyectaron 50 mL de DMF anhidra y la mezcla permaneció en agitación durante 30 min; se formó una suspensión blanca. Manteniendo el sistema cerrado, se introdujeron 6.90 g (0.027 mol, 3 eq.) de fosfato de di-*terc*-butilclorometilo (**20**) y se agitó por 10 min. Después se adicionó 2 mL de Et₃N (0.014 mol, 1.5 eq.). Con agitación constante a una temperatura entre 27-30 °C (baño de aceite) se dejó reaccionar durante 24 h. Se observó la formación de una suspensión amarilla. El análisis por CCF evidenció un progreso de la reacción aproximadamente del 98% y la formación de un subproducto menos polar (1%); en la CCF se observó una mancha abundante en la aplicación, esta disminuye después del tratamiento. Se procedió a tratar la reacción vertiendo la mezcla de reacción en 500 mL de agua con hielo (mezcla de reacción pH 10) y se agitó vigorosamente durante 30 min. Se formó una resina, se extrajo con 250 mL de CH₂Cl₂. Se recuperó la fase orgánica y se lavó con de agua (3 x 100 mL). La fase orgánica se secó y se concentró a sequedad. Se obtuvieron 8.91 g de crudo; un residuo oleoso color café (R_f 0.4 y 0.5; regioisómeros, Sistema IV). El producto se sometió directamente a la siguiente reacción y una pequeña fracción (3 g de crudo) se purificó por cromatografía en columna bajo las siguientes condiciones: fase estacionaria: gel de sílice 0.040-0.063 mm. Fase móvil: CHCl₃:MeOH (95:5). Flujo: columna abierta. Lavado: 200 mL. Tamaño de las fracciones: 10 mL. Fracciones colectadas: 19. Fracciones con compuesto puro: 9-10. Cantidad de compuesto puro: 0.280 mg. Pf. 88.4-88.8 °C. IR (ATR-FT, cm⁻¹): 3483.95 (C=O, sobretono), 2980.65 y 2933.37 (H-C_{sat}), 1644.67 (C=O), 1439.35 (CH₃), 1267.24 (P=O). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 1.22-1.43 (m, 36H, ^tBu), 2.76 (s, 6H, SCH₃), 2.80-2.97 (m, 6H, 2xHC₇, HC₆), 3.16-3.46 (m, 2H, HC₁), 3.63-4.09 (m, 4H, 2xHC₃), 4.52-4.73 (m, 4H, HC₆, HC₁), 4.97-5.03 (m, 2H, HC_{11b}), 5.94-5.97 (m, 4H, CH₂-OP), 6.60-7.97 (m, 12 H, Ar). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 14.4 (SCH₃), 28.1 (C₇), 29.3 ([(CH₃)₃CO]), 38.3 (C₆), 45.5 (C₁), 50.0 (C₃), 54.0 y 54.1 (C_{11b}), 68.4 (CH₂-OP), 82.87 y 82.94 ([(CH₃)₃CO]),

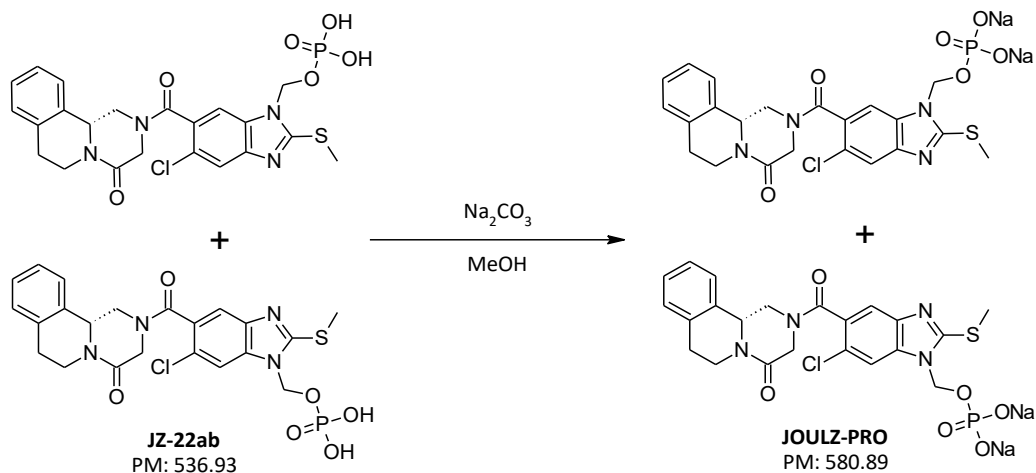
109.7, 110.0, 111.6, 116.6, 116.9, 118.1, 122.7, 124.6, 124.9, 125.3, 126.4, 126.7, 127.1, 129.0, 132.6, 133.3, 134.6, 135.0, 135.2, 136.7, 141.6, 144.0, 156.2, 162.3, 163.3, 165.8. RMN ³¹P (243 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): -10.39 (s), -10.55 (s). EM (HPLC/MS-ESI+, *m/z*): 649. EMAR (FAB+, *m/z*): 649.2024 ([M+H]⁺, C₃₀H₃₉ClN₄O₆PS, error=1.2 ppm).

10.2.22. Fosfato diácido de (11*bR*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (JZ-22a) y fosfato diácido de (11*bR*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (JZ-22b)



El producto crudo de la reacción anterior (8.60×10^{-3} mol) (**JZ-21ab**), se disolvió en un matraz de bola de 500 mL, acondicionado con baño de hielo en 50 mL de dioxano. Después se adicionaron 22 mL (8.60×10^{-2} mol, 10 eq.) de una solución comercial de HCl en dioxano 4 M. La mezcla se agitó vigorosamente durante 3 h. Se concentró el disolvente y se obtuvo una resina color amarillo/naranja. Se adicionaron 250 mL de agua con hielo y se dejó agitar durante 1 h (mezcla de reacción pH 1). Precipitó un sólido blanco que se recuperó vía filtración y se secó con vacío durante 4 días. El análisis por CCF mostró una ligera presencia del precursor (**R**)-PZQ-BZ. Lo anterior, no sucede si previamente se purifica **JZ-21ab** por cromatografía (**Sección 10.2.21**). El sólido pesó 3.40 g (6.33×10^{-3} mol, 74%). *R_f* 0. (Sistema IV). Pf. 248 °C con descomposición. IR (ATR-FT, cm⁻¹): 3320.14 (OH, agua), 3031.31 (H-C_{Ar}), 2925.43 (H-C_{sat}), 2725-2525 (amplia, OP-OH), 1625.80 (C=O), 1420.07 (CH₃), 1239.88 (P=O). RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 2.73 (s, 6H, SCH₃), 2.78-2.90 (m, 6H, 2xHC₇, HC₆), 3.17-3.38 (m, 2H, HC₁), 3.68-4.04 (m, 4H, 2xHC₃), 4.49-4.73 (m, 4H, HC₆, HC₁), 5.01-5.08 (m, 2H, HC_{11b}), 5.84 (s, 4H, CH₂-OP), 6.63-7.81 (m, 12 H, Ar). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 14.8 (SCH₃), 28.6 (C₇), 38.9 (C₆), 45.2 y 46.1 (C₁), 49.6 y 50.2 (C₃), 54.5 y 54.8 (C_{11b}), 66.9 y 68.4 (CH₂-OP), 110.1, 112.0, 117.0, 117.3, 118.6, 123.3, 123.5, 125.3, 125.6, 125.9, 127.2, 127.7, 128.6, 129.3, 129.6, 133.1, 133.9, 135.2, 135.5, 137.3, 142.4, 144.5, 164.0, 164.5, 166.5, 166.7. RMN ³¹P (243 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm): -1.75 (s amplio). EM (FAB+, *m/z*)= 536 [M⁺]. EM (HPLC/MS-ESI+, *m/z*): 537. EMAR (FAB+, *m/z*)= 537.0774 ([M+H]⁺, C₂₂H₂₃ClN₄O₆PS, error=1.8 ppm). EM (HPLC/MS-ESI+, *m/z*): 537.

10.2.23. Fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (JOUZ-PRO)



En un matraz de bola de 500 mL, acondicionado con baño de hielo y atmósfera de nitrógeno, se mezclaron 3.40 g (6.34×10^{-3} mol) del fosfato ácido **JZ-22ab** con 1.40 g (0.013 mol, 2 eq.) de Na_2CO_3 anhidro. Posteriormente, se introdujeron 15 mL de MeOH anhidro (5 mL/g de **JZ-22ab**) y la suspensión permaneció en agitación durante 2 h. Después se filtró al vacío para retirar el exceso de carbonato de sodio. A la solución resultante se le eliminó completamente el disolvente. Se obtuvo un sólido amarillo claro que pesó 3.63 g. En el análisis por CCF (Sistema IV) presentó un R_f de 0; sin embargo, todavía se observaron trazas de (**R**)-**PZQ-BZ**. Para aislar la sal de las impurezas orgánicas, el sólido se disolvió en 50 mL de agua desionizada (se observó pH 10) y se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 20 mL). La fase acuosa se concentró a sequedad y se obtuvo un sólido cristalino amarillo pálido que pesó 3.11 g. Este se lavó con una mezcla Hexano: CH_2Cl_2 (8:2) hasta observar la formación de un sólido con tamaño de partícula fina (4 h); el cual se recuperó por filtración. Se obtuvieron 3.27 g (5.64×10^{-3} mol, 88.9%) de un sólido beige (**JOULZ-PRO**). Pf. 305 °C con descomposición. IR (ATR-FT, cm^{-1}): 3236.13 (OH, agua de cristalización), 2924.46 (H- C_{sat}), 1626.70 (C=O), 1420.26 (CH_3), 1291.11 (P=O), 1106.55 (ROPO_3^{2-}). RMN ^1H (600 MHz, D_2O , δ en ppm): 2.69-2.75 (m, 6H, SCH_3), 2.79-3.04 (m, 6H, $2 \times \text{HC}_7$, HC_6), 3.14-3.43 (m, 2H, HC_1), 3.86-4.20 (m, 4H, $2 \times \text{HC}_3$), 4.42-4.72 (m, 4H, HC_6 , HC_1), 4.93-5.08 (m, 2H, HC_{11b}), 5.69-5.81 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 6.57-7.94 (m, 12 H, Ar). RMN ^{13}C (150 MHz, D_2O , δ en ppm): 14.2 (SCH_3), 27.8 (C_7), 39.9 (C_6), 45.7 (C_1), 49.4 y 50.0 (C_3), 54.8 y 55.2 (C_{11b}), 68.2 ($\text{CH}_2\text{-OP}$), 123.4, 123.6, 125.0, 125.3, 126.6, 126.7, 126.9, 127.0, 127.15, 127.26, 127.4, 127.5, 127.6, 127.8, 129.1, 131.2, 132.1, 134.6, 135.2, 137.2, 141.2, 144.0, 158.0, 158.6, 166.5, 166.8, 169.2, 169.4. RMN ^{31}P (243 MHz, D_2O , δ en ppm): 1.88 (s), 2.12 (s). EM (FAB $^+$, m/z)= 581 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 603 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$. EMAR (FAB $^+$, m/z)= 581.0403 ([$\text{M}+\text{H}$] $^+$, $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{PSNa}_2$, error=0.4 ppm).

10.3. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA DE (R)-PZQ-BZ Y JOULZ-PRO

10.3.1. Preparación de las soluciones amortiguadoras

Se utilizaron dos soluciones amortiguadoras (SA) para los ensayos de solubilidad: Fosfatos pH 7.4, 0.05 M (SAF) y Boratos pH 9, 0.05 M (SAB).

Para la SAF se pesaron 2.6632 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 4.2588 g de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) y se llevó al aforo de 1 L con agua desionizada.

Para la SAB se pesaron 3.0940 g de H_3BO_3 , se adicionó 194 mL de una solución de NaOH 0.1 N y se llevó a la marca de aforo de 1 L con agua desionizada.

Una vez preparadas las SA se filtraron con una membrana de nylon de 0.45 μm . Después se ajustó el pH a 7.4 y 9.0, según corresponda, con HCl 1N o NaOH 1N.

10.3.2. Ensayo de solubilidad cinética de JOULZ-PRO

Para conocer la cantidad de profármaco **JOULZ-PRO** necesaria para obtener una disolución sobresaturada en agua, se realizó un estudio de solubilidad cinética. Este consistió en colocar 500 μL de SA en un tubo de microcentrífuga e ir adicionando por etapas una cantidad conocida de compuesto. De tal manera, fue posible identificar en qué momento se alcanzaba la saturación (aparición de precipitado/formación de suspensión). La **Tabla 10.2** muestra la cantidad adicionada en cada etapa; después de cada adición se agitó con un agitador Vortex durante 3 min para homogenizar.

Tabla 10.2. Estudio de solubilidad cinética de **JOULZ-PRO**

Etapa	SAF (mg)	SAB (mg)
1	9.5	59.2
2	9.7	17.6 ^a
3	10.4	27.1
4	13.6	16.0 ^b
5	12.5 ^a	
6	15.9	
7	18.9	
8	13.3 ^b	

^aSe observó turbidez (suspensión). Considerado como el punto de saturación.

^bSe observó la formación de un gel.

10.3.3. Curva patrón del precursor (R)-PZQ-BZ

Por triplicado y para cada SA, se pesaron alrededor de 5 mg de (R)-PZQ-BZ y se disolvieron en 15 mL de MeOH, después se llevó al aforo con SA (Solución A [200 µg/mL]). Enseguida, de la Solución A se realizó una dilución 5/100 (Solución B [10 µg/mL]). La Solución B se utilizó para medir las alícuotas y preparar las diluciones que se muestran en la Tabla 10.3. Se midió la absorbencia a una longitud de onda (λ) de 305 nm (Tabla 10.4 y Tabla 10.5).

Tabla 10.3. Preparación de la curva patrón de (R)-PZQ-BZ

Concentración [µg/mL]	Alícuota/Aforo [mL]
1.0	1.0/10
2.5	2.5/10
5.0	5.0/10
7.5	7.5/10
10.0	10.0/10

Tabla 10.4. Curva patrón de (R)-PZQ-BZ en SAF

Pesado [mg]			Concentración experimental [µg/mL]				Abs ($\lambda=305$ nm)			
1	2	3	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
5.3	5.3	5.0								
Concentración nominal [µg/mL]										
0.0			0.0	0.0	0.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000
1.0			1.1	1.1	1.0	1.0	0.043	0.034	0.036	0.038
2.5			2.7	2.7	2.5	2.6	0.098	0.086	0.077	0.087
5.0			5.3	5.3	5.0	5.2	0.177	0.178	0.165	0.173
7.5			8.0	8.0	7.5	7.8	0.273	0.267	0.239	0.260
10.0			10.6	10.6	10.0	10.4	0.365	0.354	0.319	0.346
Pendiente							0.034	0.034	0.032	0.033
ordenada							0.003	-0.001	0.001	0.001
r²							0.9991	0.9999	0.9994	0.9995

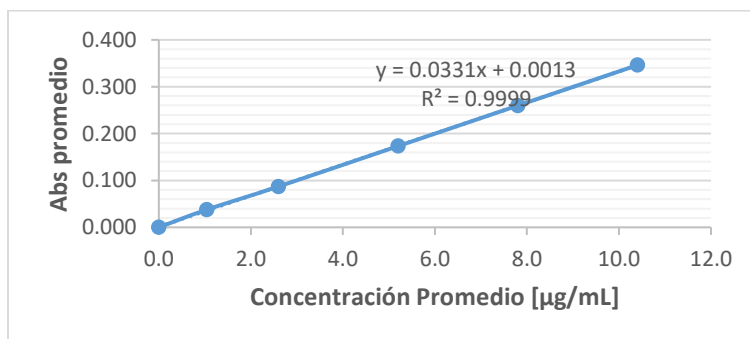


Gráfico 10.1. Curva patrón de (R)-PZQ-BZ en SAF.

Tabla 10.5. Curva patrón de (R)-PZQ-BZ en SAB

Pesado [mg]			Concentración experimental [µg/mL]				Abs (λ=305 nm)			
1	2	3	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
5.2	5.1	5.0								
Concentración nominal [µg/mL]			Concentración experimental [µg/mL]				Abs (λ=305 nm)			
0.0			0.0	0.0	0.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000
1.0			1.0	1.0	1.0	1.0	0.027	0.026	0.019	0.024
2.5			2.6	2.6	2.5	2.6	0.076	0.079	0.068	0.074
5.0			5.2	5.1	5.0	5.1	0.154	0.164	0.149	0.156
7.5			7.8	7.7	7.5	7.7	0.240	0.252	0.221	0.238
10.0			10.4	10.2	10.0	10.2	0.324	0.337	0.317	0.326
Pendiente							0.031	0.033	0.032	0.032
ordenada							-0.004	-0.005	-0.009	-0.006
r²							0.9994	0.9995	0.9969	0.9986

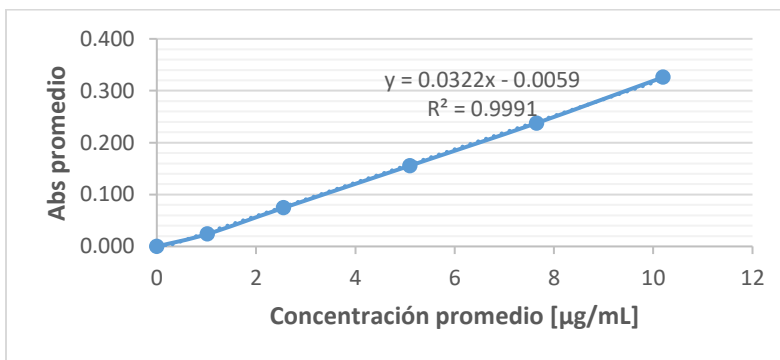


Gráfico 10.2. Curva patrón de (R)-PZQ-BZ en SAB.

10.3.4. Curva patrón del profármaco JOULZ-PRO

Por triplicado y para cada una de las soluciones amortiguadoras, se pesaron alrededor de 10 mg de **JOULZ-PRO**, se disolvieron con 5 mL de SA y se llevó a la marca de aforo de 10 mL (**Solución A** [1000 µg/mL]). De la **Solución A** se realizaron las diluciones que se muestran en la **Tabla 10.6**. Se midió la absorbencia a 303.5 nm (**Tabla 10.7** y **Tabla 10.8**).

Tabla 10.6. Preparación de la curva patrón de **JOULZ-PRO**

Concentración [µg/mL]	Alícuota[µL]/Aforo [mL]
5	50/10
10	100/10
20	200/10
30	300/10
40	400/10

Tabla 10.7. Curva patrón de **JOULZ-PRO** en SAF

Pesado [mg]			Concentración experimental [µg/mL]				Abs (λ=303.5 nm)			
1	2	3								
10.1	10.2	10.3								
Concentración nominal [µg/mL]			1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
0.0			0.0	0.0	0.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000
5.0			5.1	5.1	5.2	5.1	0.100	0.108	0.103	0.104
10.0			10.1	10.2	10.3	10.2	0.233	0.221	0.209	0.221
20.0			20.2	20.4	20.6	20.4	0.425	0.450	0.412	0.429
30.0			30.3	30.6	30.9	30.6	0.569	0.631	0.605	0.602
40.0			40.4	40.8	41.2	40.8	0.770	0.861	0.779	0.803
			Pendiente				0.019	0.021	0.019	0.020
			ordenada				0.018	0.005	0.008	0.010
			r²				0.9947	0.9989	0.9989	0.9975

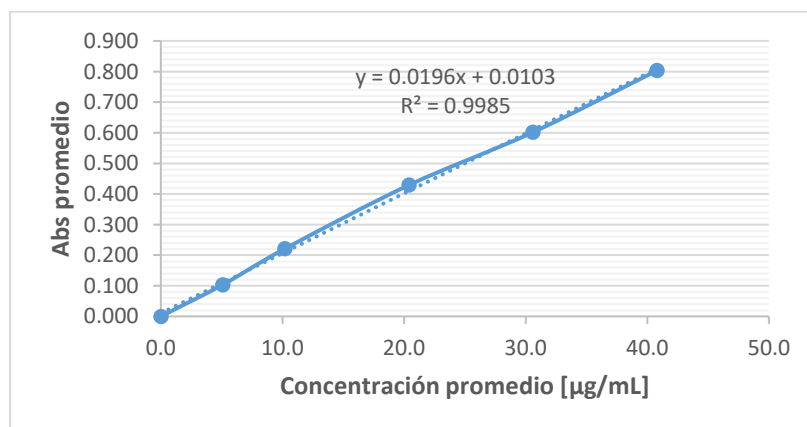


Gráfico 10.3. Curva patrón de **JOULZ-PRO** en SAF.

Tabla 10.8. Curva patrón de JOULZ-PRO en SAB

Pesado [mg]			Concentración experimental [µg/mL]				Abs (λ=303.5 nm)				
1	2	3	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio	
10.2	10.1	10									
Concentración. nominal [µg/mL]											
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	
5.0	5.1	5.1	5.0	5.1	5.0	5.1	0.108	0.098	0.099	0.102	
10.0	10.2	10.1	10.0	10.2	10.0	10.1	0.230	0.204	0.207	0.214	
20.0	20.4	20.2	20.0	20.4	20.0	20.2	0.449	0.389	0.414	0.417	
30.0	30.6	30.3	30.0	30.6	30.0	30.3	0.659	0.594	0.597	0.617	
40.0	40.8	40.4	40.0	40.8	40.0	40.4	0.853	0.801	0.790	0.815	
							Pendiente	0.021	0.020	0.020	0.020
							ordenada	0.008	-0.001	0.005	0.004
							r²	0.9990	0.9997	0.9994	0.9994

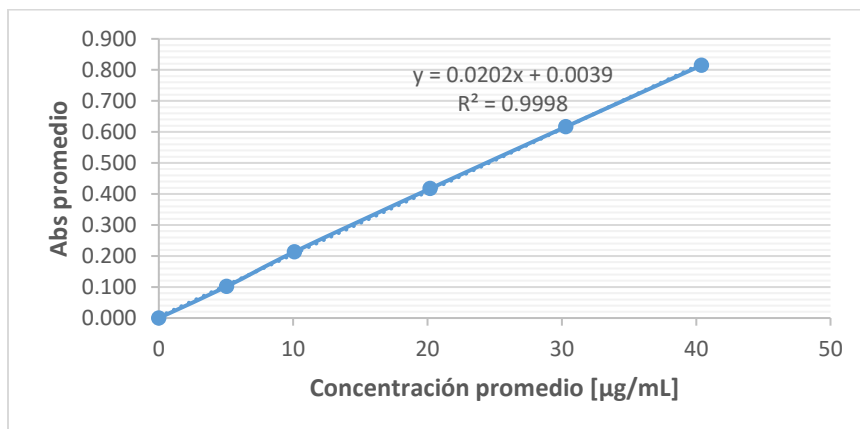


Gráfico 10.4. Curva patrón de JOULZ-PRO en SAB.

10.3.5. Determinación de la solubilidad termodinámica por el método de Shake Flask

Para el precursor (**R**)-PZQ-BZ se pesó por triplicado 10 mg y se colocaron en un vial de 20 mL con tapa (2 cm de diámetro), posteriormente se adicionaron 10 mL de SAF. De igual manera, también por triplicado se pesaron 15 mg de (**R**)-PZQ-BZ y se adicionaron 10 mL de SAB.

Por otro lado, una vez conocida la cantidad de JOULZ-PRO necesaria para alcanzar la saturación en cada SA (solubilidad cinética, Sección 10.3.2), se pesaron por triplicado 70 mg de profármaco y se colocaron en un vial de 5 mL con tapa (1.5 cm de diámetro), después se adicionó 500 µL de SAF. Se realizó el mismo procedimiento para la SAB; sin embargo, la cantidad de JOULZ-PRO que se pesó fue de 100 mg.

Después de preparar las muestras, los viales de 2 mL se introdujeron en un matraz Erlenmeyer con tapa de 250 mL y se rellenó el matraz con algodón con la finalidad de mantenerlos en una

posición vertical fija; análogamente, se adaptaron los viales de 20 mL. Después los matraces se colocaron en la incubadora *Shaker* y se agitaron a 300 rpm a una temperatura de 25 °C durante 24 h.

Al cabo del tiempo de agitación, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Del sobrenadante de las muestras de (*R*)-PZQ-BZ se realizó una dilución 1/25 y se midió la absorbencia en el espectrofotómetro a 305 nm (Tabla 10.9). En lo que respecta a las muestras de JOULZ-PRO se realizó una serie de diluciones; (1) 0.1/25, (2) 0.5/25 y se midió la absorbencia a 303.5 nm (Tabla 10.10).

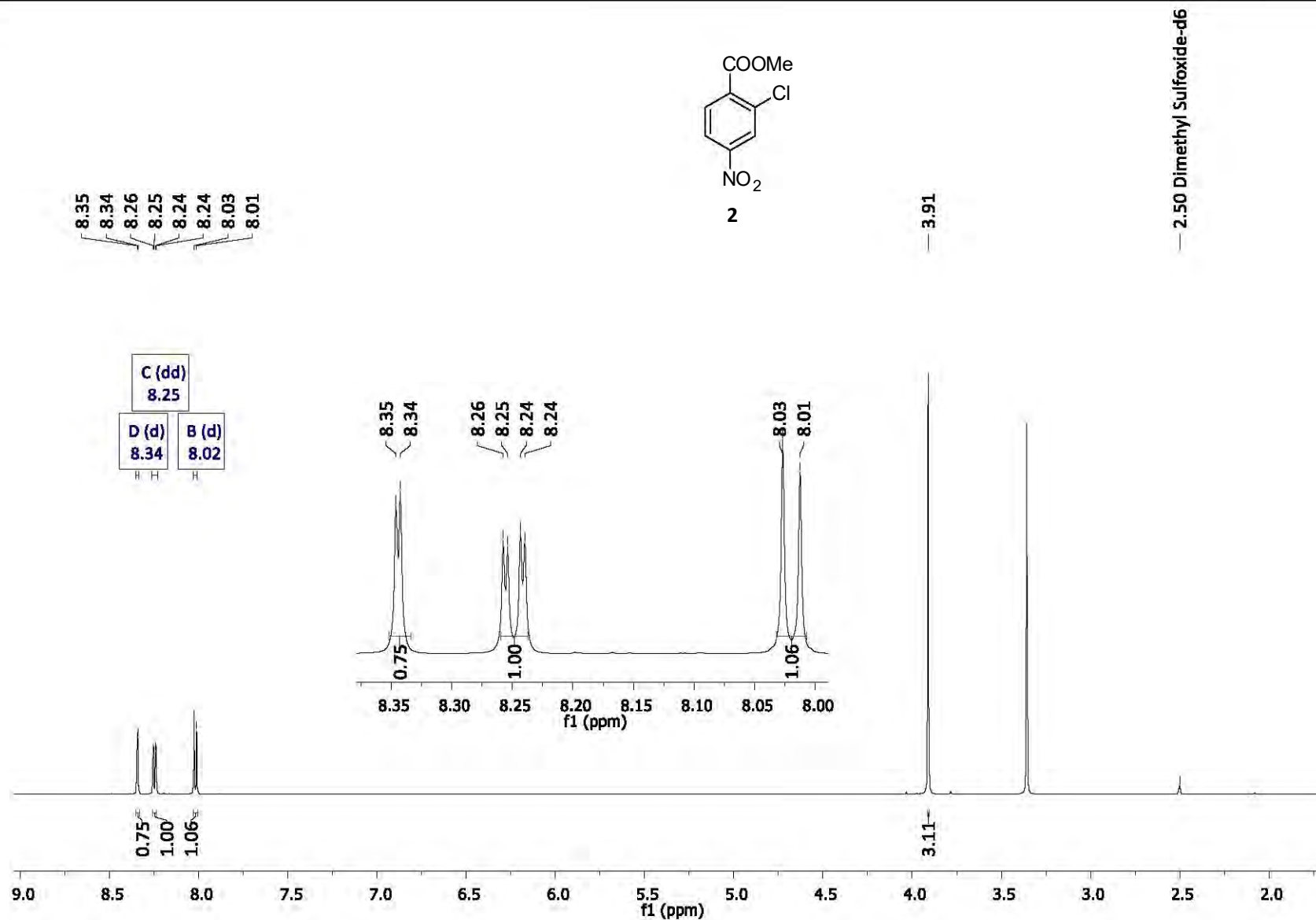
Tabla 10.9. Solubilidad termodinámica de (*R*)-PZQ-BZ

Muestra	Fosfatos pH 7.4, 0.05 M			Boratos pH 9.0, 0.05 M		
	Abs $\lambda=305$ nm	[$\mu\text{g/mL}$]	Solubilidad (mg/mL)	Abs $\lambda=305$ nm	[$\mu\text{g/mL}$]	Solubilidad (mg/mL)
1	0.131	97.9	0.0979	0.164	132.0	0.1320
2	0.132	98.7	0.0987	0.174	139.8	0.1398
3	0.128	95.7	0.0957	0.173	139.0	0.1390
		Promedio	0.0974		Promedio	0.1370
		DE	0.0016		DE	0.0043
		CV%	1.61		CV%	3.13

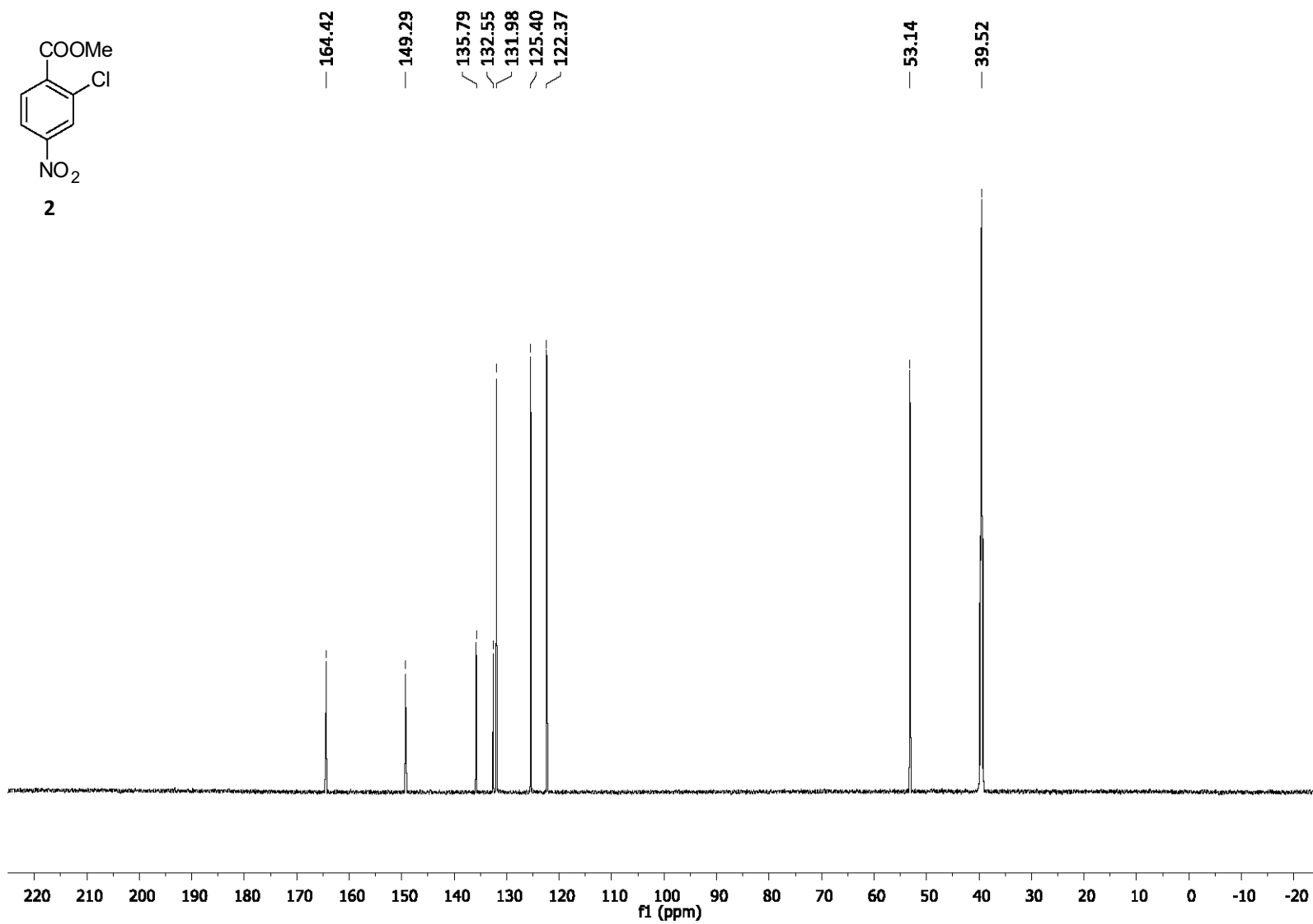
Tabla 10.10. Solubilidad termodinámica de JOULZ-PRO

Muestra	Fosfatos pH 7.4, 0.05 M			Boratos pH 9.0, 0.05 M		
	Abs $\lambda=303.5$ nm	[$\mu\text{g/mL}$]	Solubilidad (mg/mL)	Abs $\lambda=303.5$ nm	[$\mu\text{g/mL}$]	Solubilidad (mg/mL)
1	0.228	138998.7	139.0	0.269	164202.3	164.2
2	0.227	138360.2	138.4	0.281	171635.4	171.6
3	0.221	134529.4	134.5	0.282	172254.8	172.3
		Promedio	137.3		Promedio	169.4
		DE	2.4172		DE	4.4810
		CV%	1.76		CV%	2.65

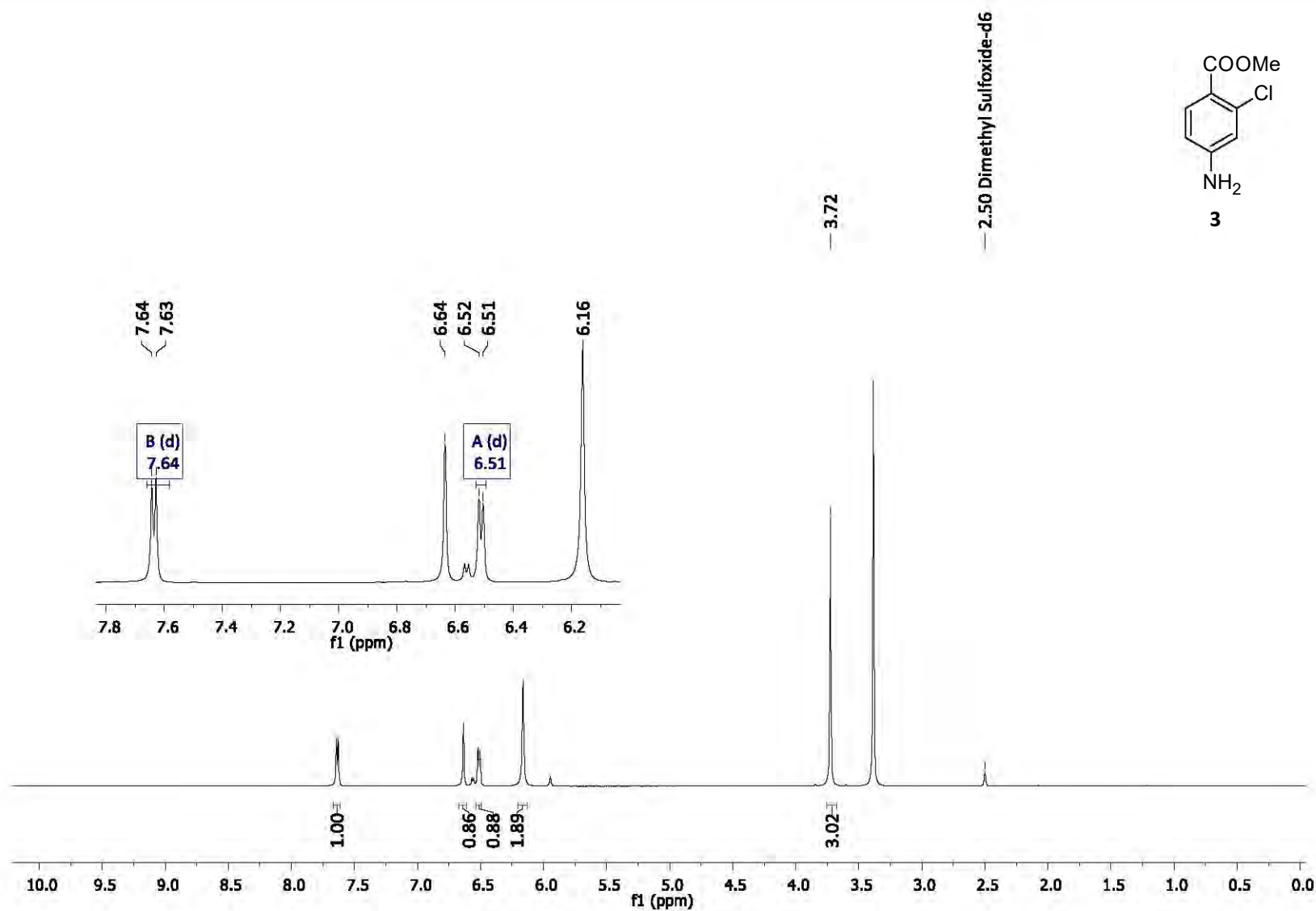
11. APÉNDICE B. ESPECTROS



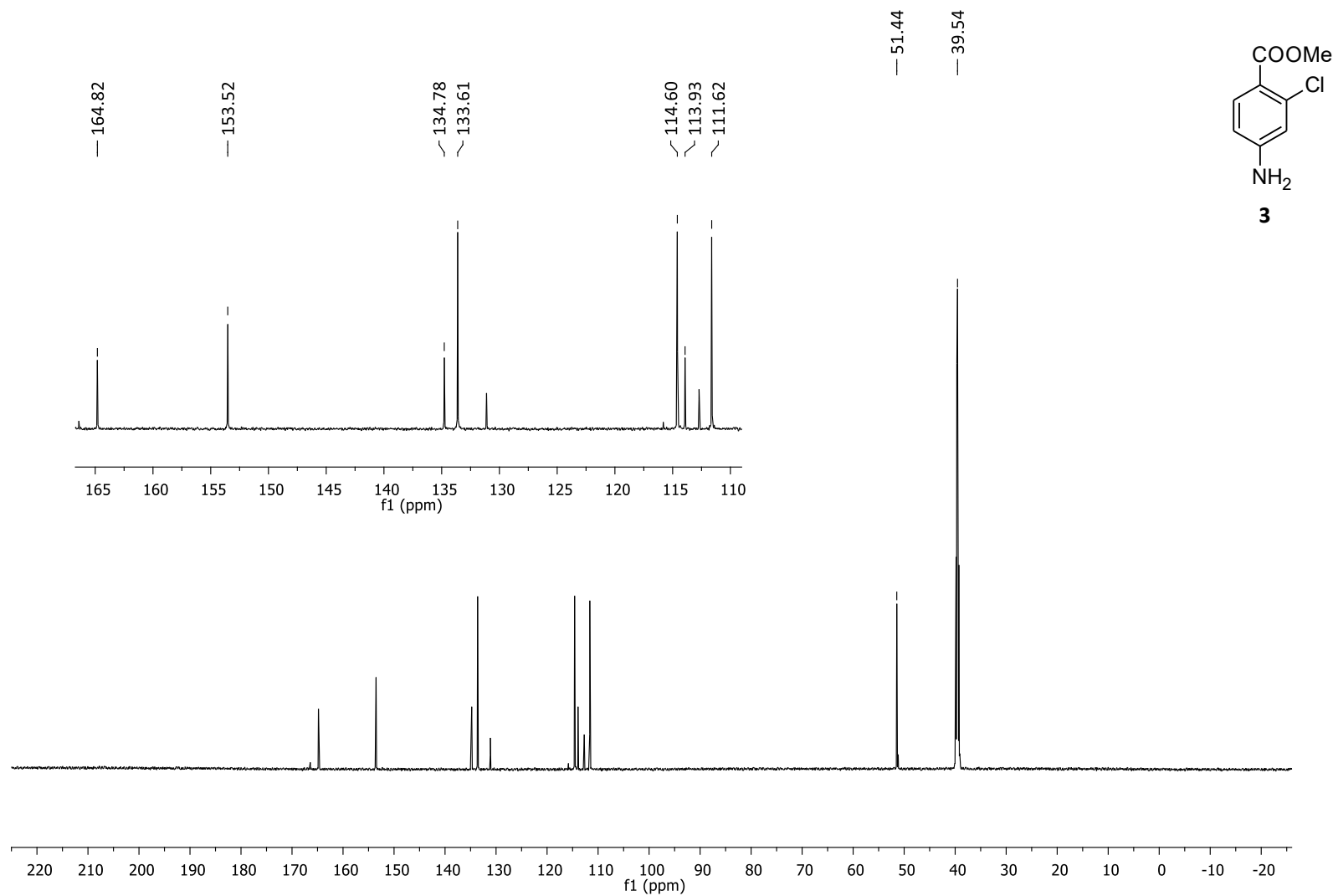
Espectro 11.1. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)



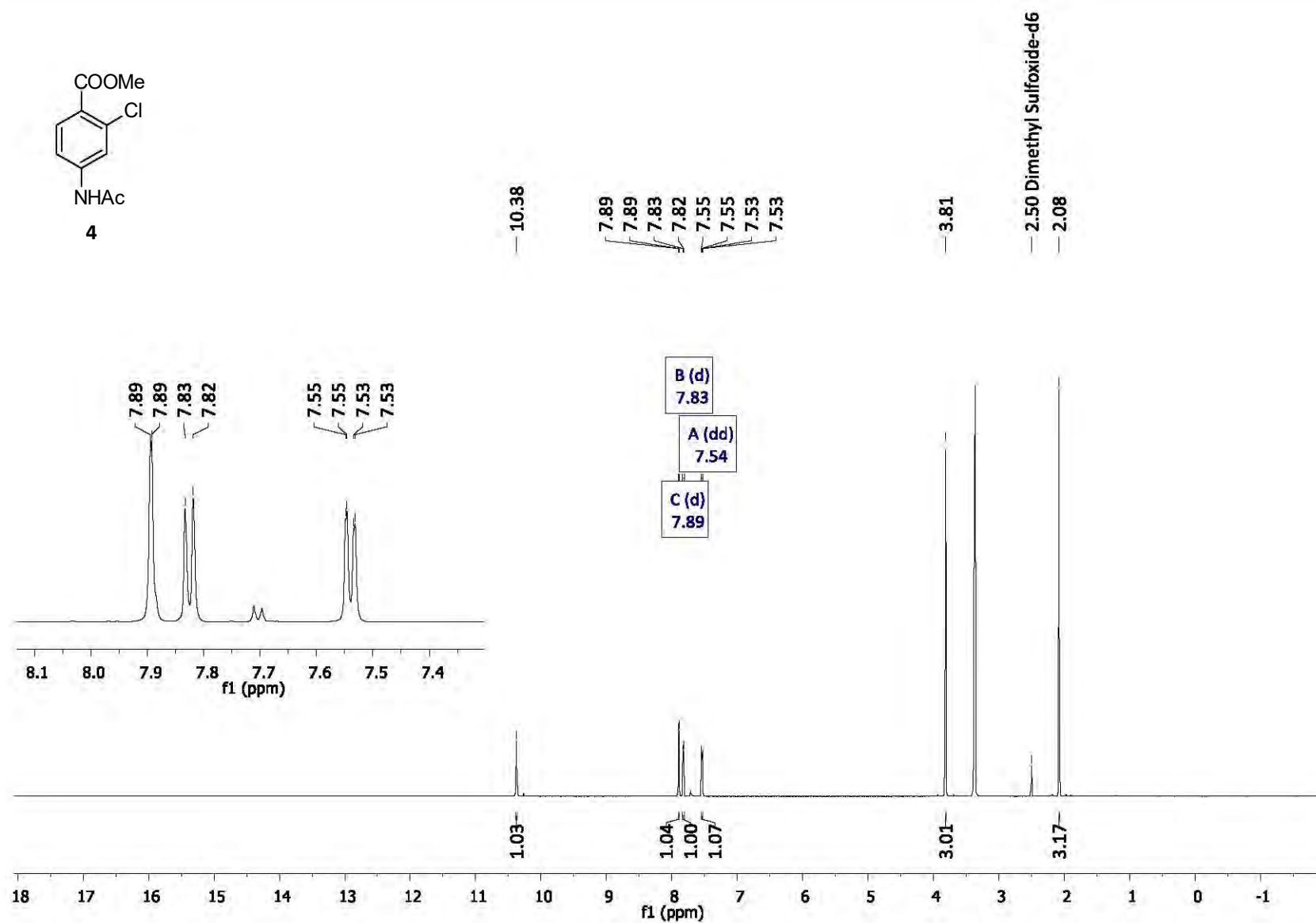
Espectro 11.2. RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**)



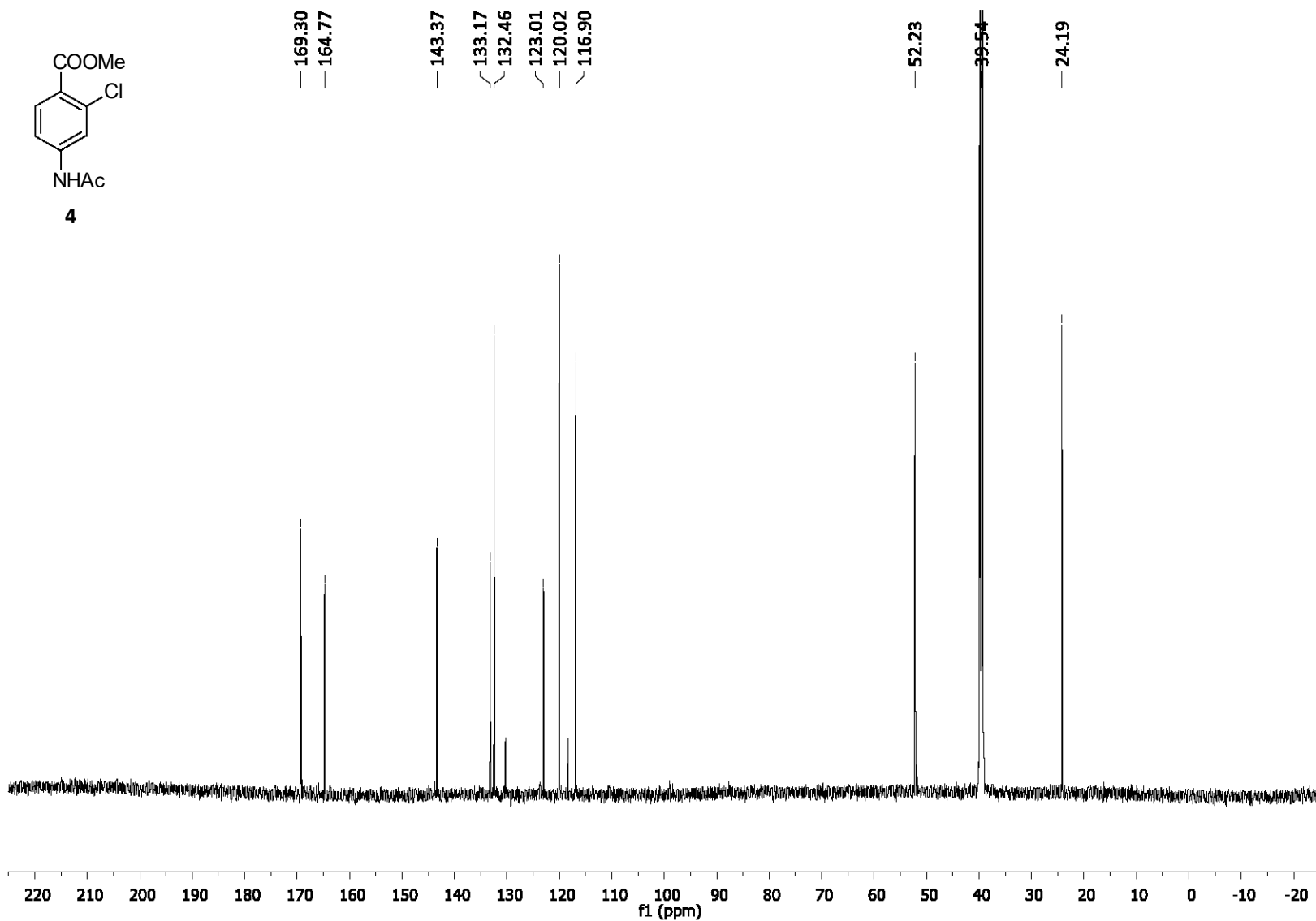
Espectro 11.3. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3)



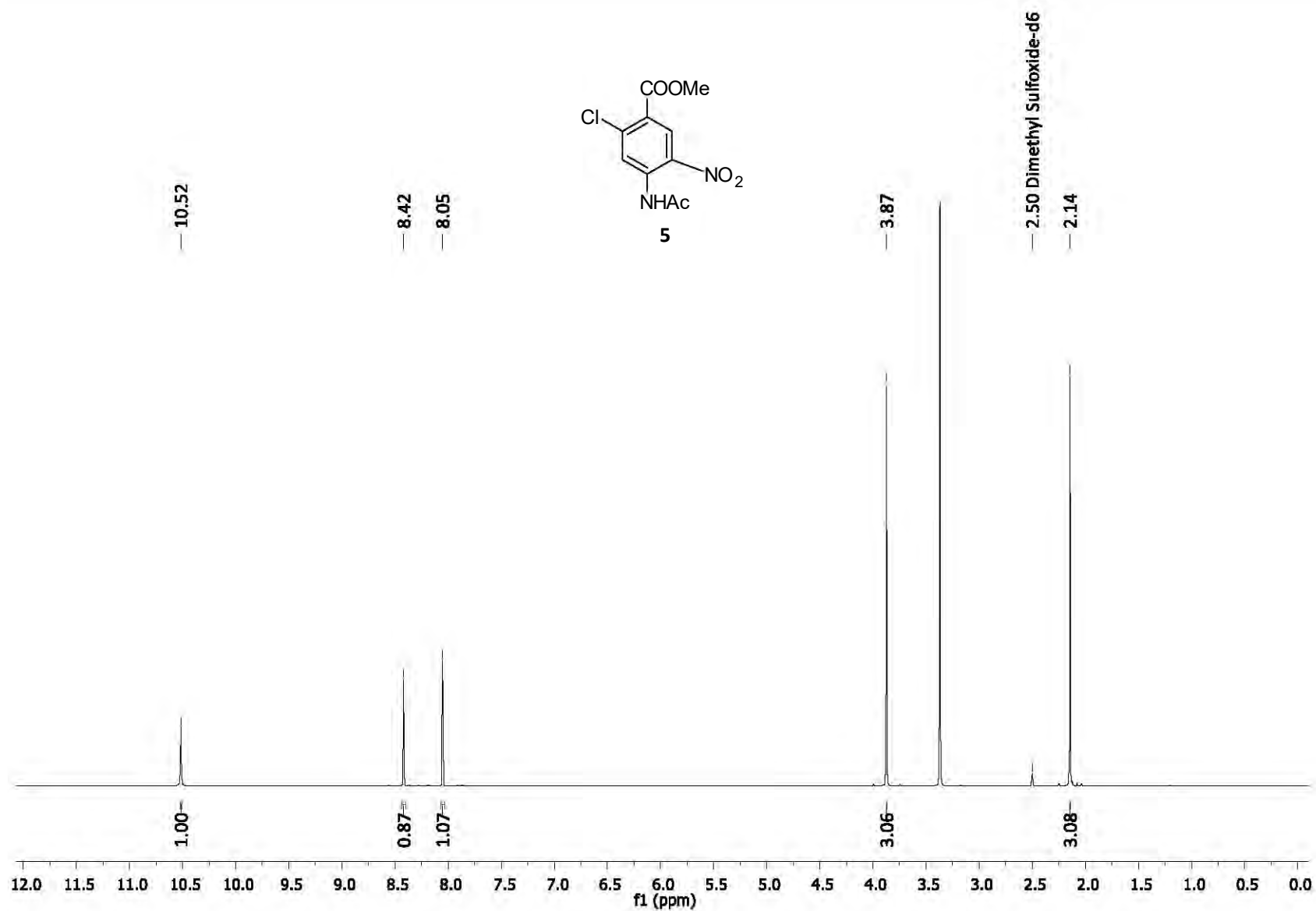
Espectro 11.4. RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm) del compuesto 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**)



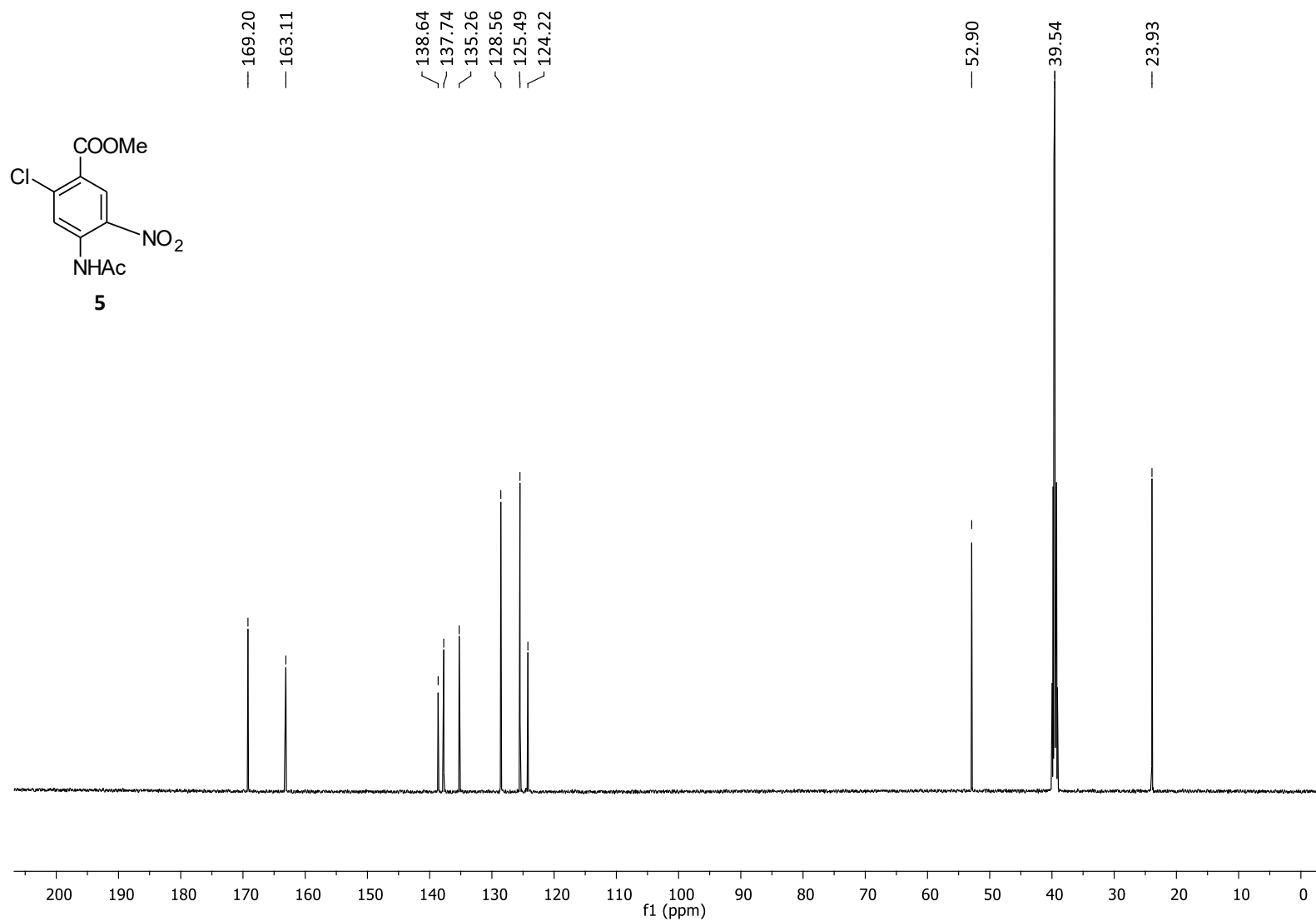
Espectro 11.5. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) de compuesto 4-acetilamino-2-clorobenzoato de metilo (**4**)



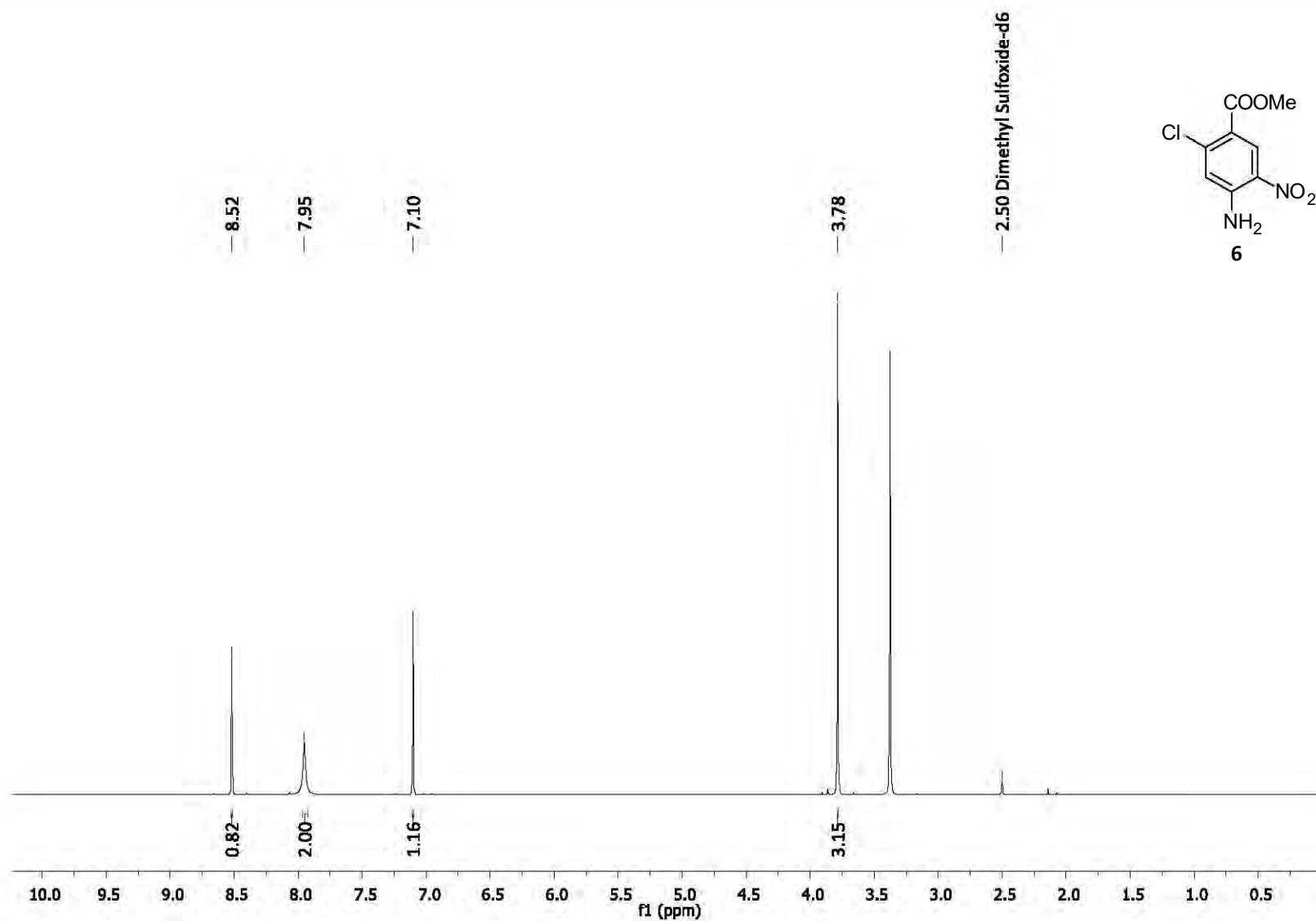
Espectro 11.6. RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto 4-acetilamino-2-clorobenzoato de metilo (4)



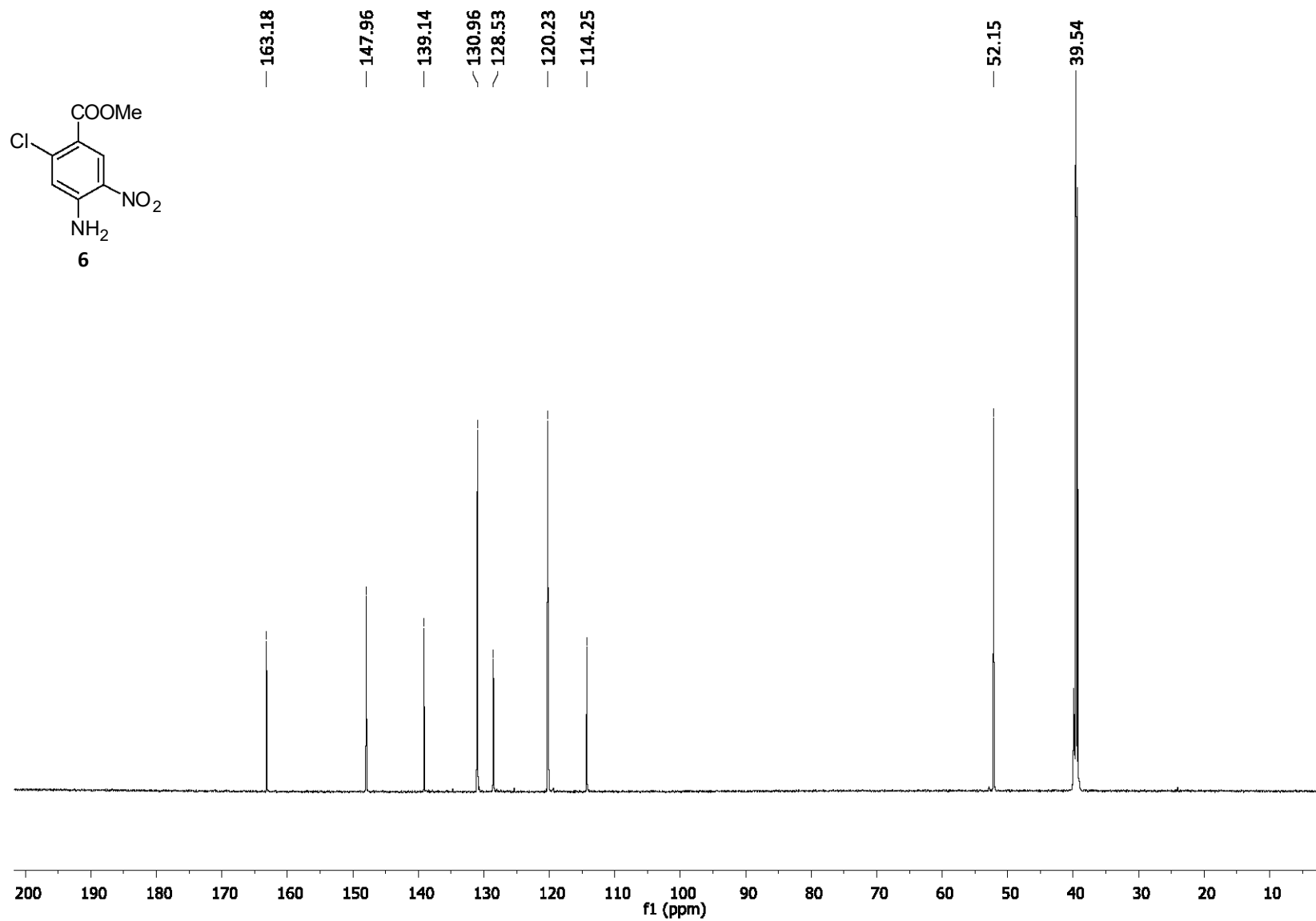
Espectro 11.7. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) de compuesto 4-acetilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)



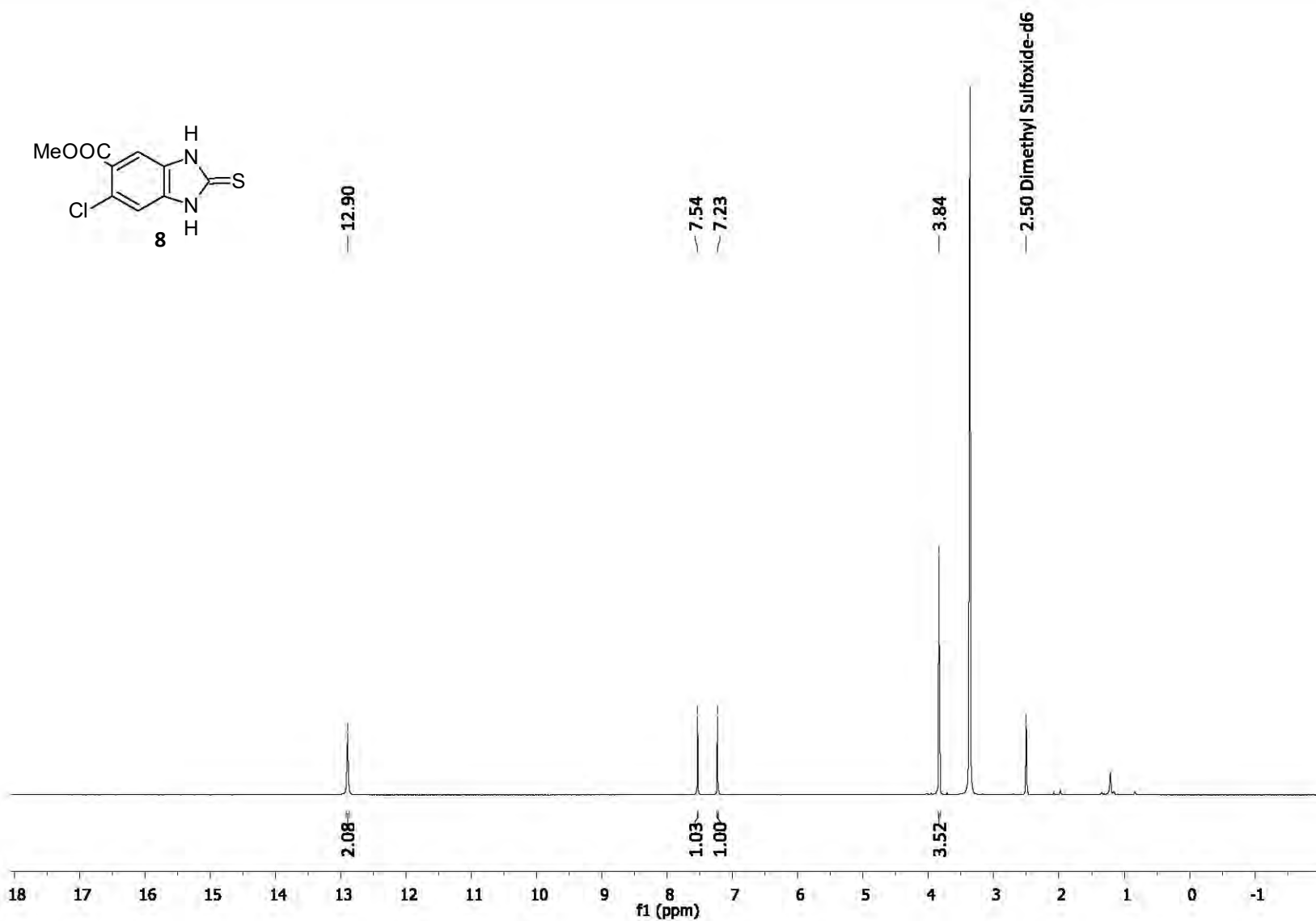
Espectro 11.8. RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto 4-acetilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**)



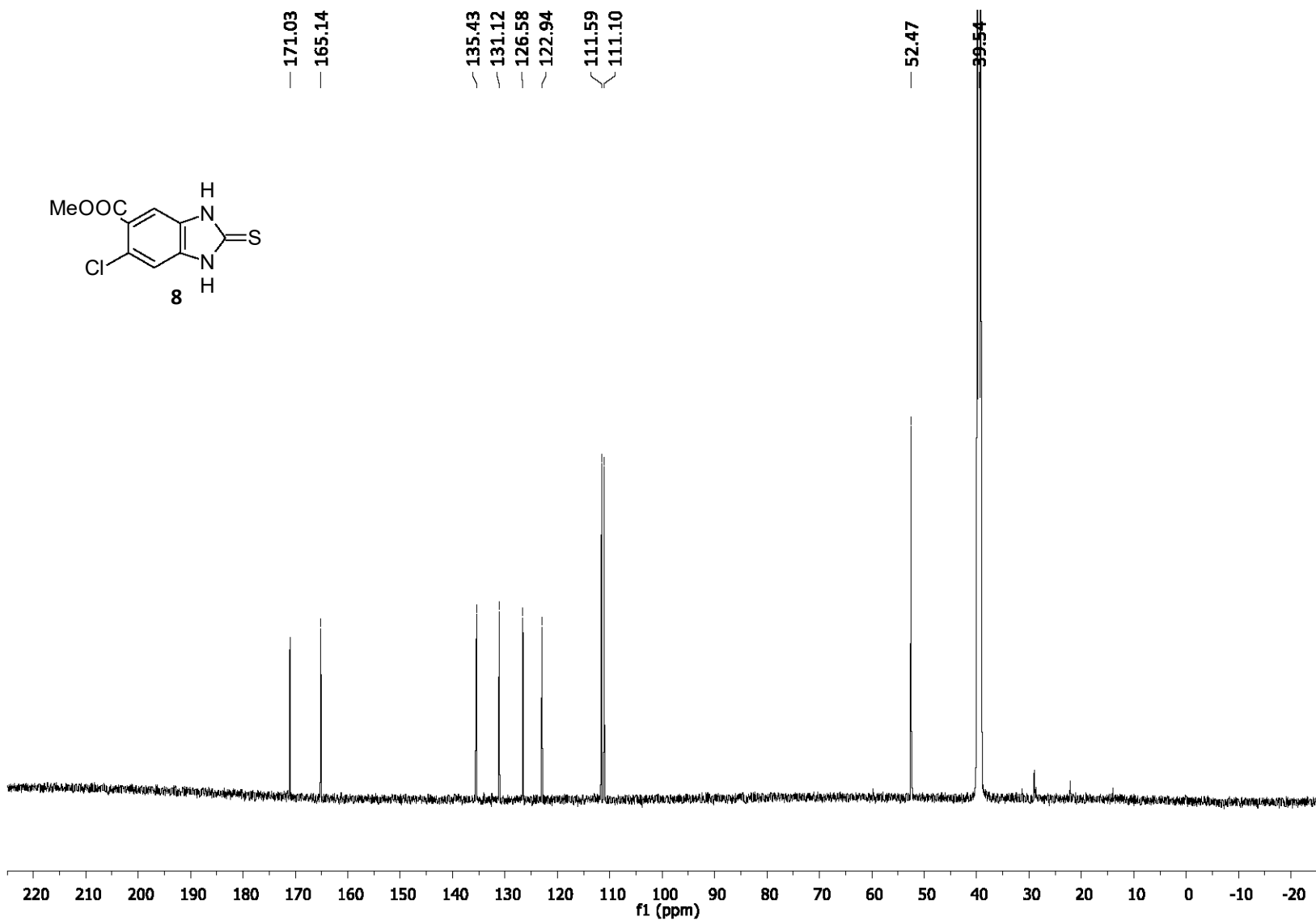
Espectro 11.9. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) de compuesto 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**)



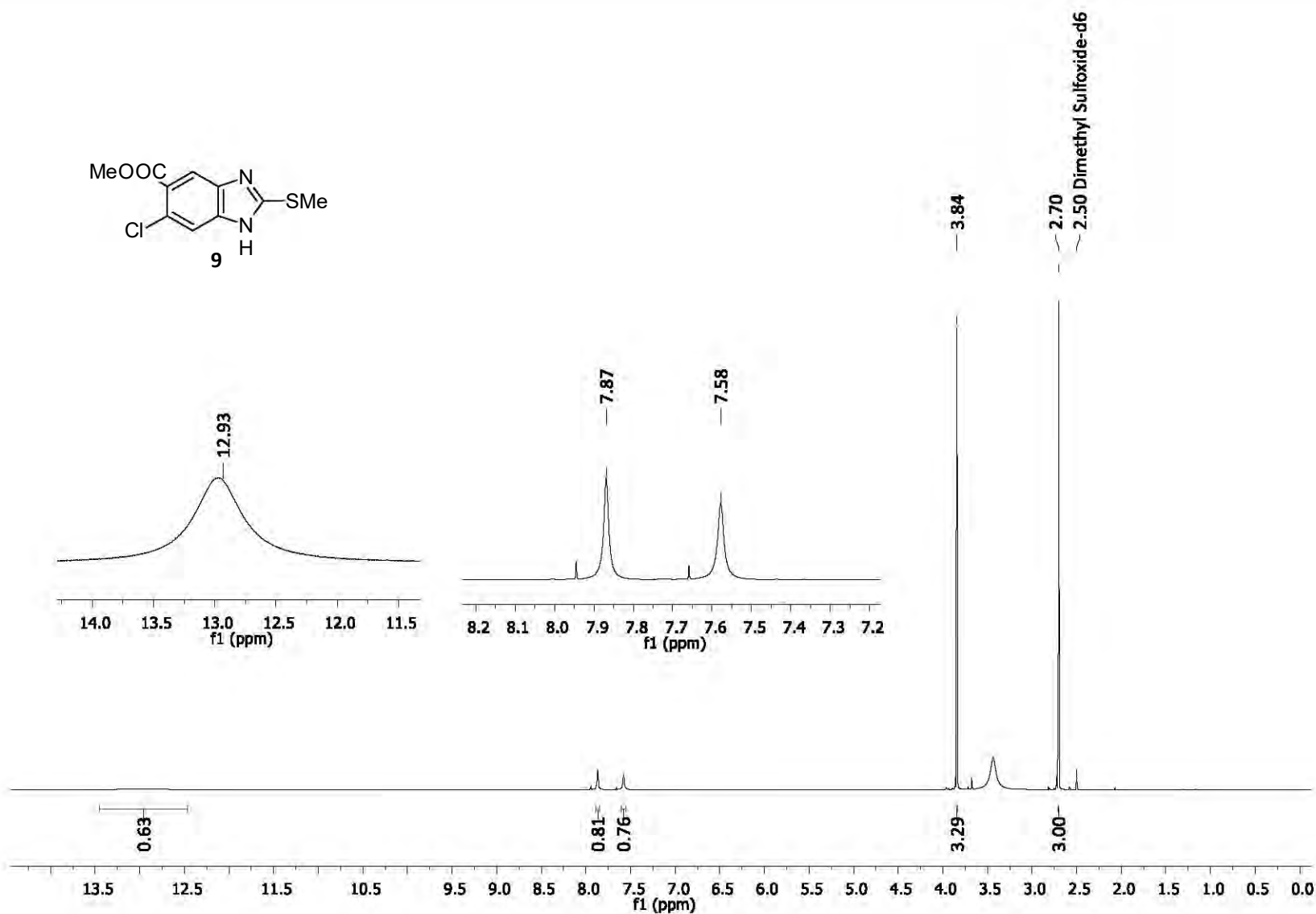
Espectro 11.10. RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**)



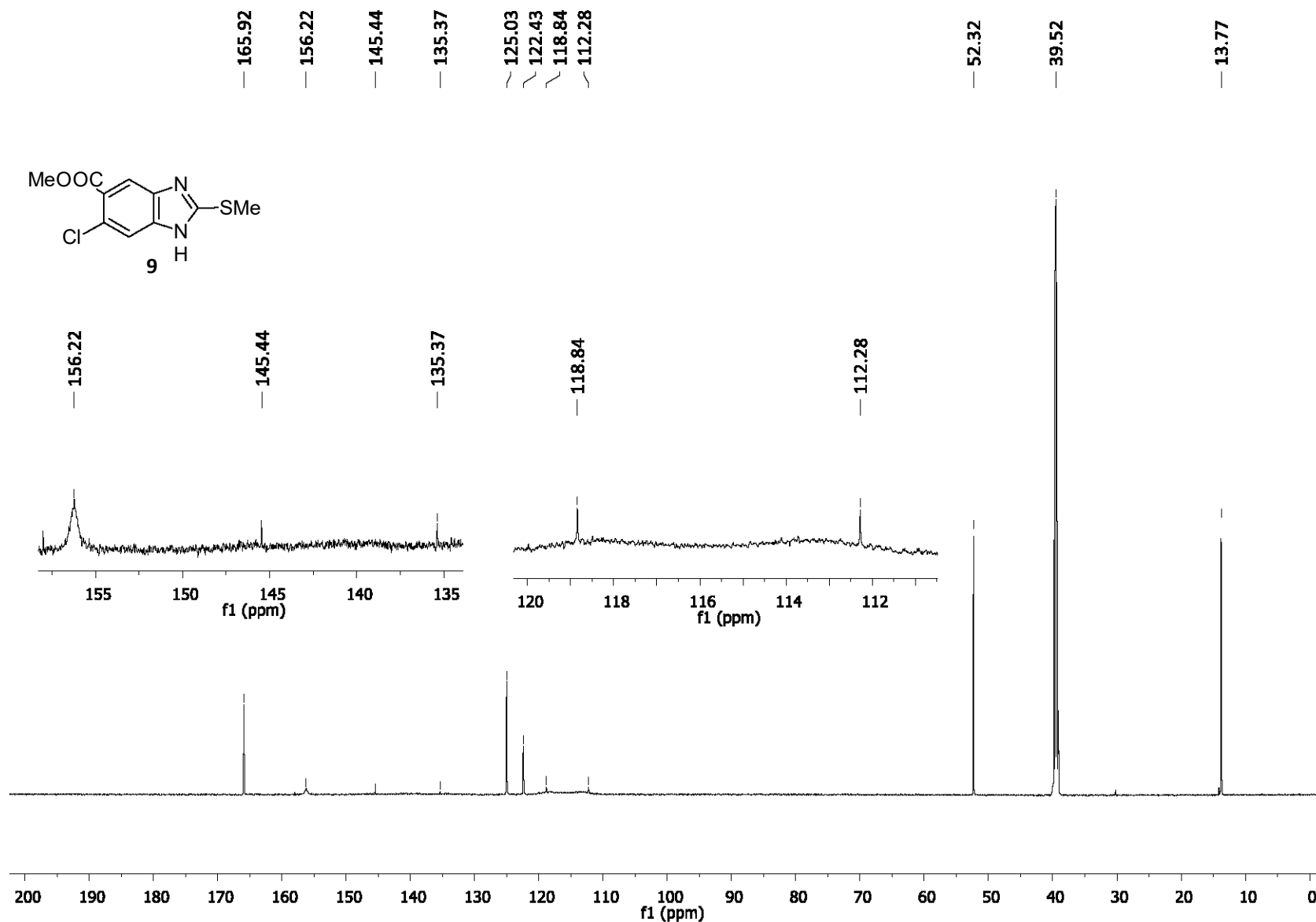
Espectro 11.11. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) de compuesto 6-cloro-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**)



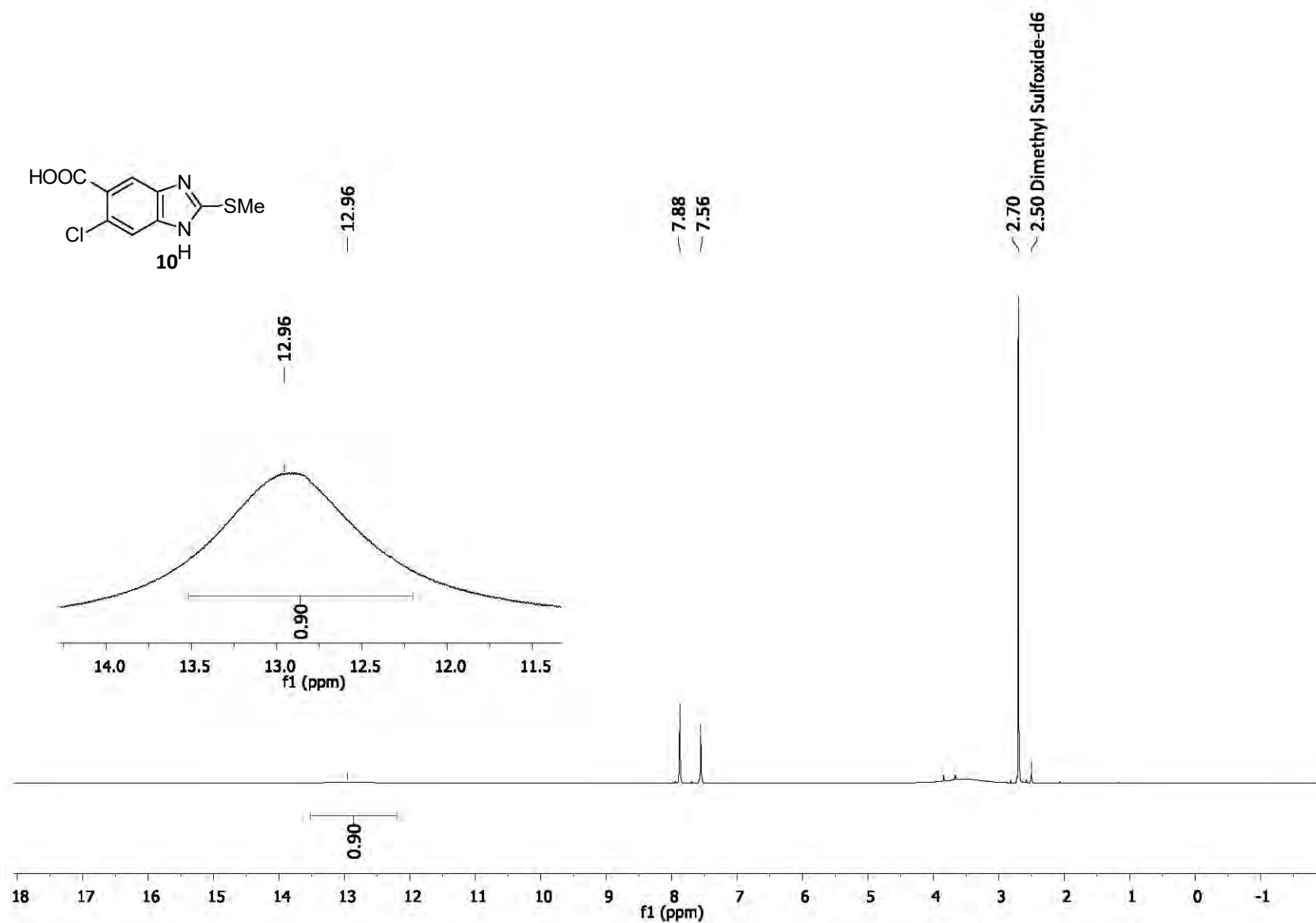
Espectro 11.12. RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**)



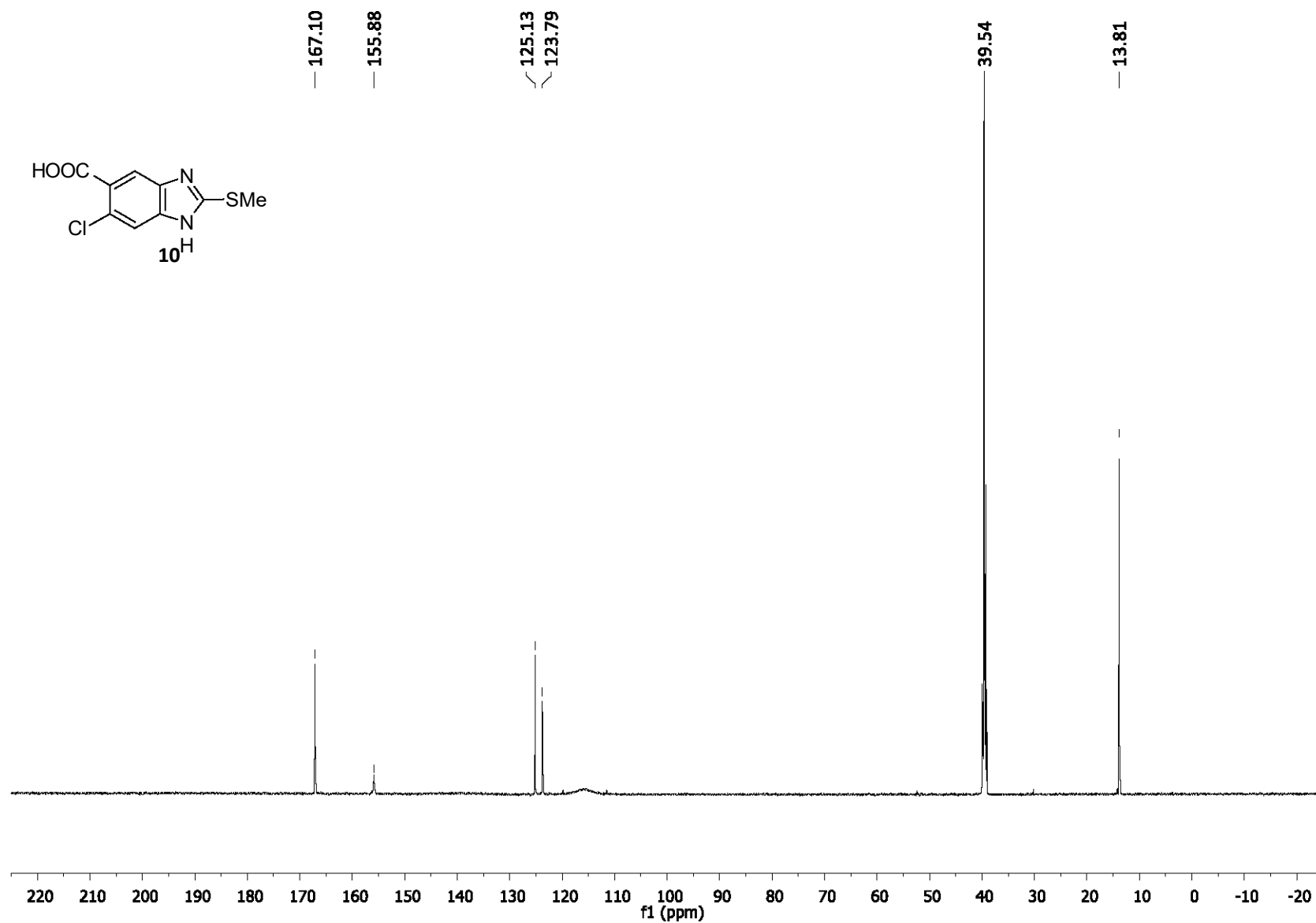
Espectro 11.13. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) de compuesto 6-cloro-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)



Espectro 11.14. RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)



Espectro 11.15. RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ en ppm) de compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (**10**)

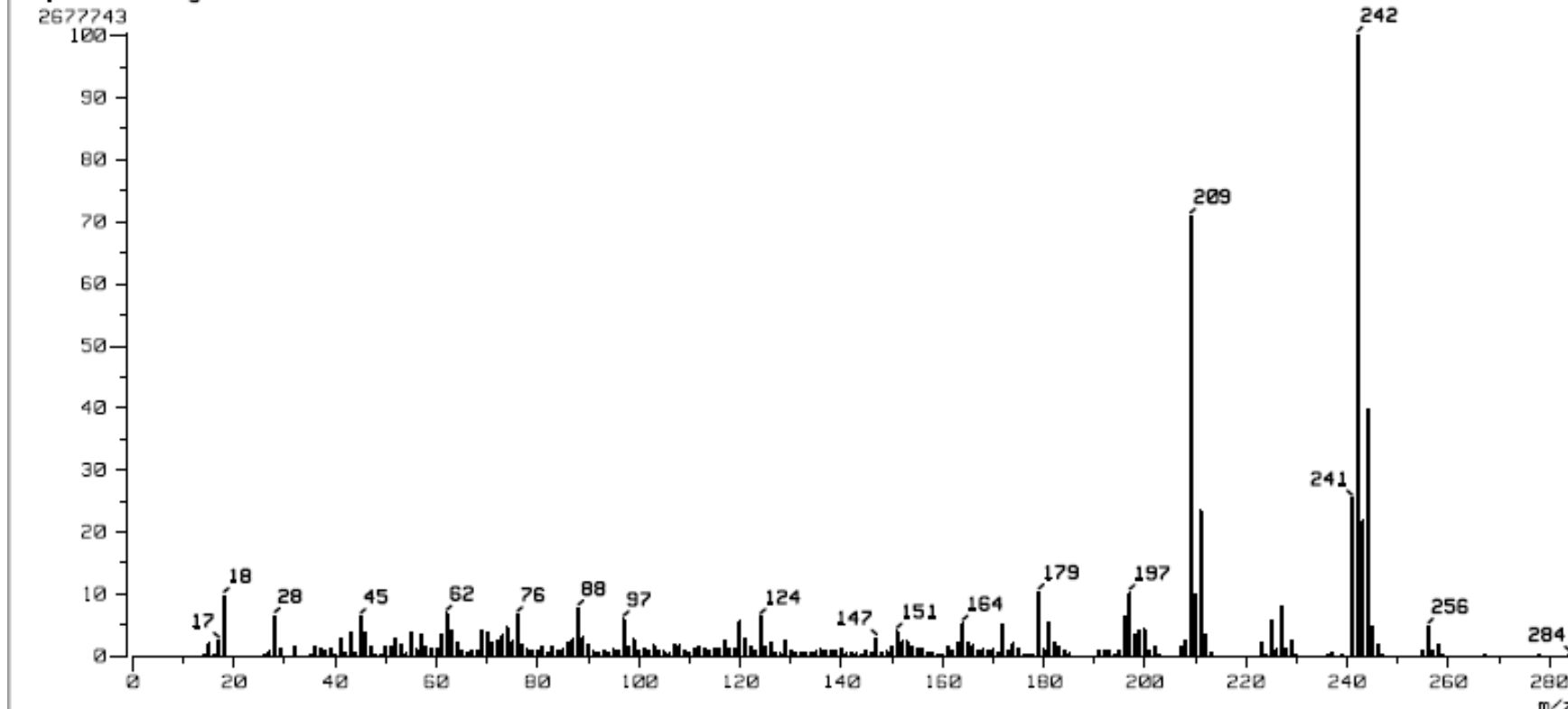


Espectro 11.16. RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (**10**)

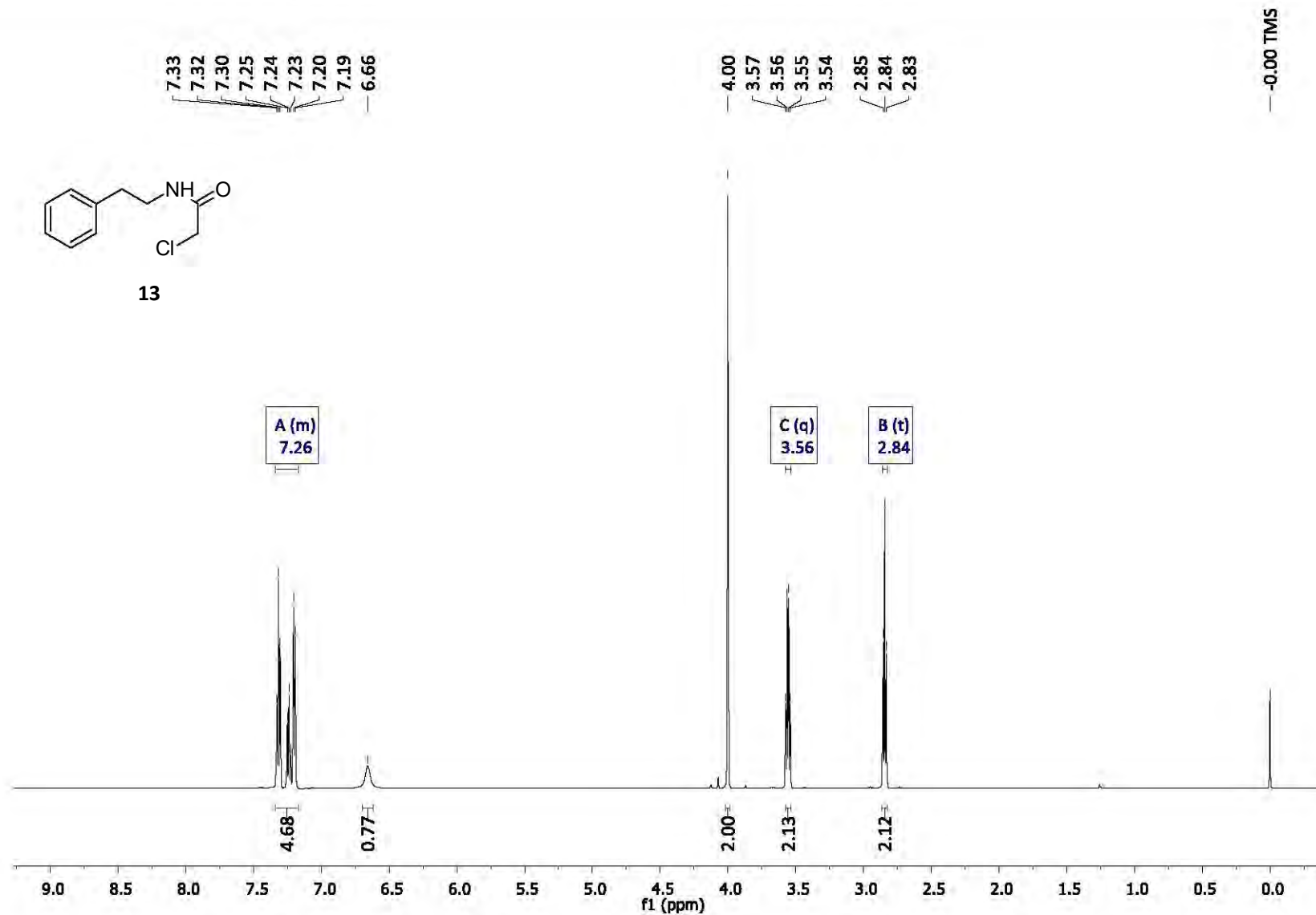
[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Castillo-Rafael-037 Date : 22-May-2018 09:17
 Sample: 106 STE-7630 Acid X JeolSX102A
 Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.55 min Scan# : (16,18)
 BP : m/z 242.0000 Int. : 254.63
 Output m/z range : 0.0000 to 284.8665 Cut Level : 0.00 %



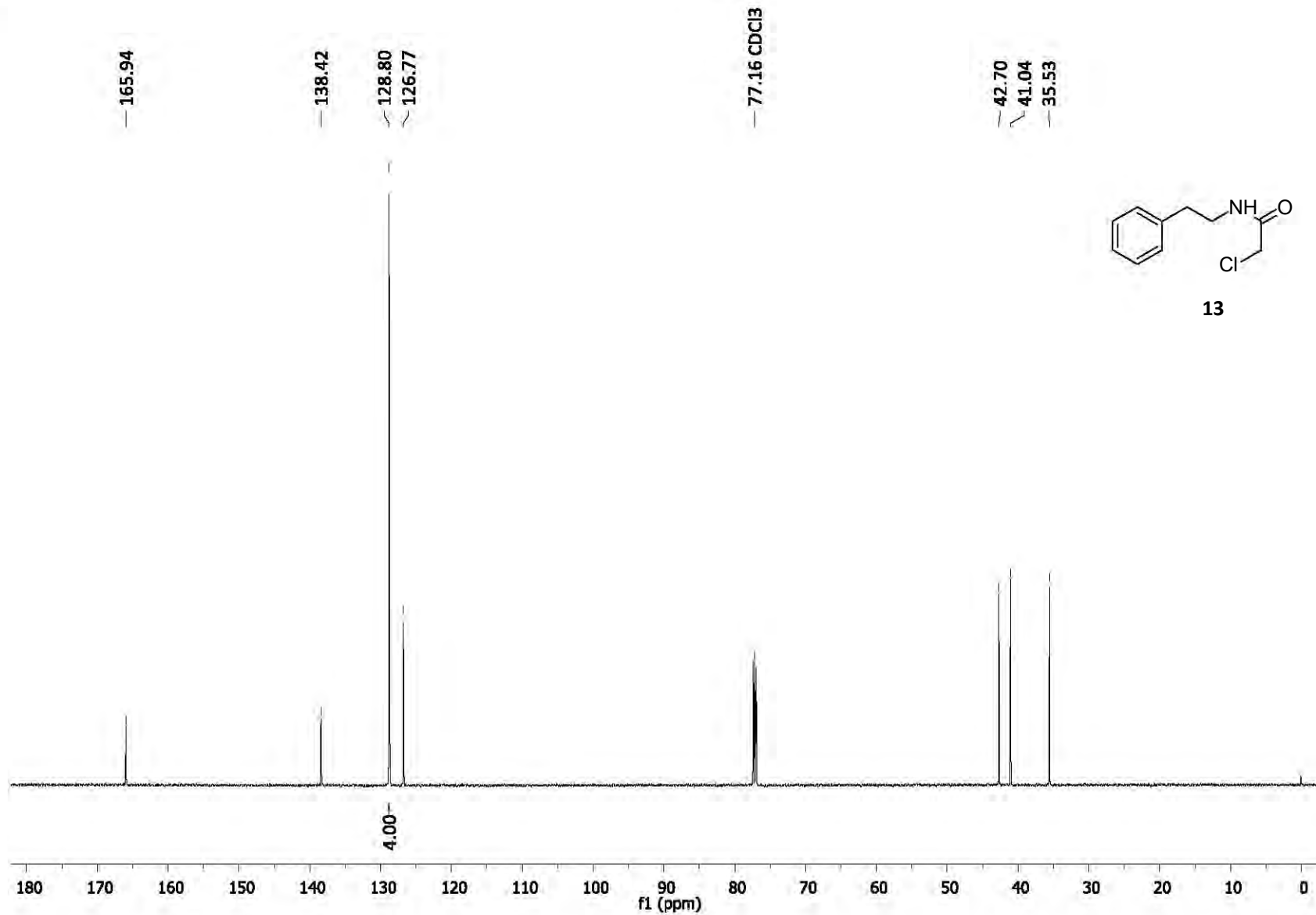
Masa monoisotópica: 241.991675



Espectro 11.17. EM (IE, m/z) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (**10**)

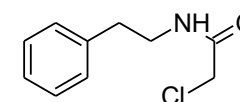


Espectro 11.18. RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-(2-feniletil)acetamida (**13**)

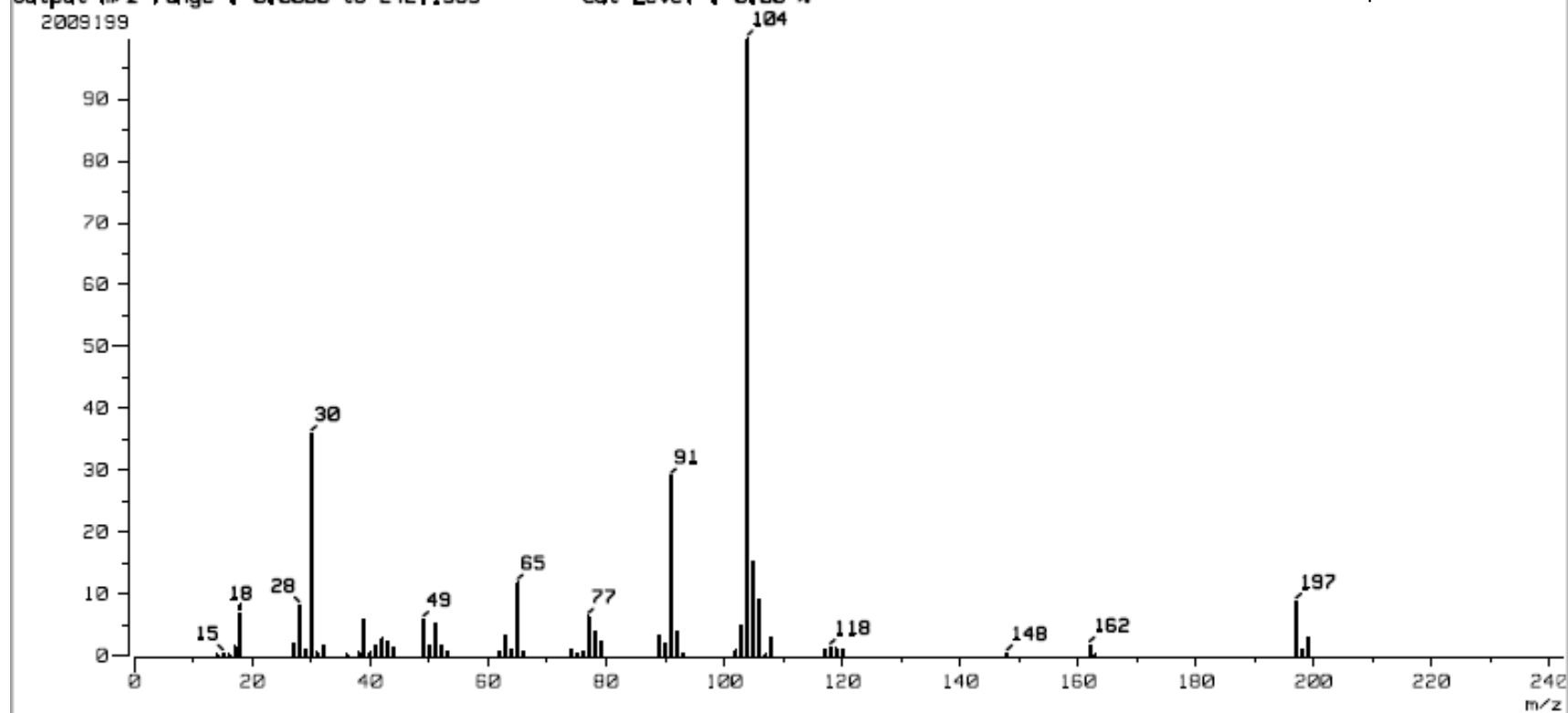


Espectro 11.19. RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-(2-feniletil)acetamida (**13**)

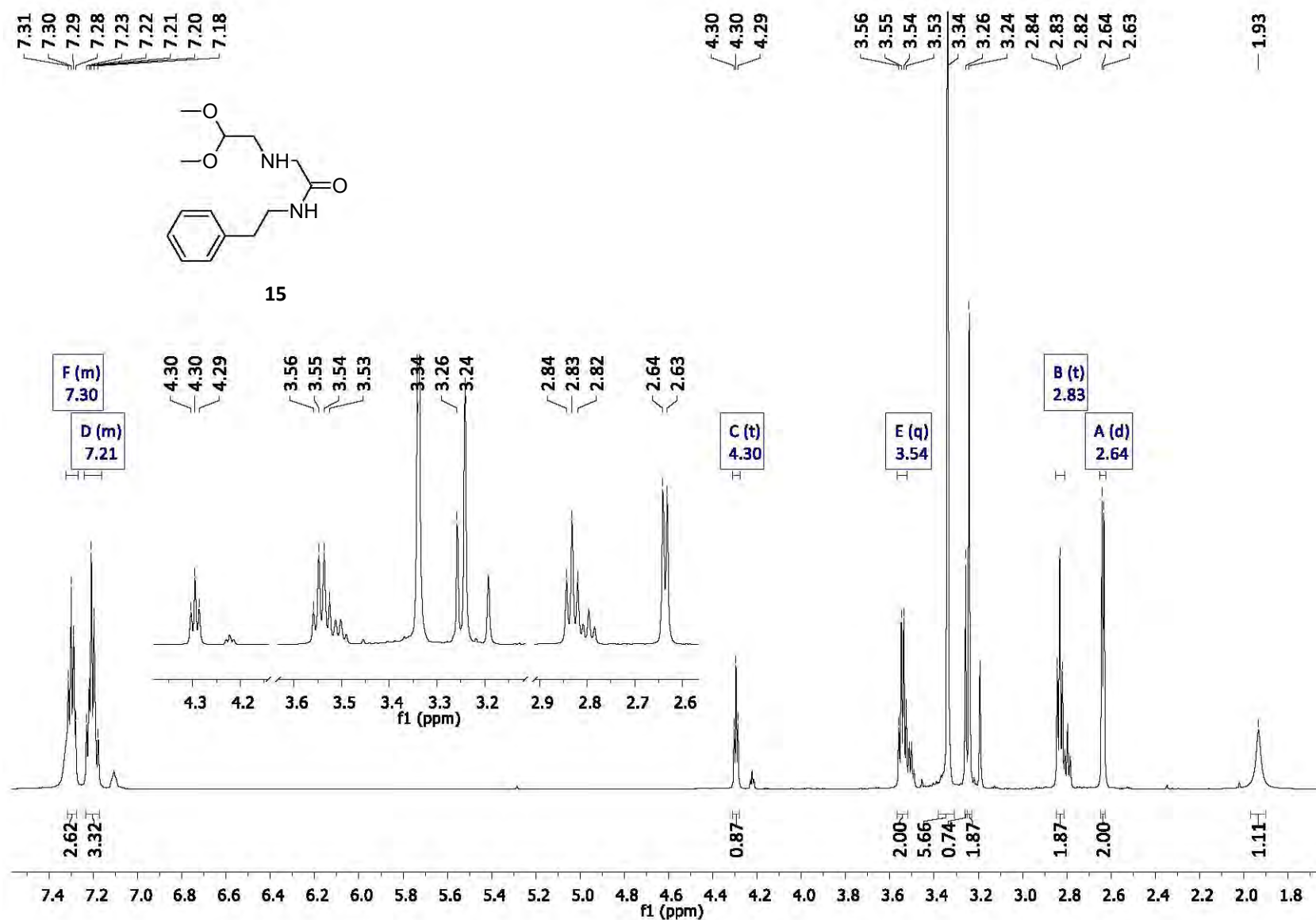
[Mass Spectrum]
Data : Dr-Castillo-Rafael-038 Date : 22-May-2018 09:21
Sample: 107 STE-7631 Int XIII JeolSX102A
Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.34 min Scan# : (11,12)
BP : m/z 104.0000 Int. : 192.17
Output m/z range : 0.0000 to 242.1365 Cut Level : 0.00 %

**13**

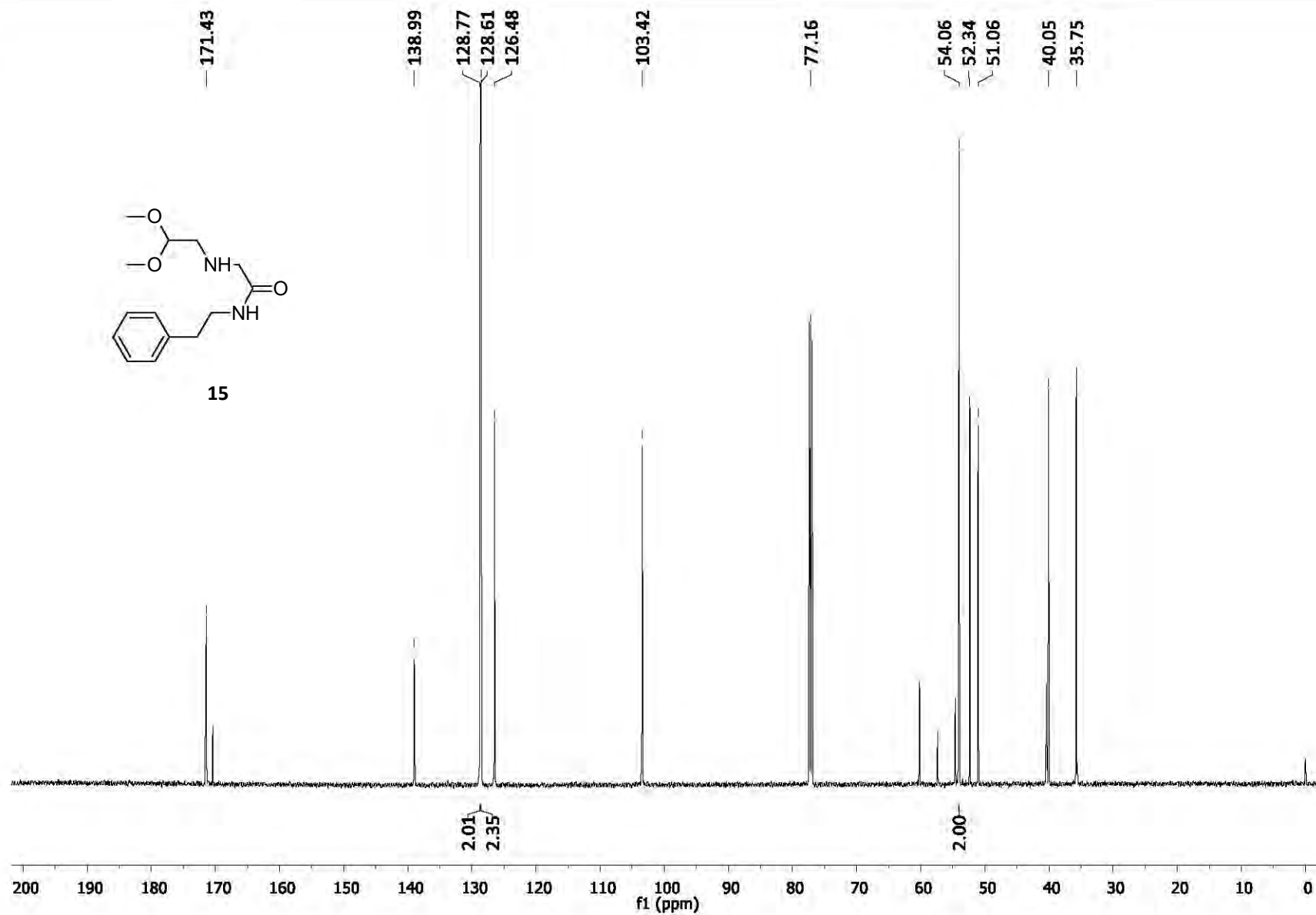
Masa monoisotópica: 197.060742



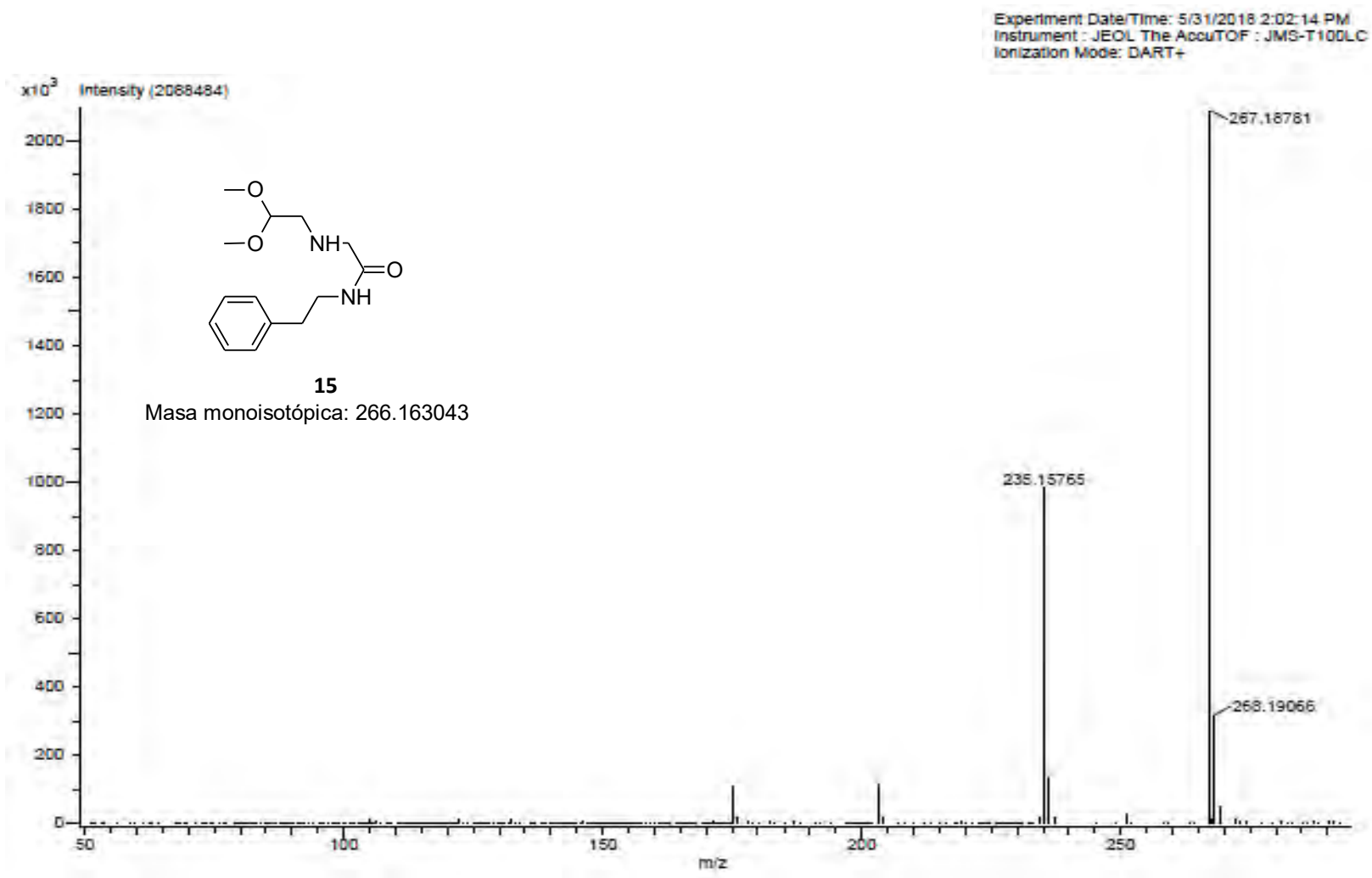
Espectro 11.20. EM (IE, m/z) del compuesto 2-cloro-*N*-(2-feniletíl)acetamida (**13**)



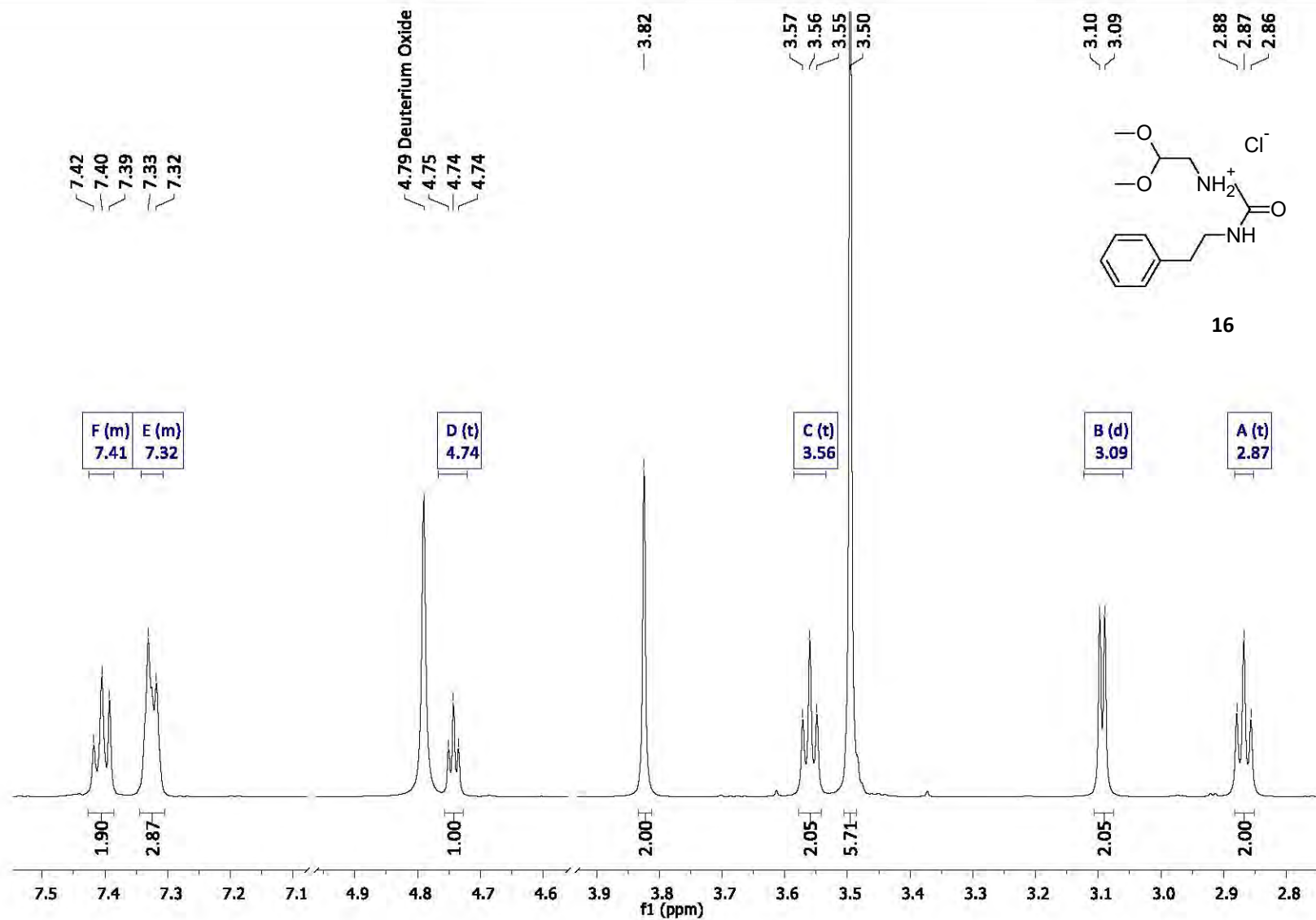
Espectro 11.21. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ en ppm) del compuesto 2-[(2,2-dimetoxietil)amino]-N-(2-feniletil)acetamida (**15**)



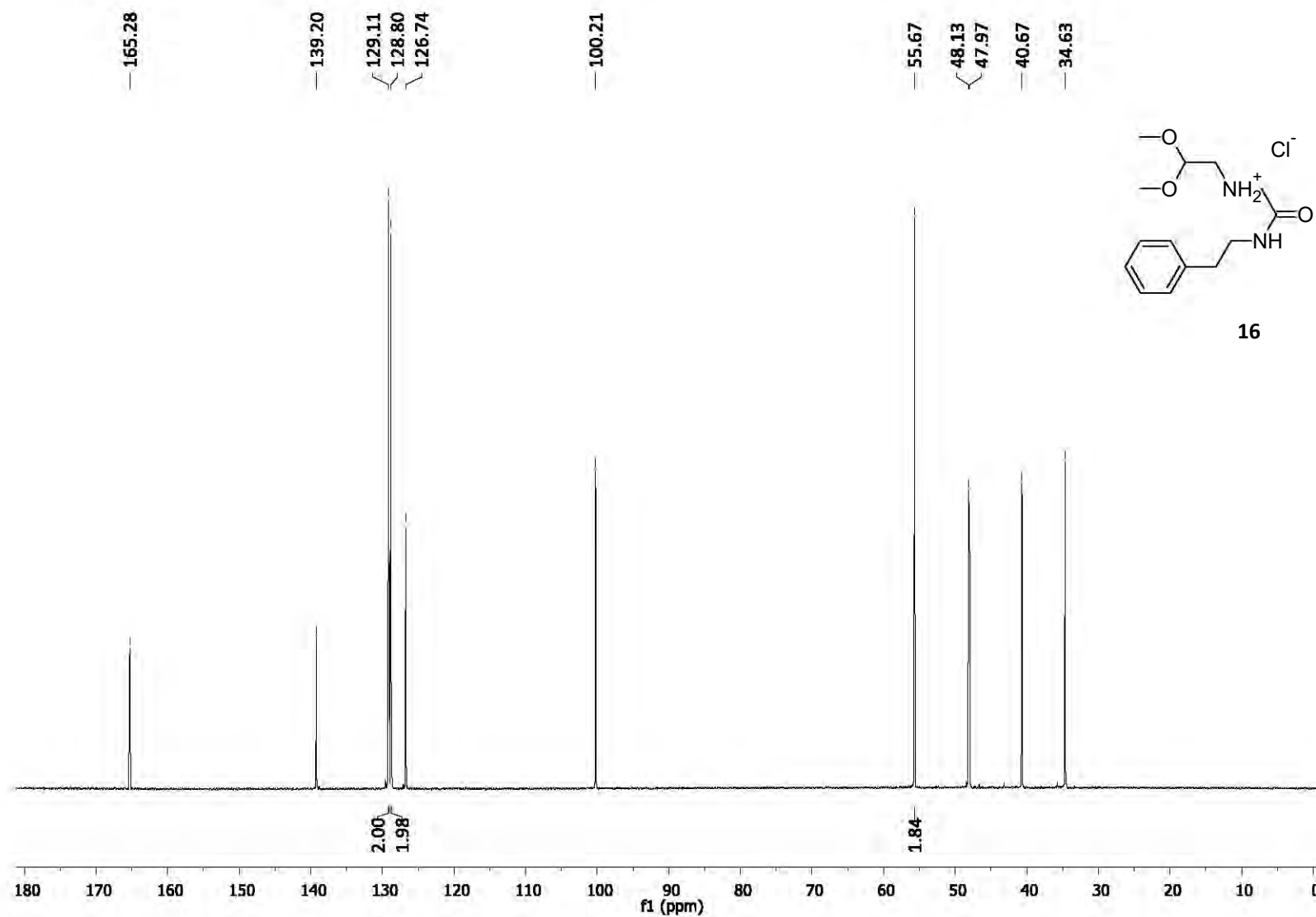
Espectro 11.22. RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ en ppm) del compuesto 2-[(2,2-dimetoxietil)amino]-*N*-(2-feniletil)acetamida (**15**)



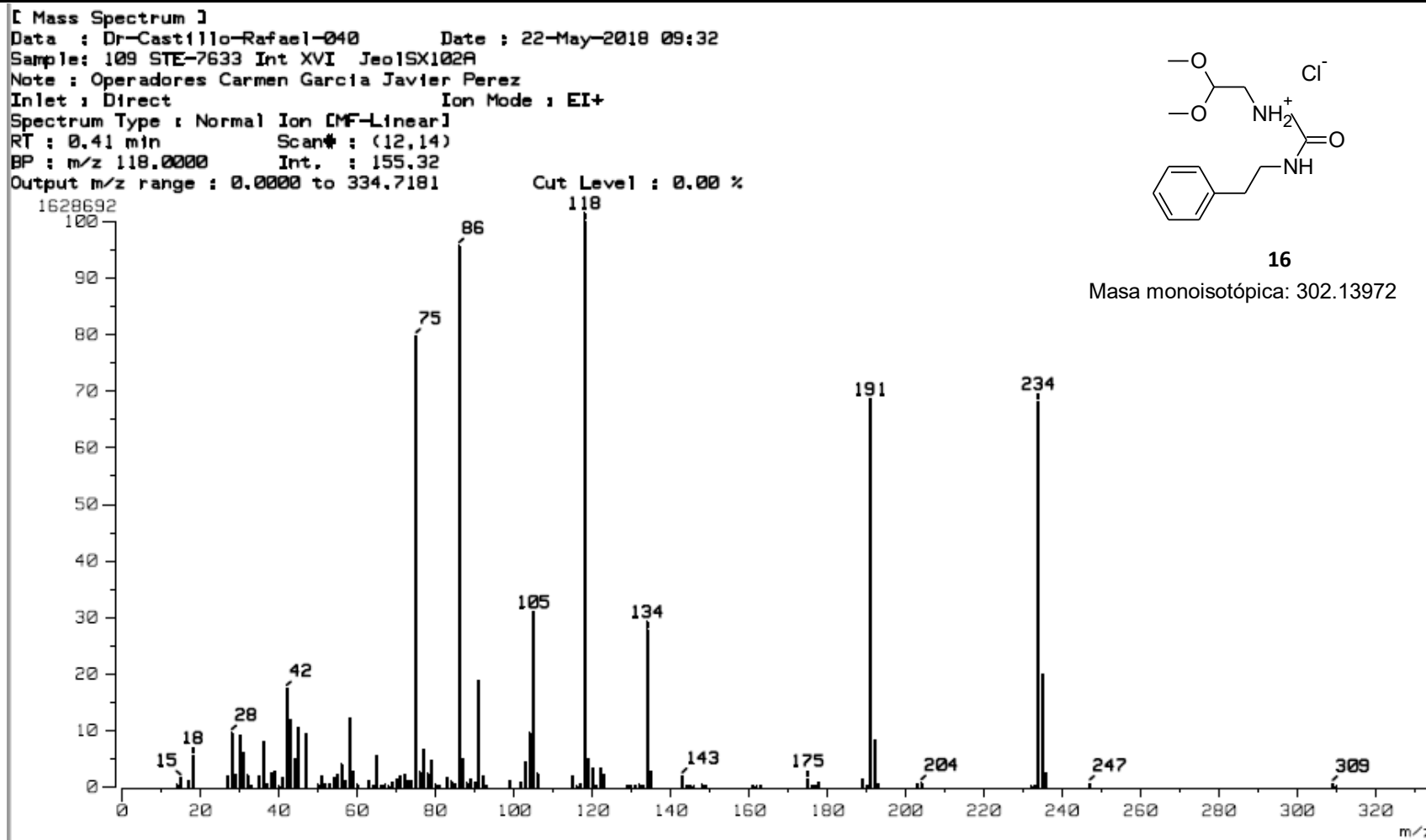
Espectro 11.23. EM (DART⁺, *m/z*) del compuesto 2-[(2,2-dimetoxietil)amino]-*N*-(2-feniletíl)acetamida (**15**)



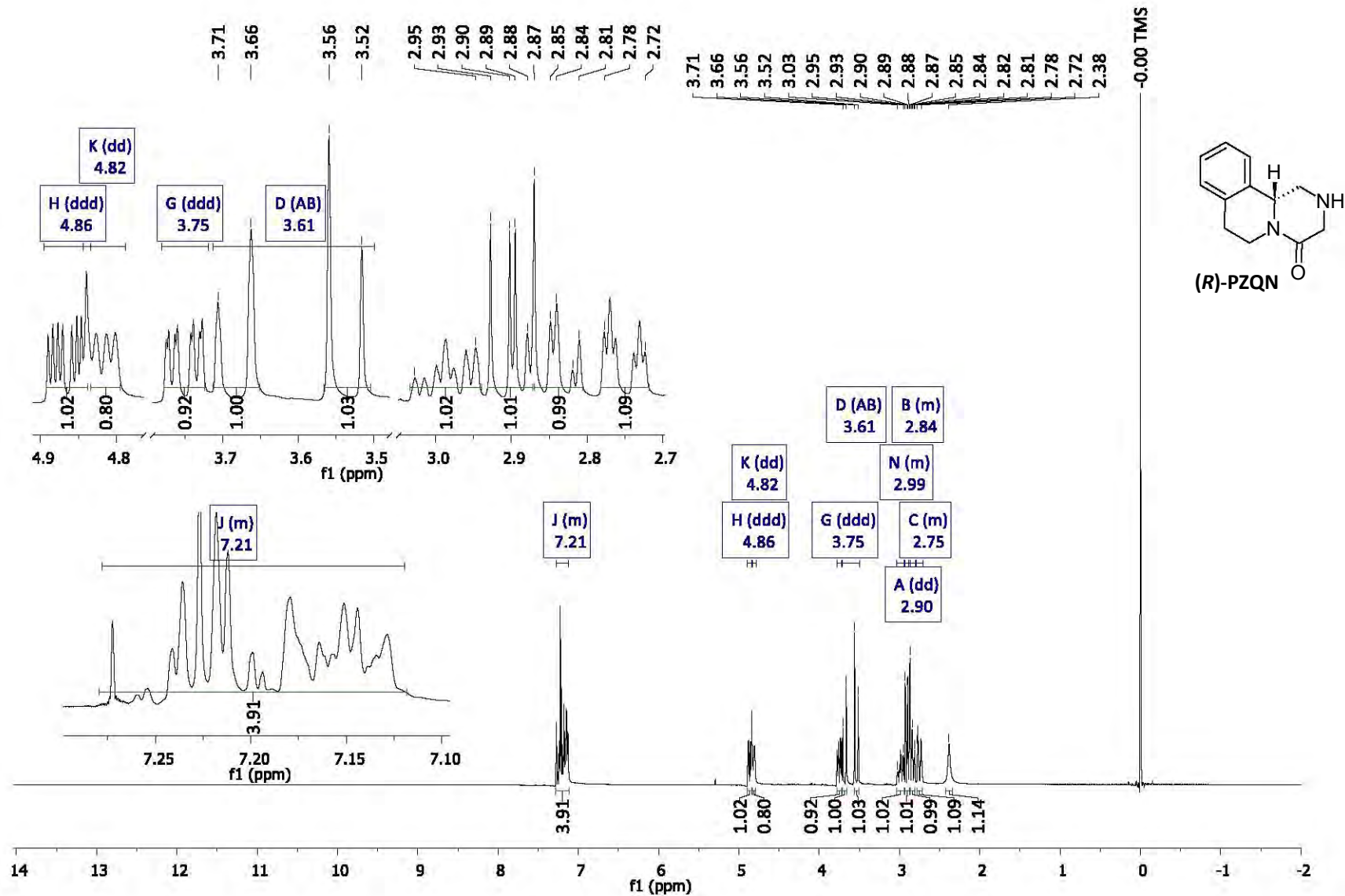
Espectro 11.24. RMN ^1H (600 MHz, D_2O , δ en ppm) del compuesto clorhidrato de 2,2-dimetoxi-*N*-{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamonio (16)



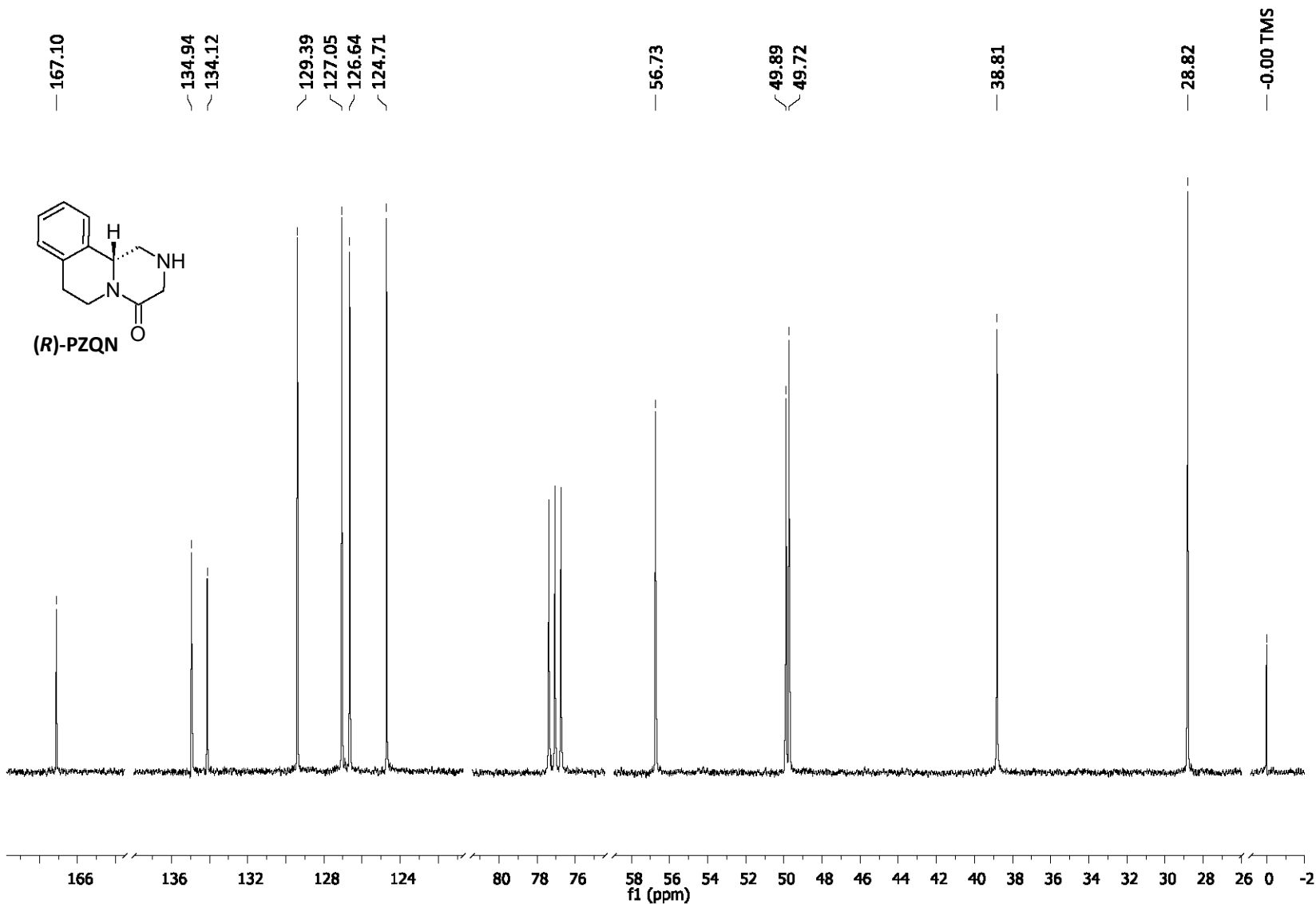
Espectro 11.25. RMN ^{13}C (150 MHz, D_2O , δ en ppm) del compuesto clorhidrato de 2,2-dimetoxi-*N*-{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamonio (**16**)



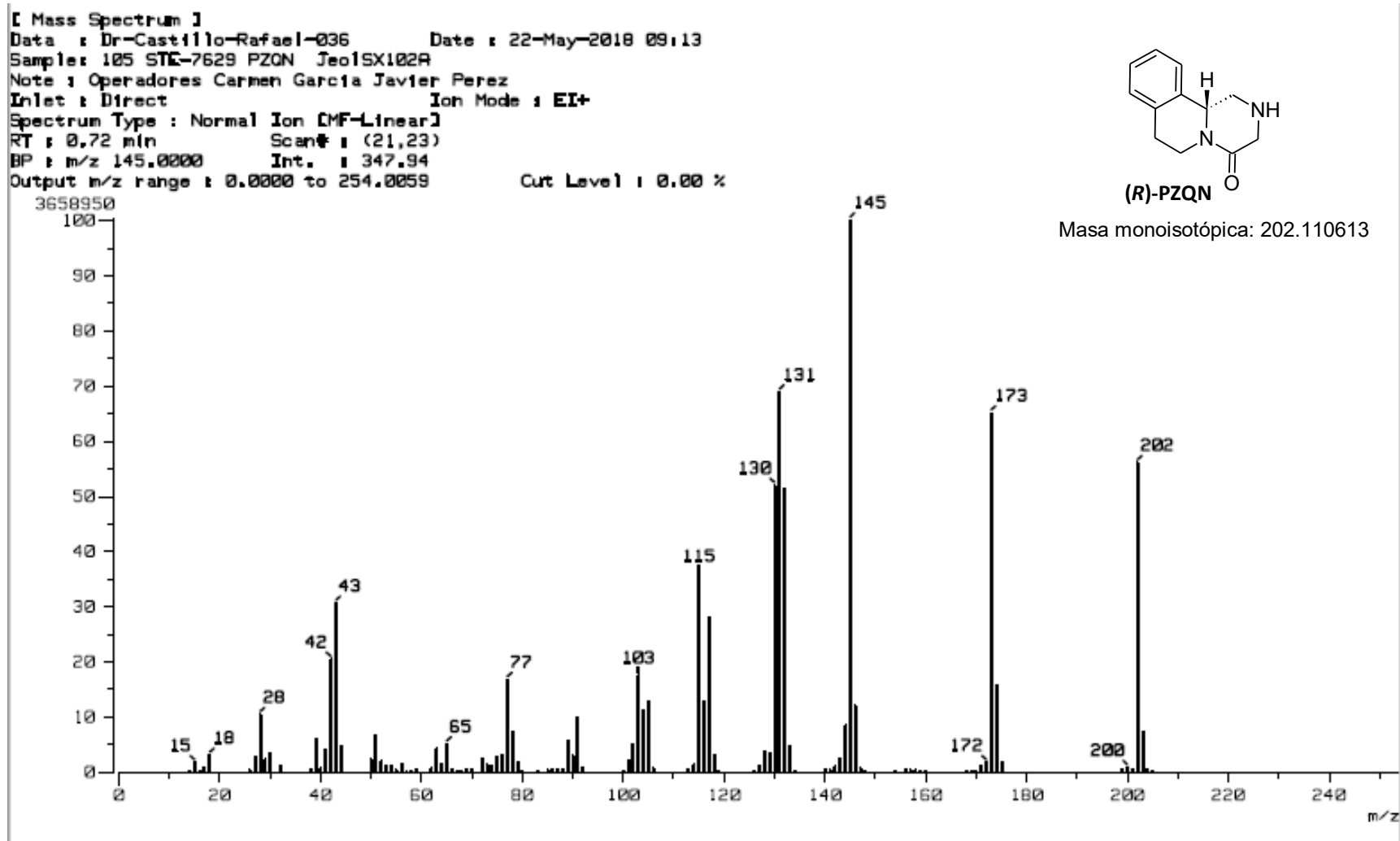
Espectro 11.26. EM (IE, m/z) del compuesto clorhidrato de 2,2-dimetoxi-*N*-{2-oxo-2-[(2-feniletil)amino]etil}etanamonio (**16**)



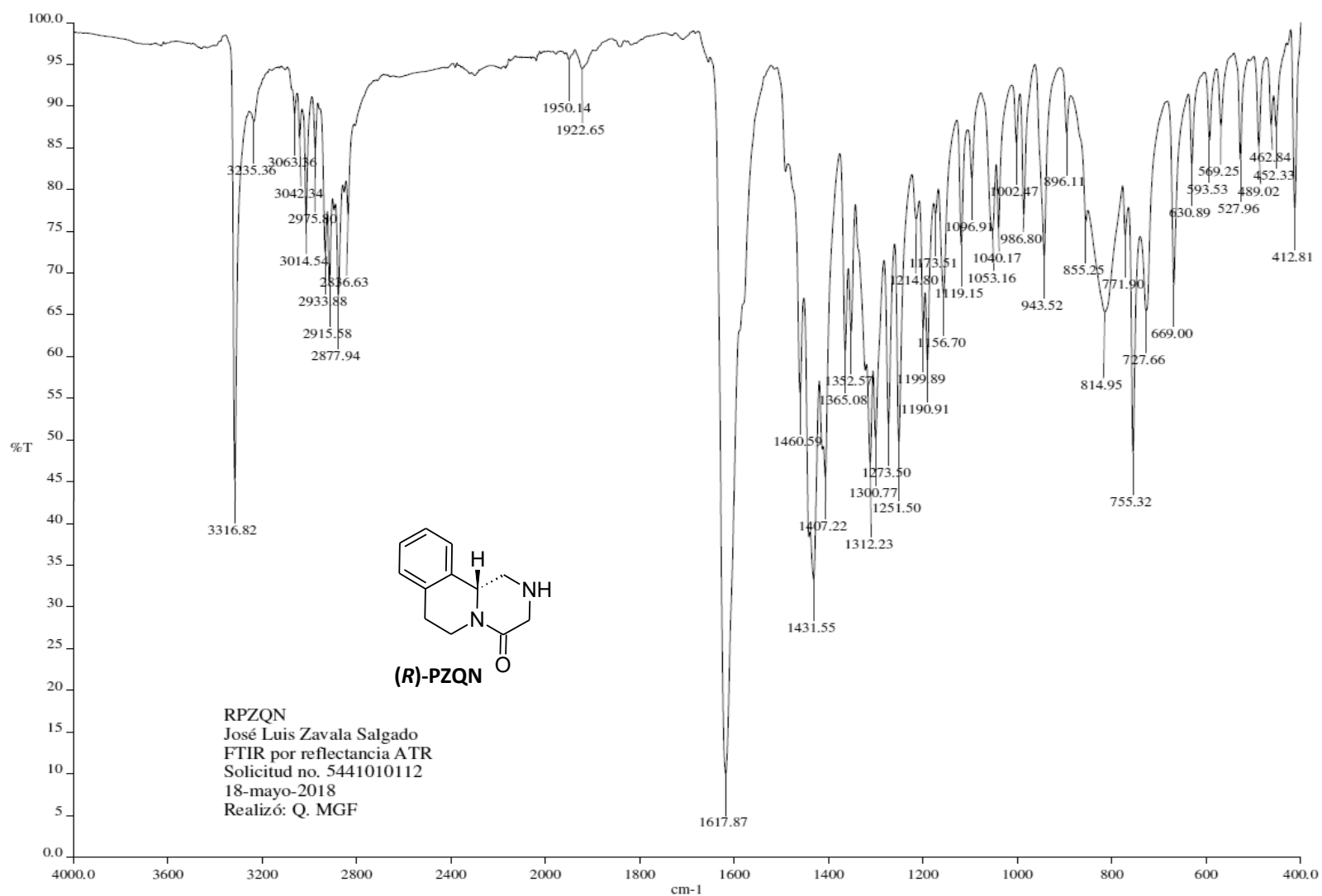
Espectro 11.27. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm) del compuesto (11b*R*)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((*R*)-PZQN)



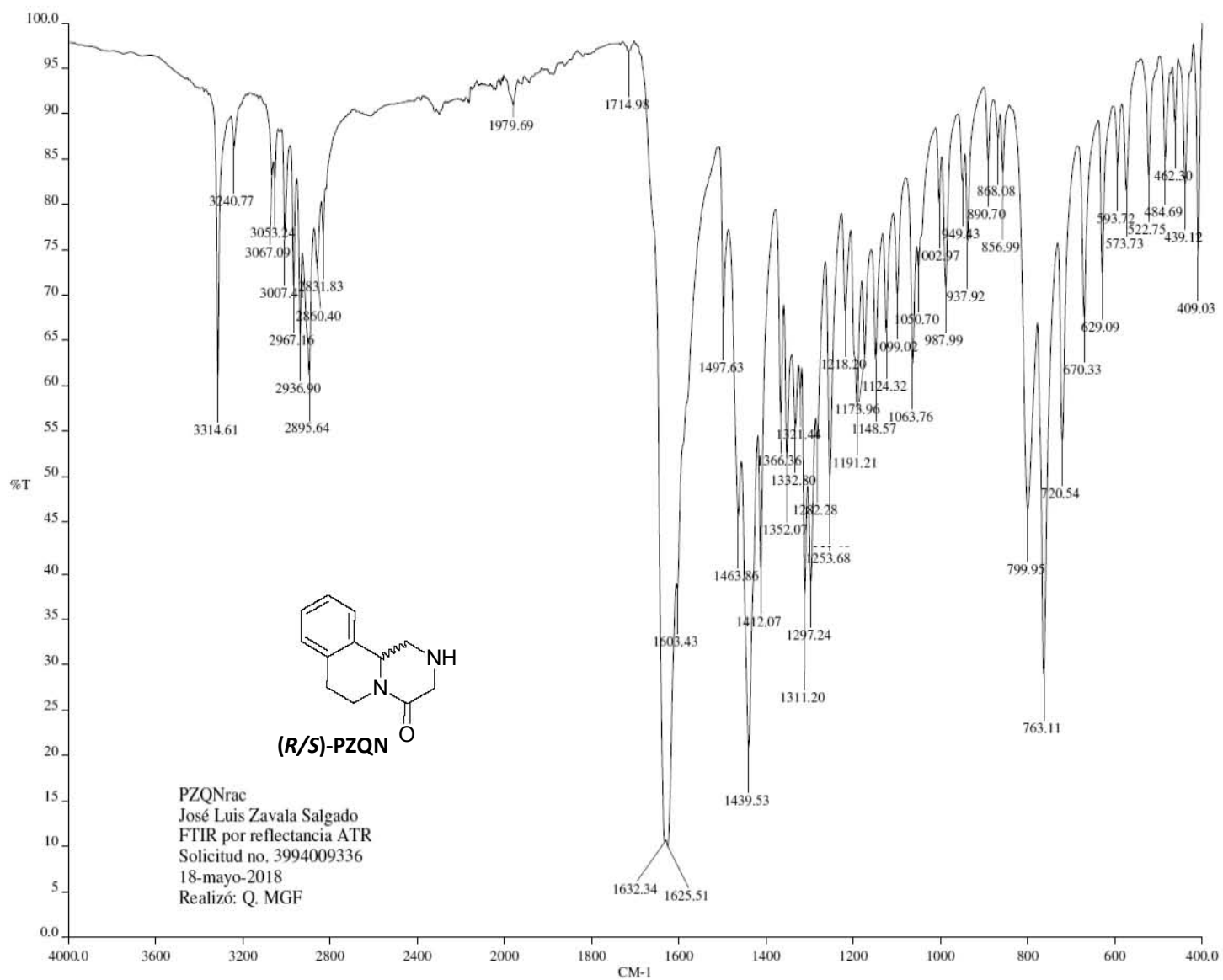
Espectro 11.28. RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ en ppm) del compuesto (11b*R*)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((*R*)-PZQN)



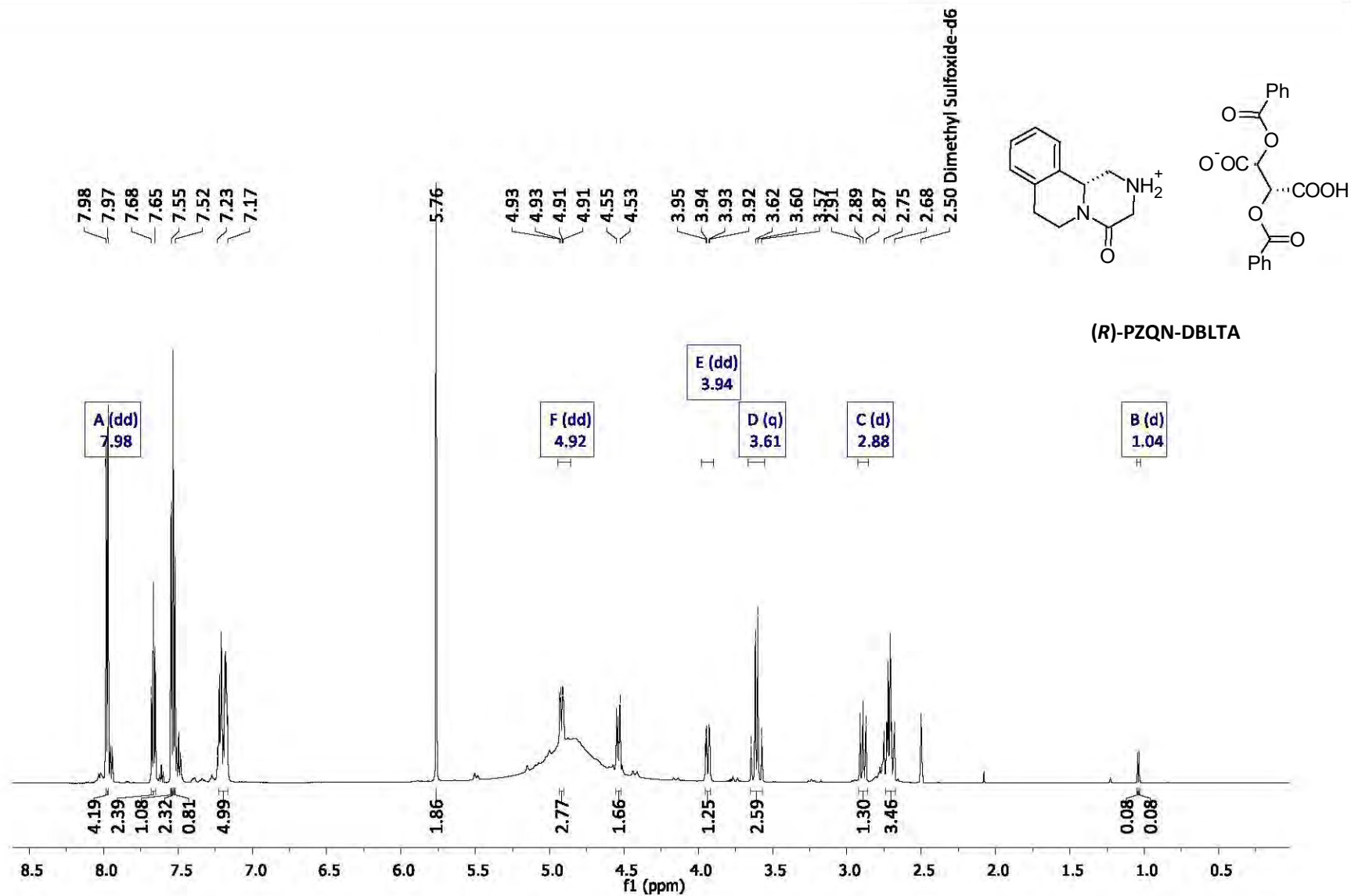
Espectro 11.29. EM (IE, m/z) del compuesto (11bR)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQN)



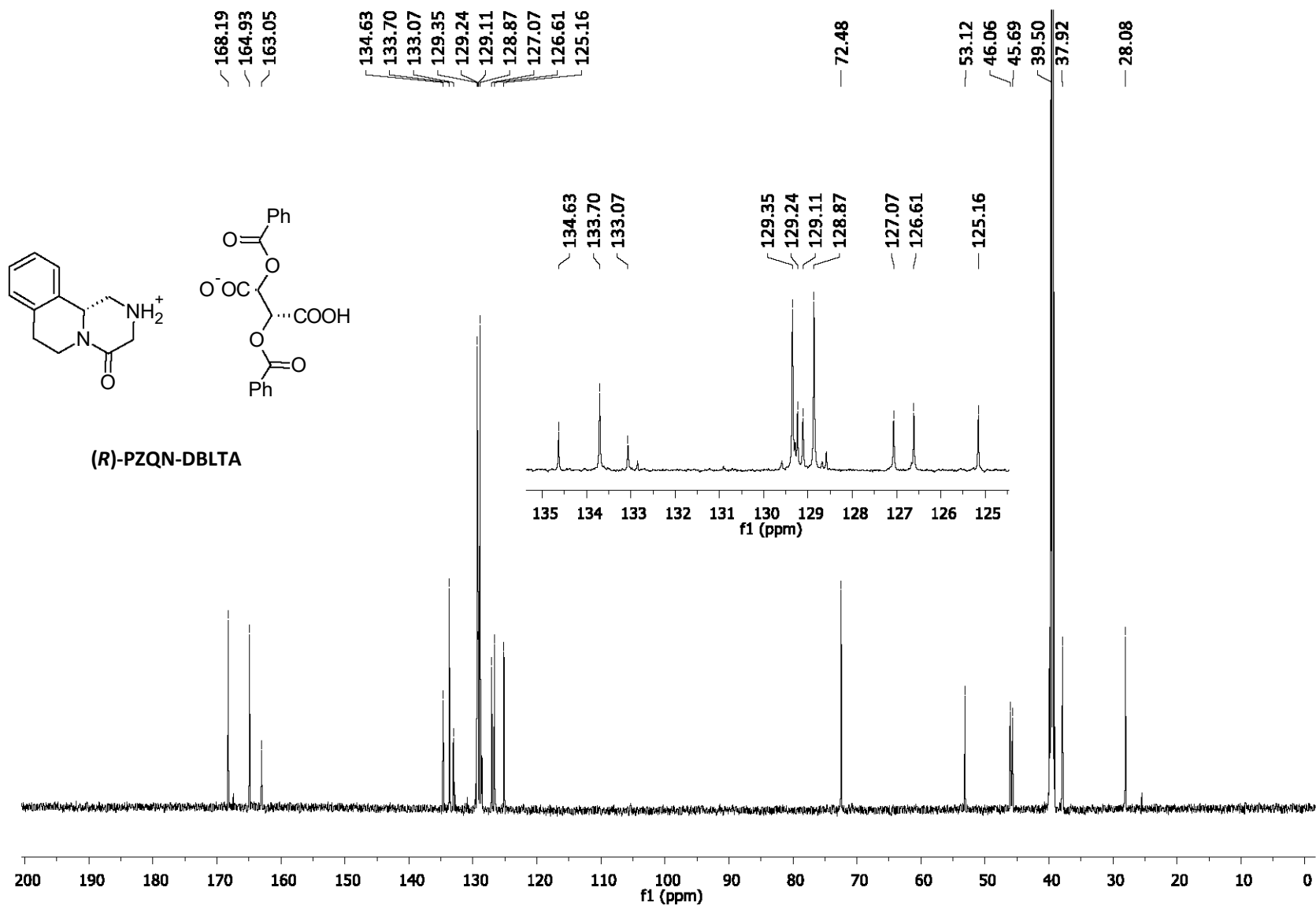
Espectro 11.30. IR (ATR-FT, cm^{-1}) del compuesto (11bR)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQN)



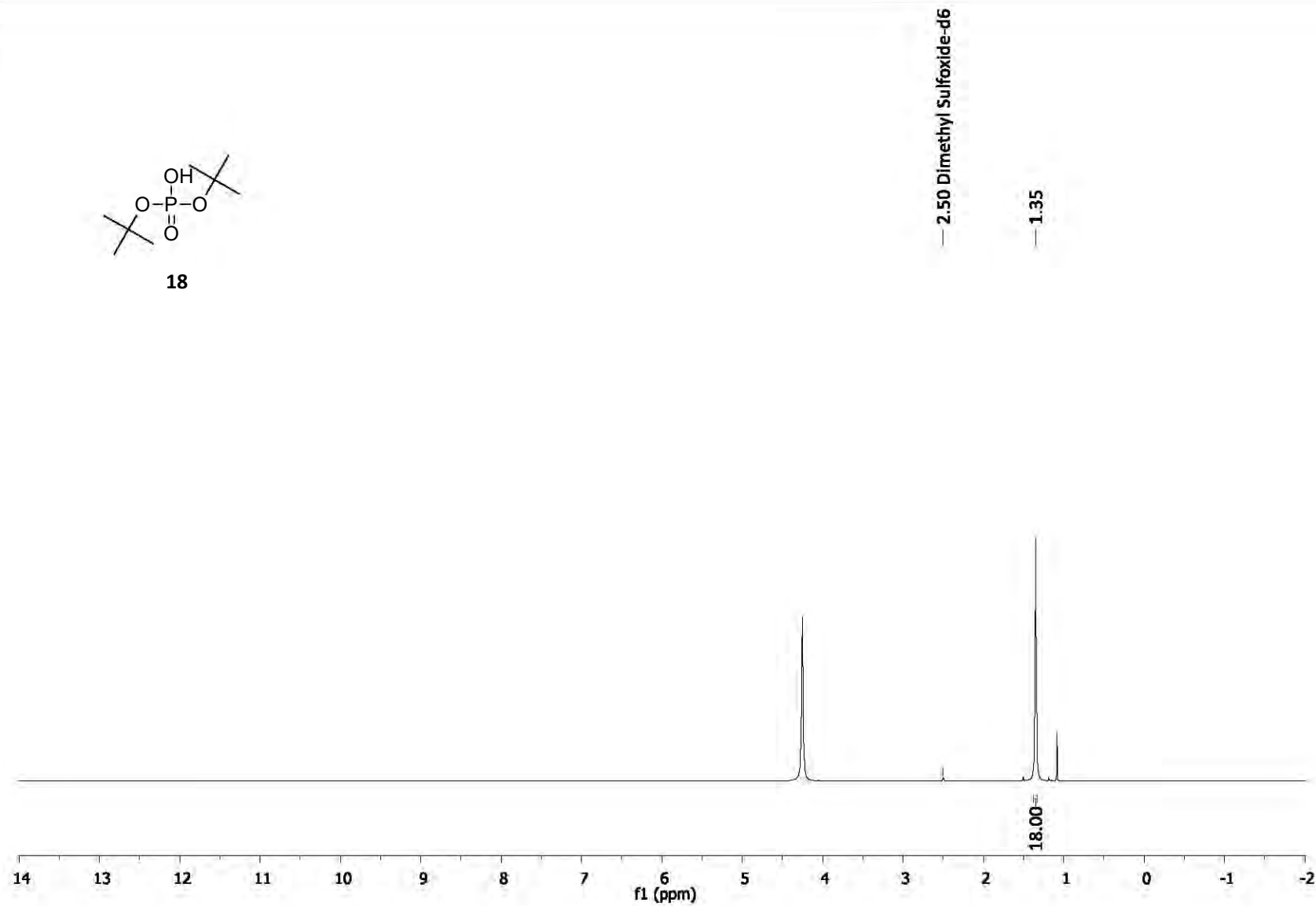
Espectro 11.31. IR (ATR-FT, cm⁻¹) del compuesto (*R/S*)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona (*(R/S)*-PZQN)



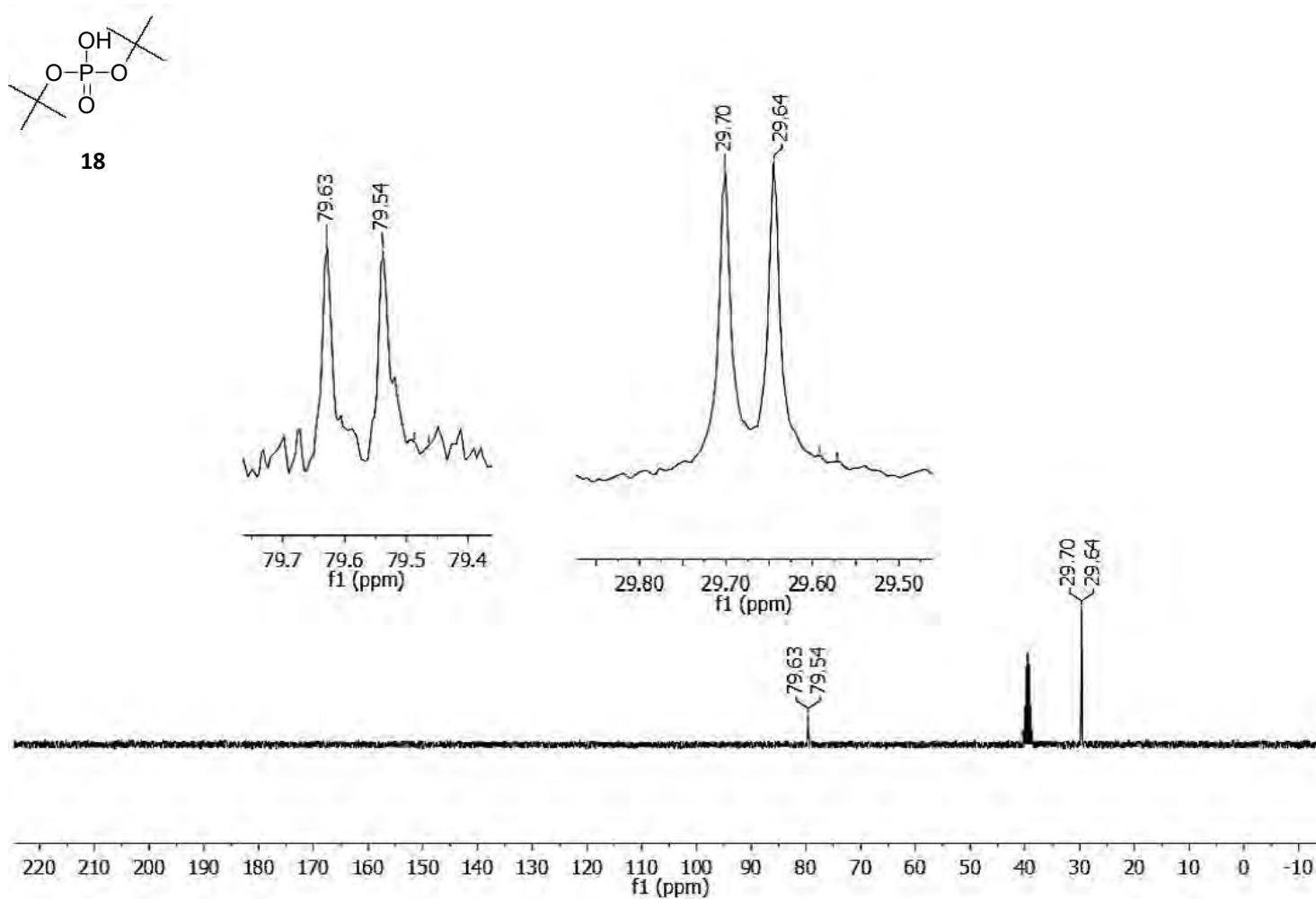
Espectro 11.32. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto (*R*)-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-io (2*R*,3*R*)-2,3-bis(benzoiloxi)-3-carboxipropanoato (**(*R*)-PZQN-DBLTA**)



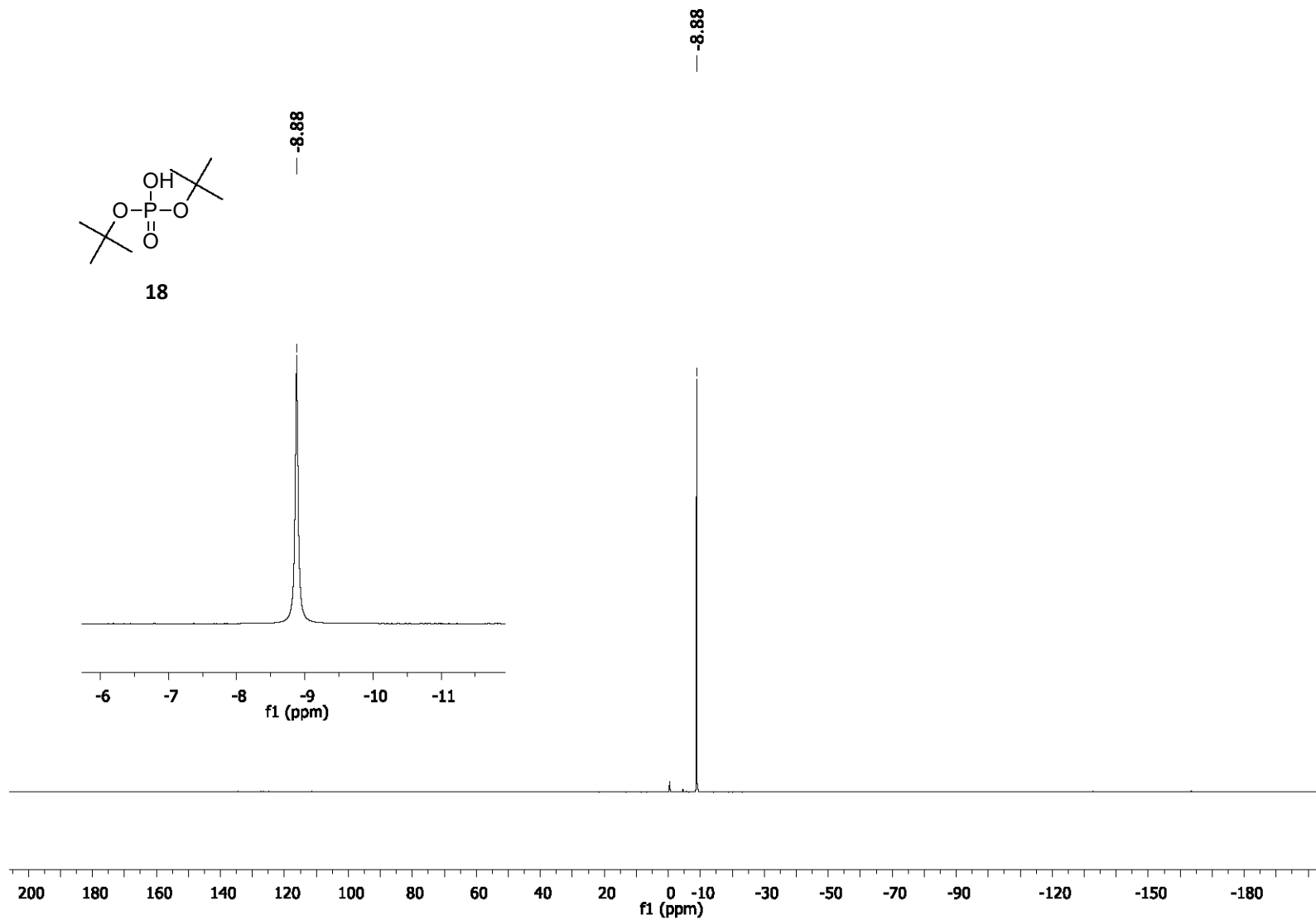
Espectro 11.33. RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto (*R*)-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-io (2*R*,3*R*)-2,3-bis(benzoiloxi)-3-carboxipropanoato ((*R*)-PZQN-DBLTA)



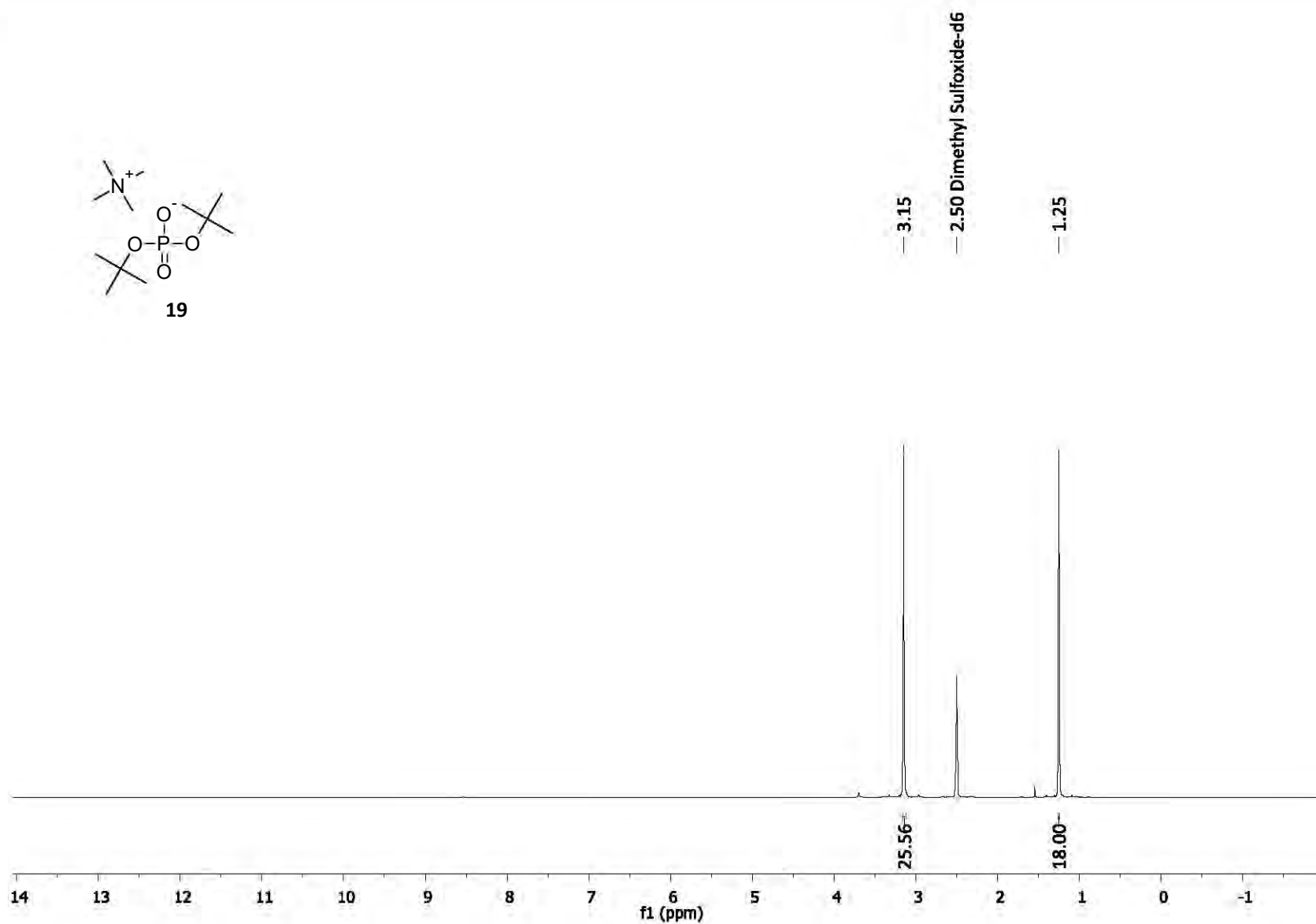
Espectro 11.34. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto fosfato monoácido de di-*tert*-butilo (**18**)



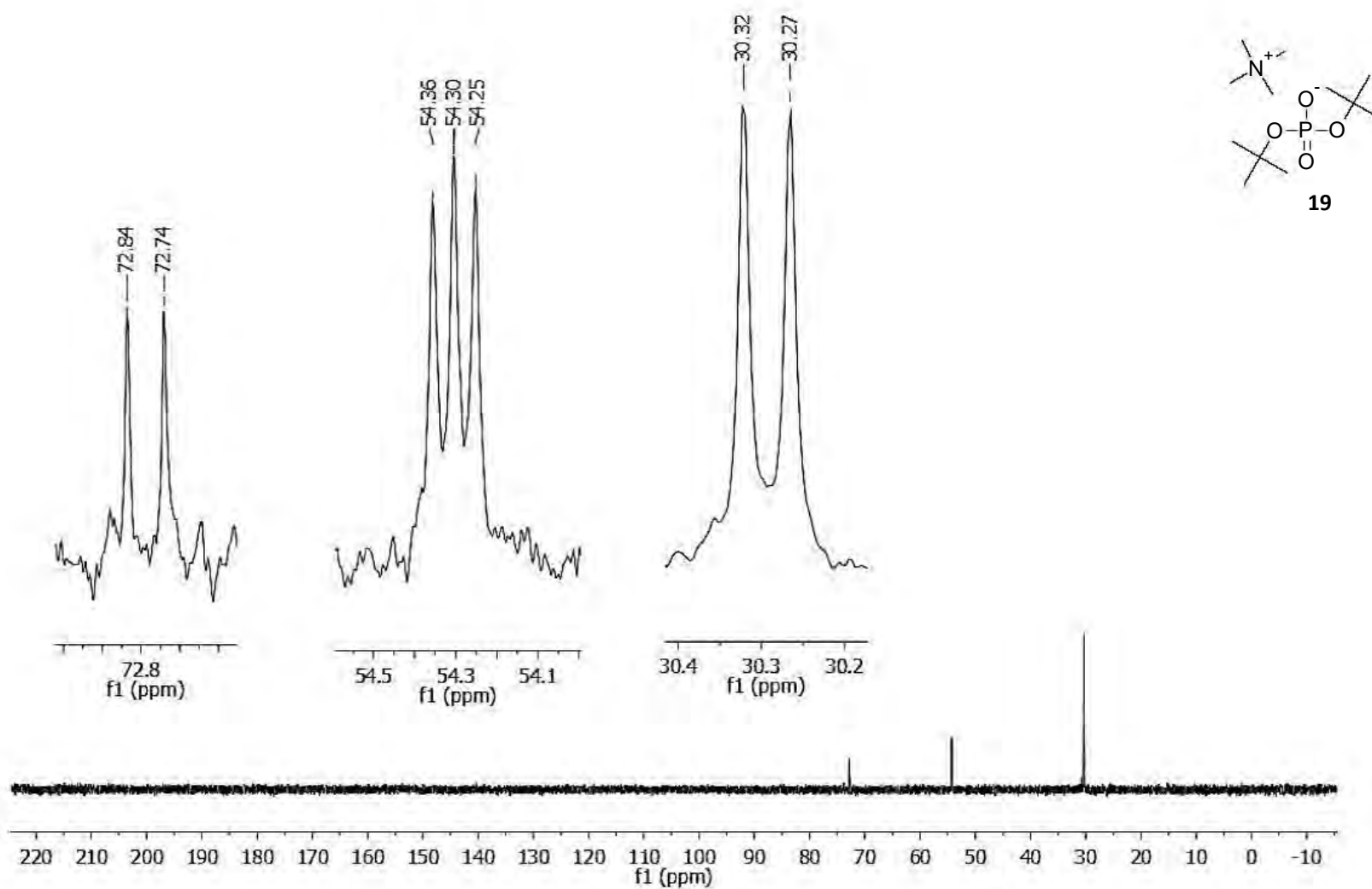
Espectro 11.35. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato monoácido de di-*tert*-butilo (**18**)



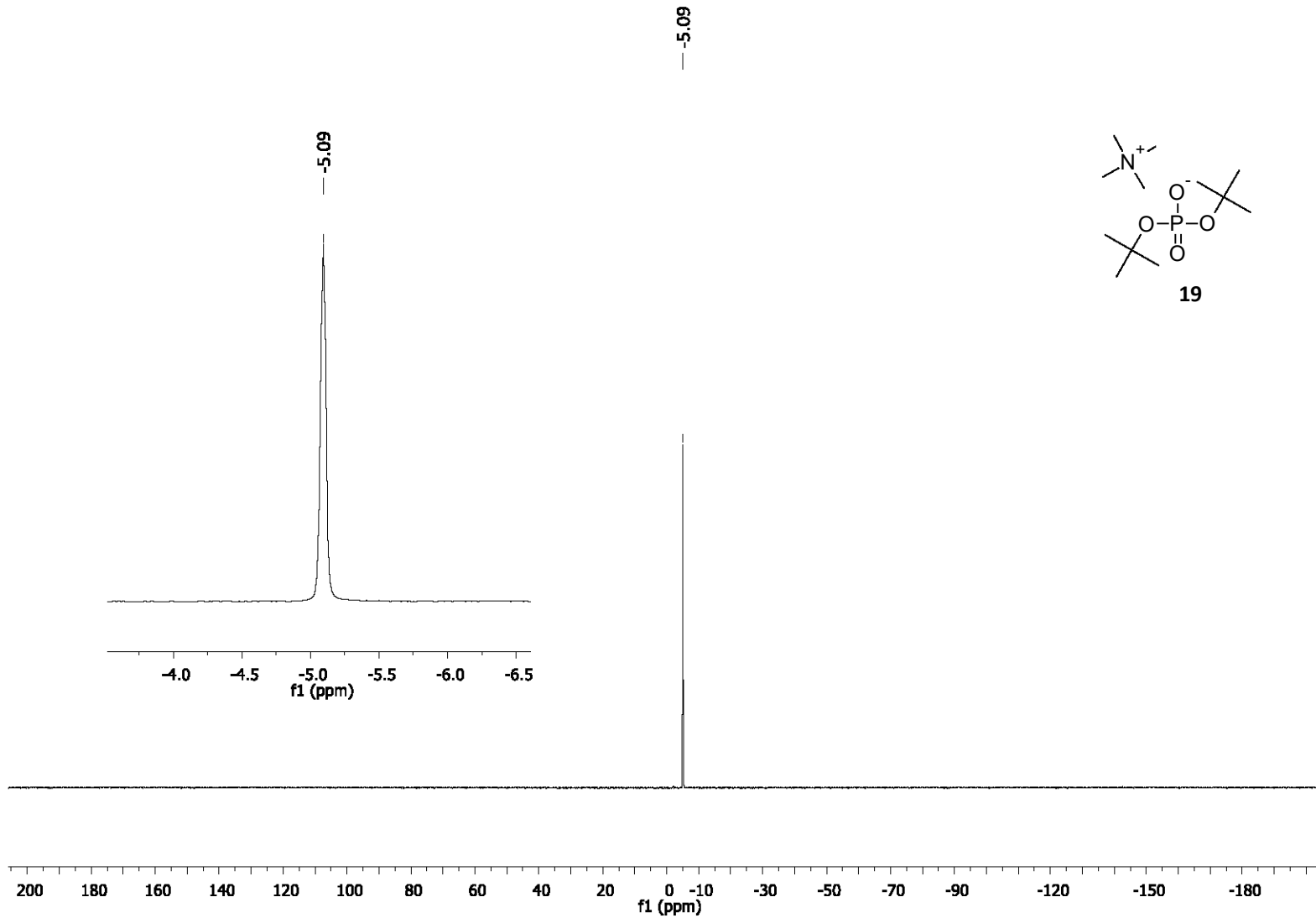
Espectro 11.36. RMN ^{31}P (273 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto fosfato monoácido de di-*tert*-butilo (**18**)



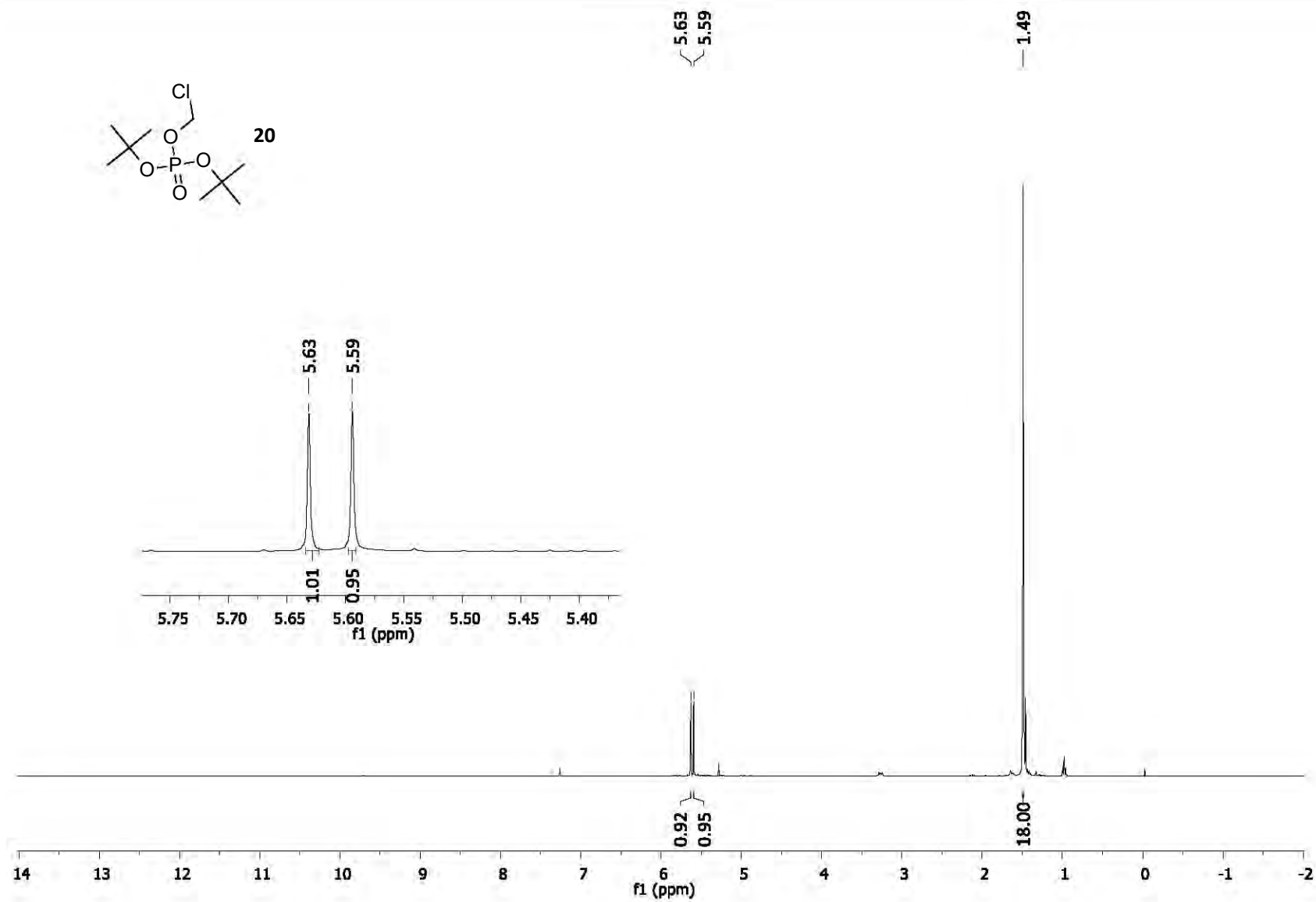
Espectro 11.37. RMN ¹H (400 MHz, D₂O, δ en ppm) del compuesto di-*terc*-butilfosfato de tetrametilamonio (**19**)



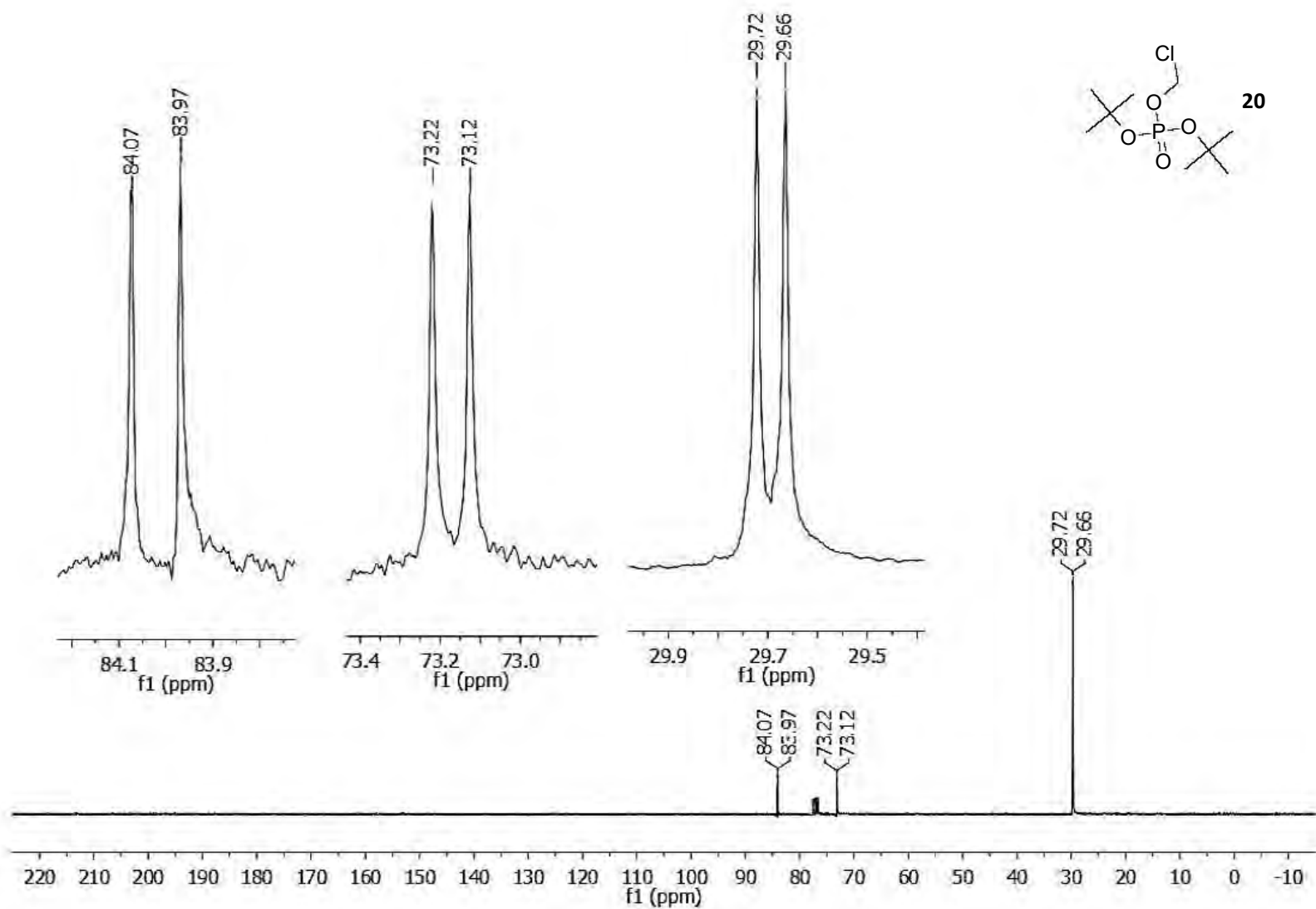
Espectro 11.38. RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , δ en ppm) del compuesto di-*tert*-butilfosfato de tetrametilamonio (**19**)



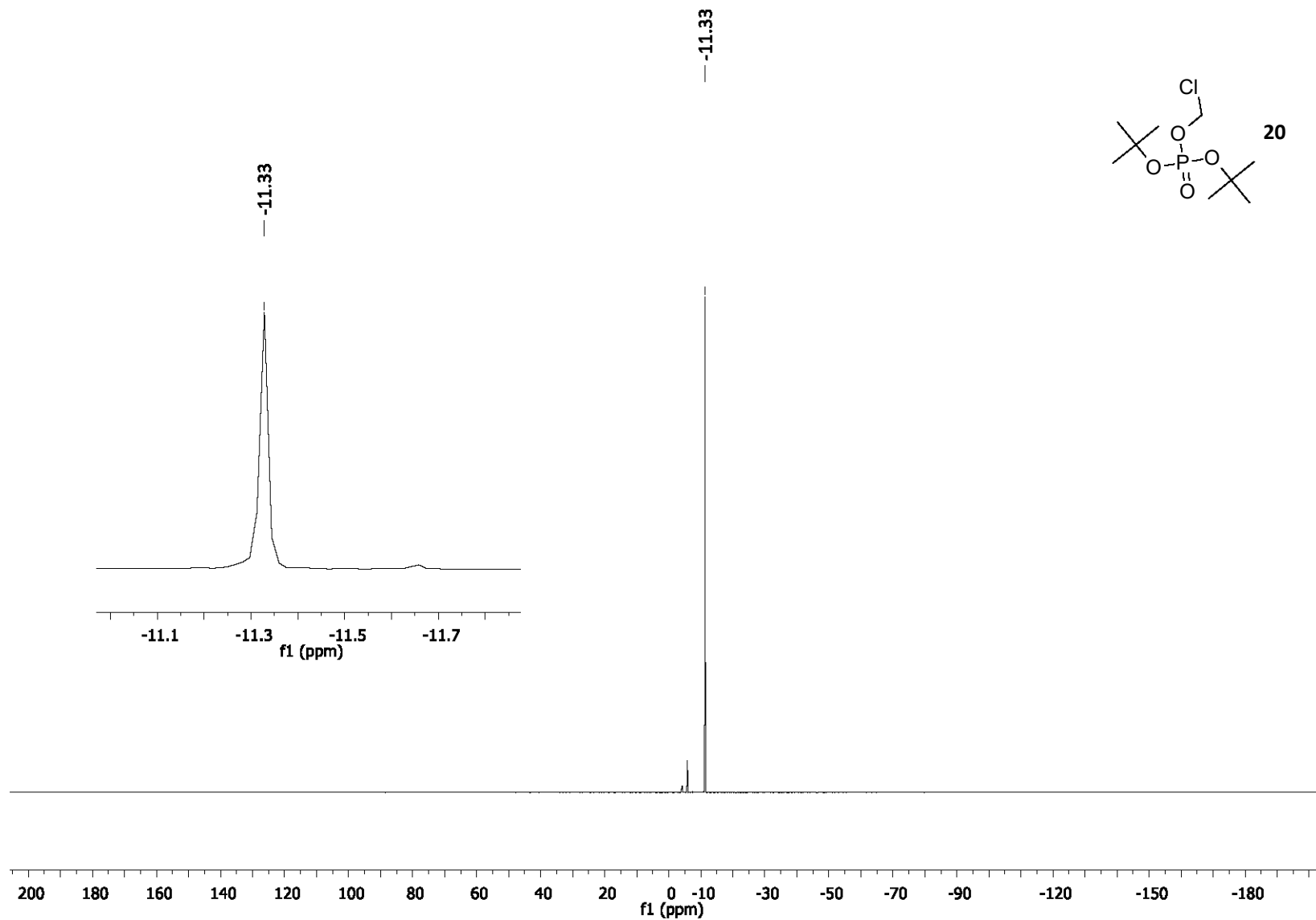
Espectro 11.39. RMN ^{31}P (273 MHz, D_2O , δ en ppm) del compuesto di-*tert*-butilfosfato de tetrametilamonio (19)



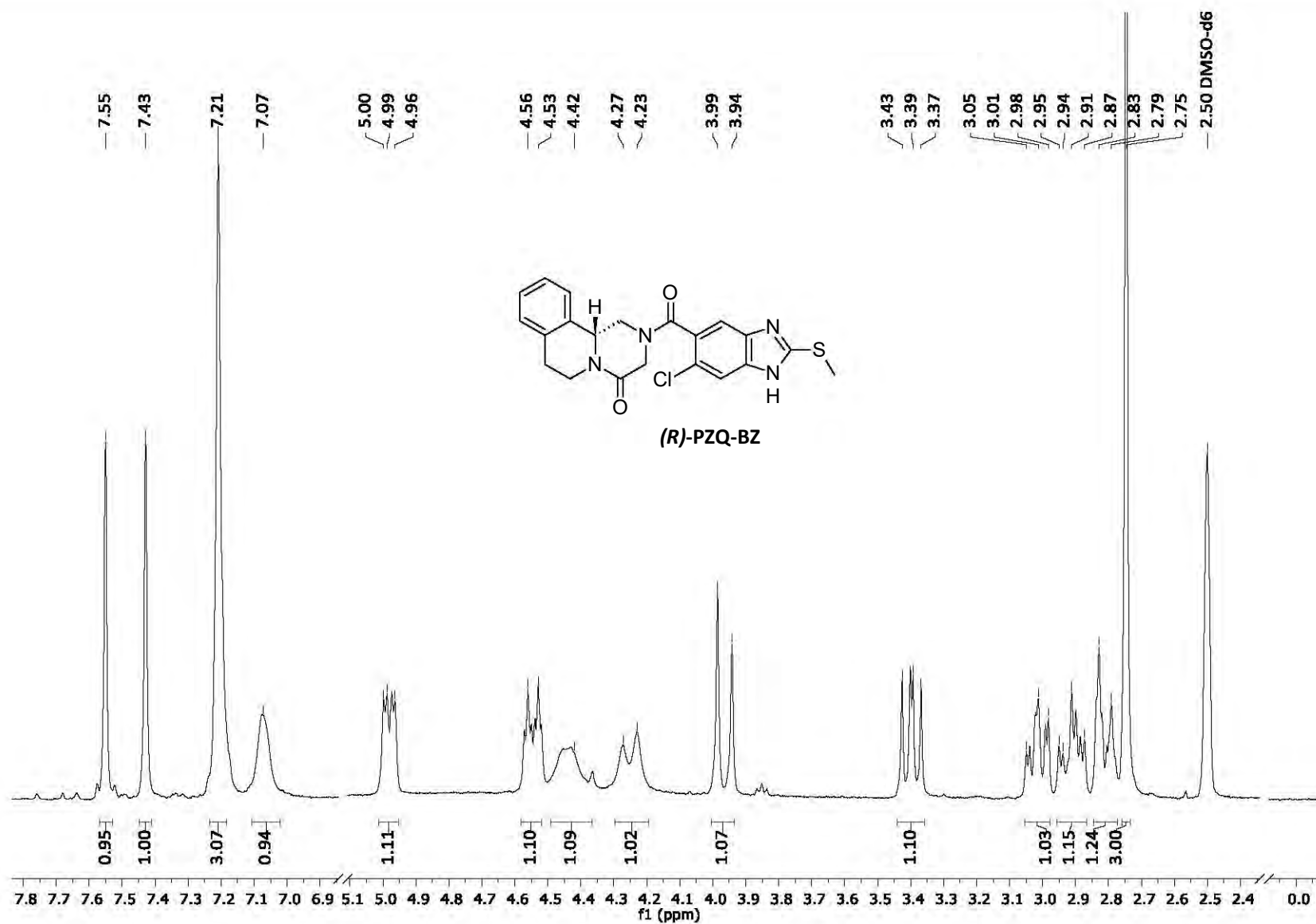
Espectro 11.40. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm) del compuesto fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**20**)



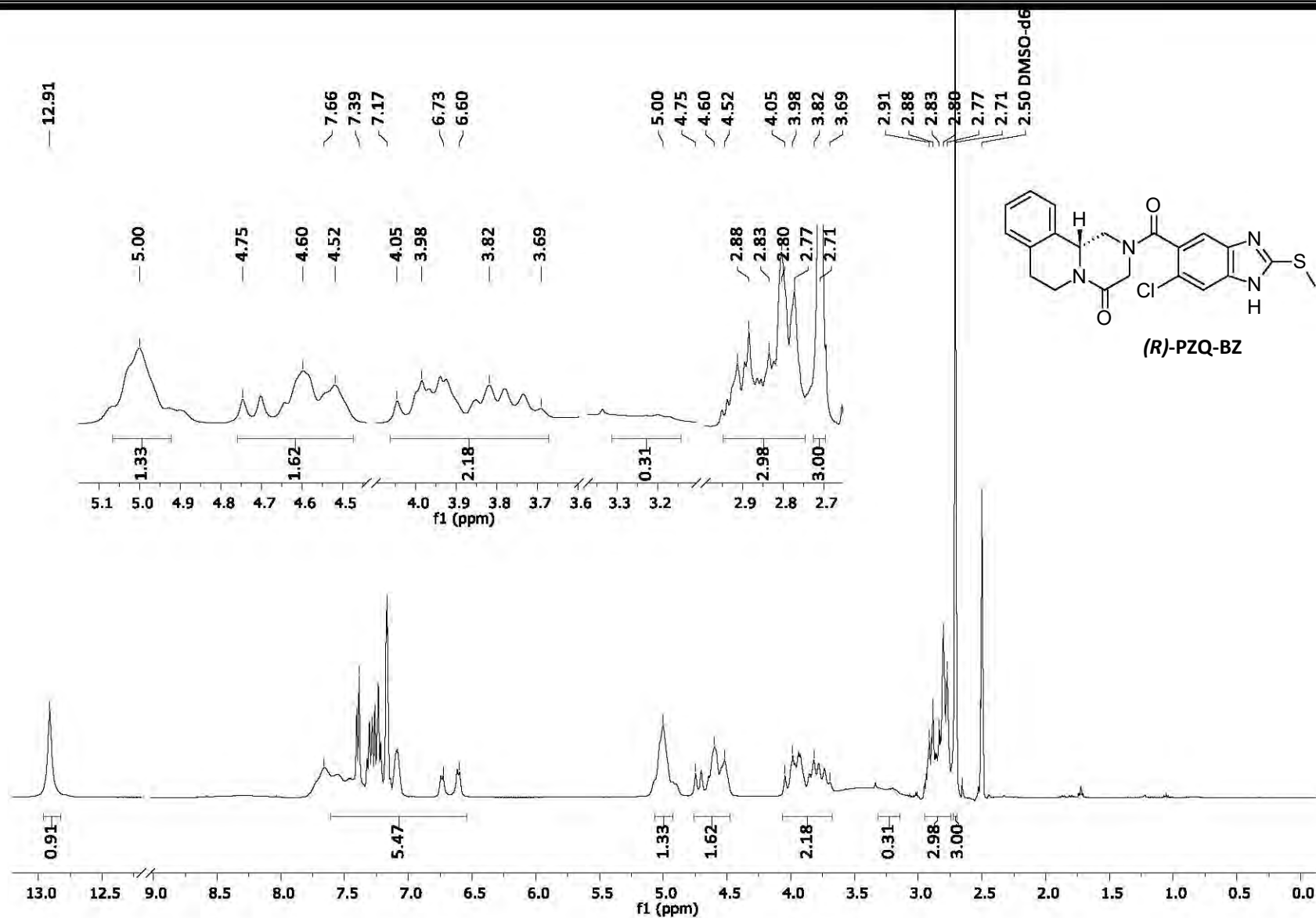
Espectro 11.41. RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ en ppm) del compuesto fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (20)



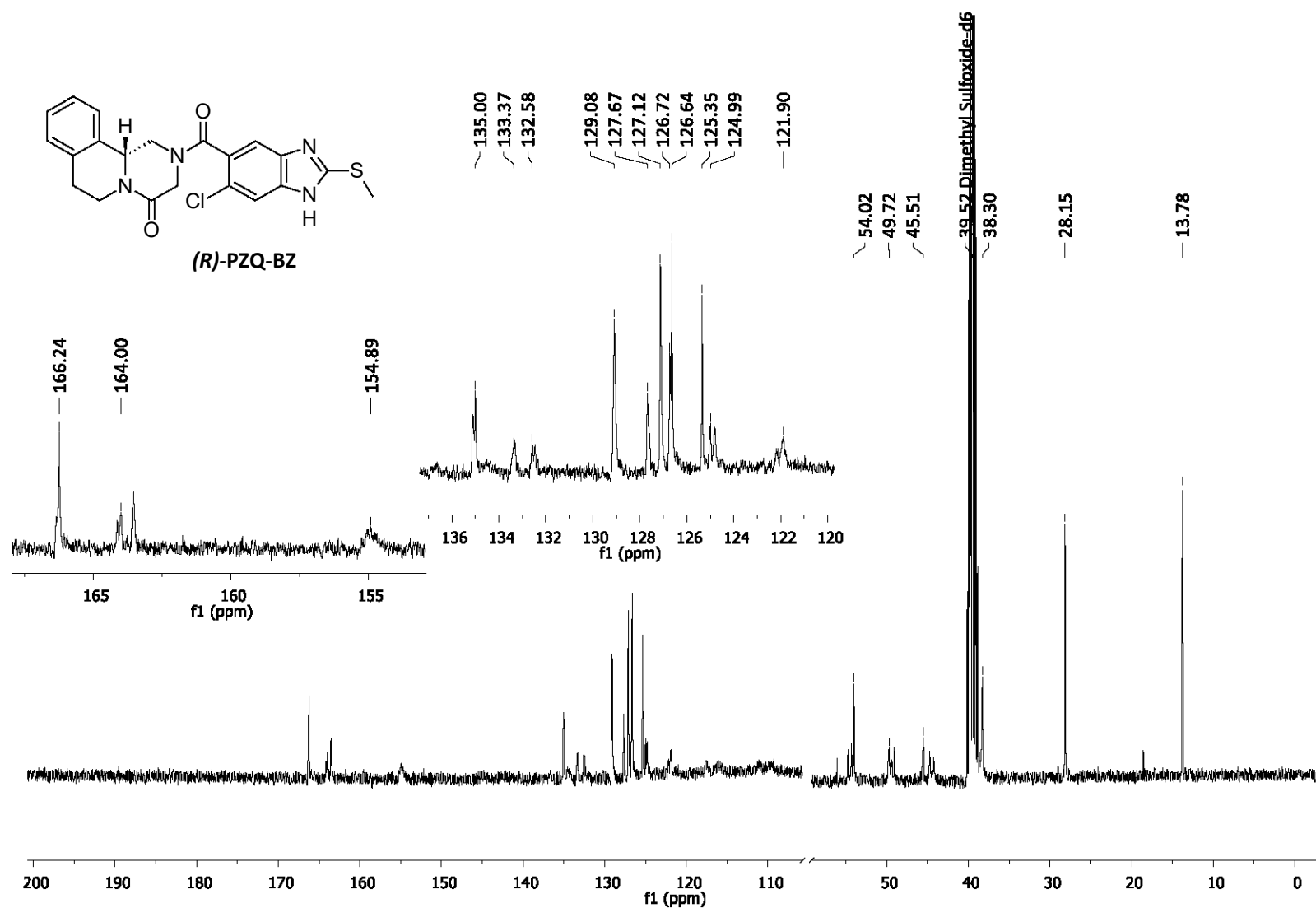
Espectro 11.42. RMN ^{31}P (273 MHz, CDCl_3 , δ en ppm) del compuesto fosfato de di-*tert*-butilclorometilo (**20**)



Espectro 11.43. RMN ^1H (170 °C, 400 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto (11*bR*)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11*b*-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona (*(R)*-PZQ-BZ)



Espectro 11.44. RMN ^1H (26 °C, 400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)



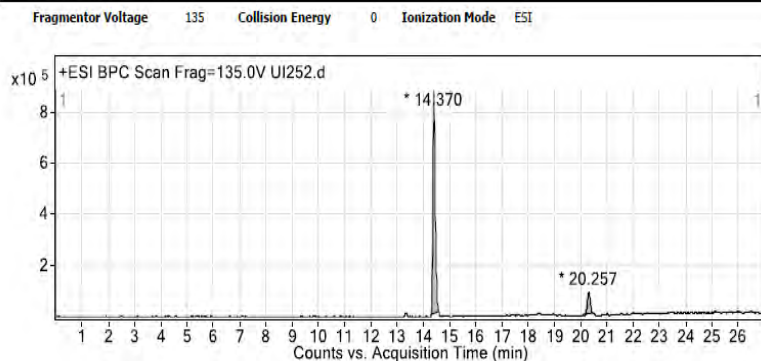
Espectro 11.45. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, δ en ppm) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)

Qualitative Analysis Report

Data Filename: UI252.d Sample Name: PZQBZSEF
 Sample Type: Sample Position: P1-D8
 Instrument Name: USAII_QQQ User Name:
 Acq Method: GRAL_10ACN-A2B1_P.m Acquired Time: 5/17/2018 9:27:05 PM
 IRM Calibration Status: Not Applicable DA Method: ACCESOFARM.m

Comment

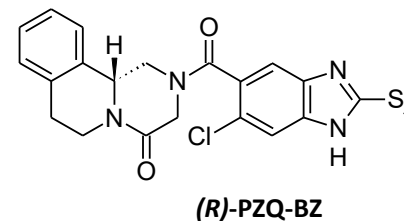
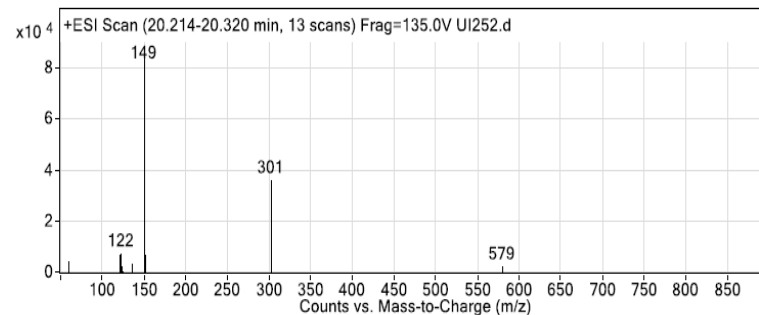
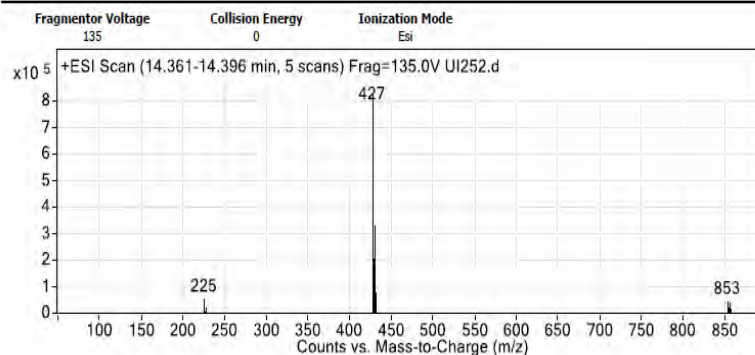
User Chromatograms



Integration Peak List

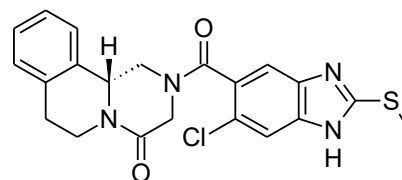
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	14.27	14.37	14.559	874356	5270953	100
2	20.097	20.257	20.464	91026	727808	13.81

User Spectra



Espectro 11.46. HPLC-MS (ESI⁺) del compuesto (11bR)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona ((R)-PZQ-BZ)

Data : Dr Rafael Castillo009 Date : 23-May-2018 16:41
 Instrument : MStation
 Sample : 112 STE-7636 PZQBZ
 Note : -Luis Velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 0.31 min Scan# : (3,8)
 Elements : C 24/0, H 49/0, Cl 2/0, N 5/0, O 3/0, S 2/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 1mmu if m/z > 1
 Unsaturation (U.S.) : 11.0 - 15.0

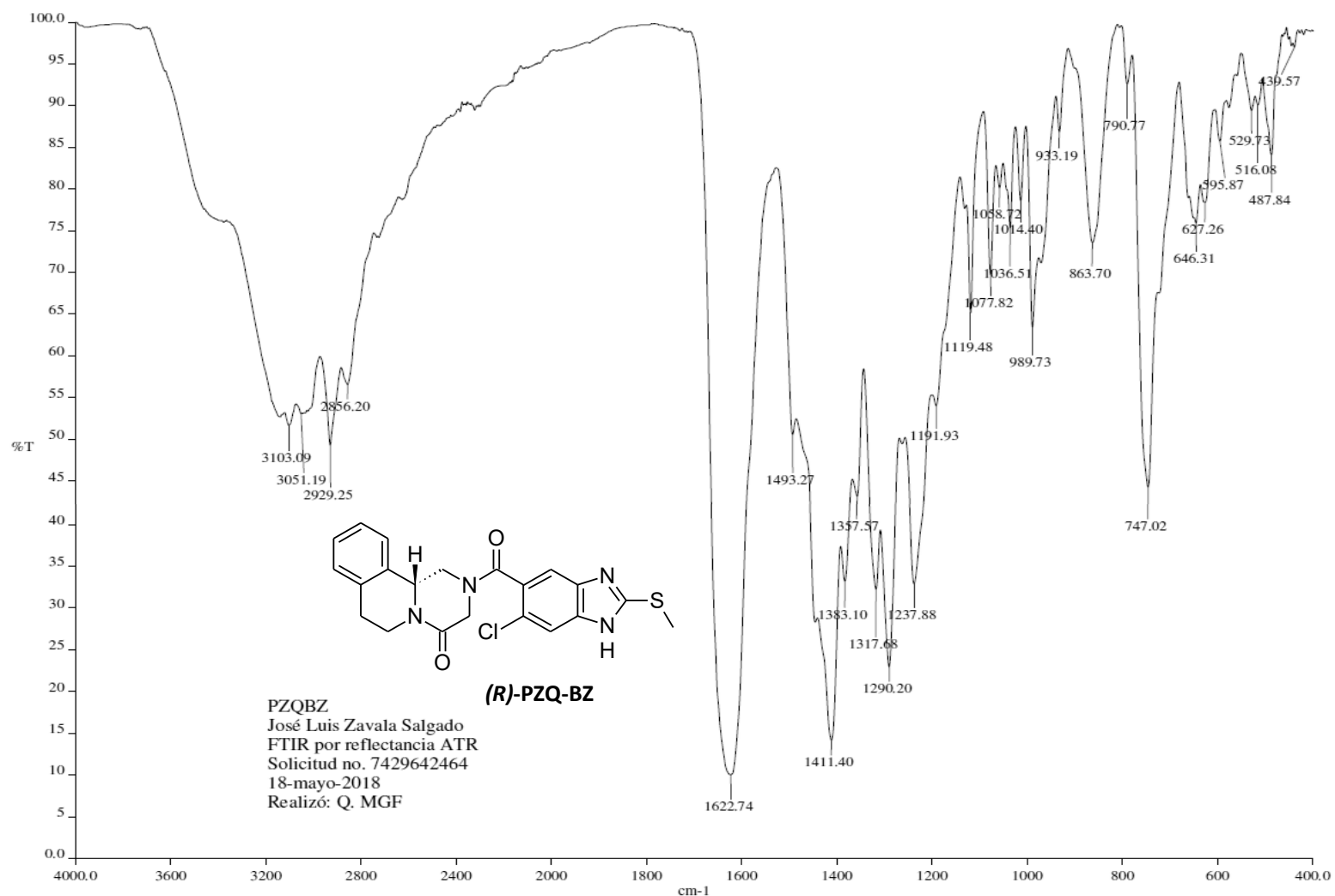


(R)-PZQ-BZ

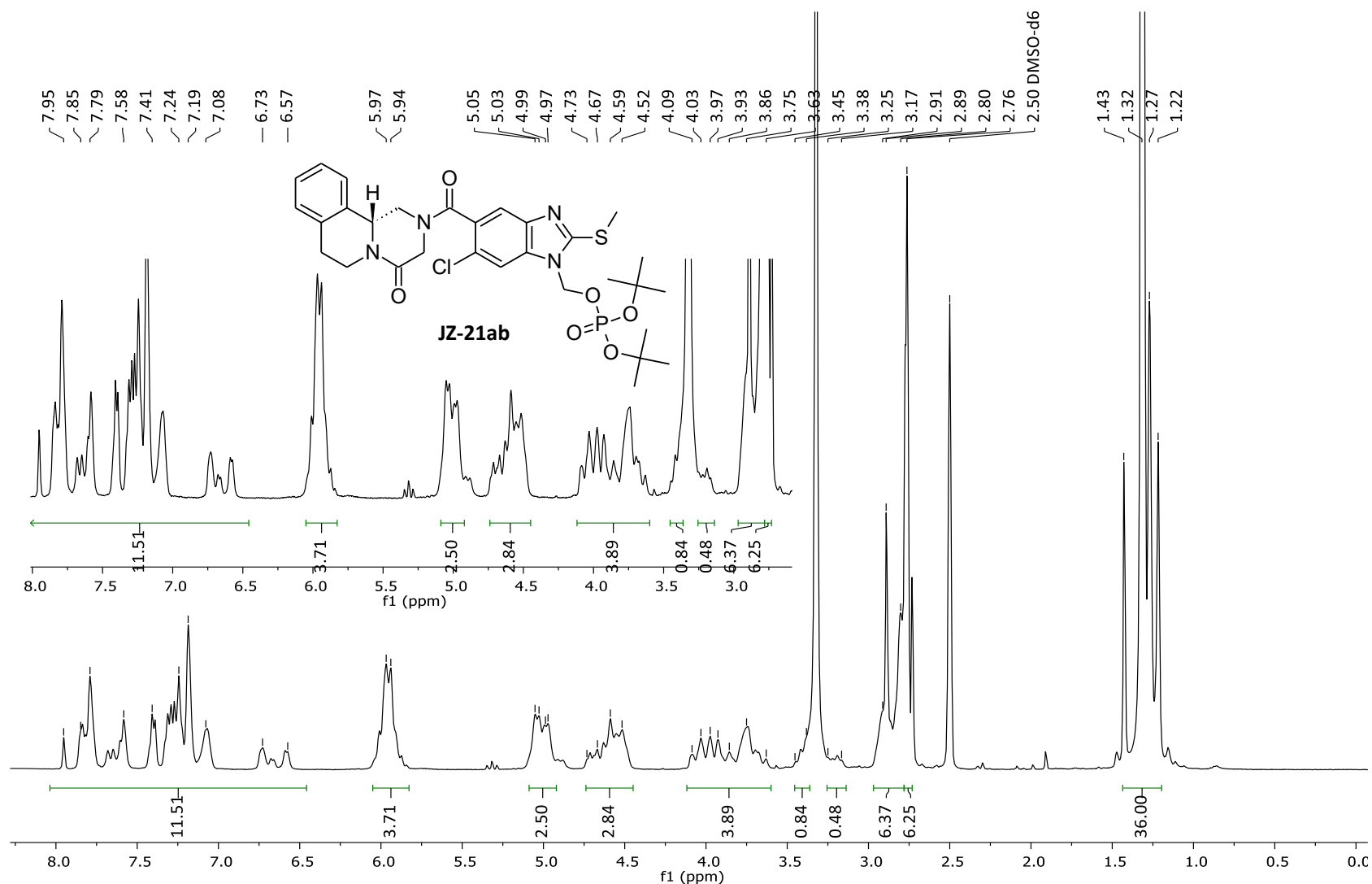
Masa monoisotópica: 426.091724

	Observed m/z	Int%							
	427.0993	73.06							
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	Cl	N	O	S
1	427.0996	-0.6 / -0.3	14.5	21	20	1	4	2	1

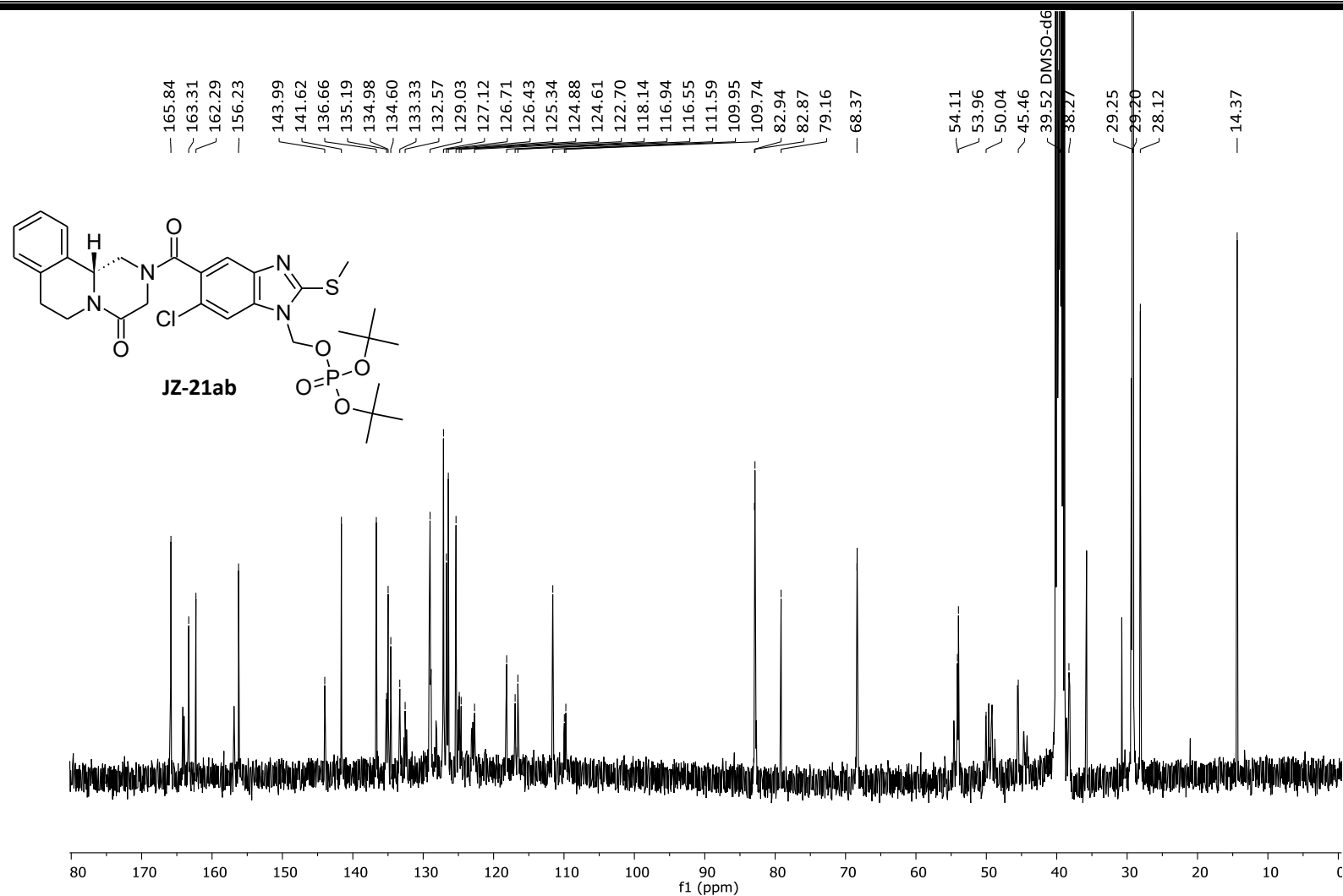
Espectro 11.47. EMAR (FAB⁺, m/z) del compuesto (11b*R*)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11*b*-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona (**(R)-PZQ-BZ**)



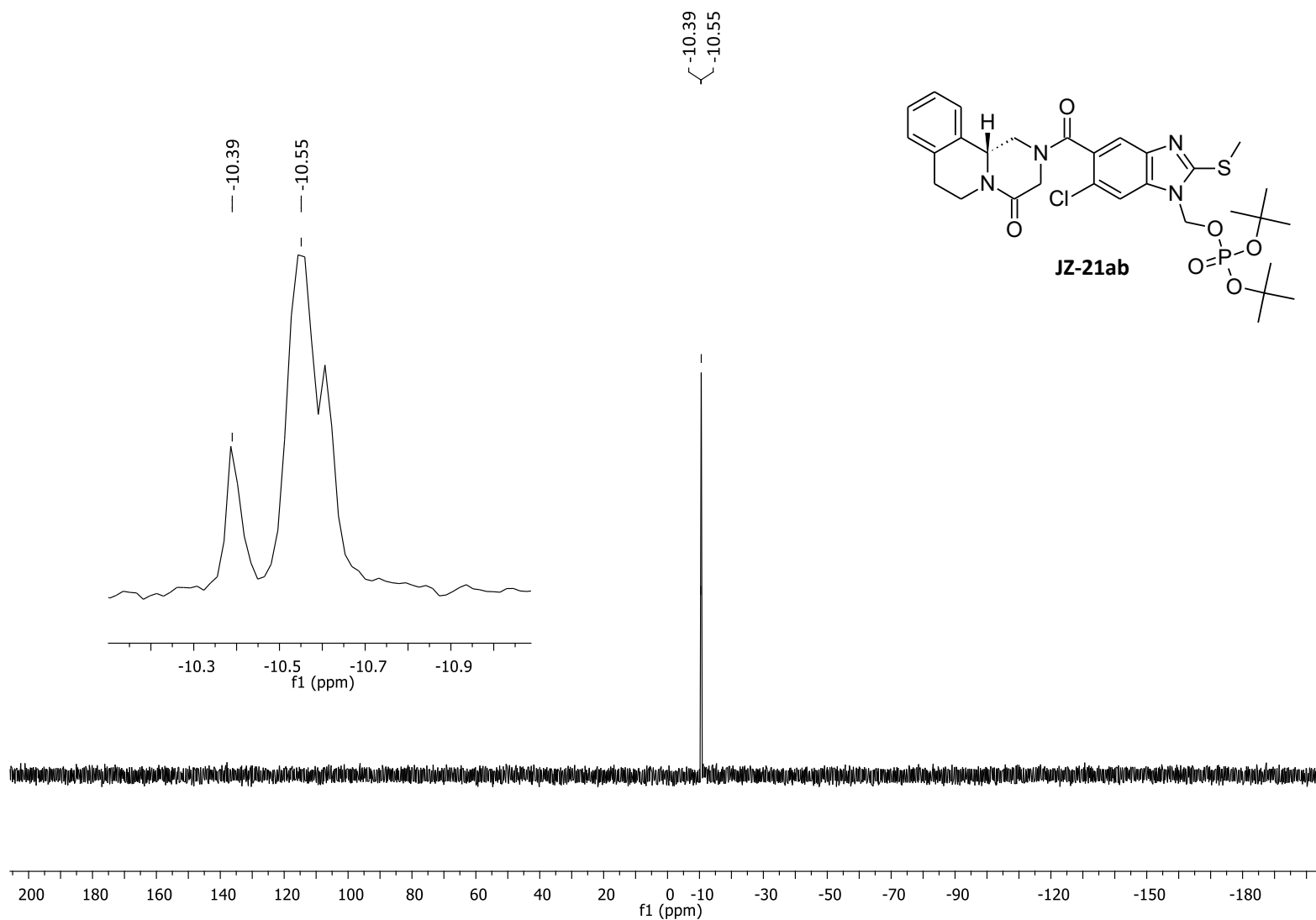
Espectro 11.48. IR (ATR-FT, cm^{-1}) del compuesto (11*bR*)-2-(6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carbonil)-1,2,3,6,7,11*b*-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona ((*R*)-PZQ-BZ)



Espectro 11.49. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*tert*-butilo (**JZ-21a**) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*tert*-butilo (**JZ-21b**)



Espectro 11.50. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ en ppm) del compuesto fosfato de (11*bR*)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metil) di-*tert*-butilo (**JZ-21a**) y fosfato de (11*bR*)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metil) di-*tert*-butilo (**JZ-21b**)



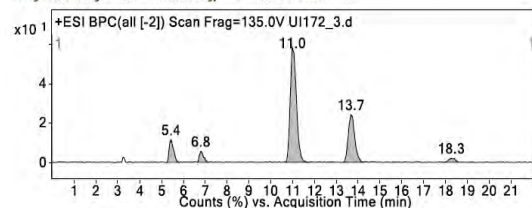
Espectro 11.51. RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6 , δ en ppm) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21a**) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21b**)

Qualitative Analysis Report

Data Filename: UI172_3.d Sample Name: J212ab
 Sample Type: Sample Position: P1-E2
 Instrument Name: USAIL_QQQ User Name:
 Acq Method: ISO_EST+ 50A.m Acquired Time: 07/03/2018 05:07:32 p.m.
 IRM Calibration Status: Not Applicable DA Method: Default.m
 Comment: A

User Chromatograms

Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI

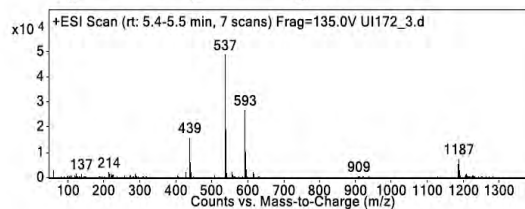


Integration Peak List

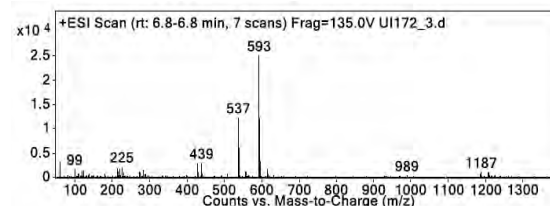
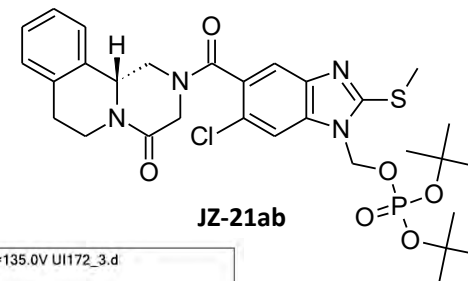
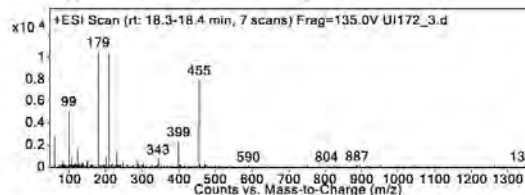
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	5.2	5.4	5.8	47542.03	670697.83	14.1
2	6.6	6.8	7.1	23120.79	318078.46	6.69
3	10.7	11	11.7	242736.46	4756447.04	100
4	13.3	13.7	14.2	100176.41	2069639.29	43.51
5	17.9	18.3	18.6	8518.85	181960.18	3.83

User Spectra

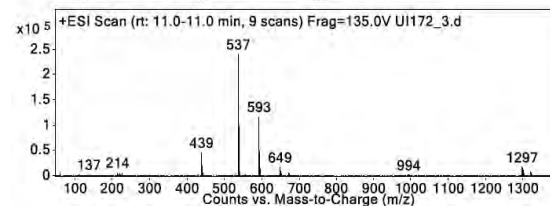
Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI



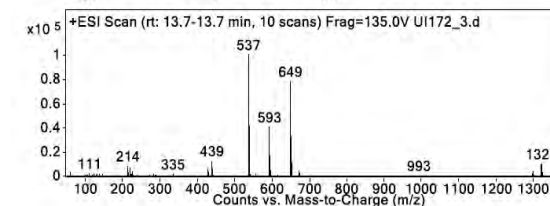
Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI



Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI



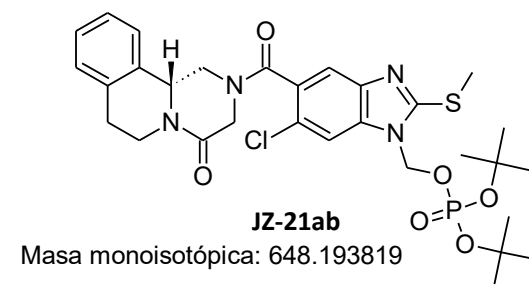
Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI



Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI

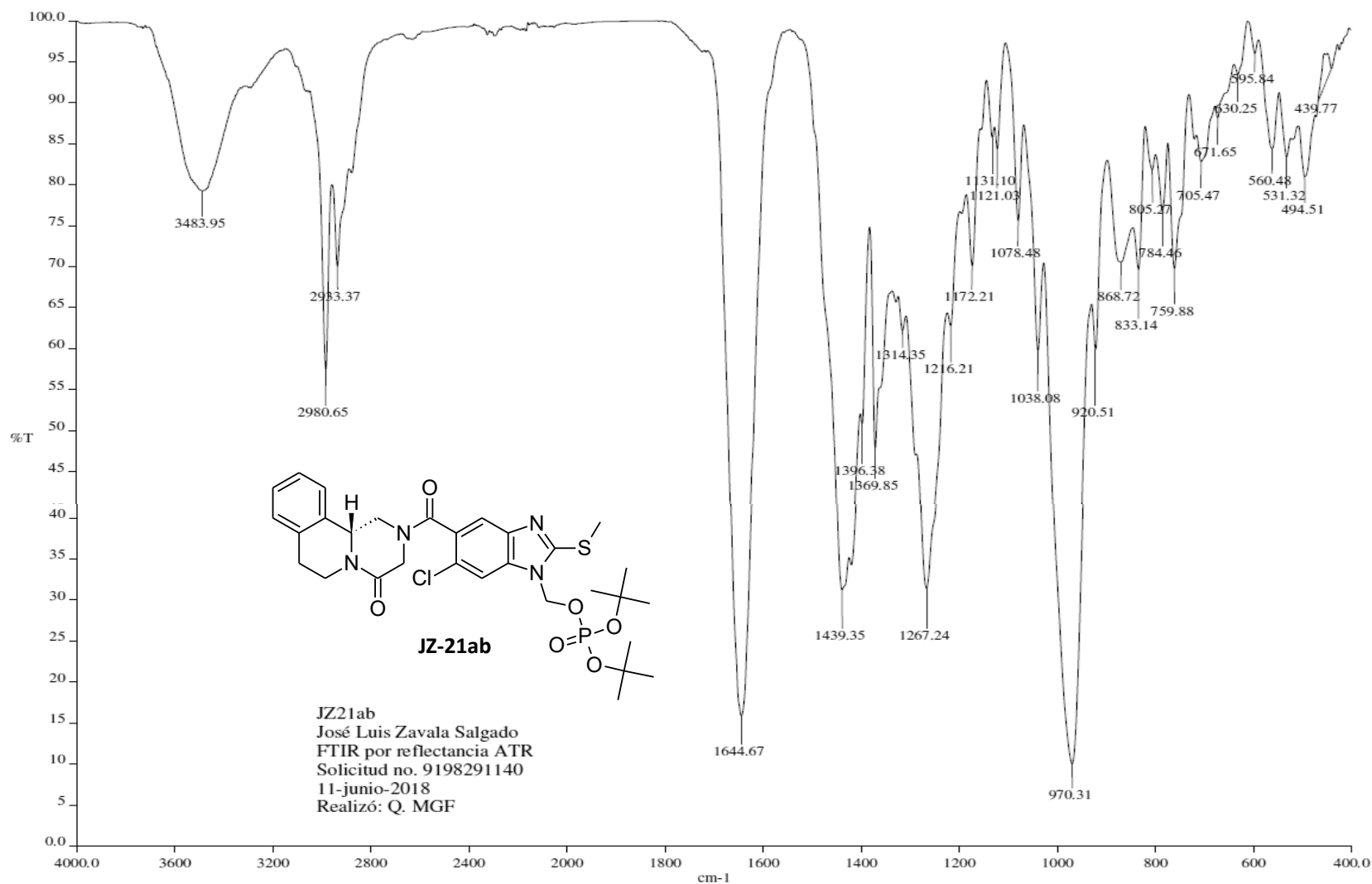
Espectro 11.52. HPLC-MS (ESI⁺) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21a**) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21b**)

Data : Dr Rafael Castillo011 Date : 01-Jun-2018 15:44
 Instrument : MStation
 Sample : STE-7647 JZ21ab
 Note : -Luis Velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 0.47 min Scan# : (5,15)
 Elements : C 31/0, H 49/0, Cl 1/0, N 4/0, O 7/0, P 1/0, S 1/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 2mmu if m/z > 2
 Unsaturation (U.S.) : 7.0 - 45.0

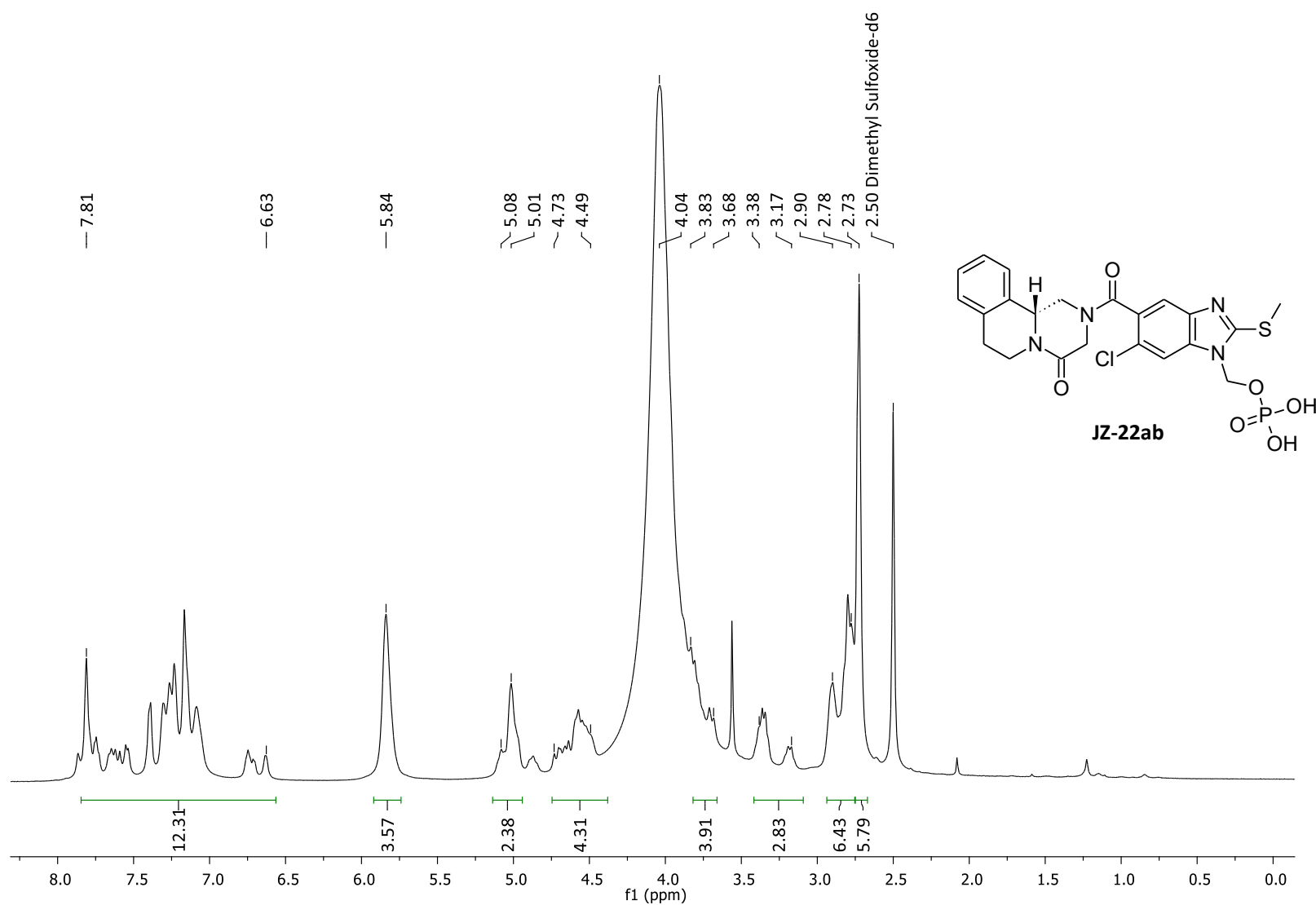


	Observed m/z	Int%								
	649.2024	28.82								
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	Cl	N	O	P	S
1	649.2016	+1.2 / +0.8	15.5	30	39	1	4	6	1	1

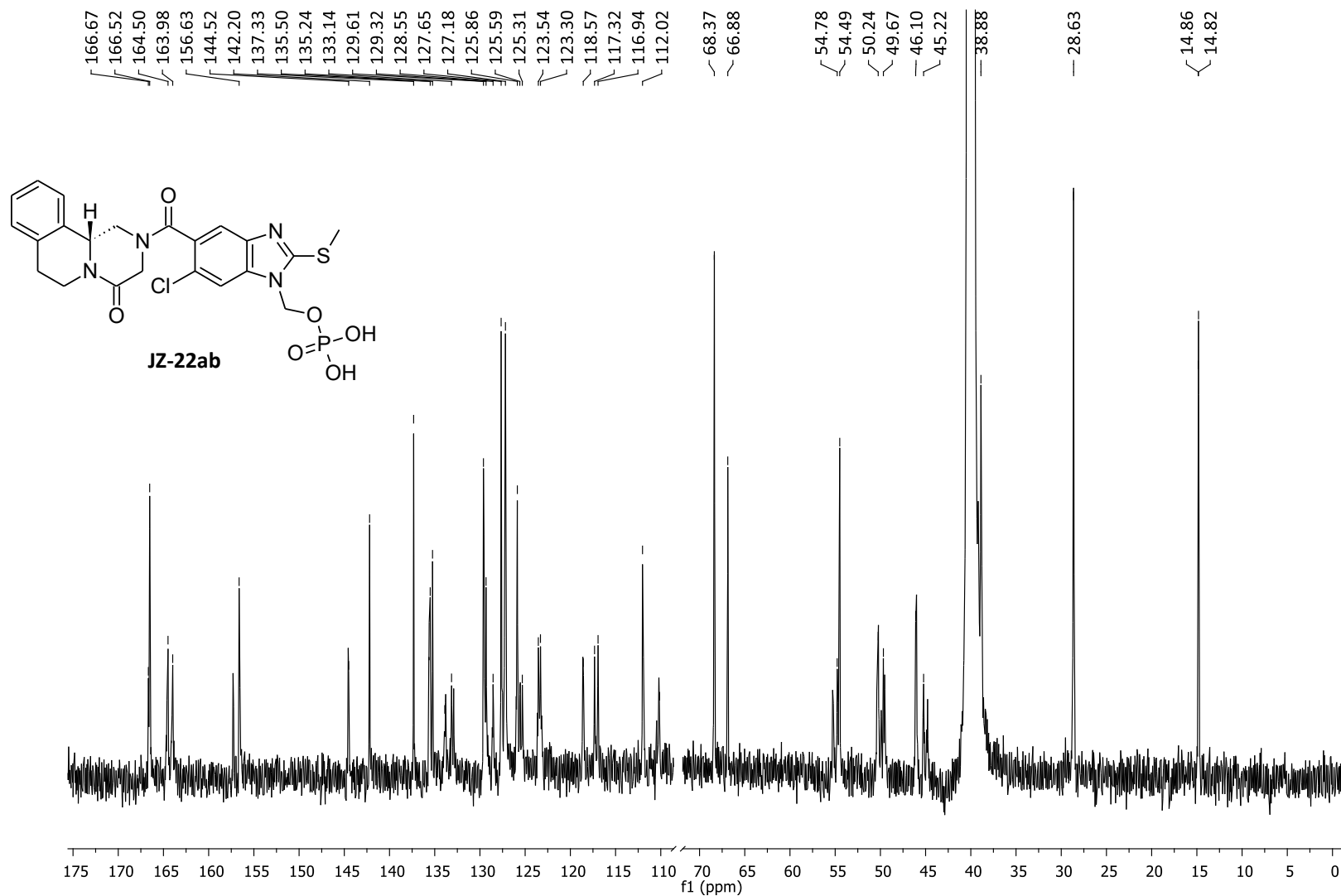
Espectro 11.53. EMAR (FAB⁺, m/z) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21a**) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21b**)



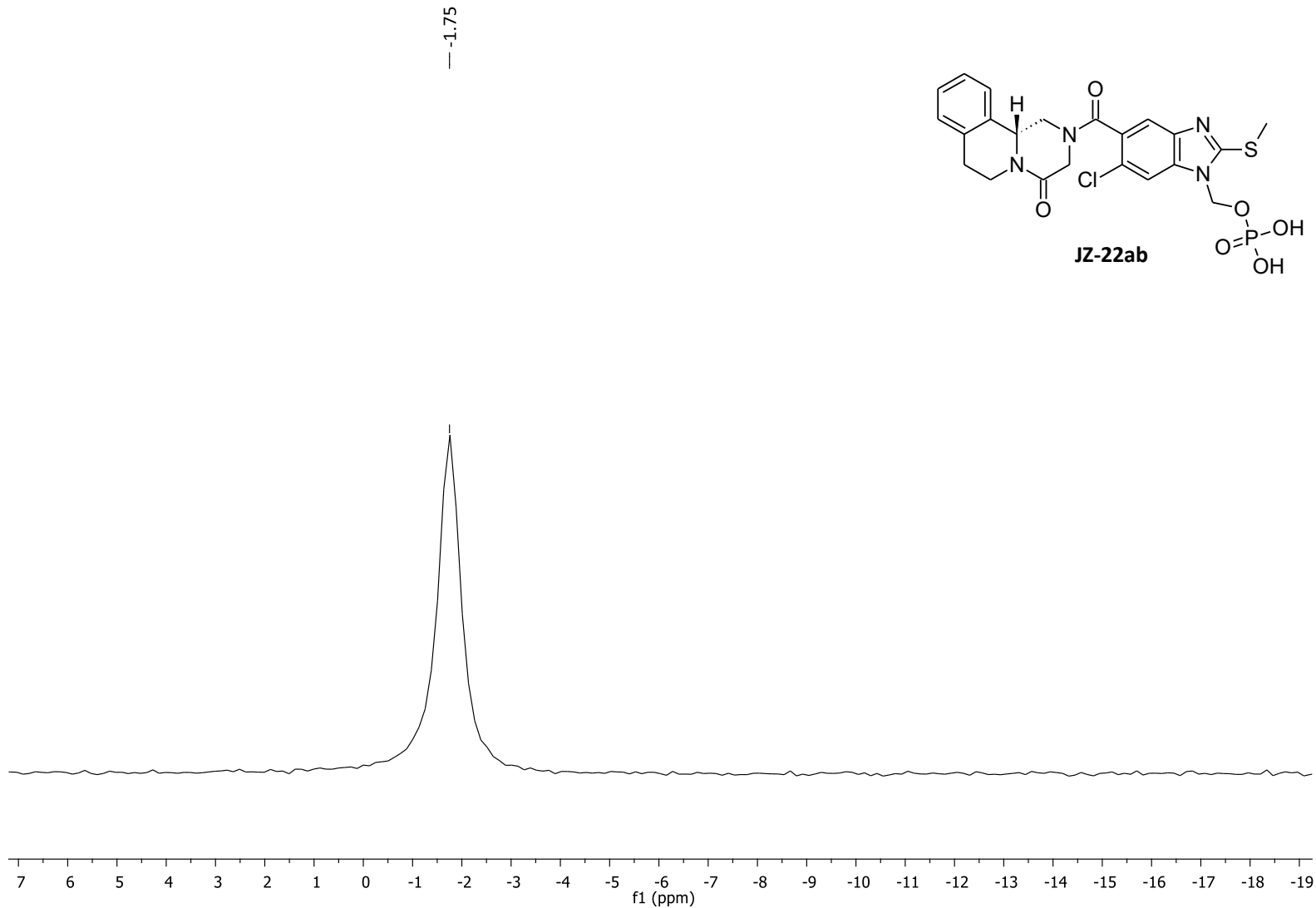
Espectro 11.54. IR (ATR-FT, cm^{-1}) del compuesto fosfato de (11bR)-((6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21a**) y fosfato de (11bR)-((5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metil) di-*terc*-butilo (**JZ-21b**)



Espectro 11.55. RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**)

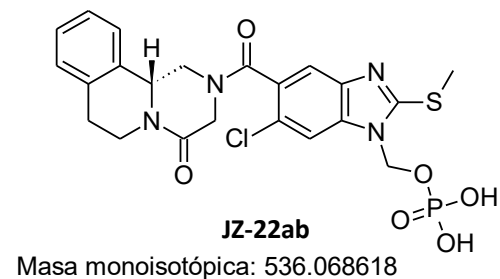
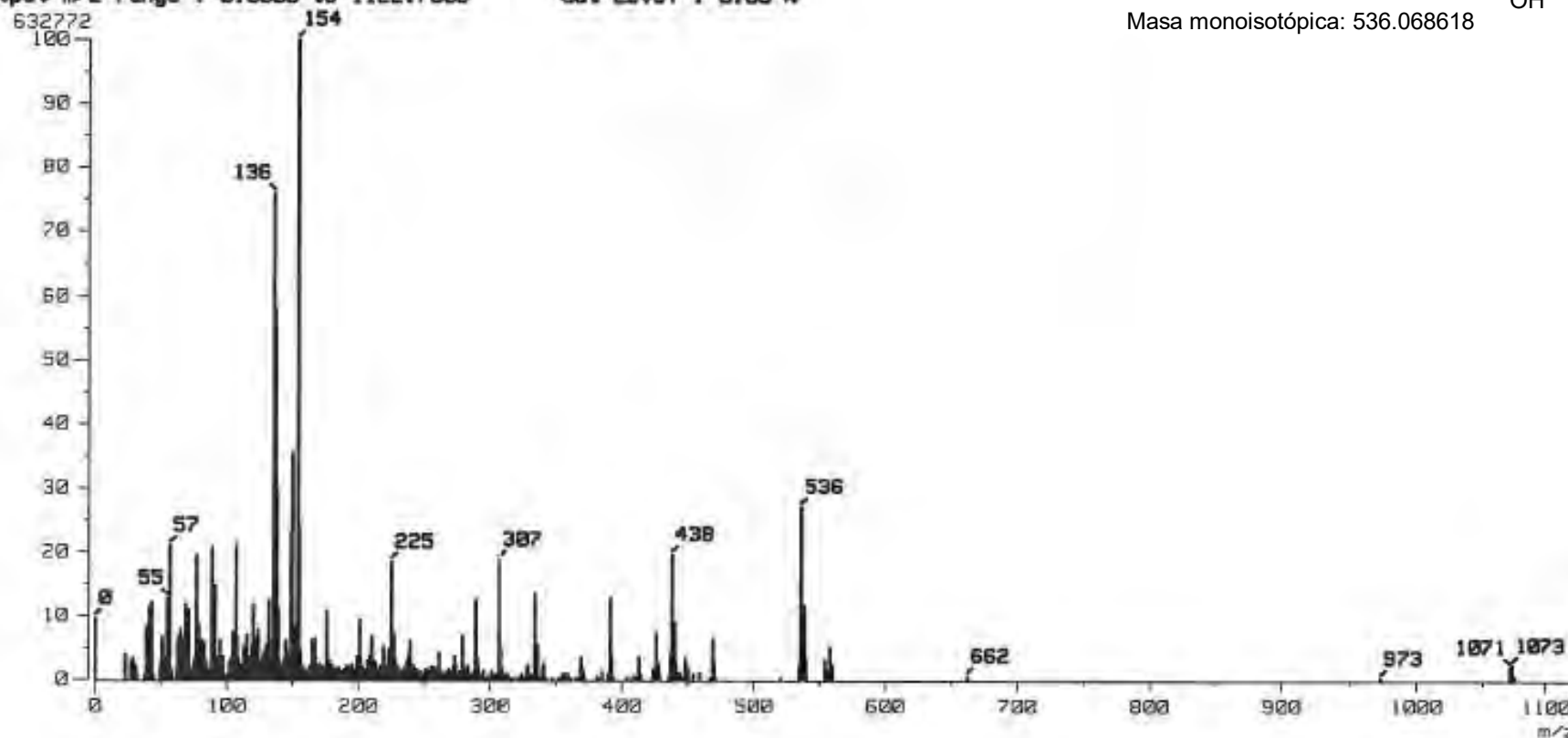


Espectro 11.56. RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**)



Espectro 11.57. RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**)

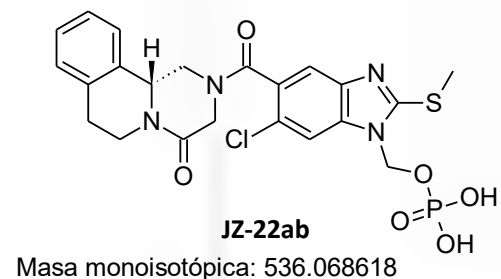
[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Castillo-Rafael-002 Date : 19-Jun-2010 09:01
 Sample: JZ22ab Jeol SX102A
 Note : operadores Javier Perez Carmen Garcia
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.62 min Scan# : (2,5)
 BP : m/z 154.0000 Int. : 60.35
 Output m/z range : 0.0000 to 1122.7003 Cut Level : 0.00 %



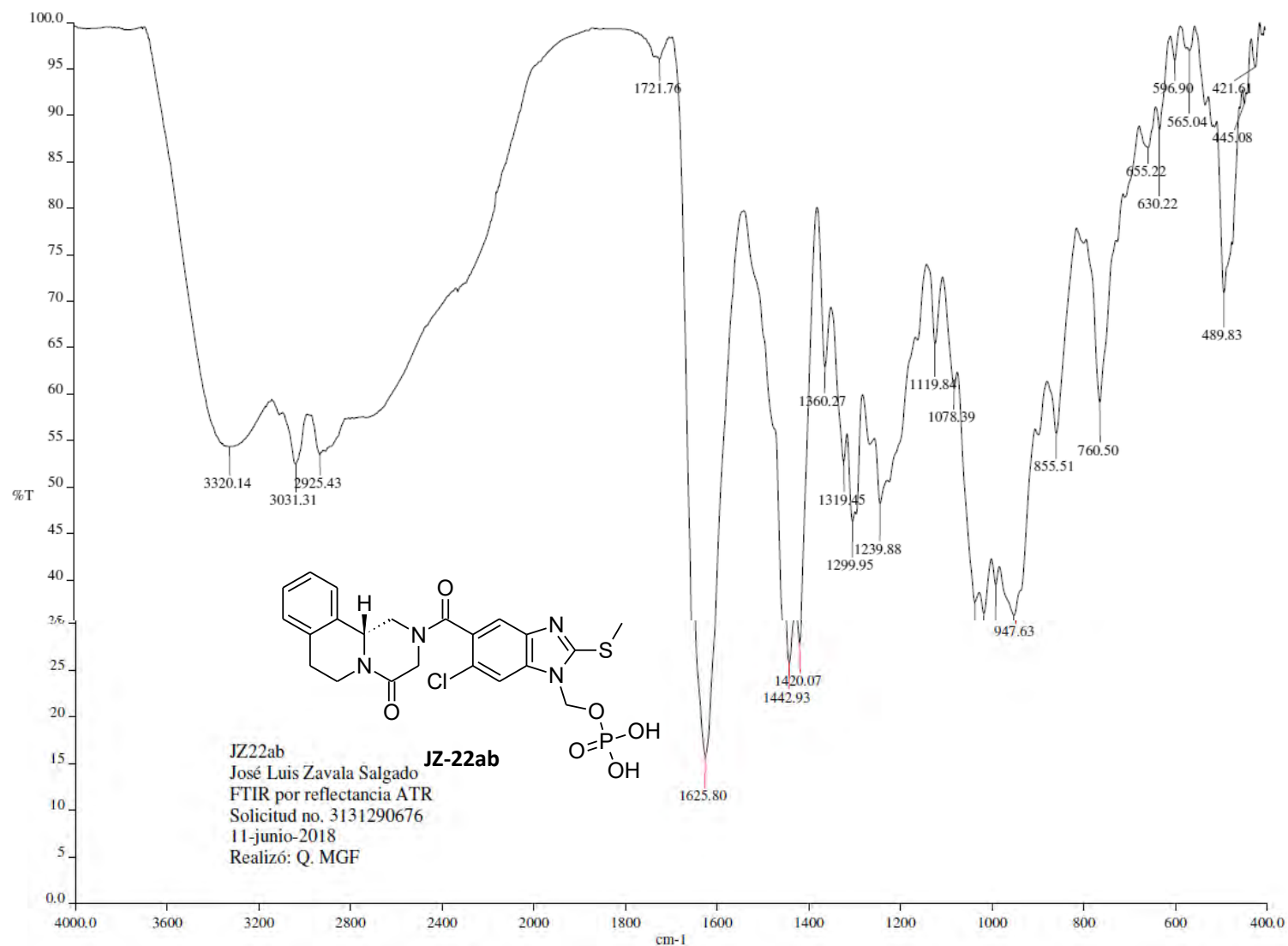
Espectro 11.58. EM (FAB⁺, m/z) del compuesto fosfato diácido de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**)

Data : Dr Rafael Castillo036 Date : 27-Jun-2018 17:23
 Instrument : MStation
 Sample : 119 STE-7648 IZ22ab
 Note : -Luis Velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 6.36 min Scan# : (49,73)
 Elements : C 24/0, H 24/0, Cl 2/1, N 5/0, O 7/0, P 2/1, S 2/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 2mmu if m/z > 2
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 45.0

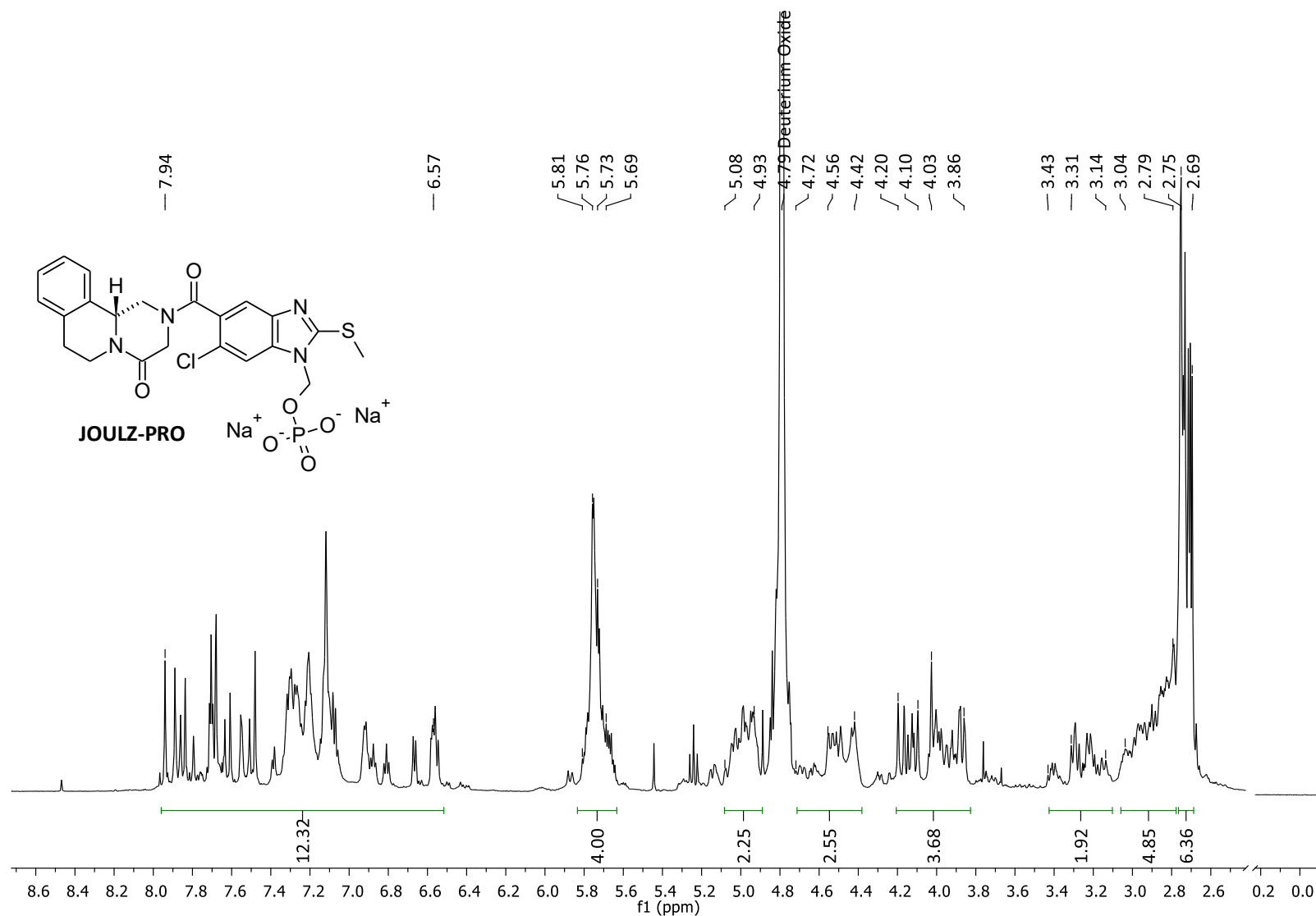
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	Cl	N	O	P	S
537.0774	7.99	537.0764	+1.8 / +1.0	15.5	22	23	1	4	6	1	1



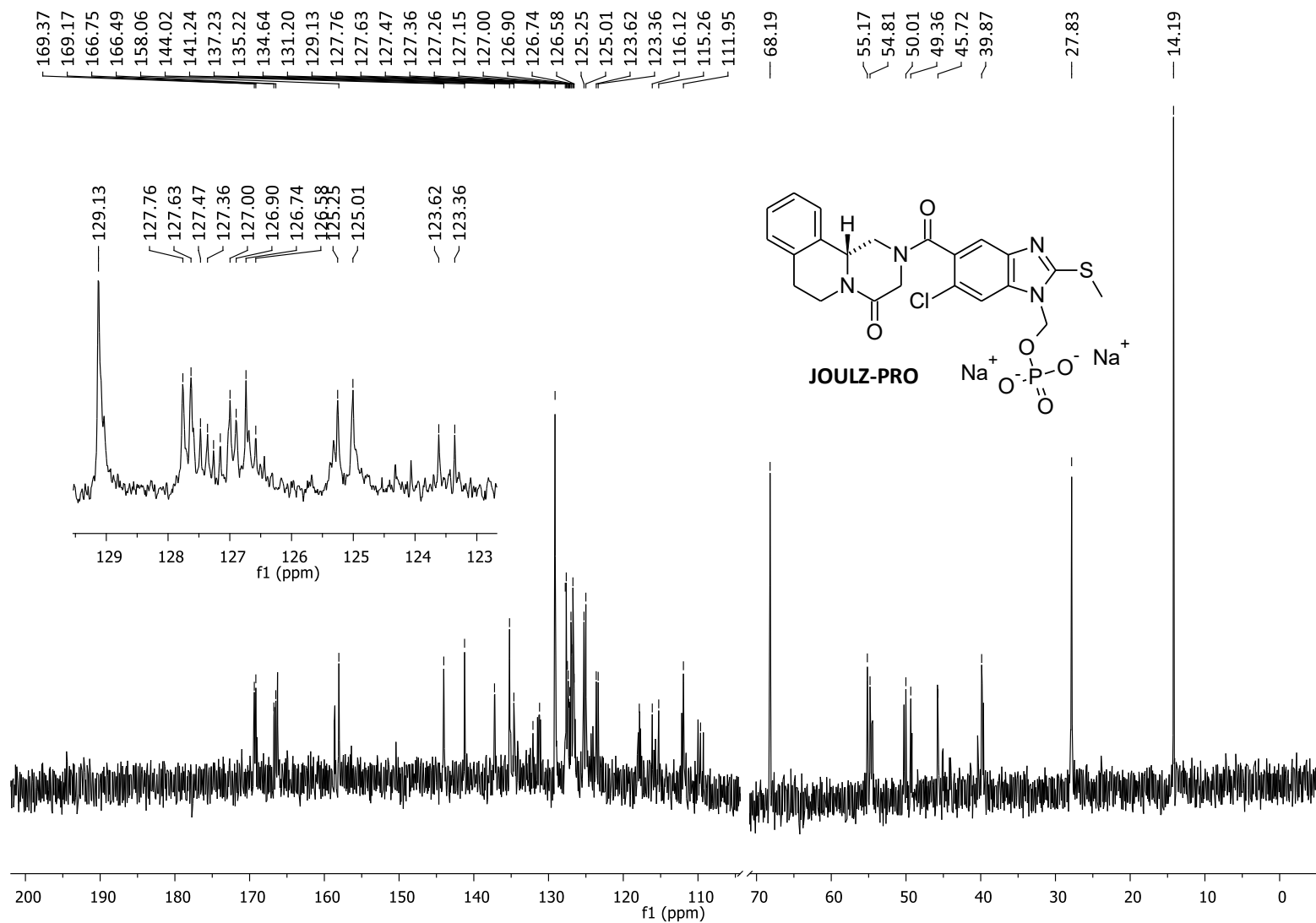
Espectro 11.59. EMAR (FAB⁺, *m/z*) del compuesto fosfato diácido de (11*bR*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11*bR*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**)



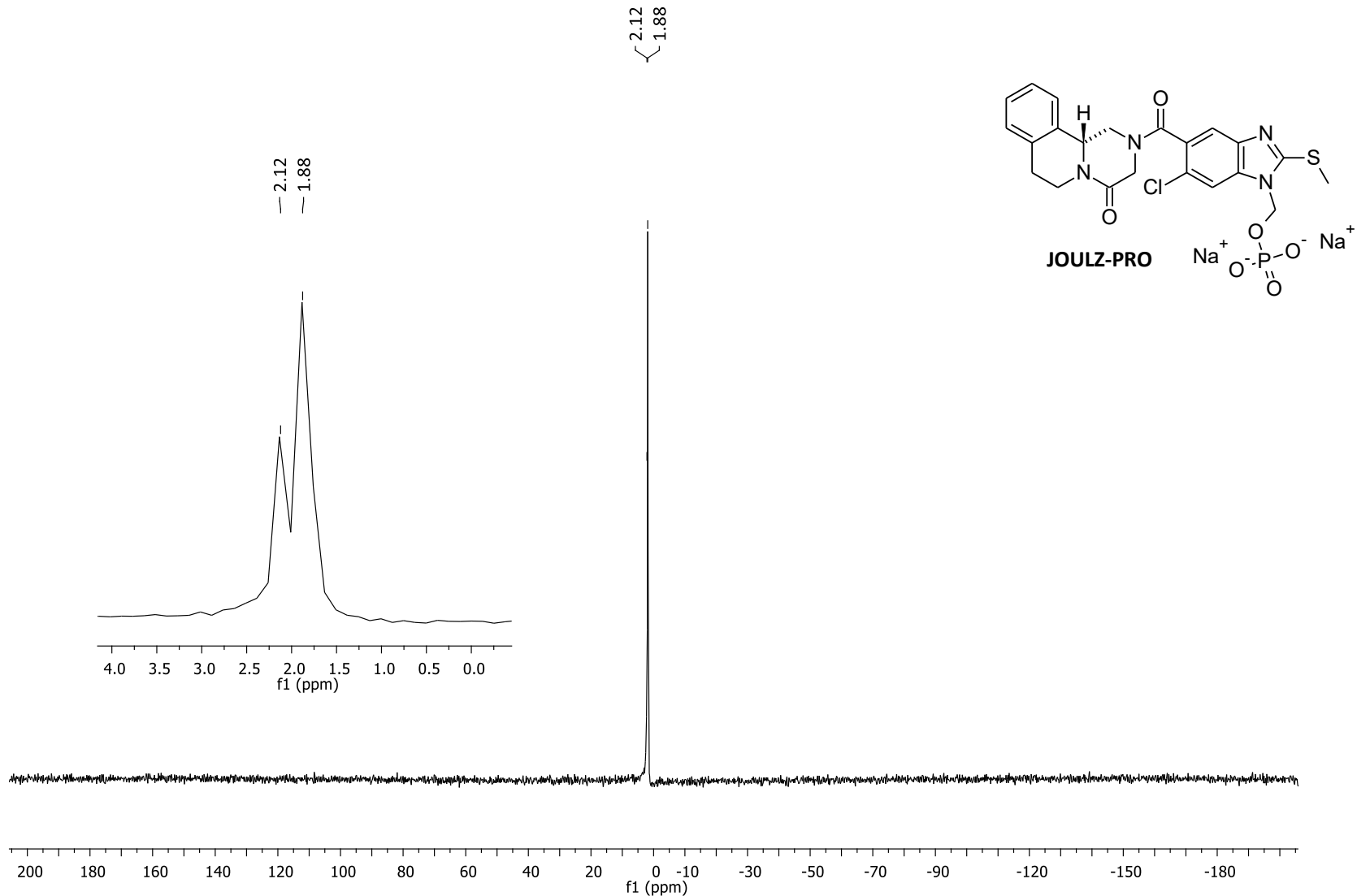
Espectro 11.60. IR (ATR-FT, cm^{-1}) del compuesto fosfato diácido de (11b*R*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22a**) y fosfato diácido de (11b*R*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JZ-22b**)



Espectro 11.61. RMN ^1H (600 MHz, D_2O , δ en ppm) del compuesto fosfato disódico de (11bR)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11bR)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-2-carbonil)-1H-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)



Espectro 11.62. RMN ^{13}C (150 MHz, D_2O , δ en ppm) del compuesto fosfato disódico de (11*R*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11*R*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)



Espectro 11.63. RMN ^{31}P (243 MHz, D_2O , δ en ppm) del compuesto fosfato disódico de (11b*R*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11b*R*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)

Qualitative Analysis Report

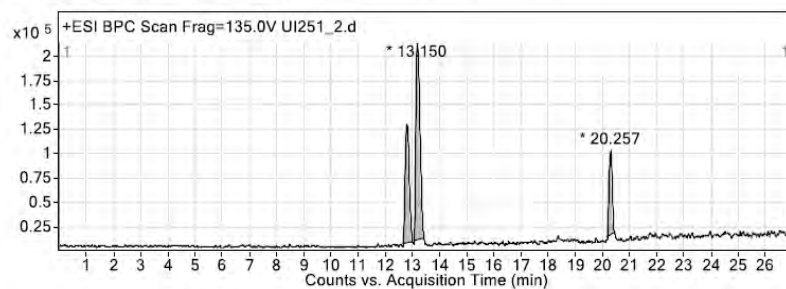
Data Filename: UI251_2.d Sample Name: JOULZPRO
 Sample Type: Sample Position: P1-D7
 Instrument Name: USAII_QQQ User Name:
 Acq Method: GRAL_10ACN-A2B1_P.m Acquired Time: 5/17/2018 8:53:17 PM

IRM Calibration Status: Not Applicable DA Method: ACCESOFARM.m

Comment:

User Chromatograms

Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI

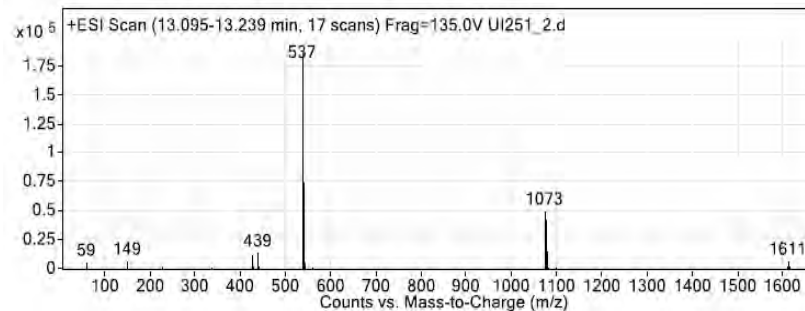
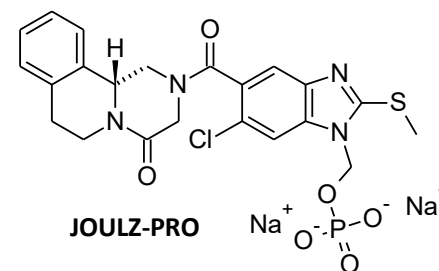
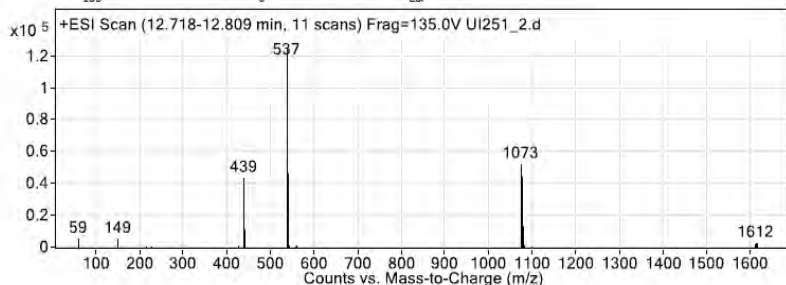


Integration Peak List

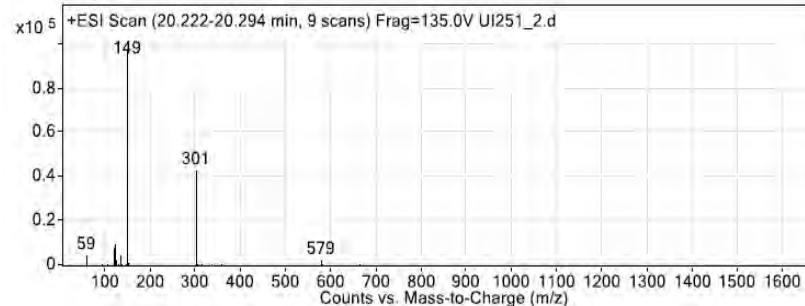
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	12.637	12.754	12.987	121947	1255102	58.48
2	13.041	13.15	13.401	201910	2146095	100
3	20.142	20.257	20.411	87884	681671	31.76

User Spectra

Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI



Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI

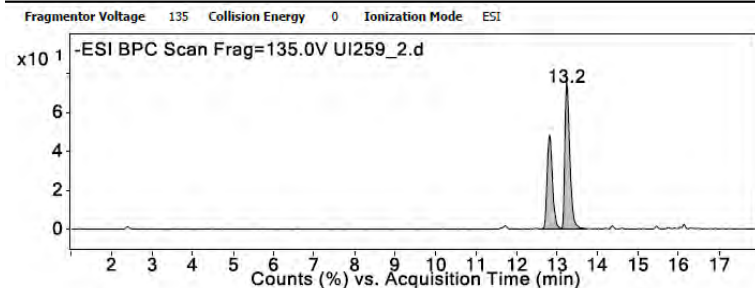


Espectro 11.64. HPLC-MS (ESI⁺) del compuesto fosfato disódico de (11*bR*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11*bR*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)

Qualitative Analysis Report

Data Filename	UI259_2.d	Sample Name	JOULZPRO
Sample Type	Sample	Position	P1-B7
Instrument Name	USAITL_QQQ	User Name	
Acq Method	GRAL_10ACN-A2B1_N.m	Acquired Time	21/05/2018 04:34:30 p.m.
IRM Calibration Status	Not Applicable	DA Method	Default.m

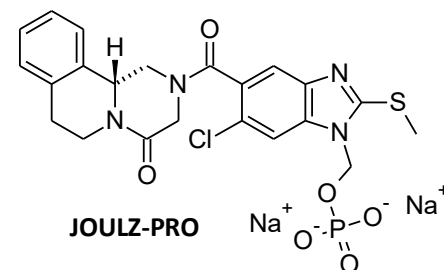
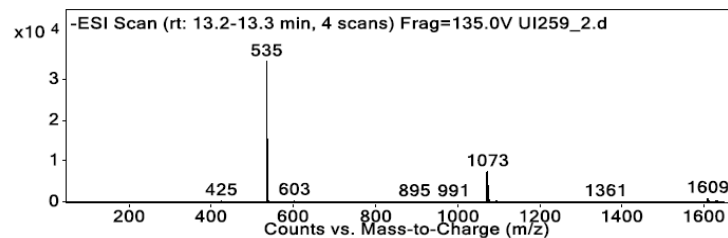
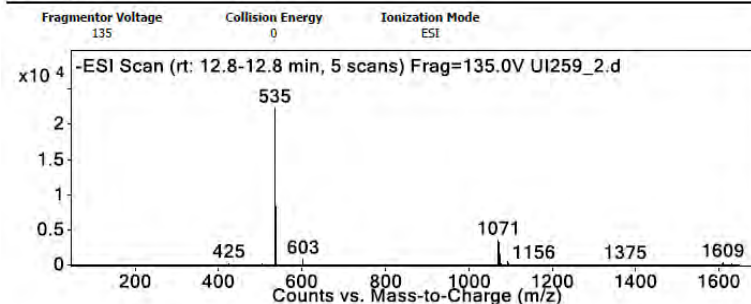
User Chromatograms



Integration Peak List

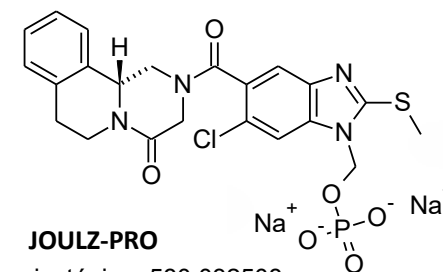
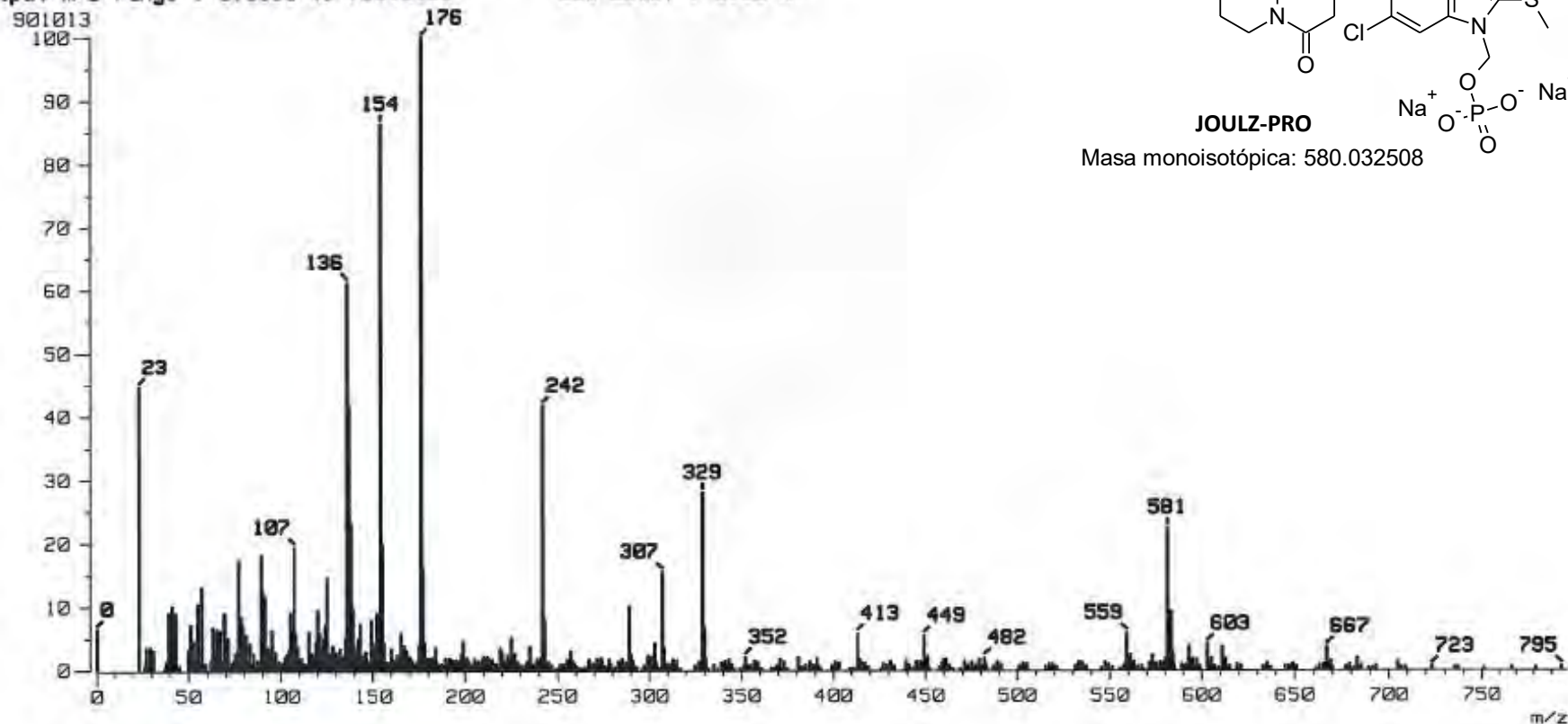
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	12.6	12.8	13.1	22738.04	209299.19	69.08
2	13.1	13.2	13.7	35840.68	302985.31	100

User Spectra



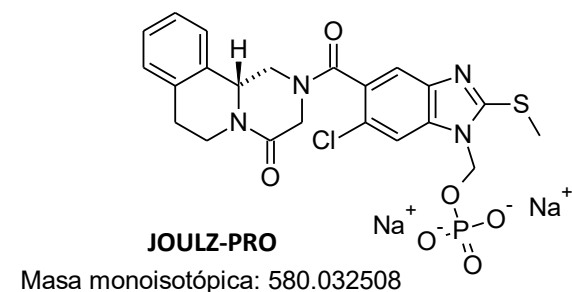
Espectro 11.65. HPLC-MS (ESI⁻) del compuesto fosfato disódico de (11b*R*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11b*R*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)

[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Castillo-Rafael-040 Date : 04-Jun-2018 18:53
 Sample: 123 STE-7655 PRORX68 Jeol SX102A
 Note : operadores Javier Perez -Carmen Garcia
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.62 min Scan# : (2,5)
 BP : m/z 176.0000 Int. : 85.68
 Output m/z range : 0.0000 to 798.5163 Cut Level : 0.00 %



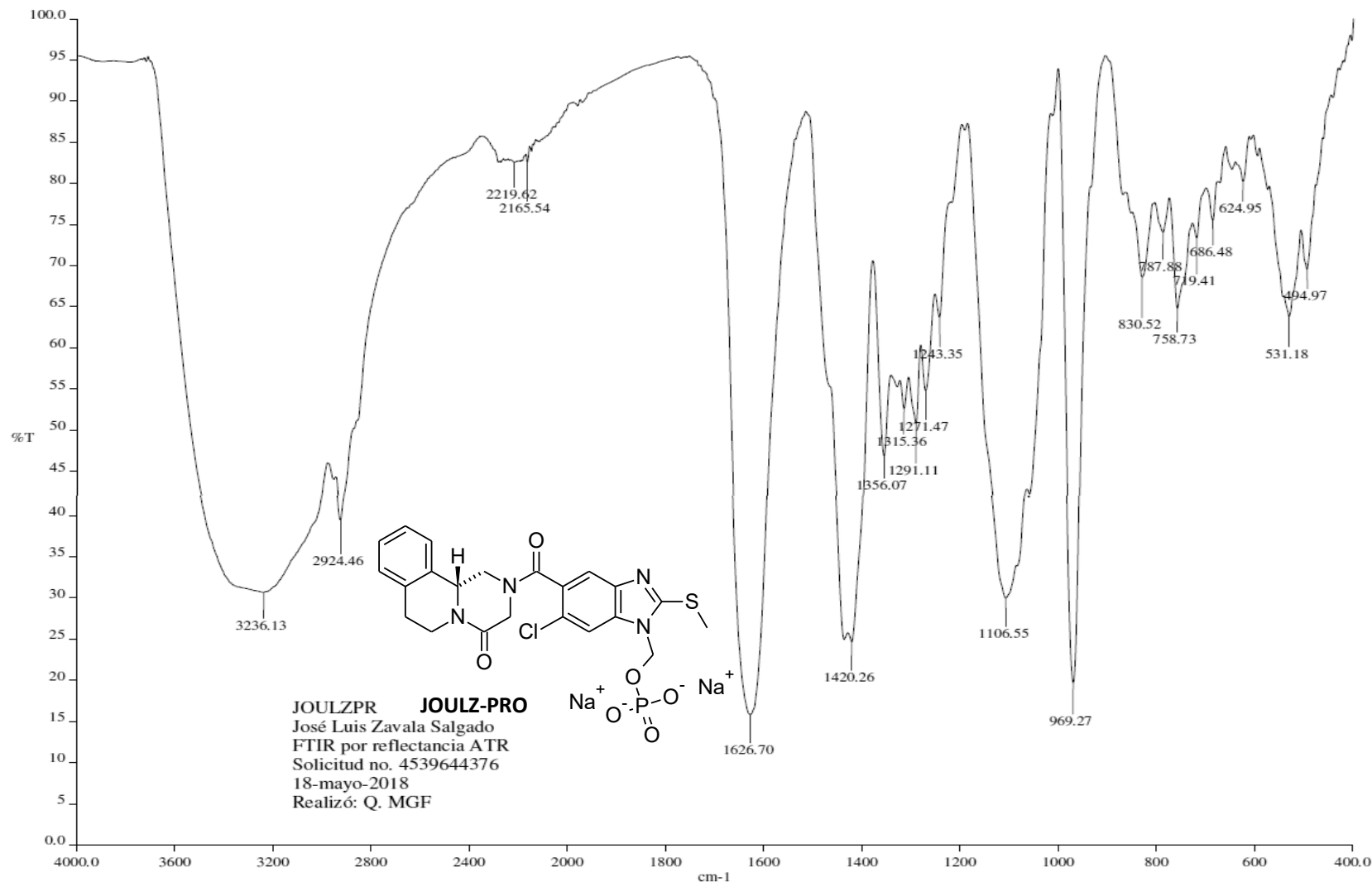
Espectro 11.66. EM (FAB⁺, *m/z*) del compuesto fosfato disódico de (11*bR*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11*bR*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)

Data : Dr Rafael Castillo010 Date : 23-May-2018 16:54
 Instrument : MStation
 Sample : 111 STE-7635 JOsLPRO
 Note : -Luis Velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 0.63 min Scan# : (6,11)
 Elements : C 24/0, H 49/0, Cl 2/0, N 5/0, O 7/0, P 1/1, S 1/0, Na 3/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 1mmu if m/z > 1
 Unsaturation (U.S.) : 14.0 - 16.0



Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	Cl	N	O	P	S	Na
581.0401	6.84	581.0403	-0.4 / -0.2	15.5	22	21	1	4	6	1	1	2

Espectro 11.67. EMAR (FAB⁺, m/z) del compuesto fosfato disódico de (11b*R*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11b*R*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)



Espectro 11.68. IR (ATR-FT, cm⁻¹) del compuesto fosfato disódico de (11*R*)-(6-cloro-2-(metiltio)-5-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo y fosfato disódico de (11*R*)-(5-cloro-2-(metiltio)-6-(4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidro-2*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-2-carbonil)-1*H*-bencimidazol-1-il)metilo (**JOULZ-PRO**)