



7
00582
2E
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION DE DERIVADOS HIDROSOLUBLES
DEL ALBENDAZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(F A R M A C I A)
P R E S E N T A :
M. en C. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

BAJO LA DIRECCION DEL:

DR. RAFAEL CASTILLO



CIUDAD UNIVERSITARIA,

274557

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

PASINACION

DISCONTINUA.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	DRA. HELGI JUNG COOK <i>Facultad de Química, UNAM.</i>
PRIMER VOCAL	DR. EUGENE A. BRATOEFF TITEFF <i>Facultad de Química, UNAM.</i>
SEGUNDO VOCAL	DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN <i>Instituto de Fisiología Celular, UNAM.</i>
TERCER VOCAL	DRA. LILIÁN YEPEZ MULÍA <i>Hospital de Pediatría, IMSS-Siglo XXI</i>
SECRETARIO	DR. RAYMUNDO CRUZ ALMANZA <i>Instituto de Química, UNAM.</i>
PRIMER SUPLENTE	DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO <i>Facultad de Química, UNAM.</i>
SEGUNDO SUPLENTE	DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE <i>Facultad de Veterinaria, UNAM.</i>

RECONOCIMIENTOS

A la UNAM porque me ha dado la oportunidad de crecer en la adquisición de conocimientos, aprender de mis maestros, convivir con mis compañeros, y participar en el proceso enseñanza-aprendizaje de estudiantes que comparten la misma vocación farmacéutica.

A Blanca Estela porque sin necesidad de promesas pasajeras, hemos comulgado incontables momentos compartidos.

Al Dr. Rafael Castillo, por permitirme compartir, en el campo profesional, sus conocimientos y experiencias en la preparación de compuestos, y en el campo humano, su afición por la fotografía y la música.

AGRADECIMIENTOS

- A los miembros del jurado por sus observaciones, críticas y sugerencias al manuscrito de la presente tesis.
- A la profesora Alicia Hernández Campos por su amistad, sugerencias y valiosas observaciones en la realización del trabajo cotidiano.
- A la Dra. Lilián Yopez Mulía, Raúl Morales del Hospital de Pediatría del IMSS-Siglo XXI, por su colaboración en el manejo y la evaluación de los compuestos contra Trichinella spiralis.
- A la Dra. Helgi Jung y a Manuel Morales, de la Facultad de Química, UNAM, porque me permitieron realizar experimentos en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución y utilizar el procedimiento analítico validado del albendazol.
- Al Dr. Edgardo Escamilla Marván, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, porque me permitió trabajar en su laboratorio para la realización de los experimentos con bacterias.
- Al personal de la USAI de la Fac. Química, UNAM., por su apoyo: las profesoras Maricela Gutierrez y Graciela Chávez por el registro de los espectros de infrarrojo; a la profesora Georgina Duarte por el registro de los espectros de masas; a la profesora Rosa Isela del Villar, por su dedicación en la realización de experimentos en el espectrómetro de resonancia magnética nuclear. Al personal del Instituto de Química, UNAM, por el registro de espectros de resonancia protónica.
- A los alumnos que han compartido conmigo su trabajo de servicio social, tesis, estancia en el laboratorio 122 y actividades docentes en toxicología. ¡Gracias por su confianza y amistad!

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se sintetizaron dos grupos de profármacos del albendazol (**1**) para incrementar la solubilidad acuosa de este antihelmíntico. Los compuestos sintetizados fueron diseñados bajo las variantes de bioprecusores y derivados biorreversibles. Para el primer grupo, se prepararon dos compuestos: N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-6-propiltio)fenil]tiourea (**2**) y N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil]tiourea (**3**). Estos bioprecusores presentaron el doble de solubilidad que **1**; cuando **2** y **3** se administraron a ratas y ratones por vía oral, se demostró por HPLC que generaron a **1**, aunque no con eficiencia satisfactoria. Esta biotransformación también se presentó al colocar a los bioprecusores en contacto con microorganismos de la flora intestinal. Cuando se evaluó la actividad antihelmíntica de **2** y **3** contra *T. spiralis*, los bioprecusores fueron activos contra organismos adultos y pre-adultos, afectando la fertilidad del adulto hembra; sin embargo, no se observó actividad contra la fase sistémica del parásito. El otro grupo sintetizado fue el de los derivados biorreversibles, donde tres de los 9 compuestos sintetizados, mostraron las mayores solubilidades. Estos compuestos fueron: 1-Acetil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (**10**); 1-Etoxicarbonil-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (**13a**); 1-Etoxicarbonil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (**13b**); Diclorhidrato de 1-[(4-aminometilbenzoil)oximetil]-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (**25**). Todos los compuestos fueron identificados y caracterizados por p.f., infrarrojo, ¹H RMN, ¹³C RMN, masas y análisis elemental. La magnitud en el incremento de solubilidad fueron para **10**: 4 veces, **13a** y **13b**: 5 veces, y **25**: ocho veces más soluble que el albendazol. En la prueba de estabilidad en amortiguadores, **10** fue inestable al incrementar la cantidad del amortiguador. Frente a material biológico **13a**, **13b** y **25**, presentaron t_½ en plasma de 7.19, 8.32 y 55.73 min, respectivamente; frente a esterasa, 6.99, 6.92 y 45.31 min; y en amortiguador de fosfatos (pH = 7.4), 119.83, 120.88 y 123.128 min. Estos tres derivados presentaron las mejores características para ser calificados como profármacos hidrosolubles del albendazol.

ABSTRACT

In this thesis a series of potential prodrugs of albendazole, **1**, was synthesized and evaluated in attempt to increase the water-solubility of this benzimidazole substance. Two prodrug approach were investigated as a means to obtain bioprecursors and bioreversible derivatives. In the first case, N-methoxycarbonyl-N'-(2-nitro-4-propylthiophenyl)thiourea, **2**, and N-methoxycarbonyl-N'-(2-nitro-5-propylthiophenyl)thiourea, **3**, were synthesized. Both compounds may undergo cyclization into **1** after reduction of the nitro group by microflora of the intestine. These bioprecursors were more lipophilic than **1** as determined by partition experiments in octanol-aqueous buffer systems, but their aqueous solubility was only slightly improved relative to **1**. Although *in vivo* studies in rats and mice showed that **2** and **3** gave **1** and its metabolite, after oral administration, this biotransformation was poor efficient. In relation to the anthelmintic activity of these bioprecursors against Trichinella spiralis, it was shown that their activity was mainly directed against the preadult and adult stages of this parasite. Also, it was observed that **3** had better efficacy than **2**, and at high doses (50 mg/Kg), **3** behaved similarly to **1**. In the second case, bioreversible derivatization of **1** was performed by N-acylation of the benzimidazole moiety with various acid chloride and chloroformates as well as by N-acyloxymethylation. The N-acylcarbonyl derivative was methyl 1-acetyl-5-n-propylthiobenzimidazole-2-carbamate, **10**; the N-alkoxy-carbonyl were methyl 1-ethoxycarbonyl-6-n-propylthiobenzimidazole-2-carbamate, **13a** and 1-ethoxycarbonyl-5-n-propylthiobenzimidazole-2-carbamate, **13b**; the N-acyloxymethyl was methyl 1-[(4-aminomethylbenzoyl)oxymethyl]-5-n-propylthiobenzimidazole-2-carbamate dihydrochloride, **25**. All compounds were characterized by m.p., infrared, ¹H NMR, ¹³C NMR, masses and elementary analyses. The liposolubility was similar to **1** in all cases. The water-solubility were 4, 5, 5 and 8 times higher than **1** for **10**, **13a**, **13b** and **25**, respectively. Compound **10** showed poor stability in aqueous buffer systems. Compounds **13a**, **13b** and **25** combined a high stability in aqueous solution with a high susceptibility to undergo enzymatic hydrolysis in human plasma and pig esterase to give **1**. The latter derivatives showed the greatest promise as prodrugs of albendazole

ÍNDICE GENERAL

	pag
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. El albendazol como sustancia biológicamente activa.....	3
1.1.1. Problemas farmacocinéticos del albendazol como antiparasitario sistémico.....	4
1.1.2. Mecanismos de acción antiparasitaria del albendazol.....	6
1.1.3. La toxicidad del albendazol.....	7
1.2. Los profármacos en la investigación Química Farmacéutica.....	8
1.2.1. Procesos para optimizar el comportamiento biológico de fármacos.....	8
1.2.2. Estrategias para el diseño de profármacos.....	9
1.2.2.1. Los profármacos y los fármacos "suaves".....	9
1.2.2.2. Clasificación de los profármacos.....	10
1.2.2.3. Diferencias entre los bioprecusores y los derivados biorreversibles.....	11
1.2.2.4. El diseño de los profármacos en el desarrollo de un medicamento.....	12
1.2.2.5. Criterios para la elaboración de profármacos.....	12
1.2.3. Los pro-bencimidazoles.....	14
1.3. La liposolubilidad y la solubilidad acuosa en la acción biológica.....	16
1.3.1. Importancia de las propiedades fisicoquímicas del fármaco.....	17
1.3.2. La liposolubilidad.....	18
1.3.3. La solubilidad acuosa.....	20
1.3.4. Los profármacos para modificar la solubilidad y liposolubilidad.....	21
1.3.4.1. Los bioprecusores y derivados biorreversibles en la insolubilidad acuosa.....	21
1.3.5. Estrategias en el diseño de derivados biorreversibles hidrosolubles.....	22
1.3.5.1. Adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones biológicas.....	22
1.3.5.2. Adición de un modificador para disminuir el punto de fusión del fármaco.....	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	27
3.1. Objetivo general.....	27
3.2. Hipótesis de trabajo.....	27
3.3. Objetivos particulares.....	27
4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	30
4.1. Preparación de profármacos.....	31
4.1.1. Instrumentación y materiales.....	31
4.1.2. Métodos de preparación.....	32
4.1.2.1. Síntesis de los bioprecusores.....	32
4.1.2.2. Preparación de los derivados biorreversibles.....	37
4.1.2.3. Preparación de análogos N-monometilados del albendazol.....	51
4.2. Evaluación de profármacos.....	59
4.2.1. Evaluación de los bioprecusores.....	59
4.2.1.1. Solubilidad en agua desionizada.....	59
4.2.1.2. Determinación del coeficiente de partición de 1, 2 y 3	59
4.2.1.3. Conversión química de los bioprecusores.....	61

4.2.1.4. Comportamiento de los bioprecursores en ratas.....	61
4.2.1.5. Comportamiento de los bioprecursores en ratones.....	62
4.2.1.6. Comportamiento de los bioprecursores 2 y 3 frente a microorganismos.....	63
	pag
4.2.1.7. Comportamiento de los bioprecursores 2 y 3 frente a <u>Trichinella spiralis</u>	64
4.2.2. Evaluación de los derivados biorreversibles.....	66
4.2.2.1. Evaluación de la solubilidad acuosa del albendazol y los análogos 27-29	66
4.2.2.2. Determinación de la solubilidad acuosa de los derivados biorreversibles.....	66
4.2.2.3. Determinación del coeficiente de partición de los derivados biorreversibles.....	67
4.2.2.4. Estabilidad de los derivados biorreversibles en soluciones amortiguadoras.....	67
4.2.2.5. Liberación del albendazol de los derivados biorreversibles frente a material biológico.....	69
5. RESULTADOS Y DISCUSION	71
5.1. Los bioprecursores	71
5.1.1. Consideraciones para el diseño.....	71
5.1.2. Preparación de bioprecursores.....	76
5.1.3. La solubilidad y coeficiente de partición de los bioprecursores.....	76
5.1.4. Conversión química de los bioprecursores.....	78
5.1.5. Bioconversión de los bioprecursores.....	78
5.1.5.1. Estudio de bioconversión en ratas.....	78
5.1.5.2. Estudio de bioconversión en ratones.....	79
5.1.6. Los bioprecursores frente a <u>Trichinella spiralis</u>	83
5.2. Los derivados biorreversibles	87
5.2.1. Consideraciones para el diseño.....	87
5.2.1.1. Derivados que disminuyen el punto de fusión del albendazol.....	87
5.2.1.2. Derivados con modificador ionizable.....	90
5.2.2. Preparación de los derivados.....	92
5.2.3. La solubilidad acuosa y la liposolubilidad.....	100
5.2.4. Estabilidad de los derivados en soluciones amortiguadoras.....	106
5.2.4.1. Evaluación de la estabilidad por espectrofotometría.....	106
5.2.4.2. Evaluación de la estabilidad por HPLC.....	111
5.2.5. Liberación del albendazol de los derivados frente a material biológico.....	113
6. CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFIA	118
APENDICE	124
A. Preparación de soluciones amortiguadoras con fuerza iónica de 0.5	124
B. Datos para la determinación experimental del coeficiente de partición por HPLC.....	126
C. Medio de cultivo mínimo y procedimiento para el cultivo de microorganismos.....	126
D. Datos para la elaboración de la curva estándar de los bioprecursores.....	128
E. Datos para la elaboración de la curva estándar del albendazol.....	129
F. Datos para la elaboración de la curva estándar de los análogos 27-29	130
G. Datos para la elaboración de la curva estándar del derivado biorreversible 25	132
H. Elaboración de la curva para la cuantificación de albendazol por HPLC.....	132
I. Determinación de proteínas totales.....	133
J. Espectros.....	134

ÍNDICE DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Parásitos sensibles al albendazol.....	4
Tabla 2. Valores de DL ₅₀ del albendazol.....	7
Tabla 3. Criterios de clasificación para los profármacos.....	10
Tabla 4. Diferencias operativas entre un derivado biorreversible y un bioprecursor.....	11
Tabla 5. Beneficios ganados por el diseño de profármacos en el desarrollo de medicamentos.....	12
Tabla 6. Modificadores para solubilizar fármacos.....	23
Tabla 7. Valores de Δ p.f. para algunas modificaciones con profármacos.....	24
Tabla 8. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 4, 5, 6, 7, 2	34
Tabla 9. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 8, 9, 3 y 3a	37
Tabla 10. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 1, 10, 11 y 12	39
Tabla 11. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 13a, 13b, 14a, 14b	41
Tabla 12. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 15 y 16	44
Tabla 13. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 17, 18, 19 y 20	46
Tabla 14. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 21, 22, 23, 24 y 25	49
Tabla 15. Punto de fusión y datos espectroscópicos del compuesto 26.....	51
Tabla 16. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 30, 31, 32, 33 y 27	53
Tabla 17. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 35, 36, 37, 38 y 28	57
Tabla 18. Punto de fusión y datos espectroscópicos del compuesto 29	58
Tabla 19. Datos relevantes de IR para la elucidación de los bioprecursores 2 y 3	75
Tabla 20. Solubilidad en agua desionizada de 1, 2 y 3	76
Tabla 21. Coeficiente de partición para 1, 2 y 3	77
Tabla 22. Determinación plasmática de 1 y AbzSO después de administrar en rata 1, 2 y 3 a 10 mg/Kg).....	78
Tabla 23. Determinación plasmática de 1 y AbzSO después de administrar en rata 1, 2 y 3 a 30 mg/Kg).....	79
Tabla 24. Determinación de 1 y AbzSO después de administrar 1 (50 mg/Kg)	79
Tabla 25. Determinación plasmática de AbzSO, 1 y 2 después de administrar a ratones 2 a 50 mg/Kg	80
Tabla 26. Determinación plasmática de AbzSO, 1 y 3 después de administrar a ratones 3 a 50 mg/Kg	80
Tabla 27. Absorbencia de los medios de cultivo con 1, 2 y 3 a 540 nm	82
Tabla 28. Presencia de 1, 2 y 3 en medios de cultivo bacterianos.....	83
Tabla 29. Evaluación de 1, 2 y 3 contra <i>Trichinella spiralis</i> en fase pre-adulta.....	84
Tabla 30. Evaluación de 1, 2 y 3 contra <i>Trichinella spiralis</i> en fase adulta.....	84
Tabla 31. Actividad de 1, 2 y 3 sobre la fecundidad de <i>T. spiralis</i>	85
Tabla 32. Comportamiento de 1, 2 y 3 sobre la larva muscular de <i>T. spiralis</i>	85

	pag.
Tabla 33. Efecto de los bioprecusores y albendazol sobre la infectividad de LM	86
Tabla 34. Porcentaje de inhibición de la actividad metabólica de <i>T. spiralis</i>	86
Tabla 35. Asignación en ¹ H RMN de H-7 y H-4 para 1 , 13a , 13b , 14a y 14b	93
Tabla 36. Señales de IR para los carbonilos de los compuestos enlistados.....	94
Tabla 37. Valores ppm y <i>J</i> (Hz) para H-4 y H-7 de 27 y 28	96
Tabla 38. Solubilidad a diferente relación sólido/agua desionizada de 1 , 27 - 29	100
Tabla 39. Solubilidad a diferente relación sólido/agua desionizada de los derivados biorreversibles..	101
Tabla 40. Relación de solubilidad derivado biorreversible/albendazol	102
Tabla 41. Coeficiente de partición para 1 , derivados biorreversibles y análogos	104
Tabla 42. Valores de solubilidad, log P y p.f. para 10-14	105
Tabla 43. Valores de <i>k_{obs}</i> para los derivados 10 , 13a , 13b y 25	109
Tabla 44. Valores de <i>t_{1/2}</i> para los derivados 10 , 13a , 13b y 25	109
Tabla 45. <i>k_{obs}</i> y <i>t_{1/2}</i> de 25 a diferentes valores de pH	110
Tabla 46. Valores de <i>k_{obs}</i> y <i>t_{1/2}</i> para 13a , 13b y 25	112
Tabla 47. Valores de <i>k_{obs}</i> y <i>t_{1/2}</i> para 13a , 13b y 25 en plasma, esterasa y solución amortiguadora....	115

ÍNDICE DE ESQUEMAS

		pag.
Esquema 1.	Metabolismo del albendazol.....	6
Esquema 2.	Diferencia conceptual entre un bioprecursor y un derivado biorreversible.....	11
Esquema 3.	Pro-bencimidazoles de 2-bencimidazolcarbamato de metilo.....	15
Esquema 4.	Bioprecusores de 2-bencimidazolcarbamatos de metilo reportados.....	16
Esquema 5.	Equilibrios ácido-base del albendazol.....	19
Esquema 6.	Bioprecusores propuestos del albendazol.....	27
Esquema 7.	Derivados biorreversibles propuestos con menor de punto de fusión que 1	28
Esquema 8.	Derivados biorreversibles propuestos con grupo modificador ionizable.....	29
Esquema 9.	Análogos N-monometilados del albendazol	29
Esquema 10.	Etapas a realizar en el trabajo de tesis.....	30
Esquema 11.	Preparación del bioprecursor N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-4-propiltio)fenil]tiourea, 2 ...	32
Esquema 12.	Preparación del N-fenil-N'-metoxicarboniltiourea.....	34
Esquema 13.	Preparación del bioprecursor N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil]tiourea, 3	35
Esquema 14.	Preparación de los derivados biorreversibles acilados 10, 11 y 12	38
Esquema 15.	Preparación de los derivados biorreversibles alquioxycarbonílicos 13 y 14	40
Esquema 16.	Preparación del derivado biorreversible 16	43
Esquema 17.	Preparación de los derivados biorreversibles aciloximetilados 19 y 20	44
Esquema 18.	Preparación del derivado biorreversible con grupo ionizable, 25	47
Esquema 19.	Preparación alternativa del intermediario 24	50
Esquema 20.	Preparación del análogo N-monometilado 27	51
Esquema 21.	Preparación del análogo N-monometilado 28	54
Esquema 22.	Metilación del albendazol y obtención del análogo 29	57
Esquema 23.	Procedimiento para evaluar el comportamiento de los bioprecusores frente a microorganismos	63
Esquema 24.	Evaluación de la solubilidad del albendazol y análogos N-monometilados.....	66
Esquema 25.	Bioprecusores de 2-bencimidazolcarbamatos de metilo tomados como modelo	71
Esquema 26.	Bioconversión propuesta para los bioprecusores 2 y 3	72
Esquema 27.	Reducción del grupo nitro a grupo amino	81
Esquema 28.	Liberación del albendazol de los derivados acilados por influencia del pH	88
Esquema 29.	Propuesta de transformación de los derivados biorreversibles tripartitas del albendazol	89
Esquema 30.	Bioactivación del derivado 14 en dos porciones estructurales	90
Esquema 31.	Pérdida de 32 u.m.a. de 1, 10, 11 y 12	92
Esquema 32.	Desplazamiento a campos bajos del H-7 para 13a y 13b	93
Esquema 33.	Experimento NOESY para el derivado 16	95

	pag.
Esquema 34. Obtención del isómero 25 a partir de 24 por hidrólisis ácida	96
Esquema 35. ¹ H RMN para 25	97
Esquema 36. Experimento NOESY para 25	97
Esquema 37. Rutas para la preparación del intermediario 24	98
Esquema 38. Pérdidas mayoritarias propuesta para los análogos 27 , 28 y 29	100
Esquema 39. Termogramas para 1 , 13a y 13b	103
Esquema 40. Estabilidad de 10 en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0, 7.4 (T = 22 °C)	106
Esquema 41. Estabilidad de 13a en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0, 7.4 (T = 22 °C).....	107
Esquema 42. Estabilidad de 13b en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0, 7.4 (T = 22 °C).....	107
Esquema 43. Estabilidad de 25 en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0, 7.4 (T = 22 °C).....	108
Esquema 44. Estabilidad de 25 en soluciones amortiguadoras de pH = 2.0, 6.0, 8.0 y 12.0 (T=22 °C)	110
Esquema 45. Influencia del pH en los valores de k_{obs} para el compuesto 25	110
Esquema 46. Estabilidad de 13a en amortiguadores de pH = 5.0 y 7.4 (T = 37 °C)	111
Esquema 47. Estabilidad de 13b en amortiguadores de pH = 5.0 y 7.4 (T = 37 °C)	111
Esquema 48. Estabilidad de 25 en amortiguadores de pH = 5.0 y 7.4 (T = 37 °C)	111
Esquema 49. Comportamiento de 25 en soluciones de pH = 7.4 a dos temperaturas diferentes	112
Esquema 50. Liberación del 4-nitrofenol del acetato de 4-nitrofenol por el material biológico	113
Esquema 51. Liberación del albendazol de 13a en presencia del plasma humano y esterasa de cerdo	114
Esquema 52. Liberación del albendazol de 13b en presencia del plasma humano y esterasa de cerdo	114
Esquema 53. Liberación del albendazol de 25 en presencia del plasma humano y esterasa de cerdo.	114

INTRODUCCION

El descubrimiento y desarrollo de sustancias químicas para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades, constituye el propósito central de la investigación Químico Farmacéutica.¹ La mayoría de los fármacos utilizados hoy en día han sido encontrados de manera empírica en los productos naturales o han sido preparados por medio de la síntesis química.² Los productos farmacéuticos han resultado de procesos de investigación prolongados, complejos y de alto costo económico; ya que de cientos de sustancias evaluadas, con la intención de encontrarles alguna actividad de interés terapéutico, sólo una de cada 10000 ha logrado convertirse en un nuevo medicamento, después de un periodo de desarrollo, de aproximadamente 10 años.³ Una de estas sustancias es el albendazol, compuesto del grupo de los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, con actividad antihelmíntica de amplio espectro,⁴ tradicionalmente utilizado para combatir parasitosis gastrointestinales, tanto en medicina humana como veterinaria.^{5,6} El éxito que el albendazol ha alcanzado en el tratamiento de estas enfermedades se debe a su acción preferentemente localizada en el tracto gastrointestinal, situación atribuida a su poco grado de absorción, hacia el torrente sanguíneo, debido a su escasa solubilidad acuosa.⁵

Además del uso terapéutico antes mencionado del albendazol, recientemente se ha estado investigando la posible utilidad de este compuesto para combatir parasitosis sistémicas (extraintestinales), tanto humanas como veterinarias, causadas principalmente por helmintos⁷ y hongos.⁸ En esta nueva perspectiva, es indispensable que el fármaco pueda atravesar membranas biológicas para que alcance a destruir a los parásitos que se encuentran en diversos órganos o tejidos del individuo infectado. Aunque los resultados *in vitro*, con algunos roedores y animales domésticos, han sido alentadores, la desventaja de la insolubilidad acuosa que presenta este principio activo ocasiona, por un lado, problemas de baja disolución, que provoca que su absorción gastrointestinal sea muy pobre, y por otro lado, cierra muchas posibilidades para su formulación y aplicación parenteral o intravenosa.⁶ Como consecuencia de lo anterior, muchos de los experimentos que utilizan al albendazol para parasitosis sistémicas, aplican dosificaciones orales mayores a 15 mg/Kg/día, en una o dos administraciones por periodos cortos de tiempo, con la intención de alcanzar la mejor eficacia terapéutica y aminorar la aparición de reacciones adversas.⁹ Sin embargo, en muchas ocasiones los resultados presentan gran variabilidad en su respuesta y controversia en sus dictaminaciones.¹⁰ Ante tal situación, ha sido necesario diseñar y preparar nuevos bencimidazoles u otros compuestos semejantes, con

mejores comportamientos de absorción biológica, así como, aplicar estrategias farmacéuticas (formulaciones) para rebasar la barrera de la insolubilidad de este principio activo.

Los padecimientos, denominados enfermedades parasitarias sistémicas o extraintestinales, son provocados por algunos helmintos, protozoarios y hongos. Algunas de estas parasitosis que afectan a seres humanos son: la neurocisticercosis, la criptococosis, la triquinosis muscular, la leishmaniosis, la enfermedad de Chagas, la oncocercosis y el paludismo. Las cuatro últimas han sido ubicadas por la Organización Mundial de la Salud, como las enfermedades de origen parasitario, más importantes en países tropicales.¹² Estas parasitosis se encuentran en algunas regiones de nuestro país con características endémicas. En estas afecciones parasitógenas, por la ausencia de vacunas y resultados no siempre exitosos en la prevención de la transmisión, la quimioterapia se convierte en una herramienta indispensable para combatirlas.¹² Sin embargo, es preciso señalar, que se cuentan con pocos fármacos para tal fin, y muchos de ellos, presentan problemas de poca eficacia terapéutica, toxicidad y/o resistencia por parte de los parásitos.¹¹ Por esto, el desarrollo de programas de investigación cuya finalidad sea, la búsqueda de nuevos principios activos, quimioprolifáticos o quimioterapéuticos, así como, la implementación de estrategias que permitan eliminar las desventajas de los fármacos antiparasitarios ya existentes, como el albendazol, son una necesidad primordial de la investigación farmacéutica.

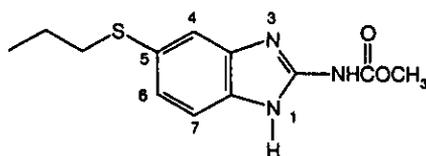
Con la intención de aportar elementos que ayuden a aminorar esta problemática de salud pública desde el ámbito de la Química Farmacéutica, y adquirir experiencia formativa en esta área del conocimiento; en el presente proyecto de tesis se diseñaron y prepararon profármacos potenciales del albendazol para optimizar sus propiedades de solubilidad, con el propósito de contar con moléculas que pudiesen ser mejor absorbidas, y en consecuencia, convertirse en herramientas terapéuticas eficientes para combatir a las enfermedades parasitarias sistémicas que respondan a la acción terapéutica de este principio activo.

1. ANTECEDENTES

En el presente capítulo se presentan los conceptos e información adicionales necesarios para dar soporte al diseño de los profármacos del albendazol que incluirá el presente trabajo de tesis. El desglose abarcará tres apartados centrales: el primero estará relacionado al principio activo considerado; el segundo, englobará los tipos de modificaciones estructurales que se aplicarán, y el tercero cubrirá los aspectos relevantes para ponderar la importancia del problema que se está tratando de eliminar en el compuesto activo.

1.1. El albendazol como sustancia biológicamente activa.

El albendazol (1) fue reportado en 1976 como agente antiparasitario de amplio espectro.⁴ Pertenece al grupo de los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, los cuales han sido utilizados para eliminar nematodos y cestodos que infectan el tracto gastrointestinal del ser humano y animales domésticos.^{5,6} Por ello, el albendazol ha sido utilizado tradicionalmente para el tratamiento de dichas parasitosis con la ventaja de ser administrado una o dos veces para tal fin.⁹



albendazol (1)

Además de la actividad antiparasitaria gastrointestinal, se ha informado que este principio activo puede utilizarse contra infecciones sistémicas causadas por algunos helmintos⁷, hongos⁸ y protozoarios. Esto ha renovado el interés por establecer qué parásitos son sensibles a este fármaco (vease Tabla 1), así como investigar su comportamiento biológico en animales de laboratorio. Uno de los requisitos que se deben cumplir para la acción antiparasitaria sistémica, es que el albendazol o sus metabolitos, alcancen concentraciones suficientes en plasma y tejidos para poder eliminar al agente infeccioso. En esta nueva faceta de antiparasitario sistémico, el albendazol ha sido utilizado en el tratamiento de la neurocisticercosis causada por *Taenia solium* y se ha visto que destruye los cisticercos presentes en el parénquima cerebral, y membrana subaracnoidea.^{13,14} Sin embargo, uno de los problemas que presenta el albendazol, cuando se le ha utilizado en el campo clínico, es la variabilidad de su respuesta terapéutica,^{10,13} a pesar de ello, hoy se le considera como uno de los fármacos de elección para el tratamiento de este padecimiento.

Tabla 1. Parásitos sensibles al albendazol

Parásito	Organo afectado	Interés en medicina
HELMINTOS		
Nematodos¹⁵		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	intestinos	H y V
<i>Strongyloides stercoralis</i>	intestinos, víceras	H y V
<i>Capillaria philippinensis</i>	intestinos	V
<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	intestinos	V
<i>Trichuris trichiura</i>	intestinos	H y V
<i>Trichinella spiralis</i>	intestinos y músculos	H
<i>Enterobius vermicularis</i>	intestinos	H y V
<i>Dictyocaulus filaria</i>	pulmones	V
<i>Onchocerca volvulus¹⁹</i>	ojos y músculos	H
<i>Ancylostoma braziliense</i>	piel	H y V
<i>Toxocara canis</i>	víceras	H y V
<i>Dracunculus medinensis</i>	peritoneo, piel	H
<i>Dictyocaulus viviparus</i>	pulmones	V
Cestodos		
<i>Echinococcus granulosus¹⁷</i>	pulmones	H
<i>Echinococcus multilocularis¹⁵</i>	pulmones	H y V
<i>Taenia solium (cisticercosis)¹³</i>	músculos y cerebro	H y V
PROTOZOARIOS		
<i>Giardia lamblia¹⁸</i>	intestinos	H
HONGOS		
<i>Criptococcus neoformans⁸</i>	pulmones y cerebro	H

H: humana; V: veterinaria

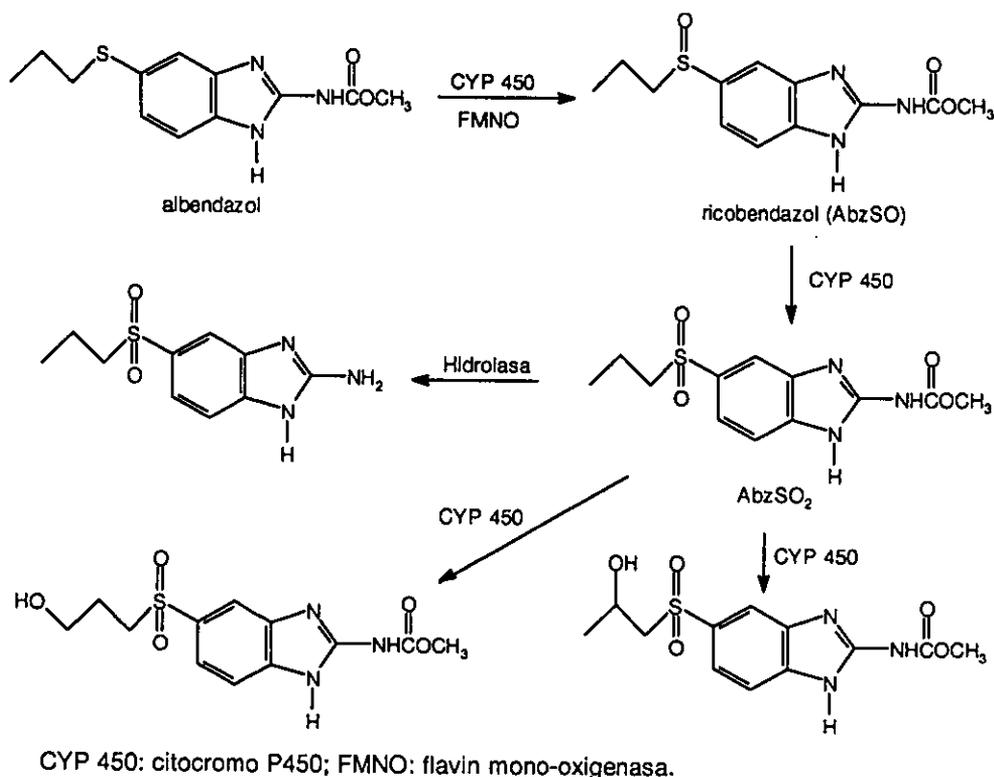
1.1.1. Problemas que presenta el albendazol para utilizarlo como antiparasitario sistémico

Uno de los inconvenientes que presenta el albendazol es su poca solubilidad acuosa que no permite optimizar su dosificación y su actividad terapéutica para obtener mejores resultados en las parasitosis sistémicas.¹⁵ Actualmente, existen algunos preparados medicinales (por ejemplo Zentel[®]) que dosifican al albendazol en 200 mg por tableta, aunque se reconoce que sólo el 5% de esta cantidad es la que llega a absorberse.¹⁶ En consecuencia, se tienen que administrar altas dosis con el propósito de alcanzar concentraciones plasmáticas suficientes para la eliminación de parásitos sistémicos.

Estudios de absorción *in situ*, en el tracto gastrointestinal de ratas, mostraron que el albendazol se absorbió mediante difusión pasiva en el tracto gastrointestinal con la tendencia siguiente: estómago>>íleon>yeyuno>colon>duodeno, presentado en todos los casos, una cinética de orden cero cuando se utilizaron 1.5, 3, 4 y 5 µg/mL.²⁰ Por otro lado, cuando se emplearon suspensiones de mayor concentración, la cinética fue de primer orden, conservando la misma tendencia en el sitio de absorción.²¹ Algunos investigadores trataron de aprovechar el hecho que

el albendazol, por su naturaleza estructural, presenta su mayor grado de solubilidad acuosa a valores de pH = 1; administraron este fármaco a animales en ayunas,^{22,23} o lo co-administraron con ácidos grasos.^{24,25} Con estas condiciones experimentales, se logró provocar un retraso en el vaciamiento gástrico que prolongó la estancia del principio activo en el estómago, lo que favoreció la disolución del antiparasitario en este órgano, con el consecuente incremento en su grado de absorción. Los resultados mostraron aumentos en la concentración plasmática del albendazol o sus metabolitos.²²⁻²⁵

Otro aspecto que influye en la actividad antiparasitaria sistémica del albendazol, es su metabolismo. Este antiparasitario sufre procesos de biotransformación en el intestino delgado²⁶ y principalmente en el hígado.²⁷ La ruta de biotransformación se inicia con la oxidación del átomo de azufre, por el citocromo P450 (CYP 450) o por la flavin mono-oxigenasa (FMNO), para dar lugar al sulfóxido (ricobendazol, AbzSO), el cual a su vez se oxida, por el CYP 450, a la sulfona correspondiente (AbzSO₂). Este último compuesto va a dar origen a otros tres metabolitos; por la acción de hidrolasas sobre el carbamato de metilo, se presentará un grupo amino en la posición 2. Por la acción del CYP 450, se llevará a cabo una ω y ω -1 mono-oxidación, en la cadena lateral.²⁷



Esquema 1. Metabolismo del albendazol

Aunque el albendazol contribuye al efecto antiparasitario, el ricobendazol es el metabolito principalmente encontrado en el plasma de los seres humanos,¹⁰ ratones,²⁷ ratas,²⁸ ovejas,²⁹ y vacas.³⁰ Asimismo, se ha encontrado que algunos parásitos, como el cestodo Moniezia expansa y el nematodo Ascaris suum, logran realizar la primera oxidación.³¹ Tanto la sulfona (AbzSO₂) como los otros tres metabolitos que de ella derivan, no presentan actividad antiparasitaria, y prácticamente no se detectan en forma cuantitativa en el plasma de los animales de experimentación.²⁷⁻³⁰ La sulfoxidación del albendazol parece ser un proceso rápido, y la posterior oxidación a sulfona, es un proceso lento y de tipo irreversible.²⁷ Dada la rapidez con que ocurre el primer paso de este proceso metabólico, se propone que la variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos del sulfóxido, se debe a divergencias en la absorción y no a diferencias en el metabolismo. Los estudios farmacocinéticos del albendazol en seres humanos que recibieron durante 8 días, por vía oral, 15 mg/Kg, mostraron que el ricobendazol presentó un rango de concentración plasmática entre 0.45 a 2.96 µg/mL (1.59-10.52 µM) con t_½ entre 10-15 h.³³

Varios grupos de investigación han procedido a explotar el comportamiento de la biotransformación del albendazol, para tratar de incrementar la cantidad de ricobendazol en el torrente sanguíneo. Con esta intención, han explorado la co-administración de albendazol con dexametasona,³² cimetidina,³⁴ metimazol,³⁵ el dipéptido fenilalaninifenilalaninato de metilo,³⁶ y etanol.³⁷ Con excepción del último caso, en los restantes se lograron incrementos del metabolito activo en plasma. Del mismo modo, se ha administrado el ricobendazol como tal, con resultados favorables en la absorción.²⁸ Sin embargo, este metabolito es una molécula con poca estabilidad química, para utilizarla en formulaciones orales, y ópticamente activa, por lo que las investigaciones recientes en este ámbito, se dirigen a tratar de administrar o favorecer metabólicamente, la presencia plasmática de sólo uno de los enantiómeros del ricobendazol (eutómero), responsable de la actividad antiparasitaria, ya que se ha demostrado que su contraparte (distómero) es el que ocasiona algunos de los efectos adversos que se presentan durante el tratamiento.^{38, 39}

1.1.2. Mecanismos de acción antiparasitaria del albendazol.

Los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo en general provocan cambios degenerativos en las células tegumentarias e intestinales de los helmintos⁴⁰ y protozoarios.⁴¹ Se ha propuesto primeramente que estos compuestos inhiben la polimerización de la tubulina para formar el microtúbulo nuclear, afectando la división mitótica de la célula.^{42,43} El albendazol presentó una CI₅₀ de 1.83 µg/mL (6.9 µM) y 0.055 µg/mL (0.21 µM) para inhibir la polimerización de tubulina de cerebro de ovejas y Haemonchus contortus, respectivamente. Aunque el ricobendazol no inhibió la polimerización de la tubulina de ovejas, para la del parásito presentó una CI₅₀ de 0.640 µg/mL

(2.3 μM).⁴³ Por otro lado, se ha propuesto que los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, incluyendo al albendazol, provocan alteraciones bioenergéticas como resultado de descargas transmembranales de protones, a concentraciones menores de 0.026 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.1 μM).⁴⁴ Aparentemente con los datos obtenidos de estos estudios farmacodinámicos *in vitro*, no habría problemas con las cantidades de AbzSO alcanzadas después de administrar albendazol *in vivo*. Sin embargo, su eficacia antiparasitaria no sólo depende de su afinidad por la tubulina del parásito, sino también de la capacidad para mantener concentraciones efectivas en el sitio donde este organismo se encuentre ubicado; lo cual depende principalmente del comportamiento farmacocinético del compuesto.

1.1.3. La toxicidad del albendazol.

Los estudios de toxicidad aguda del albendazol en varios animales de experimentación, lo clasifican como un compuesto ligeramente tóxico para ratones y hamster, o moderadamente tóxico para ratas.⁴⁵

Tabla 2. Valores de DL₅₀ del albendazol

Especie	DL ₅₀ (mg/Kg de peso)*
ratones	5000
hamster	10000
ratas	1500

*administración oral

El albendazol, administrado a seres humanos por 30 días en dosis de 10 mg/Kg/día es bien tolerado. Sin embargo, con 15 mg/Kg/día por el mismo periodo, se reportaron algunos efectos colaterales, como cefaleas, náuseas y crisis convulsivas. Estas reacciones no se asociaron a la toxicidad del fármaco, sino a la reacción inflamatoria desarrollada por el paciente ante la destrucción de los parásitos.⁴⁶ Cuando las dosis se incrementaron, o los periodos de administración rebasaron los tres meses, se presentaron reacciones adversas tales como ictericia, alopecia y urticarias, atribuidas al fármaco en cuestión.⁴⁷ En este contexto, cabe señalar que en la actualidad para el tratamiento clínico de la neurocisticercosis, la administración de albendazol en dosis de 15 mg/Kg/día, no se realiza por tiempos prolongados.

Otro de las cosas que hay que mencionar, es la capacidad de inducción de enzimas microsomales hepáticas que provoca el albendazol, por lo que podría influir en su propio comportamiento metabólico o en el de otros fármacos que con él se administren.⁴⁸ Por otro lado, estudios *in vitro* con cultivos celulares mostraron que el albendazol presenta efectos teratogénicos,⁴⁹ los cuales han sido atribuidos a su metabolito principal, el ricobendazol,⁵⁰ por lo que su administración en mujeres embarazadas no ha sido recomendada.¹⁶

1.2. Los profármacos en la investigación Química Farmacéutica

En algunas ocasiones, las propiedades físicas y químicas de los compuestos que presentan alguna actividad biológica de interés terapéutico, como el albendazol, no pueden ser siempre del todo satisfactorias. Los grupos funcionales que poseen, pueden provocar una absorción muy pobre o una distribución inadecuada en el organismo; o bien, pueden ser la causa de la inestabilidad del fármaco, ya sea por reacción química o por destrucción metabólica en el hígado u otros órganos. Esto puede dar lugar a perfiles farmacococinéticos inadecuados para los fines terapéuticos perseguidos. Ante tal situación, la administración de estas sustancias se encuentra limitada y su utilidad clínica es de ámbito restringido.^{51,52}

1.2.1. Los procesos para la optimización del comportamiento biológico de fármacos.

Para tratar de eliminar los inconvenientes que presentan algunos fármacos en su comportamiento biológico, se utilizan recursos biológicos, físicos y químicos.⁵³ Las líneas de investigación que estos estudios llevan a cabo se agrupan bajo el nombre de optimización del comportamiento biológico de los fármacos.⁵⁴

Los recursos biológicos implican cambios en las rutas de administración. Por ejemplo, el uso de inyectables para acelerar el inicio de la acción del fármaco, incrementar su concentración en sangre, y eliminar las irritaciones gástricas. La utilidad de este recurso está limitado porque las rutas de administración parenterales son siempre menos convenientes que la administración oral.⁵⁵ En el caso del albendazol, este recurso no ha podido ser aplicado, ya que la insolubilidad acuosa de este compuesto no permite cambiar su ruta de administración oral.

Una versatilidad más amplia lo presentan los recursos físicos. Algunas veces una formulación adecuada (microencapsulación, liberación sostenida) pueden superar las desventajas fisicoquímicas y farmacológicas que presente el fármaco.⁵³ Con el albendazol se han llevado a cabo estudios de formulación en forma de suspensiones, utilizando como surfactante taurocolato de sodio (38 mM), y concentraciones iniciales de albendazol de 2.5×10^{-3} mg/mL; con esto se incrementó su paso a través del intestino delgado perfundido de rata, alcanzando un 49% de absorción de la dosis inicial después de 30 min ($K_a = 2.810 \pm 0.116 \text{ h}^{-1}$).⁵⁶ En estudios con ratones infectados con *Trichinella spiralis*⁵⁷ y *Echinococcus multilocularis*,⁵⁸ el albendazol ha sido formulado, para administración parenteral, en liposomas y en nanopartículas coloidales de poli(D,L-lactido), respectivamente. En ambos trabajos, la formulación incrementó la eficiencia antiparasitaria del albendazol. En el último caso, se observó un efecto antiparasitario equivalente, cuando se administraron 6 mg/Kg de albendazol formulado en forma coloidal, por vía

intravenosa, con 1500 mg/Kg de albendazol no formulado, por vía oral.⁵⁸ Estos resultados refuerzan la idea que al incrementar la solubilidad acuosa del albendazol se logra una mayor eficiencia antiparasitaria de este principio activo.

Por su parte, los recursos químicos ofrecen el mayor grado de flexibilidad para lograr la optimización del comportamiento biológico.^{53,55} En este rubro, dos alternativas de trabajo pueden ser consideradas. La primera y más utilizada, se denomina optimización farmacodinámica,⁵⁹ la cual consiste en realizar modificaciones estructurales a un principio activo (prototipo), con el propósito de obtener derivados, denominados análogos, con mayor potencia terapéutica o índice terapéutico más amplio.^{60,61} Estos cambios no siempre cumplen con su cometido de optimización; ya que en ocasiones, provocan la pérdida total de la actividad o el encuentro de una nueva molécula con propiedades farmacológicas diferentes.⁶⁰ En el área de investigación de los 2-bencimidazol-carbamatos de metilo, la búsqueda de análogos se ha realizado con moléculas como el albendazol, mebendazol, flubendazol y fenbendazol, que hoy en día se utilizan en el campo clínico para combatir parásitos en medicina humana o veterinaria.^{5,6} En ningún caso se logró mejorar la solubilidad acuosa de estos principios activos, por lo que su uso quedó prácticamente restringido al tracto gastrointestinal.

En la segunda alternativa, denominada optimización farmacocinética,^{1,59} las modificaciones son dirigidas a lograr una mejor eficiencia en el comportamiento de absorción, distribución, metabolismo y excreción, así como, hacer más selectiva la acción biológica de un principio activo utilizado en la clínica o en etapa de investigación preclínica. Dentro de este ámbito, existen dos diseños cualitativamente bien establecidos, los profármacos^{1,3,63} y los fármacos "suaves".^{3,62} Con frecuencia, los procedimientos para desarrollarlos resultan ser más económicos, que la búsqueda de nuevos análogos que pudiesen servir de prototipos para una optimización farmacodinámica.³

1.2.2. Estrategias para el diseño de profármacos.

En virtud que, tanto los profármacos y los fármacos "suaves", son dos alternativas de optimización farmacocinética de fármacos, es importante tener en cuenta las diferencias conceptuales que conciernen a cada uno de ellos.

1.2.2.1. Los profármacos y los fármacos "suaves".

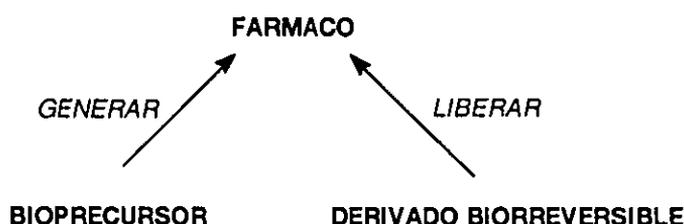
Un profármaco es un compuesto farmacológicamente inactivo que requiere de una transformación espontánea o enzimática, dentro del organismo, para poder liberar o generar al

En el presente trabajo se van a utilizar los términos bioprecusores y derivados biorreversibles para la clasificación de los compuestos que se van a preparar.

1.2.2.3. Diferencias entre los bioprecusores y los derivados biorreversibles

Los tipos de profármacos que se han considerado como la primera alternativa para la optimización de las propiedades de un fármaco son los *bioprecusores* y los *derivados biorreversibles*, los cuales difieren entre sí por sus características estructurales y la forma en como se espera su biotransformación.⁶⁶

- a. *Bioprecusores*. Son aquellos compuestos que formalmente no presentan la estructura del principio activo pero una vez dentro del organismo, lo generan mediante reacciones de reducción u oxidación o hidrólisis.^{1,3,66}
- b. *Derivados biorreversibles*. Son aquellos compuestos que presentan la estructura del principio activo, al cual se le ha adicionado una porción estructural, denominada modificador, que cambiará temporalmente las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Este tipo de compuestos liberan al principio activo mediante reacciones de hidrólisis, oxidaciones o reducciones.^{1,3,52}



Esquema 2. Diferencia conceptual entre un bioprecursor y un derivado biorreversible

Por la forma en como están constituidos, los bioprecusores y los derivados biorreversibles van a presentar algunas diferencias en sus características fisicoquímicas, mismas que pueden convertirse en ventajas o desventajas según sea el caso particular de que se trate.^{1,3,66}

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

Característica	<i>Derivado biorreversible</i>	<i>Bioprecursor</i>
Constitución	Principio activo + modificador	No presenta al principio activo
Liposolubilidad	Fuertemente modificada	Ligéramente modificada
Bioactivación	Liberación o reconversión del principio activo por hidrólisis, oxidación, o reducción	Generación del principio activo por oxidación, reducción, o hidrólisis
Estabilidad	Problemas de estabilidad en solución acuosa	Estables en solución acuosa
Catálisis	Química o enzimática	Solamente enzimática

1.2.2.4. El diseño de los profármacos en el desarrollo de un medicamento.

La aplicación del diseño de profármacos en la investigación y el desarrollo de medicamentos, se divide en dos etapas. En la primera, conocida como etapa *Post hoc*, se aplica sobre aquellos fármacos que se encuentran en la fase de investigación clínica IV o en aquellos que ya están comercializados; por otro lado, la segunda etapa denominada *Ad hoc*, se aplica sobre aquellos compuestos activos que se encuentran en fase de investigación preclínica o en evaluaciones clínicas I, II y III. En el caso del albendazol, la etapa de aplicación corresponde a la *Post hoc* debido a que este principio activo ya se encuentra en aplicación clínica.⁶⁵

Tabla 5. Beneficios ganados por el diseño de profármacos en el desarrollo de medicamentos

Etapa	Descripción	Beneficios
<i>Post hoc</i>	Diseñar y preparar profármacos de compuestos activos ya comercializados	Desde un beneficio notable, cuando se logra una mejor eficiencia terapéutica; hasta beneficios trascendentales, cuando se obtienen profármacos de liberación selectiva.
<i>Ad hoc</i> *	Para compuestos activos que requieran de modificación estructural para su desarrollo en la investigación preclínica	Beneficios generalmente importantes para que el compuesto activo tenga mejores posibilidades de convertirse en medicamento.

* (latín) hecho o modificado para un propósito particular

1.2.2.5. Criterios para la elaboración de profármacos.⁶⁷

Los criterios que deben tomarse en cuenta en el diseño y la elaboración de los profármacos son:

- Identificar el problema de comportamiento biológico del fármaco.
- Identificar las propiedades fisicoquímicas requeridas para la eficiencia máxima y liberación óptima del fármaco
- Planear las modificaciones estructurales del fármaco que sean necesarias para reducir o eliminar el efecto indeseable en particular. El cambio químico propuesto modificará las propiedades fisicoquímicas del fármaco con lo cual se afectará su absorción, distribución y metabolismo enzimático.
- Ponderar las condiciones que son disponibles *in vivo* (enzimas, pH, etc.) para la transformación del profármaco en fármaco después que el primero ha sido administrado. Esta bioconversión del profármaco se lleva a cabo mediante la intervención de enzimas hidrolasas, reductasas u oxidasas, o por reacciones intramoleculares.
- Proponer estructuras de profármacos en los cuales se espere que el compuesto diseñado será inactivo o menos activo biológicamente que el fármaco de origen.
- Tratar que la preparación de los profármacos se lleve a cabo en la menor cantidad de pasos posibles.

- g) Seleccionar a los profármacos propuestos que tengan las propiedades físicas y químicas adecuadas y que puedan ser potencialmente biotransformados en el compartimento biológico deseado como candidatos a evaluaciones de biodisponibilidad, toxicidad, etc.

Bioprecursores.

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

- a) La generación del fármaco debe llevarse a cabo preferencialmente, mediante reacciones de reducción u oxidación.
- b) El bioprecursor diseñado debe presentar mejores características de liposolubilidad y/o solubilidad acuosa o en disolventes orgánicos polares que el principio activo
- c) Debe existir en el bioprecursor algún grupo funcional susceptible a sufrir la reacción de reducción u oxidación de forma favorable en condiciones biológicas.

Derivados biorreversibles.

Para la elaboración de los derivados biorreversibles se deben tomar en cuenta los siguientes lineamientos adicionales

- a) La unión entre el fármaco y el modificador es generalmente un enlace covalente.
- b) La unión entre el fármaco y el modificador debe ser rota *in vivo*.
- c) La liberación del fármaco debe ser cinéticamente rápida para asegurar niveles efectivos del principio activo en los sitios de acción, y/o minimizar el metabolismo del profármaco como tal, o la gradual inactivación del fármaco mismo.
- d) El derivado así como el modificador liberado *in vivo* deben presentar un riesgo mínimo de toxicidad a las concentraciones utilizadas.

*Tipos estructurales de derivados biorreversibles:*³

Bipartita: se forma por la unión del principio activo al modificador, [**modificador-fármaco**].

Tripartita: el modificador y el fármaco son enlazados por un tercer componente estructural llamado acoplador: [**modificador-acoplador-fármaco**]. El acoplador no le confiere alguna propiedad fisicoquímica al fármaco.

Profármaco doble o pre-profármaco: estos se caracterizan por la presencia de dos modificadores [**modificador-modificador-fármaco**]. Algunas veces uno de los modificadores le confiere propiedades fisicoquímicas diferentes al fármaco y el otro sirve para realizar una liberación selectiva del mismo. En otras ocasiones, un modificador bloquea un sitio de biotransformación y el otro sirve como acarreador del fármaco a través de las membranas.⁶⁸

Profármaco mutuo: se forman por el acoplamiento de dos principios activos [fármaco₁-fármaco₂].

Esta unión puede darse de forma directa o mediante un acoplador.

Para agentes antiparasitarios de administración no prolongada, como el albendazol, existe la libertad de utilizar cualquiera de las variantes estructurales anteriores. Todo dependerá de la facilidad de su preparación y perspectiva de obtener los mejores resultados biológicos.

1.2.3. Los pro-bencimidazoles

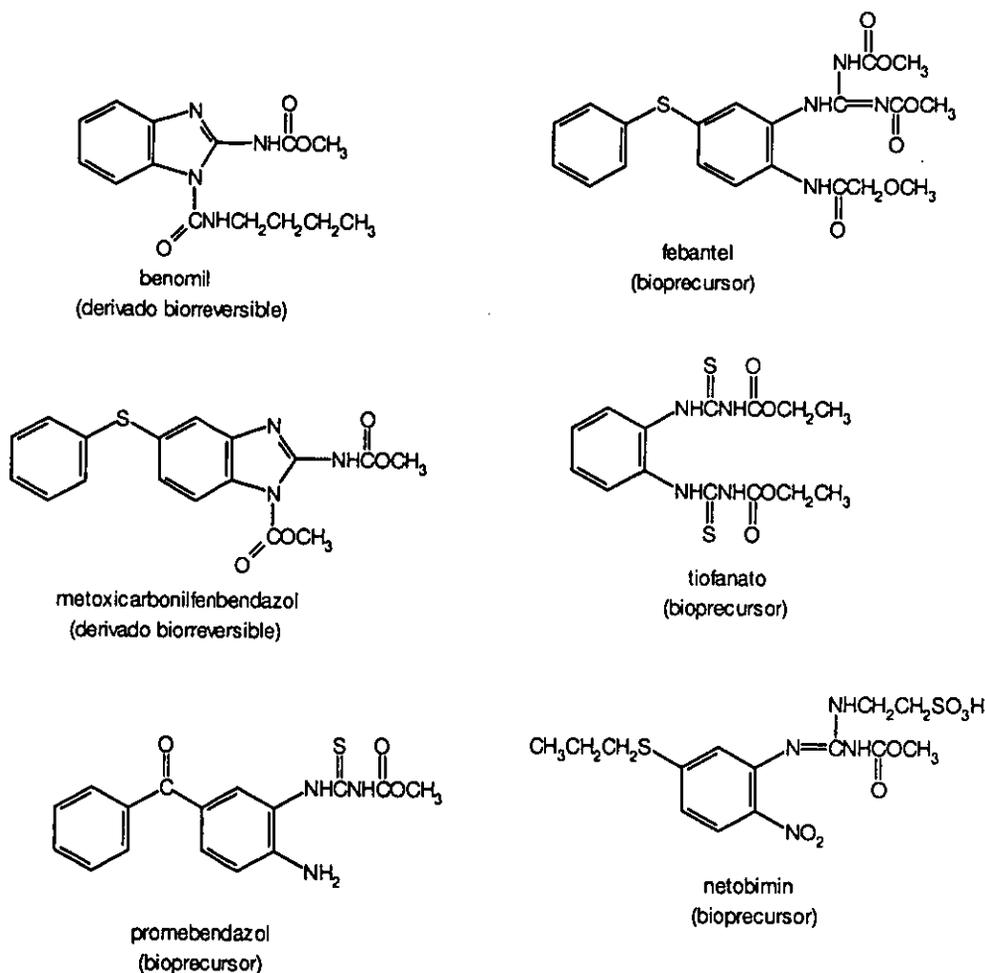
En el campo de investigación de los bencimidazoles, se ha utilizado la estrategia de los profármacos con el propósito fundamental de incrementar la escasa solubilidad acuosa que presentan este tipo de compuestos. Los profármacos diseñados y sintetizados reciben el nombre de pro-bencimidazoles.^{5,6} En el esquema 3 se presentan algunos de los pro-bencimidazoles que se encuentran en fase de investigación pre-clínica en medicina veterinaria.⁴³

Uno de estos pro-bencimidazoles es el netobimin el cual fue diseñado como un bioprecursor del albendazol,⁶⁹ y cuya evaluación se ha llevado a cabo en animales domésticos.⁶⁹⁻⁷² Aunque dichos trabajos han mostrado que este bioprecursor ha generado al albendazol, así como sus metabolitos, no ha logrado superar las concentraciones de estos últimos, cuando se compara su administración con el albendazol en dosis equimoleculares.⁶⁹⁻⁷¹ Es probable que este comportamiento sea debido a que el netobimin, presenta un comportamiento zwitterión⁷³ a los valores de pH del tracto gastrointestinal, lo que merma su capacidad para disolverse en el lumen intestinal.

Otros bioprecursores de 2-bencimidazolcarbamatos de metilo como el pro-mebendazol, el febantel y el tiofanato, se presentan como compuestos en donde la generación de la porción 2-imidazolcarbamato de metilo, se lleva a cabo mediante una reacción de ciclación intramolecular. Estos bioprecursores no presentan comportamiento de zwitterión en las condiciones de acidez gastrointestinal, por lo que las perspectivas para absorberse son buenas.⁴³

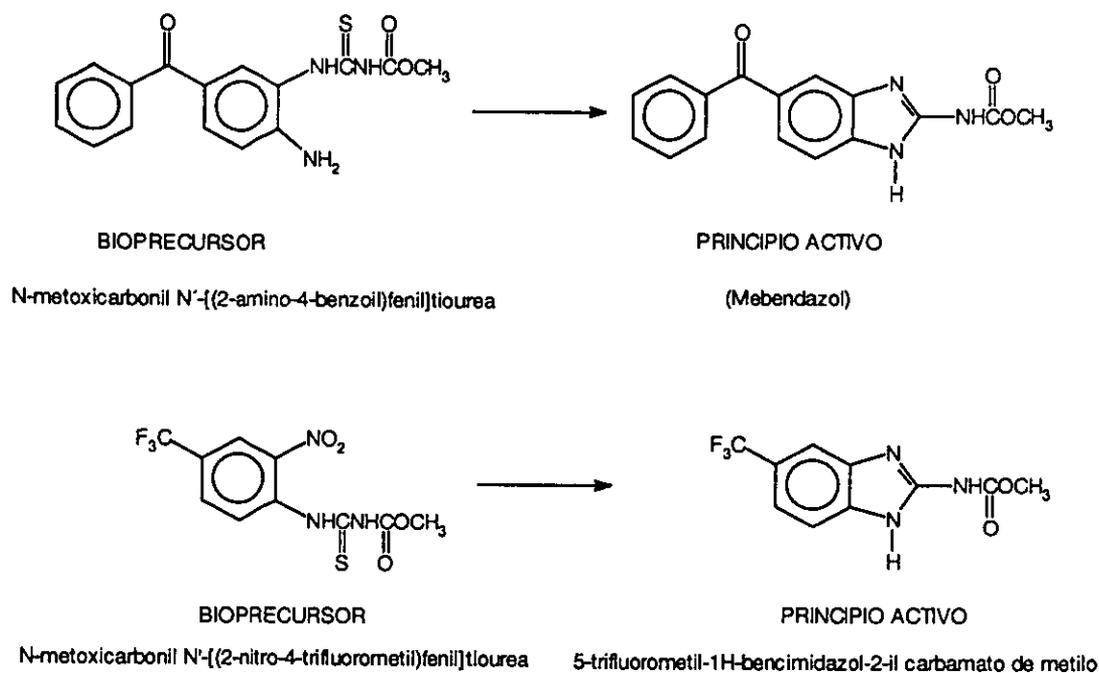
En el esquema 4 se presentan dos bioprecursores del tipo tiureidos N,N'-disustituidos cuyos resultados fueron favorables para el propósito de su diseño, y que los hacen atractivos para una más amplia investigación. En el primer caso, se trata de un bioprecursor del mebendazol, el pro-mebendazol. En el trabajo realizado, se mostró que la ciclación intramolecular, en la cual el grupo amino se comporta como nucleófilo, fue favorecida al

incrementar los valores de pH. La conversión fué prácticamente cuantitativa a valores de pH mayores a 7.0. Sin embargo, no se realizaron estudios biológicos con este compuesto.⁷⁴



Esquema 3. Pro-benzimidazoles de 2-benzimidazolcarbamatos de metilo

El segundo caso trata sobre un bioprecursor del 5-trifluorometil-2-benzimidazolcarbamato de metilo.⁷⁵ Este diseño, al igual que en el del netobimin, consideró que en primera instancia, se debería llevar a cabo la reducción del grupo nitro a grupo amino, y luego la reacción de ciclación intramolecular, para dar lugar al 2-benzimidazolcarbamato de metilo. Cabe hacer mención que en este bioprecursor, la ubicación del grupo nitro, en relación al sustituyente de la posición 5 del 2-benzimidazolcarbamato de metilo, difiere de la que presenta el netobimin. En este trabajo, se administró el bioprecursor a gerbos infectados con *Echinococcus multilocularis* en tejido pulmonar. Los resultados mostraron una regresión de la infección, la cual fue atribuida a que el bioprecursor generaba al correspondiente benzimidazol, el cual es activo contra este parásito.⁷⁵



Esquema 4. Bioprecursores de 2-benzimidazolcarbamatos de metilo reportados.

Por lo que respecta a los derivados biorreversibles, básicamente las modificaciones, para la optimización farmacocinética, se han llevado a cabo al adicionar alguna porción estructural, a los nitrógenos de la porción imidazol de estos antiparasitarios. Como ejemplo, podemos citar al metoxicarbonilmebendazol, el cual cuando se administró a conejos, logró incrementar la cantidad del principio activo en el plasma en relación a aquellos animales que solo recibieron mebendazol en cantidades equimoleculares.⁷⁶

Todos estos estudios muestran que es factible utilizar la estrategia de los profármacos para tratar de optimizar el comportamiento biológico de 2-benzimidazolcarbamatos de metilo, en especial el del albendazol.

1.3. La liposolubilidad y la solubilidad acuosa en la actividad biológica.

A menos que un compuesto activo alcance su sitio de acción dentro del organismo en cantidad suficiente para mostrar su eficacia terapéutica, no será clínicamente útil como fármaco.⁸³ La eficacia de la actividad biológica, depende en muchas ocasiones, de una liberación eficiente del compuesto en su sitio de acción, dando lugar con esto a las mejores respuestas terapéuticas con un mínimo de efectos colaterales o secundarios. Para que un principio activo

llegue a tener una liberación eficiente, es necesario que las dificultades encontradas en su absorción, su distribución, su metabolismo y su excreción, no constituyan las etapas críticas de su comportamiento biológico. La optimización de las propiedades del compuesto activo para lograr dicha liberación es un proceso crucial dentro de la etapa de diseño y desarrollo de fármacos, y frecuentemente se convierte en la etapa clave para que un principio activo llegue a convertirse en medicamento.^{68,77}

1.3.1. Importancia de las propiedades fisicoquímicas del fármaco.

En los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, como el albendazol, que presentan perspectivas de utilizarse como antiparasitarios sistémicos, un parámetro crítico a considerar será el transporte a través de las membranas biológicas que el principio activo tenga que efectuar hasta alcanzar su sitio de acción (el parásito).⁷¹ Es reconocido que dentro de los factores que influyen en el transporte de un compuesto, sus propiedades fisicoquímicas ocupan un lugar preponderante, sobre todo en aquellos que son administrados en un lugar distante a su sitio de acción. En este sentido, debemos mencionar que las sustancias activas deben cumplir con requerimientos de liposolubilidad, polaridad, carga eléctrica, solubilidad acuosa, tamaño molecular o similitud a sustancias endógenas. Los dos últimos, prácticamente restringidos a un grupo particular de compuestos, tales como, iones metálicos de tamaño pequeño para atravesar los poros membranales, o compuestos orgánicos que utilizan el transporte activo para trasladarse en el organismo.⁷⁸

Para el caso del albendazol, el cual se va administrar por vía oral, es preciso tomar en cuenta, a los factores que están involucrados en el proceso de absorción gastrointestinal, ya que todos, particularmente o en su conjunto, pueden influir en la respuesta antiparasitaria eficiente de este principio activo.⁷⁹

- a) Parámetros biológicos: tipo de transporte, pH, vaciamiento gástrico, presencia de enzimas, secreción biliar, flora intestinal, estado de salud.
- b) Propiedades fisicoquímicas: solubilidad acuosa, liposolubilidad, pKa, estabilidad, punto de fusión, adsorción.
- c) La forma farmacéutica: tableta, solución, emulsión, suspensión cápsula.

Como se mencionó anteriormente, el albendazol utiliza la difusión simple como medio de transporte a través de las membranas biológicas. Los elementos que influyen en la velocidad a la que ocurre dicho proceso son:⁵⁴

- a) El gradiente de concentración, el cual influye de manera directamente proporcional a la velocidad de difusión y depende de la cantidad disuelta del compuesto en ambos lados de la membrana.
- b) Los parámetros que afectan la facilidad para que la molécula del fármaco pueda moverse al interior lipofílico de la membrana, a saber, la liposolubilidad, el tamaño molecular y el grado de ionización.

Para tratar de optimizar el comportamiento de una sustancia activa que se administra por vía oral, como el albendazol, se debe tomar en cuenta a la absorción y la disolución. Para que estos dos parámetros puedan modificarse, mediante el uso de recursos químicos, es necesario alterar las características de liposolubilidad y solubilidad acuosa del principio activo. La decisión de intentar modificaciones químicas a la estructura del principio activo, depende del tamaño de dosis administrada, el costo de producción de tales cambios estructurales, la dificultades de formar sales acuosas en condiciones biológicas, así como la eficiencia de la respuesta terapéutica.⁸⁰

1.3.2. La liposolubilidad.

Este parámetro denota el grado de solubilidad de un compuesto en una fase lipoidea (por ejemplo la membrana celular). De forma ideal, la liposolubilidad podría ser medida directamente como el coeficiente de partición entre una bicapa de fosfolípidos y agua; el valor de este coeficiente señalaría la facilidad con que el compuesto puede transportarse en las membranas biológicas. Experimentalmente, la fragilidad de la capa de fosfolípidos no permite utilizarla en mediciones de rutina, por lo que es reemplazada por disolventes orgánicos, como el 1-octanol, con la intención de hacer aproximaciones al comportamiento de la membrana celular.⁸³ Los valores usualmente manejados para el coeficiente de partición (P) son logarítmicos (\log_{10}); por lo que un fármaco que se distribuya en una proporción 10:1 en un sistema de octanol/agua, tendrá un valor de $\log P = 1$.

$$P = \frac{[\text{Fase orgánica}]}{[\text{Fase acuosa}]}$$

En la actualidad se disponen de paquetes computacionales para calcular el valor de $\log P$, los cuales se basan en que la liposolubilidad intrínseca de un compuesto depende de las contribuciones que en este sentido, realicen sus grupos funcionales y porciones estructurales que lo integren.⁸¹⁻⁸³ Para el caso del albendazol, el valor calculado de $\log P = 3.01$.

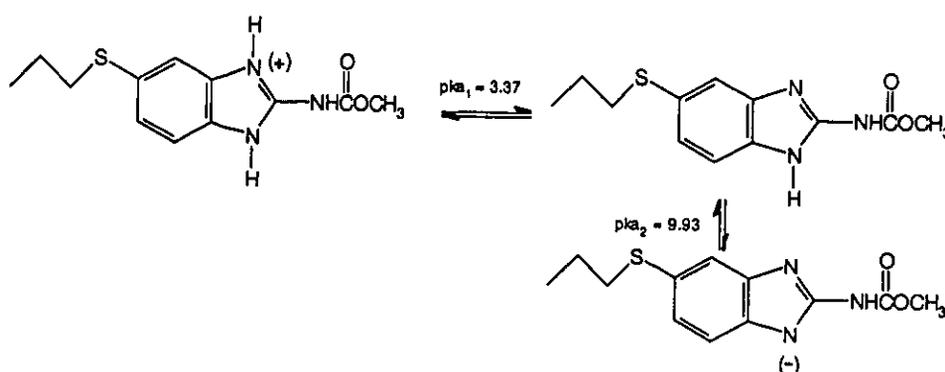
Un aspecto adicional a considerar, es la ionización de bases y ácidos débiles, ya que el grado de partición de un fármaco es dependiente del pH. Experimentalmente, la fase acuosa es reemplazada por una solución amortiguadora de fosfatos, usualmente a pH 7.4 o pH 6.0. Los valores obtenidos de esta manera son referidos como coeficientes de distribución, $\log D_{pH}$, en lugar de $\log P$. Se asume que el $\log P$ representa la liposolubilidad intrínseca y no cambia a menos que la estructura del fármaco se modifique; por el contrario, el $\log D_{pH}$, se modificará de acuerdo a las condiciones de acidéz del medio. Con el valor del coeficiente de distribución, se espera mayor representatividad del comportamiento de partición de los ácidos y bases débiles. Ambos términos pueden relacionarse mediante la siguiente ecuación:⁸⁴

$$\text{Para los ácidos : } \log D_{pH} = \log P - \log (1 + 10^{pH - pK_a})$$

$$\text{Para las bases: } \log D_{pH} = \log P - \log (1 + 10^{pK_a - pH})$$

A manera de ejemplo para un ácido, un aumento de una unidad en el valor de pH sobre el valor del pKa, disminuirá en una unidad el valor de $\log D$. Por otro lado, para una base, una disminución en una unidad del valor de pH, disminuirá en una unidad el $\log D$. La facilidad de transporte de un principio activo a través de los tejidos generalmente se observa con valores de $\log D_{7.4}$ entre 1 y 2, y en el intestino delgado con valores de 2, aunque se llegan a presentar excepciones en esta disposición. Fármacos con valores de $\log D_{7.4}$ mayores a 2 serían completamente absorbidas, siempre y cuando no presenten problemas de insolubilidad acuosa en el lumen gastrointestinal.⁸⁴

Debido a su naturaleza estructural, el albendazol presenta al menos dos valores de pKa,⁸⁴ por lo que se conduce como un anfótero en solución acuosa a diferentes valores de pH. Sin embargo, en condiciones biológicas, al parecer sólo el primer equilibrio es el que contribuye a su comportamiento, ya que para presentarse el segundo, se requieren condiciones de basicidad que no se encuentran en las células.



Esquema 5. Equilibrios ácido-base del albendazol

Tomando el pK_a , para aplicarlo a la ecuación anterior de una base, se tendría, para un $pH = 6$, y $\log P = 3.01$, un $\log D_{6.0} = 2$. Esto indicaría que el albendazol no tendría problemas para atravesar la barrera intestinal, en cuanto a liposolubilidad se refiere. Por lo que la poca absorción que manifiesta, se debe a otros parámetros, como la insolubilidad acuosa, la cual hay que tomar en cuenta para tratar de optimizar el comportamiento de este principio activo.

1.3.3. La solubilidad acuosa.

Como hemos indicado, el gradiente de concentración es un parámetro que influye en la velocidad de difusión simple. A mayor gradiente de concentración mayor velocidad de difusión, y en consecuencia mayor absorción, hasta que la relación de equilibrio alcance un valor máximo. Un gradiente de concentración dependerá de la velocidad de disolución del principio activo sólido, misma que estará limitada por la solubilidad acuosa que presente dicho compuesto.⁸⁷ Para el albendazol, su solubilidad acuosa de 4.35×10^{-3} mg/mL ($pH = 6.0$, $T = 37^\circ C$), no permite alcanzar altas concentraciones en solución para que pueda lograr un gradiente que propicie, de inicio, la absorción de cantidades significativas de este principio activo. Por otro lado, en las condiciones de acidez del estómago ($pH = 1$), el albendazol se encontraría en forma iónica y con mayor grado de solubilidad acuosa. Esto ha sido aprovechado en la administración de este principio activo en ayunas. En experimentos que utilizaron al emulsificante Transcutol® en proporción de 40%, la solubilidad en suspensión ácida ($pH = 1.2$) fue de 2.226 mg/mL.⁸⁵⁻⁸⁶

La solubilidad acuosa es un parámetro crítico. Una solubilidad mayor al 1% (10 mg/mL) a $37^\circ C$ de un principio activo, indica que no se presentarán problemas en la biodisponibilidad como resultado de sus características de solubilidad.⁸⁸ Es importante indicar que esto es una guía y no una limitante estricta en la relación solubilidad-absorción. Los factores que determinan esta relación son:⁸⁷

- i) la velocidad de disolución y la solubilidad como una función del pH dentro del rango fisiológico,
- ii) la velocidad de disolución en función del tamaño de partícula o su área superficial, y
- iii) la dosis del compuesto.

A diferencia de la liposolubilidad, no existe una guía general para estimar la solubilidad acuosa de las moléculas orgánicas, a partir de sus estructuras o sus propiedades físicas. La razón, es que el fenómeno de la solubilidad, no surge de un simple equilibrio sino de una combinación de varios de ellos.

Factores que afectan la solubilidad de un fármaco.⁸⁹

- a. *El soluto*: estructura molecular, grupos funcionales, polimorfismo.
- b. *El disolvente*: polaridad, formación de puentes de hidrógeno, fuerza iónica, cosolvencia, agentes solubilizantes.
- c. *Temperatura*: exotérmico versus endotérmico.
- d. *Tamaño de partícula y agitación*. usualmente afectan únicamente la velocidad de disolución, pero en algunos casos pueden afectar la solubilidad.

Los datos preliminares de solubilidad de un principio activo no solamente apoyan a los estudios biofarmacéuticos, también son útiles para el farmacólogo y el toxicólogo, en la administración del compuesto a probar biológicamente; con esto se pueden prevenir ambigüedades de sustancias reportadas como inactivas o no tóxicas, cuando de hecho, fueron pobremente absorbidas debido a su baja solubilidad acuosa.⁸⁰

1.3.4. Los profármacos para modificar la solubilidad y liposolubilidad.

Cuando un principio activo presenta problemas de insolubilidad acuosa, lo primero es intentar incrementarla mediante cosolvencia o por la formación de sales, debido a la facilidad de su elaboración y bajo costo económico. En caso de que con estos medios no se mejore satisfactoriamente, el comportamiento de solubilidad; entonces se requerirá de aplicar otras herramientas más elaboradas, como recursos físicos de formulación o el recurso químico de los profármacos.⁸⁶ Cuando se ha decidido utilizar a los profármacos, con miras a incrementar la solubilidad acuosa, se ha establecido como meta el obtener compuestos cuya solubilidad sea igual o mayor al valor de la dosis (mg/Kg) del principio activo, dividida entre 100 y referida a mL. En el caso del albendazol, cuya dosis promedio de administración es de 10 mg/Kg, los profármacos deberían presentar al menos una solubilidad de 0.1 mg/mL; esto representaría una ganancia de 23 veces con relación a la solubilidad del albendazol (4.35×10^{-3} mg/mL).

El éxito en el diseño de profármacos de un principio activo con problemas de absorción radica en lograr incrementos en la extensión de su absorción de hasta una doble o triple cantidad. La consecuencia de esto podría ocasionar disminuciones significativas en la dosis administrada o en el abatimiento del costo del tratamiento particular. En general un fármaco o un profármaco que presente una absorción uniforme minimizará las variaciones que se presenten entre diversos pacientes o entre las administraciones dadas a un mismo individuo.⁹⁰

1.3.4.1. Los bioprecursores y los derivados biorreversibles en la insolubilidad acuosa.

La aplicación de los profármacos para tratar de resolver problemas de insolubilidad utiliza en primera instancia, la estrategia de preparación de bioprecursores y/o derivados biorreversibles. Las ventajas que se espera obtener de estos son:

- a) bioprecursores, los cuales al no presentar la estructura del principio activo, tendrían diferentes comportamientos de solubilidad y liposolubilidad.
- b) derivados biorreversibles, los cuales, sin perder la estructura del principio activo, cambian la solubilidad mediante el uso de una porción estructural denominada modificador, el cual se puede utilizar con un mayor margen de maniobra estructural para modular la relación solubilidad-liposolubilidad.

Cuando se inicia el diseño de los profármacos es importante tomar en cuenta, que la solubilidad y la liposolubilidad en un compuesto, en general, guardan una relación inversa, cada vez que se intenta modificar la estructura de un fármaco para incrementar la solubilidad, repercute en una disminución de su liposolubilidad.

Otro aspecto a considerar es el sitio donde se espera que ocurra la biotransformación, por varias razones:

- a) la hidrólisis del derivado biorreversible para liberar al principio activo y su posible precipitación deben ser minimizados previamente a su absorción oral o parenteral.
- b) las ventajas de la difusión del fármaco no polar a través de las membranas no debe comprometerse.
- c) la presencia de enzimas para la oxidación, reducción (microflora intestinal) o hidrólisis para la transformación de un bioprecursor en el fármaco.

1.3.5. Estrategias en el diseño de derivados biorreversibles hidrosolubles.

En términos generales, hay una mayor cantidad de trabajos realizados con derivados biorreversibles que con bioprecursores para abordar el problema de la insolubilidad de diversos principios activos.^{53,54} Dos estrategias pueden ser empleadas para incrementar la solubilidad acuosa, al sintetizar derivados biorreversibles:⁸⁹

- a) mediante la adición de una porción estructural iónica o ionizable en condiciones fisiológicas.
- b) mediante la adición de una porción estructural para disminuir el punto de fusión del principio activo.

1.3.5.1. Adición de un modificador iónico o ionizable en condiciones fisiológicas.

La síntesis de un derivado biorreversible iónico o ionizable de un fármaco es tal vez la más común de las estrategias realizadas en este rubro. Esta alternativa se basa en la relación pH-solubilidad para ácidos y bases débiles. En la Tabla 6 se enlistan algunos de los modificadores utilizados para este propósito.

Tabla 6. Modificadores para solubilizar fármacos

Fármaco	Modificador	Derivado biorreversible
F-OH	Hemisuccinato	F-O-COCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺
	Clorhidrato de dimetilaminoacetato	F-O-COCH ₂ N(CH ₃) ₂ HCl
	Fosfato	F-O-PO ₃ ⁻ Na ⁺
	Aminoácido	F-O-COCHR-NH ₂
F-COOH	Éster de colina	F-COOCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ X ⁻
	Clorhidrato dedimetilaminoetilester	F-COOCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ HCl
	Aminoácido	F-CONHCH ₂ COO ⁻ Na ⁺

F: fármaco

De la tabla anterior, se puede decir, que los fármacos más fáciles para ser modificados con el propósito de desarrollar profármacos, son aquellos que tienen grupos carboxilos o hidroxilo. Algunos de los trabajos de investigación realizados en este sentido, han arrojado buenos resultados a este respecto.^{54,80} Sin embargo, no todos los compuestos activos presentan estos grupos funcionales, como el caso de la mayoría de los 2-bencimidazolcarbarnatos de metilo, por lo que los estudios actuales, se abocan a tratar de utilizar el diseño de profármacos en moléculas con estas características.

Los parámetros necesarios para seleccionar el grupo ionizable a utilizar son: la relación de las solubilidades de ácidos (o bases), sus sales y el valor del pKa. El pH donde se pueda encontrar la mejor solubilidad será, para el caso del grupo ionico ácido, mayor a su pKa, y será menor para el caso que dicho grupo sea una base. Además la estabilidad del enlace entre el modificador y el fármaco será mayor en donde se presente el más alto grado de solubilización.

Un aspecto importante que hay que señalar, y puede convertirse en una desventaja para esta alternativa, es la relación que se presenta entre la solubilidad acuosa y la liposolubilidad. La importancia de lo anterior, radica en que prácticamente todo incremento de solubilidad, necesariamente se ve acompañado por una disminución en la liposolubilidad de la sustancia. Relación que ha quedado demostrada por estudios realizados con series de análogos, en donde

se ha logrado establecer la proporción en las alteraciones de la liposolubilidad y solubilidad acuosa que se presentan en los compuestos cuando se modifica alguno de estos parámetros.⁸⁷

$$\log P = \log P_o + 0.5n$$

$$\log S = \log S_o - 0.6n$$

log P_o: coeficiente de partición del principio activo

log P: coeficiente de partición del compuesto modificado

log S_o: solubilidad acuosa del principio activo

log S: solubilidad acuosa del compuesto modificado

n: número de metilenos agregados

En esta relación inversa de la liposolubilidad y solubilidad, al parecer es esta última la que proporcionalmente está más afectada por las modificaciones estructurales que se realicen en un compuesto. En el ámbito de la absorción y disolución, si la solubilidad del principio activo es igual o mayor a la dosificación administrada, la pérdida de solubilidad, por incremento de la liposolubilidad, no tendría consecuencia en su biodisponibilidad. Por otra parte, si el fármaco presenta poca solubilidad, como el albendazol, una ganancia esperada en su absorción por mayor liposolubilidad, se vería anulada por una disminución en su velocidad de disolución.

1.3.5.2. Adición de un modificador para disminuir el punto de fusión del principio activo.

Esta estrategia se basa en el hecho de que para disolver moléculas, deben ser removidas de su red cristalina. Cualquier modificación estructural que disminuya la energía de la red cristalina, y en consecuencia provoque la reducción del punto de fusión, podría incrementar la solubilidad del fármaco. En el caso de los 2-bencimidazolcarbamatos de metilo, se ha propuesto que su insolubilidad acuosa se debe a su alta energía de red cristalina originada por la presencia de puentes de hidrógenos intermoleculares. Por estudios realizados en diversos principio activos, se ha logrado establecer que diferencias en 100 °C en el punto de fusión cambia significativamente la solubilidad acuosa y biodisponibilidad de los fármacos. Algunos de los grupos funcionales modificados con este propósito y los cambios en el punto de fusión ($\Delta p.f.$) que se han presentado en algunos profármacos se presentan a continuación:

Tabla 7 .Valores de $\Delta p.f.$ para algunas modificaciones con profármacos

Fármaco	Profármaco	Aromático ($\Delta p.f.$)	Alifático ($\Delta p.f.$)
F-COOH	F-COOCH ₃	-100	-70
	F-COOC ₂ H ₅	-150	-70
	F-COOC ₆ H ₅	70	--
	F-COONH ₂	50	20

Continuación de la Tabla 7.

Fármaco	Profármaco	Aromático ($\Delta p.f.$)	Alifático ($\Delta p.f.$)
F-OH	F-OCH ₃	-100	-30
	F-OC ₂ H ₅	-100	-50
	F-OCOCH ₃	-20	-20
	F-OCOC ₆ H ₅	0	0
F-NH ₂	F-NHCOCH ₃	60	--
	F-NHCOC ₆ H ₅	60	--

F:fármaco

A este respecto, prácticamente poco ha sido el estudio realizado cuando está presente un N-H ácido en el fármaco, como es el caso de los 2-bencimidazolcarbamato de metilo. Aunque se esperaría una disminución en el punto de fusión ya que se alteraría el patrón de formación de puentes de hidrógeno o una disminución en el número de los mismos.

Una de las ventajas que presenta esta alternativa de disminuir el punto de fusión, es que al incrementar la solubilidad del principio activo, no disminuye su liposolubilidad. Ventaja adicional sobre la alternativa anterior de adición de grupos ionizables al principio activo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El albendazol es un antihelmintico de amplio espectro, tradicionalmente utilizado para combatir parasitosis intraintraestinales por su escasa solubilidad acuosa. Sin embargo, en estudios recientes *in vitro*, ha mostrado actividad contra algunos parásitos que invaden otros órganos y tejidos diferentes al tracto gastrointestinal. En este contexto, ha sido utilizado en el tratamiento de la neurocisticercosis, en donde a pesar de su poca absorción intestinal, ha mostrado una eficacia que lo ubican actualmente como uno de los fármacos de elección para esta enfermedad. Situación que no ha sido la misma en estudios realizados *in vivo* con otros parásitos sensibles, en donde la actividad antiparasitaria de este fármaco ha mostrado poca eficiencia y variabilidad biológica en su respuesta. Este comportamiento puede ser atribuido básicamente a dos eventos que se presentan cuando se administra el albendazol por vía oral; el primero, debido a las diferencias en la velocidad para metabolizar este principio activo que pudiesen presentar los individuos bajo tratamiento; y el segundo, debido a que su absorción a través de los tejidos, está limitada por su insolubilidad acuosa más que por su liposolubilidad intrínseca, cuyo valor numérico ($\log P = 3.01$) nos indica que puede atravesar los tejidos del organismo. Por lo que respecta al aspecto metabólico, se ha encontrado que la oxidación del albendazol es un proceso rápido, lo que probablemente, no sea el factor determinante en la eficiencia terapéutica. Por otro lado, la cantidad que se absorbe de este compuesto, puede estar en función de la escasa disolución que manifiesta, misma que es ocasionada por su baja solubilidad (4.3×10^{-3} mg/mL), la cual es atribuida a las fuerzas de atracción intermolecular, que por su naturaleza de 2-bencimidazolcarbamato de metilo, presenta esta molécula. Con el propósito de mejorar la eficiencia antiparasitaria sistémica del albendazol, se han llevado a cabo estudios de formulación farmacéutica o administración con vaciamiento gástrico retardado, para ayudar a la solubilidad de este principio activo. Los resultados han sido favorables en este sentido. Estos hallazgos resaltan la importancia de la solubilidad en la actividad del albendazol contra parásitos extraintestinales. Ahora bien, dentro del ámbito de la química farmacéutica, ¿que recursos se podrían utilizar para modificar la solubilidad del albendazol?, ¿existe la posibilidad de que al modificar la molécula de este compuesto, se incremente su solubilidad acuosa?, y una vez hecho los cambios, ¿los nuevos compuestos presentarán la característica de generar o liberar a este principio activo?

3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1. Objetivo general

El presente trabajo de tesis se propone modificar las características de solubilidad acuosa del albendazol, mediante el diseño y la preparación de profármacos de este principio activo, en las modalidades de bioprecusores y derivados biorreversibles.

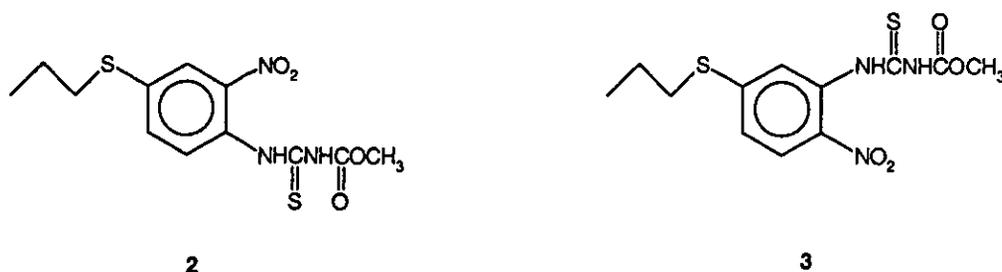
3.2. Hipótesis de trabajo

Siendo el albendazol un 2-bencimidazolcarbamato de metilo insoluble en agua:

- Es posible que mediante la preparación de bioprecusores del tipo tioureidos, estructuralmente diferentes al albendazol, se puedan tener sustancias con mejores características de solubilidad que el principio activo. Por su naturaleza estructural, dichos compuestos podrán generar al albendazol dentro del organismo mediante reacciones de reducción y ciclación intramolecular.
- Se espera que al modificar la molécula del albendazol mediante la adición de porciones estructurales en el átomo de nitrógeno del anillo imidazol, se logre disminuir la fuerza de atracción intramolecular o incrementar la polaridad de este principio activo, con el consecuente aumento en su solubilidad acuosa. Aquellos derivados que liberen al albendazol mediante hidrólisis enzimática serán considerados como biorreversibles.

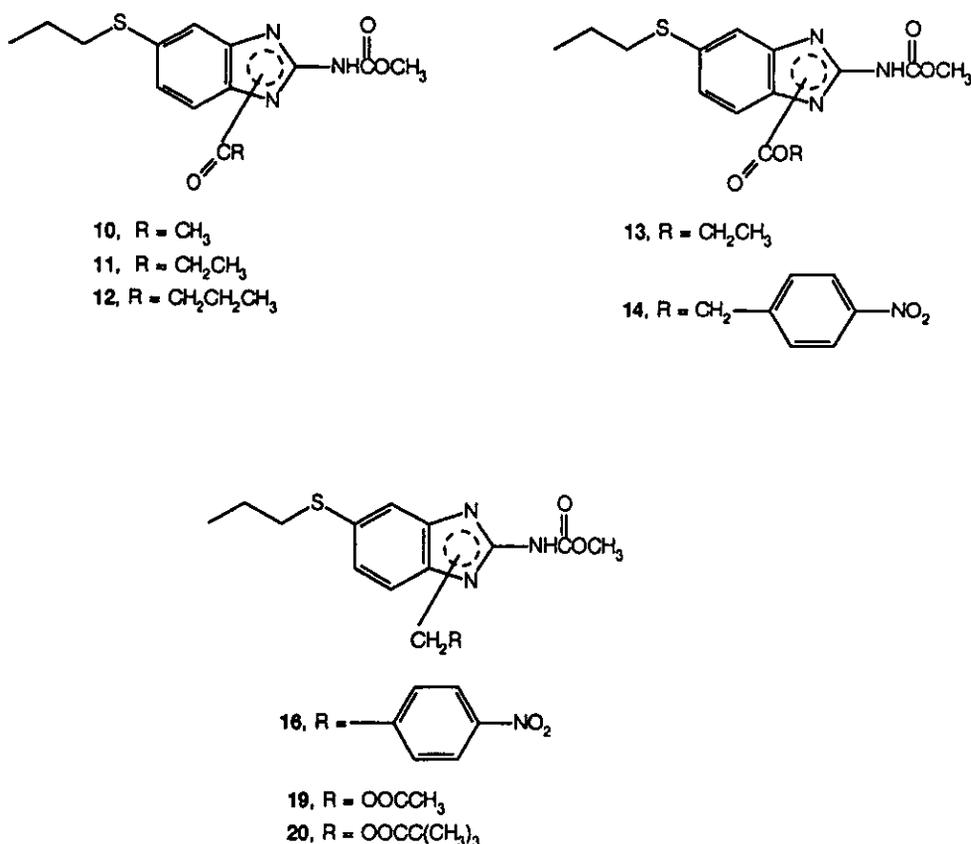
3.3. Objetivos particulares

- 3.3.1. Sintetizar dos bioprecusores estructuralmente diferentes al albendazol pero que pudiesen generarlo mediante reacciones de reducción biológica y ciclación intramolecular.



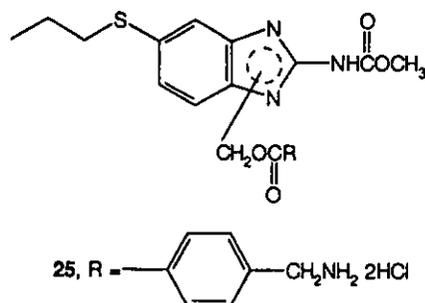
Esquema 6. Bioprecusores propuestos del albendazol

- 3.3.2. Caracterizar a los bioprecusores sintetizados, así como las materias primas que les dieron origen, mediante sus propiedades físicas: puntos de fusión, R_f y por métodos espectroscópicos (RMN, IR, UV) y espectrometría de masas
- 3.3.3. Evaluar la solubilidad acuosa, la liposolubilidad y la conversión química a albendazol, de los bioprecusores sintetizados.
- 3.3.4. Estudiar el comportamiento de los bioprecusores sintetizados en un modelo animal para determinar su biotransformación a albendazol o alguno de sus metabolitos.
- 3.3.5. Preparar derivados biorreversibles del albendazol que presenten menores puntos de fusión que este principio activo.



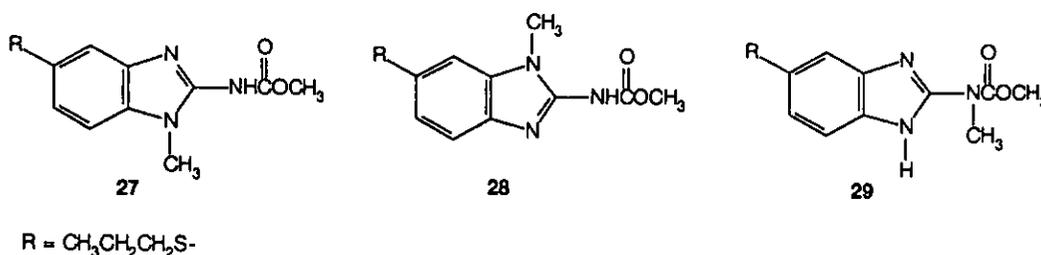
Esquema 7. Derivados biorreversibles propuestos con menor punto de fusión que el albendazol.

- 3.3.6. Preparar derivados biorreversibles que presenten un modificador ionizable responsable del incremento de la solubilidad acuosa.



Esquema 8. Derivados biorreversibles propuestos con grupo modificador ionizable.

3.3.8. Preparar derivados metilados (análogos) del albendazol

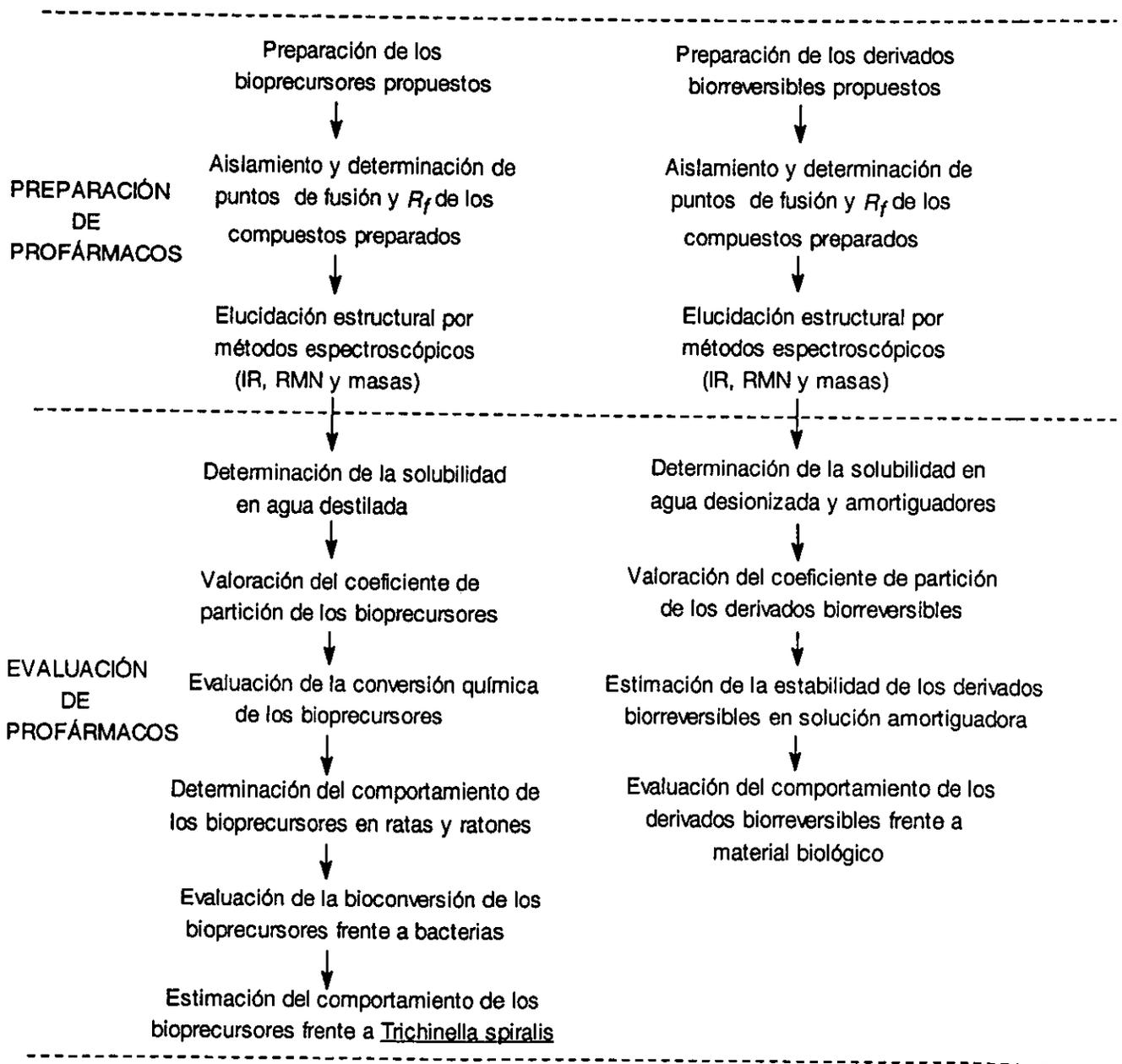


Esquema 9. Análogos N-monometilados del albendazol

- 3.3.9. Caracterizar a los derivados biorreversibles y análogos sintetizados, mediante sus propiedades físicas: puntos de fusión, R_f ; así como por métodos espectroscópicos (RMN, IR, UV) y espectrometría de masas.
- 3.3.10. Comparar el cambio en solubilidad acuosa que presenta el albendazol cuando se ha modificado su estructura por la adición de un metilo.
- 3.3.11. Determinar la solubilidad acuosa y el coeficiente de partición de los derivados biorreversibles sintetizados.
- 3.3.12. Someter a los derivados biorreversibles, que presenten una solubilidad al menos tres veces mayor que el albendazol, a evaluaciones de estabilidad acuosa.
- 3.3.13. Evaluar la bioconversión *in vitro* de estos mismos derivados biorreversibles, en presencia de enzima esterasa, homogeneizados de hígado e intestino de rata, y plasma humano, con el propósito de determinar si ocurre la liberación del albendazol.

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Con la intención de alcanzar los objetivos planteados, se llevaron a cabo las siguientes actividades, las cuales para su presentación han sido divididas en dos etapas, la de preparación de profármacos y la de evaluación de los mismos.



Esquema 10. Etapas a realizar en el trabajo de tesis

4.1. Preparación de profármacos

4.1.1. Instrumentación y materiales.

Los puntos de fusión (p.f.) se tomaron por capilar en un Buchi Mod 530. Para concentrar se empleó un rotavapor marca Büchi RE 111, con vacío generado por una bomba Felisa Mod. 1600 ajustada a 55 cm de Hg y condensador de hielo seco.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformadas de Fourier Mod FT-IR-1600 en pastilla de KBr, las señales se reportan en cm^{-1} . Los espectros de resonancia magnética protónica (^1H RMN, 90 MHz) se registraron en un espectro-fotómetro Varian EM-390 de 90 MHz. Los ^1H RMN (300 MHz) y los de resonancia magnética de C-13 (^{13}C RMN, 75 MHz) se corrieron en un Varian VXR-300S. Se utilizó dimetilsulfóxido- d_6 ($\text{DMSO}-d_6$), CDCl_3 y F_3CCOOD como disolventes; y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en todos los casos. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en partes por millón (ppm). Los espectros de masas, por ionización química (IQ) o impacto electrónico (IE, 70 eV), se determinaron en un aparato Hewlett Packard 5988A, la simbología utilizada es M^+ = ión molecular. La aplicación de la muestra fue por introducción directa o mediante cromatografía de gases (EM-CG).

El análisis elemental (C,H,N) fue realizado en un aparato Perkin Elmer 240 B del Departamento de Química en el Christopher Ingold Laboratories University College, Londres, U.K.

Los registros de absorbencia se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu 1650 con lámpara de luz UV con programas para el registro de barrido de absorbencia, cuantificación de soluciones e hidrólisis de los profármacos.

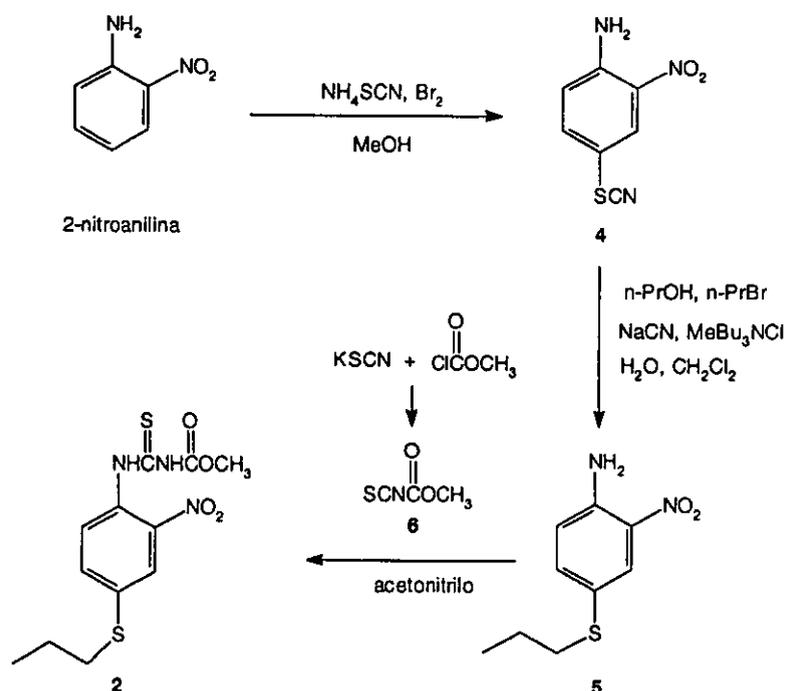
Cromatografía en capa fina, columna y preparativa. Para la cromatografía en capa fina (c.c.f.) se usaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice GF 254 (Merck). Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 35-70 (Merck). Para la cromatografía preparativa se usaron placas de vidrio de 20 x 20 cm con gel de sílice (Merck). Los compuestos se revelaron con luz UV y por exposición a vapores de yodo.

4.1.2. Métodos de preparación.

Los diferentes métodos de preparación de los siguientes profármacos fueron realizados tomando en cuenta publicaciones para la síntesis de otros compuestos diferentes al albendazol, pero que podrían llevarse a cabo para dicha sustancia con algunas modificaciones o adaptaciones experimentales.

4.1.2.1. Síntesis de los bioprecusores

Para la preparación de N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-4-propiltio)fenil]tiourea, **2**, se siguió la siguiente secuencia de reacciones:



Esquema 11. Preparación del bioprecursor N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-4-propiltio)fenil]tiourea, **2**.

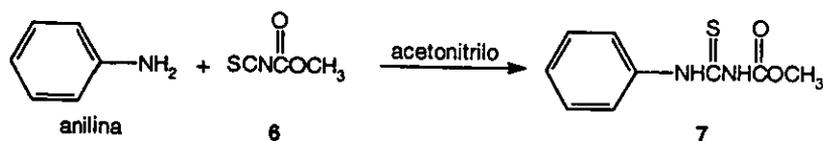
A continuación y para todos los casos, después de cada esquema se describen los diferentes procesos que se realizaron para la preparación de los intermediarios y productos que se indican en los mismos.

2-Nitro-4-tioclanoanilina (4).⁹¹ Una solución de 18.6 mL (722 mmol) de bromo en 49.5 mL de metanol anhidro, previamente saturado con bromuro de sodio, se adicionó a una solución de 33 g (239 mmol) de tiocianato de amonio en 267 mL de metanol anhidro a 0-5 °C (baño de hielo-sal) bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 1 h de agitación a la misma temperatura, se retiró el baño de hielo-sal, dejó llegar a 20 °C en 30 min y la mezcla de reacción se vertió sobre 350 g de hielo-sal. El producto crudo que precipitó se colectó por filtración al vacío, lavó con agua fría (3 x

50 mL) y recristalizó de tolueno para dar 46.95 g (100.68%) de un producto amarillo que mostró ser una mezcla de tres compuestos por c.c.f. Una segunda recristalización de tolueno, eliminando restos de humedad azeotrópicamente, dió 34.6 g (74.2%) de cristales dorados pequeños correspondientes al compuestos 4: $R_f = 0.27$ (hexano/ CH_2Cl_2 /AcOEt 50:35:15); p.f. 114-115 °C (Lit.⁹¹ 116.5-117 °C).

2-Nitro-4-propiltiocianilina (5).⁹¹ Una solución agitada de 20 g (102.6 mmol) de 2-nitro-4-tiocianoanilina, 46.4 mL (37.2 g) de n-propanol, 56 mL (75,8 g) de bromuro de n-propilo y 1.2 g (4.3 mmol) de cloruro de tetrabutilamonio en 200 mL de CH_2Cl_2 , se calentó a 40 °C bajo atmósfera de nitrógeno y se le incorporó, en un lapso de 10 min, una disolución de 39.8 g (612.9 mmol) de cianuro de potasio en 120 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó 6 h a 40-44 °C y 12 h a 20 °C. Después se separaron las fases y la acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 100 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua (2 x 100 mL), secaron con Na_2SO_4 anhidro y concentraron a sequedad en el rotavapor. El residuo oleoso, color ambar oscuro, pesó 28.2 g (129.71 %) y resultó ser una mezcla de dos sustancias por c.c.f. La mancha principal, más intensa, con R_f 0.44 (hexano/ CH_2Cl_2 /AcOEt 50:35:15), se separó de la menos intensa (R_f 0.0) por filtración a través de una columna (4 x 10 cm) con gel de sílice, eluida con CH_2Cl_2 . Los filtrados que contienen al compuesto principal se juntaron y concentraron a presión reducida en el rotavapor. El residuo obtenido pesó 18.1 g (47.8%) de un sólido café oscuro correspondiente al compuesto 5: $R_f = 0.44$ (hexano/ CH_2Cl_2 /AcOEt 50:35:15); p.f. 36-38 °C (Lit.⁹¹ 36.5-38 °C).

Isotiocianoformiato de metilo (6). Para la preparación de este compuesto se siguió el procedimiento descrito por Lamon y col.;⁹² además se hizo un estudio para su identificación y adaptación de la técnica de preparación en la síntesis del compuesto 2. El estudio realizado consistió en lo siguiente: a una solución agitada de 10 g (102.89 mmol) de tiocianato de potasio en 150 mL de acetona se le goteó lentamente, 8 mL (103.16 mmol) de cloroformiato de metilo, en condiciones anhidras. La mezcla se agitó por 2 h más a 20 °C. El sólido formado, que resultó ser soluble en agua, se separó por filtración al vacío. El filtrado se concentró en el rotavapor dejando 10.49 g (86%) de un líquido viscoso de color café, fuertemente irritante. La destilación a presión reducida de este líquido dió 7.1 g (58%) de un líquido ligeramente amarillo (p.eb. 60-61 °C/24 mmHg. Lit.⁹² p.eb.47-48 °C/13 mmHg). Para identificar este líquido, se determinó su espectro de ^1H RMN y se le hizo reaccionar con anilina, para obtener el compuesto 7 (N-fenil-N'-metoxicarboniltiourea), el cual es más fácil de manejar para obtener los registros espectroscópicos.



Esquema 12. Preparación del N-fenil-N'-metoxicarboniltiourea, 7.

Esta técnica consistió en agitar 24 h a 20 °C una solución de 4 g (34 mmol) de **6**, 3 mL (3.06 g, 31.5 mmol) de anilina en 5 mL de acetonitrilo;⁹³ concentrar a presión reducida, y recristalizar el sólido crema residual (6.4 g, 88.6%) de etanol-agua. El producto crudo fue recristalizado de etanol absoluto/agua: $R_f = 0.40$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15); p.f. 157-158 °C. Con los datos espectroscópicos obtenidos de este compuesto se confirmó la estructura de **6**. Con esta información se repitió la preparación de **7** sin aislar **6**, los resultados fueron semejantes, obteniéndose **7** con mayor facilidad.

N-Metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-4-propiltio)fenil]tiourea (2). Para la síntesis de este compuesto, ya no fue necesario el aislamiento y purificación del isotiocianoformiato de metilo, **6**, sino que se generó y se hizo reaccionar *in situ*. Una solución de 3.75 mL (4.5863 g, 48.36 mmol) de cloroformiato de metilo en 10 mL de acetonitrilo, se adicionó a una solución agitada de 4.7 g (48.36 mmol) de tiocianato de potasio en 100 mL de acetonitrilo, en condiciones anhidras. La mezcla de reacción se agitó 2 h a 20 °C. Enseguida se adicionó 5.1 g (24.17 mmol) de 2-nitro-4-propiltioanilina, **5**, y se agitó 6 h más a 30 °C, con lo que ya no se detectó **5** por c.c.f. Se filtró con succión sobre vidrio poroso, el residuo se lavó con acetona y el filtrado se concentró en el rotavapor. El residuo (7.7 g) se recristalizó de metanol-agua con enfriamiento prolongado durante 24 h. Así se obtuvieron 2.9 g (37.35%) de cristales amarillos: $R_f = 0.37$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15); p.f. 121-122 °C.

Los p.f. y datos espectroscópicos de los compuestos **4**, **5**, **6**, **7** y **2** se muestran en la Tabla 8.*

Tabla 8. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos **4**, **5**, **6**, **7** y **2**.*

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
4	114-115	IR (KBr) ν 3480 y 3360 ($-\text{NH}_2$), 1628 ($\text{S}-\text{C}=\text{N}$), 500 y 1262 ($-\text{NO}_2$) cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 6.3 (s, ancho, 2H, $-\text{NH}_2$), 6.8 (d, 1H, H-6), 7.5 (dd, 1H, H-5), 8.4 (d, 1H, H-3) ppm. EM-CG (IE) m/z 194.90 (M^+ , 94%), 122 (100%), $\text{tr} = 14.458$ min.
5	36-38	^1H RMN (CDCl_3) δ 1.0 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 1.6 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 2.7 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 6.0 (s, ancho, 2H, $-\text{NH}_2$), 6.7 (d, 1H, H-6), 7.2 (dd, 1H, H-5), 8.1 (d, 1H, H-3) ppm. EM-CG(IE) m/z 212 (M^+ , 52%), 170 (100%), $\text{tr} = 14.972$ min.

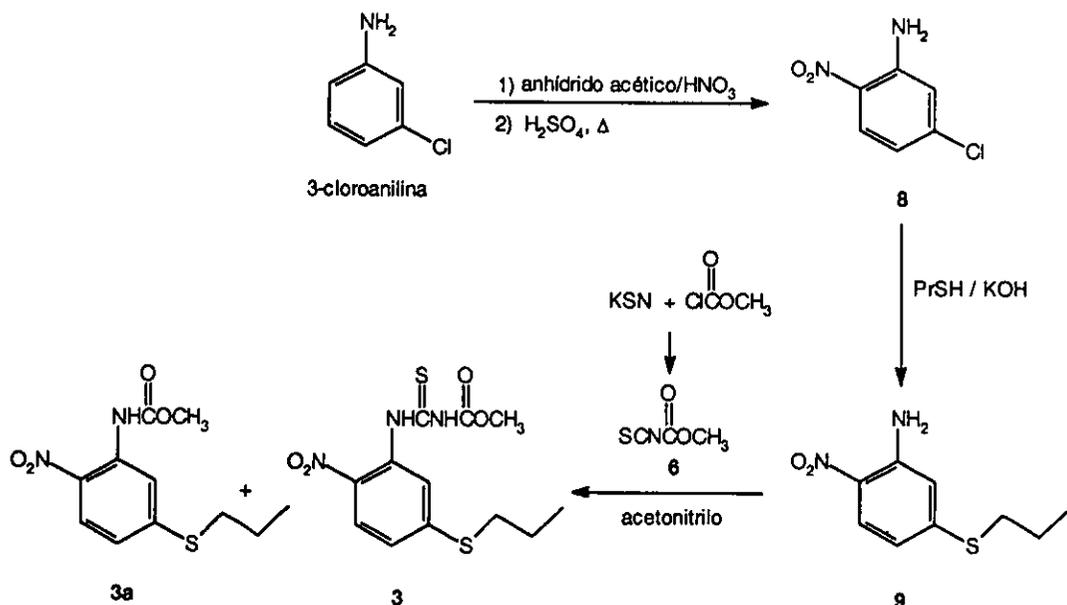
* A partir de la página 135 se presentan los diversos espectros de los productos finales obtenidos en esta tesis.

Continuación de la Tabla 8.

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
6	nd	^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3.3 (s, 3H, -OCH $_3$) ppm, λ_{max} = 312 nm IR (KBr) ν 3220, 3162, 1726, 1552, 1242, 1040 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl $_3$) δ 3.82 (s, 3H, OCH $_3$), 7.21 (dd, 1H, H-4), 7.40 (dd, 2H, H-3), 7.61 (d, 2H, H-2), 8.57 (s, 1H, -CSNHCO-, intercambiable con D $_2$ O), 11.43 (s, 1H, ArNHCS-) ppm; ^{13}C RMN (CDCl $_3$) δ 53.47(OCH $_3$), 124.43 (C-2), 126.86 (C-4), 128.82 (C-3), 137.45 (C-1), 153.26 (C=O), 177.90 (C=S) ppm. EM(IE) m/z 210 (M^+ , 40%), 209 (100%).
7	157-158	IR (KBr) ν 3170 (-NH), 1732 (-COO), 1566 (C=S), 1048 (N-C=S) cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 1.0 (t, 3H, CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ S-), 1.7 (m, 2H, CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ S-), 3.1 (t, 3H, CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ S-), 3.7 (s, 3H, -OCH $_3$), 7.6 (dd, 1H, H-5), 7.8 (d, 1H, H-6), 7.9 (d, 1H, H-3), 11.6 (s, 1H, -CSNHCO-), 11.7 (s, 1H, ArNHCS-) ppm; ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 13.145 (C-12), 21.666 (C-11), 33.567 (C-10), 53.197 (C-9), 122,298 (C-6), 129.145 (C-1), 130.504 (C-3), 131.717 (C-5), 137.403 (C-4), 144.452 (C-2), 153.85 (C-8), 180.137 (C-7) ppm; EM(IQ, CH $_4$) m/z 330 ($M+H$) $^+$ (100%). Anal. calc. para C $_{12}$ H $_{15}$ N $_3$ O $_4$ S $_2$: C, 43.76; H, 4.55; N, 12.76; exp.: C, 43.71; H, 4.56; N, 12.78.
2	121-122	

tr: tiempo de retención. s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete; nd: no determinado.

Para la preparación del otro isómero, N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil]tiourea, **3**, se efectuaron las siguientes reacciones:



Esquema 13. Preparación del bioprecursor N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil]tiourea, **3**.

5-Cloro-2-nitroanilina (8).⁹⁴ A 53 mL (63.27 g, 496 mmol) de 3-cloroanilina se le gotearon 100 mL de anhídrido acético, con agitación y enfriamiento, en condiciones anhidras. La solución obtenida de 3-cloroacetanilida se adicionó lentamente, a una solución agitada mecánicamente, de 200 mL de anhídrido acético y 50 mL de ácido nítrico fumante ($d = 1.574$), mantenida previamente a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Después de la adición a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (≈ 45 min) se retiró el baño de hielo seco-isopropanol, y se dejó llegar a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Con esto se formó sólido amarillo que se separó por filtración al vacío, lavó con agua hasta pH neutro, y dejó secar al aire. Este sólido pesó 43.5 g (40.5%), y mostró ser una sola mancha por c.c.f.: $R_f = 0.46$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15). Una muestra recristalizada de etanol dio un p.f. de $115\text{--}117\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit.⁹⁴ $116\text{--}117\text{ }^{\circ}\text{C}$). El filtrado de la reacción se vertió sobre aproximadamente 1 Kg de hielo-agua, agitó y filtró por succión. El residuo se lavó con agua hasta pH neutro y dejó secar al aire. El sólido seco (47.1 g) mostró dos manchas por c.c.f. ($R_f = 0.46$ y $R_f = 0.06$). Este sólido se suspendió tres veces con 150 mL de benceno para eliminar el compuesto insoluble 3-cloro-4-nitroacetanilida ($R_f = 0.06$). Los extractos bencénicos reunidos, se concentraron en el rotavapor. El residuo se recristalizó de etanol para dar 18.5 g más del compuesto con p.f. $115\text{--}116\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $R_f = 0.46$. De esta manera se obtuvieron finalmente, 62 g (57.78 %) de 5-cloro-2-nitroacetanilida como cristales amarillos: $R_f = 0.46$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15); p.f. $115\text{--}117\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit.⁹⁴ $115\text{--}116\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Para la hidrólisis del compuesto anterior se incorporaron 20 g (93.24 mmol) de éste a 40 mL de ácido sulfúrico ($d = 1.84$) con agitación a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego la mezcla se calentó a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min y dejó enfriar a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Acto seguido, se vertió sobre 300 g de hielo-agua. El sólido amarillo que precipitó se separó por filtración al vacío, lavó con agua hasta pH neutro, y dejó secar al aire. El sólido obtenido se recristalizó de etanol, dando 15.32 g (95%) de agujas amarillas: $R_f = 0.28$ (hexano/AcOEt 95:5), corrido tres veces; p.f. $123\text{--}124\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit.⁹⁴ $123\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2-Nitro-5-propiltioanilina (9).⁹⁴ Una mezcla agitada de 42.1 g (244 mmol) de **8**, 575 mL de agua, 11.5 mL de etilenglicol, 12 g (300 mmol) de NaOH en 12 mL de agua, y 34 mL (27.88 g, 252.7 mmol) de n-propanotiol, se llevó a reflujo ($94\text{--}95\text{ }^{\circ}\text{C}$) por un lapso de 5 h, en una campana bien ventilada y bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se agitó por 12 h a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La suspensión formada se dejó enfriar en baño de hielo. El sólido se separó por filtración, lavó con agua fría y dejó secar. Los filtrados se trataron con solución de hipoclorito de sodio para oxidar los residuos fétidos. El producto crudo de reacción (51 g, 18.5%) fue un sólido cristalino amarillo y mostró ser un solo compuesto por c.c.f.: $R_f = 0.28$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15); p.f. $69\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit.⁹⁴ $68\text{ }^{\circ}\text{C}$).

N-Metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil]tiourea (3). Una solución de 3.75 mL (4.5863 g, 48.36 mmol) de cloroformiato de metilo se adicionó a una solución agitada de 4.7 g (48.36 mmol) de tiocianato de potasio en 100 mL de acetonitrilo, en condiciones anhidras. La mezcla de reacción se agitó por 2 h, con lo cual se generó el isotiocianoformiato de metilo, **6**.^{92,93} A continuación se le agregaron 5.1 g (24.17 mmol) de 2-nitro-5-propiltioanilina, con lo que la disolución se tornó amarilla. La mezcla de reacción se dejó con agitación durante 5 h calentando a 60 °C. Transcurrido el tiempo, la suspensión se separó por filtración sobre un embudo de vidrio poroso, lavándose el sólido residual con acetona (2 x 30 mL). El filtrado se concentró al vacío, y el sólido obtenido dejó secar a temperatura ambiente. Así, se obtuvieron 7.454 g de un producto crudo, el cual se suspendió en 80 mL de hexano frío. La mezcla se separó por filtración al vacío, el residuo mostró ser una mezcla de dos productos principales por c.c.f.: $R_f = 0.36$, $R_f = 0.66$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15). Esta mezcla se suspendió en 50 mL de hexano/AcOEt (90:10) caliente y enseguida se separó por filtración. Después de eliminar el disolvente del filtrado, se obtuvo un sólido, **3a** (0.9 g) el cual después de recristalizarlo de metanol/agua, presentó un $R_f = 0.66$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15). Por otro lado, el sólido residual, de la suspensión hexano/AcOEt, se recristalizó de etanol absoluto/agua. De esta forma, se obtuvieron 5.05 g del compuesto **3** (60.26 %) como cristales amarillos: $R_f = 0.36$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15); p.f. 122 °C.

A continuación se presenta el p.f. y datos espectroscópicos para **8**, **9**, **3** y **3a**.

Tabla 9. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos **8**, **9**, **3** y **3a**.

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
8	123-124	IR (KBr) ν 3494, 3382 (-NH ₂), 1632, 1246 (-NO ₂) cm ⁻¹ ; ¹ HRMN (CDCl ₃) δ 6.6 (dd, 1H, H-4), 7.0 (d, 1H, H-6), 7.5 (s, ancho, 2H, -NH ₂), 7.9 (d, 1H, H-3) ppm.
9	69	IR (KBr) ν 3364 y 3328 (-NH ₂), 1626 y 1316 (-NO ₂) cm ⁻¹ ; ¹ H RMN (CDCl ₃) δ 1.1 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ CH ₂ S-), 1.8 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂ S-), 2.9 (t, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂ S-), 6.1 (s, ancho, 2H, -NH ₂), 6.5 (m, 2H, H-4 y H-6), 7.9 (d, 1H, H-3) ppm.
3	122	IR (KBr) ν 3186 (-NH), 1736 (-COO), 1578 (C=S), 1038 (N-C=S) cm ⁻¹ ; ¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.0 (t, 3H, -SCH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.7 (m, 2H, -SCH ₂ CH ₂ CH ₃), 3.1 (t, 2H, -SCH ₂ CH ₂ CH ₃), 3.8 (s, 3H, -OCH ₃), 7.3 (dd, 1H, H-4), 7.9 (d, 1H, H-6), 8.0 (d, 1H, H-3), 11.6 (s, 1H, -CSNHCO-), 12.1 (s, 1H, ArNHCS-) ppm; ¹³ C RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13.117 (C-12), 21.675 (C-11), 32.661 (C-10), 53.141 (C-9), 124.037 (C-6), 125.027 (C), 125.25 (C), 132.975 (C-1), 139.502 (C-2), 145.96 (C-5), 153.672 (C-8), 179.809 (C-7) ppm; EM(IQ, CH ₄) m/z 330 (M+H) ⁺ (100%). Anal. calc. para C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₄ S ₂ : C, 43.76; H, 4.55; N, 12.76; exp.: C, 43.77; H, 4.53; N, 12.72.

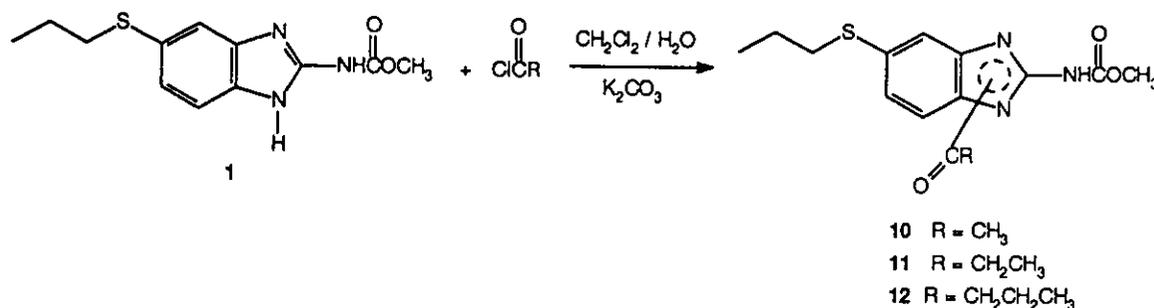
Continuación de la Tabla 9.

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
3a	122	IR (KBr) ν 3342, 1744, 1600, 1482, 1412, 1318, 1234, 1182 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 1.11 (t, 3H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.82 (m, 2H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.04 (t, 2H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.86 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.93 (dd, 1H, H-4), 8.12 (d, 1H, H-3), 8.49 (d, 1H, H-6), 10.18 (s, 1H, $\text{ArNHCO}-$) ppm; ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 13.394, 21.856, 33.678, 52.776, 115.108, 119.575, 125.975, 132.244, 135.964, 150.712, 153.568 ppm; EM (IE) m/z 270 (M^+ , 74%), 224 (100%)

s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete

4.1.2.2. Preparación de los derivados biorreversibles

Para la preparación de los derivados **10**, **11** y **12** se efectuaron las siguientes reacciones



Esquema 14. Preparación de los derivados biorreversibles acilados **10**, **11** y **12**.

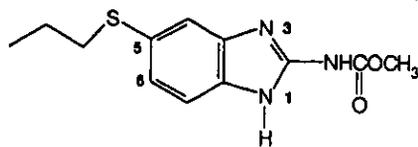
1-Acetil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (10). Una suspensión de 3 g (11.30 mmol) de albendazol, 3 g (21.17 mmol) de K_2CO_3 en 100 mL de CH_2Cl_2 y 1.5 mL de agua, se agitó 2 h a temperatura ambiente. Enseguida se le adicionó, gota a gota, una solución de 1.2 mL (16.98 mmol, $d = 1.10$, 99%) de cloruro de acetilo en 5 mL de CH_2Cl_2 .⁹⁵ La mezcla se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. Se adicionó 5 g de MgSO_4 anhidro, agitó 15 min y filtró. El filtrado se concentró en el rotavapor, de donde se obtuvo un sólido blanco, el cual después de secarlo a temperatura ambiente, pesó 3.2 g (92%). Por c.c.f. este sólido presentó dos manchas, de diferentes intensidades, al revelarlo con luz UV, $R_f = 0.42$ y $R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{ciclohexano}$ 90:7:3). Al intentar separar la mezcla por cristalización o cromatografía, el compuesto de menor R_f , y menor intensidad al revelarlo con luz UV, se descompone a albendazol. Al recrystalizar de benceno, se obtiene un solo compuesto, con un rendimiento del 40%: $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{ciclohexano}$ 90:7:3); p.f. 128 °C (Lit.⁹⁵ 125 °C).

1-Propanoil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (11). La preparación de este compuesto se llevó a cabo de forma similar al anterior, utilizando las mismas cantidades

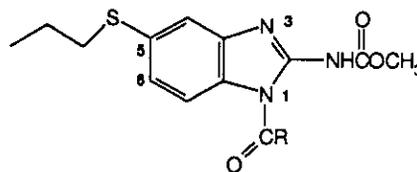
equimoleculares de las materias primas y cloruro de propanoilo. Los resultados obtenidos fueron semejantes. Un producto más estable con un rendimiento del 38%: $R_f = 0.53$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/$ ciclohexano 90:7:3); p.f. 145 °C.

1-Butanoil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (12). La preparación de este compuesto se llevó a cabo de forma similar a **10**, utilizando las mismas cantidades equimoleculares de las materias primas y cloruro de butanoilo. Se obtuvo un sólo producto con un rendimiento del 42%: $R_f = 0.56$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/$ ciclohexano 90:7:3); p.f. 138 °C.

Tabla 10. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos **1***, **10**, **11** y **12**.



1 (albendazol)



10: R = CH₃; 11: R = CH₂CH₃; 12: R = CH₂CH₂CH₃

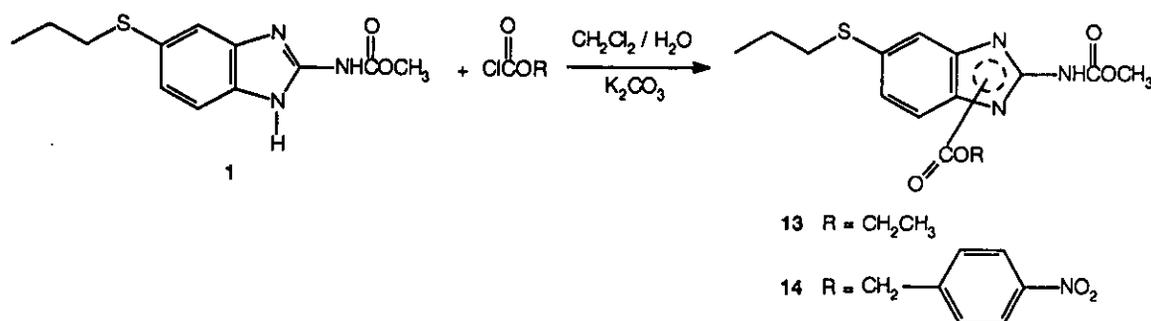
No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
1*	206	IR (KBr) ν 3332, 2958, 2666, 1634, 1588, 1444, 1270, 1096 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.93 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.52 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.83 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 7.09 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, H-6), 7.335 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-7), 7.425 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 11.65 (s, 1H, intercambiable con D_2O , -NHCO-) ppm; ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 11.35, 22.00, 36.61, 52.56, 113.95, 114.89, 124.10, 127.21, 135.1, 137.00, 147.90, 154.73 ppm.
10	128	IR (KBr) ν 3312, 2962, 1718, 1646, 1612, 1320, 1284, 1248, 1188, 1116 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.9 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.59 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.78 (s, 3H, CH_3CO -), 2.9 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.7 (s, 3H, - OCH_3), 7.15 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, H-6), 7.4 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 7.99 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-7), 12.0 (s, 1H, intercambiable con D_2O , -NHCO-) ppm. EM(IE) m/z 307 (M^+ , 20%), 265 (100%). Anal. calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 54.66; H, 5.53; N, 13.66; exp.: C, 54.66; H, 5.53; N, 13.66.
11	145	IR (KBr) ν 3312, 2964, 1722, 1648, 1602, 1310, 1276, 1152, 1114 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 1.0 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.15 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$ -), 1.6 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.9 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.3 (q, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$ -), 3.65 (s, 3H, - OCH_3), 7.15 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 7.41 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 7.95 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-7), 12.1 (amp, 1H, intercambiable con D_2O , -NHCO-) ppm; . EM(IE) m/z 321 (M^+ , 13%), 265 (100%). Anal. calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 56.05; H, 5.96; N, 13.08; exp.: C, 56.66; H, 5.74; N, 13.46.

Continuación de la Tabla 10

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
12	138	IR (KBr) ν 3334, 2958, 1716, 1632, 1588, 12270, 1098 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 1.0 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.2 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ -), 1.65 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ -), 2.85 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.3 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ -), 7.15 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 7.41 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 8.01 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-7), 12.1 (amp, 1H, intercambiable con D_2O , - NHCO -) ppm; EM(IE) m/z 335 (M^+ , 11%), 265 (100%). Anal. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 57.29; H, 6.32; N, 12.54; exp.: C, 57.19; H, 5.94; N, 12.46.

s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete; amp: señal amplia. *proporcionado por Smite-Kline.

Para la preparación de los derivados **13** y **14** se realizaron las siguientes reacciones



Esquema 15. Preparación de los derivados alquiloxicarbonilicos **13** y **14**.

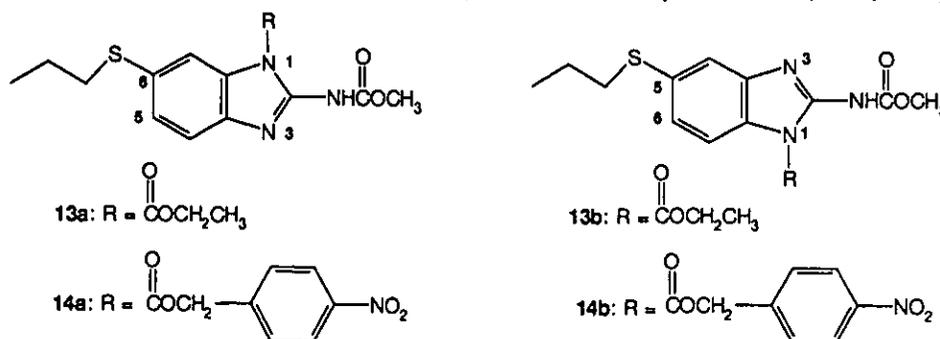
1-Etoxicarbonil-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (13). Una suspensión 5 g (18.8 mmol) de albendazol, 5 g de K_2CO_3 (36.1 mmol), 150 mL de CH_2Cl_2 y 2 mL de agua, se agitó 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionó lentamente, una solución de 2 mL de cloroformiato de etilo en 4 mL de CH_2Cl_2 . La mezcla se dejó en agitación por 5 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se lavó con agua fría (5 x 70 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y después de separar por filtración al sulfato de sodio, el filtrado se concentró en el rotavapor para obtener un líquido viscoso, el cual solidificó después de reposar durante 24 h. El peso del sólido fue de 6 g (95%), y presentó dos productos en c.c.f.: $R_f = 0.29$, $R_f = 0.36$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2). Al producto crudo se le agregaron 70 mL de eter isopropílico frío, agitando la mezcla para formar una suspensión, y enseguida agregar 2 mL de acetona. La suspensión se separó por filtración; el sólido obtenido presentó una sola mancha en c.c.f.: $R_f = 0.29$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2); p.f. 89 °C (**13a**). El filtrado se dejó en reposo en refrigeración durante 12 h, de donde se obtuvo un precipitado blanco, el cual se separó por filtración. Al sólido obtenido (1.6 g) se le agregaron 30 mL éter de petróleo caliente y 3 mL de CH_2Cl_2 . La solución se

dejó en reposo por 12 h para obtener un sólido blanco que presentó una sola mancha en c.c.f.: $R_f = 0.36$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2); p.f. 75 °C (13b).

1-(4-Nitrobenziloxicarbonil)-5(6)-propiltio-2-benzimidazolcarbamato de metilo (14). Una suspensión de 4 g (15 mmol) de albendazol con 80 mL de CH_2Cl_2 , se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron, 3 g (219 mmol) de K_2CO_3 , una solución de 5.0 g (22.49 mmol, 97%) de cloroformiato de 4-nitrobencilo en 10 mL de CH_2Cl_2 y 2 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó por 8 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se separó por filtración. El filtrado se lavó con agua fría, luego la fase orgánica secó con Na_2SO_4 anhidro y concentró en el rotavapor para dar un producto crudo de color amarillo; el cual después de lavarlo con éter de petróleo caliente, pesó 6.3 g (94%). En c.c.f. el sólido resultó ser una mezcla de dos productos: $R_f = 0.22$ y $R_f = 0.31$ ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{ciclohexano}$ 90:7:3). La separación de los productos se realizó mediante recristalización. El compuesto de menor R_f (14a) recristaliza de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ y el de mayor R_f (14b) de $\text{CHCl}_3/\text{hexano}$.

A continuación se presenta en la Tabla 11, el p.f. y datos espectroscópicos de los isómeros 13a y 13b, 14a y 14b.

Tabla 11. Puntos de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 13a, 13b, 14a y 14b.



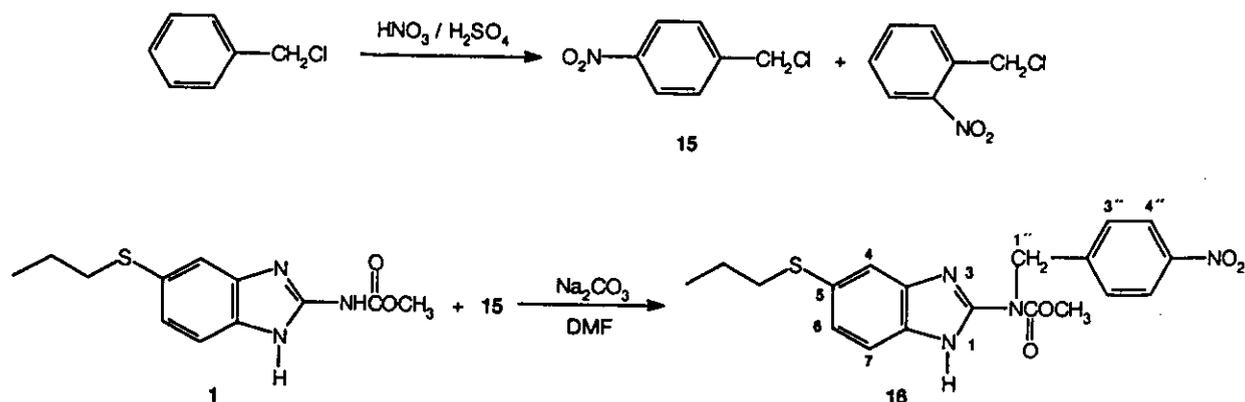
No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
13a	89	IR (KBr) ν 3314, 2960, 1764, 1736, 1536, 1374, 1334, 1288, 1220, 1186 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0.95 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.37 (t, 3H, OCH_2CH_3), 1.57 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.92 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 4.45 (q, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 7.29 (dd, $J = 2\text{Hz}$, $J = 9\text{Hz}$, 1H, H-5), 7.51 (d, $J = 9\text{Hz}$, 1H, H-4), 7.75 (d, $J = 2\text{Hz}$, 1H, H-7), 10.32 (s, 1H, intercambiable con D_2O , NHCO -) ppm; ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 12.98, 13.66, 21.90, 35.59, 52.69, 64.47, 114.57, 119.03, 125.89, 131.21, 131.49, 138.87, 144.43, 149.57, 153.113 ppm; EM(IE) m/z 337 (M^+ , 100%). Anal. calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: C, 53.40; H, 5.68; N, 12.46; exp.: C, 53.41; H, 5.63; N, 12.60.

Continuación de la Tabla 11

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
13b	75	IR (KBr) ν 3300, 2988, 1774, 1720, 1590, 1544, 1372, 1328, 1288, 1218, 1164 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.95 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.37 (t, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.55 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.92 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.71 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.45 (q, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 7.26 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 7.53 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4), 7.70 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-7), 10.31 (s, 1H, intercambiable con D_2O , NHCO -); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 13.05, 13.72, 21.90, 35.19, 52.72, 64.47, 114.54, 118.88, 125.06, 129.30, 131.83, 141.05, 145.05, 149.69, 152.89 ppm; EM(IE) m/z 337 (M^+ , 100%). Anal. calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: C, 53.40; H, 5.68; N, 12.46; exp.: C, 53.38; H, 5.61; N, 12.41.
14a	139	IR (KBr) ν 3318, 2958, 1782, 1730, 1540, 1284, 1260, 1214, 1184 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.89 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.81 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.66 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.63 (s, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 7.29 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, H-5), 7.51 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-4), 7.75 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-7), 10.4 (ampl., 1H, intercambiable con D_2O , NHCO -), 7.85 (d, $J = 10$ Hz, 2H, H-4"), 8.55 (d, $J = 10$ Hz, 2H, H-5") ppm; ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 13.10, 22.00, 35.85, 52.35, 68.10, 14.85, 18.93, 123.42, 126.00, 128.10, 129.67, 131.91, 142.20, 145.3, 147.84, 149.32, 153.87 ppm; EM(IE) m/z 444 (M^+ , 5%), 265 (100%). Anal. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$: C, 54.05; H, 4.54; N, 12.61; exp.: C, 54.33; H, 4.42; N, 12.67.
14b	105	IR (KBr) ν 332, 2964, 1770, 1732, 1570, 1520, 1340, 1324, 1266, 1216, 1165 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.98 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.82 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.95 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.63 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$), 7.25 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, H-6), 7.54 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 7.71 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-7), 7.80 (d, $J = 10$ Hz, 2H, H-4'), 8.26 (d, $J = 10$ Hz, 2H, H-5'), 10.43 (amp, intercambiable con D_2O , 1H, $-\text{NHCO}$ -) ppm; ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 12.96, 20.98, 35.10, 52.65, 68.10, 114.23, 118.41, 123.59, 124.85, 129.30, 132.21, 142.32, 157.21, 159.54 ppm. EM(IE) m/z 444 (M^+ , 8%), 265 (100%). Anal. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$: C, 54.05; H, 4.54; N, 12.61; exp.: C, 54.06; H, 4.46; N, 12.56.

s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete

La preparación del derivado **16** se realizó mediante las siguientes reacciones.



Esquema 16. Preparación del derivado biorreversible **16**.

Cloruro de 4-nitrobencilo (15).⁹⁶ A una mezcla agitada de 19.5 mL (367 mmol, $d = 1.84$) de ácido sulfúrico concentrado sobre 13 mL (288.8 mmol, $d = 1.4$) ácido nítrico concentrado, contenida en un vaso de precipitados de 2 L, se le adicionó lentamente, 22 mL (191 mmol) de cloruro de bencilo. En todo momento, la temperatura se mantuvo entre 0 a 5°C, en una campana bien ventilada. Después de 2 h de agitación y verificación del agotamiento de la materia prima, la mezcla presentó un sólido amarillo.⁹⁶ Se añadió lentamente agua con hielo, y agitó durante 30 min. Después de separar por filtración, el sólido residual impregnado con una sustancia oleosa, fue lavado con agua fría y luego de secarlo en un desecador al vacío, pesó 11.6 g (65%). Tanto el filtrado como el sólido amarillo fueron muy irritantes, por lo que se deben extremar los cuidados en el desarrollo de la reacción. El sólido recristalizó de etanol absoluto en forma de cristales amarillos: $R_f = 0.73$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2); p.f. 73 °C (Lit.⁹⁷ 71 °C).

N-(4-nitrobenzyl)-5(6)-propiltio-2-benzimidazolcarbamato de metilo (16) Una solución de 1.29 g (7.53 mmol) cloruro de 4-nitrobencilo, recién recristalizado de etanol absoluto, en 5 mL de DMF anhidra, se adicionó lentamente a una mezcla de 1.5 g (14.15 mmol) de Na_2CO_3 anhidro, 2 g (7.53 mmol) de albendazol y 20 mL de DMF anhidra. La solución oscura se calentó a 60 °C durante 2 h. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 100 mL de AcOEt y la mezcla se lavó con agua fría (5 x 25 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, y concentró en el rotavapor. El líquido viscoso de color café oscuro obtenido (2.3 g, 75%), se recristalizó de etanol absoluto, por enfriamiento prolongado en el congelador. Con esto, se obtuvo un sólido amarillo, el cual fue separado por filtración y lavado con etanol frío. Después de secarlo a temperatura ambiente, pesó 1.9 g (57%). El producto crudo fue recristalizado de

acetona para obtener un sólido amarillo, el cual después de separarlo por filtración, mostró ser prácticamente una sola mancha en c.c.f.: $R_f = 0.66$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 99:1$); p.f. 165-166 °C.

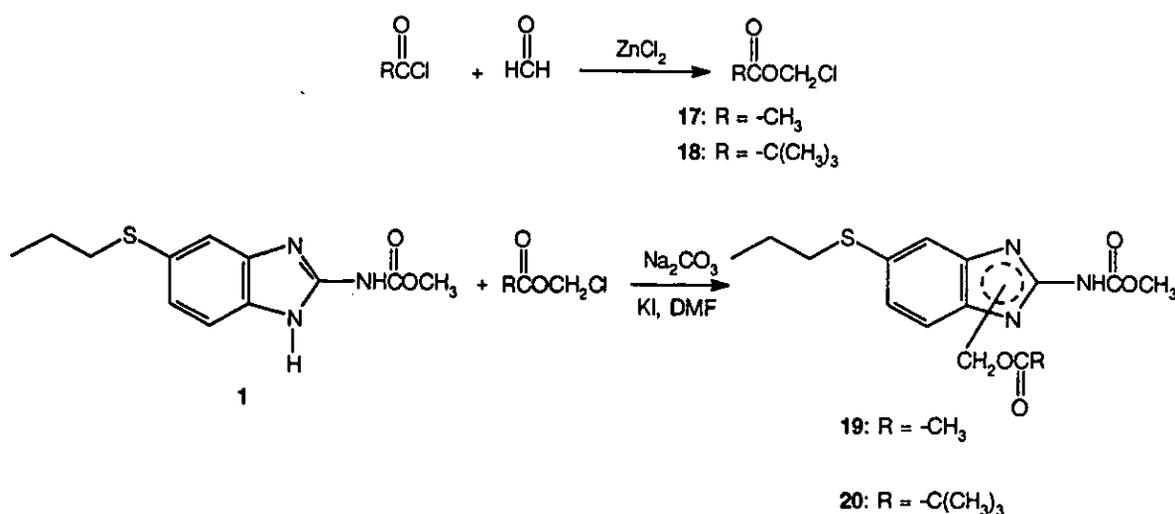
El p.f. y datos espectroscópicos de los compuestos **15** y **16** se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos **15** y **16**.

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
15	73	IR (KBr) ν 3444, 1612, 1540, 1350, 1106, 704 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 4.65 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 7.53 (d, $J=10$ Hz, 2H, H-2, H-6), 8.18 (d, $J=10$ Hz, H-3, H-5) ppm; EM (CG-IE) m/z 171 (M^+ , 48%), 136 (100%), tr = 4.69 min.
16	165-166	IR (KBr) ν 3384, 2950, 1718, 1538, 1518, 1454, 1344, 1248, 1230 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0.92 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 2.84 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 3.82 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.36 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$), 7.13 (dd, $J=2$ Hz, $J=10$ Hz, 1H, H-5), 7.41 (d, $J=10$ Hz, 1H; H-7), 7.47 (d, $J=2$ Hz, H-4), 7.56 (d, $J=11$ Hz, 2H, H-4''), 8.18 (d, $J=11$ Hz, 2H, H-3'') ppm; ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 13.95, 24.10, 38.21, 58.73, 139.56, 140.01, 125.12, 126.83, 128.92, 129.25, 131.12, 139.00, 143.27, 146.96, 150.12, 156.21 ppm; EM (IE) m/z 400 (M^+ , 100%); Anal. calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$: C, 56.98; H, 5.04; N, 14.01; exp.: C, 56.16; H, 5.36; N, 14.56.

s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete. tr = tiempo de retención.

La preparación de los derivados biorreversibles **19** y **20** se realizó como se indica en el siguiente esquema.



Esquema 17. Preparación de los derivados aciloximetilados **19** y **20**.

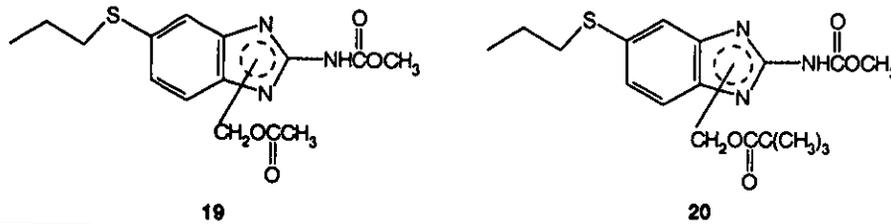
1-Acetiloximetil-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (19). Primeramente se preparó el acetato de clorometilo haciendo reaccionar 1g de $ZnCl_2$ (7.43 mmol), 5 g de paraformaldehído (166 mmol) y 13 mL de cloruro de acetilo (165 mmol, $d = 1.104$ g/mL) durante 12 h con agitación a temperatura ambiente y condiciones anhidras.⁹⁸ Al término del tiempo, se procedió a destilar para obtener el acetato de clorometilo, **17**: p.eb. 113-114 °C (Lit.⁹⁸ 113-115°C, 748 mmHg).

En la segunda parte, una mezcla de 0.8 mL (7.53 mmol) de acetato de clorometilo, 1.25 g (7.53 mmol) de KI en 20 mL de DMF, se agitó durante 12 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se agregaron 1.5 g (14.15 mmol) de Na_2CO_3 anhidro y 2 g (7.53 mmol) de albendazol. La mezcla se agitó durante 1 h, entre 40-45 °C, y luego a temperatura ambiente durante toda la noche. Después de verificar por c.c.f. el consumo de la materia prima, se agregaron 100 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua fría (5 x 25 mL), secó con $MgSO_4$ anhidro, filtró y concentró en el rotavapor hasta obtener una sustancia oleosa de color café, la cual solidifica al agregarle éter dietílico frío. Al recrystalizar de benceno-éter de petróleo, se obtuvo un sólido de color blanco (1.52 g, 60%), el cual mostró ser un sólo producto por c.c.f.: $R_f = 0.57$ ($CHCl_3/MeOH$ 98:02); p.f. 68 °C.

1-Pivalolloximetil-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (20). El pivalato de clorometilo, **18** (p.eb. 128-130 °C), se obtuvo de forma similar al acetato de clorometilo, con las mismas materias primas y cloruro de pivaloilo en las mismas cantidades equimoleculares. En la segunda parte, una mezcla de 0.6 mL (4.16 mmol) de pivalato de clorometilo, 0.69 g de KI en 15 mL de DMF, se agitó durante 12 h a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido el tiempo, se adicionó 1 g (3.768 mmol) de albendazol, y 1 g (9.43 mmol) de Na_2CO_3 anhidro. La suspensión se calentó a 50 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 h. Posteriormente, vertió sobre salmuera para obtener un sólido chiclosa crema, el cual se separó por decantación, lavó con agua fría y secó a temperatura ambiente. Luego se suspendió en una solución fría de acetona/éter isopropílico. El peso del producto crudo fué de 0.8 g (55%) y presentó dos compuestos principales por c.c.f.: $R_f = 0.5$ y $R_f = 0.58$ ($CHCl_3/MeOH$ 98:2). Intentos de separarlo por cristalización o cromatografía, provocaron la descomposición de la mezcla a un sólido de mayor polaridad, cuyo R_f y p.f. correspondían al albendazol. Por esta razón, la mezcla como tal, fue utilizada para estudios posteriores.

El p.f. y los datos espectroscópicos de los compuestos 17, 18, 19 y 20 se presentan en la Tabla 13.

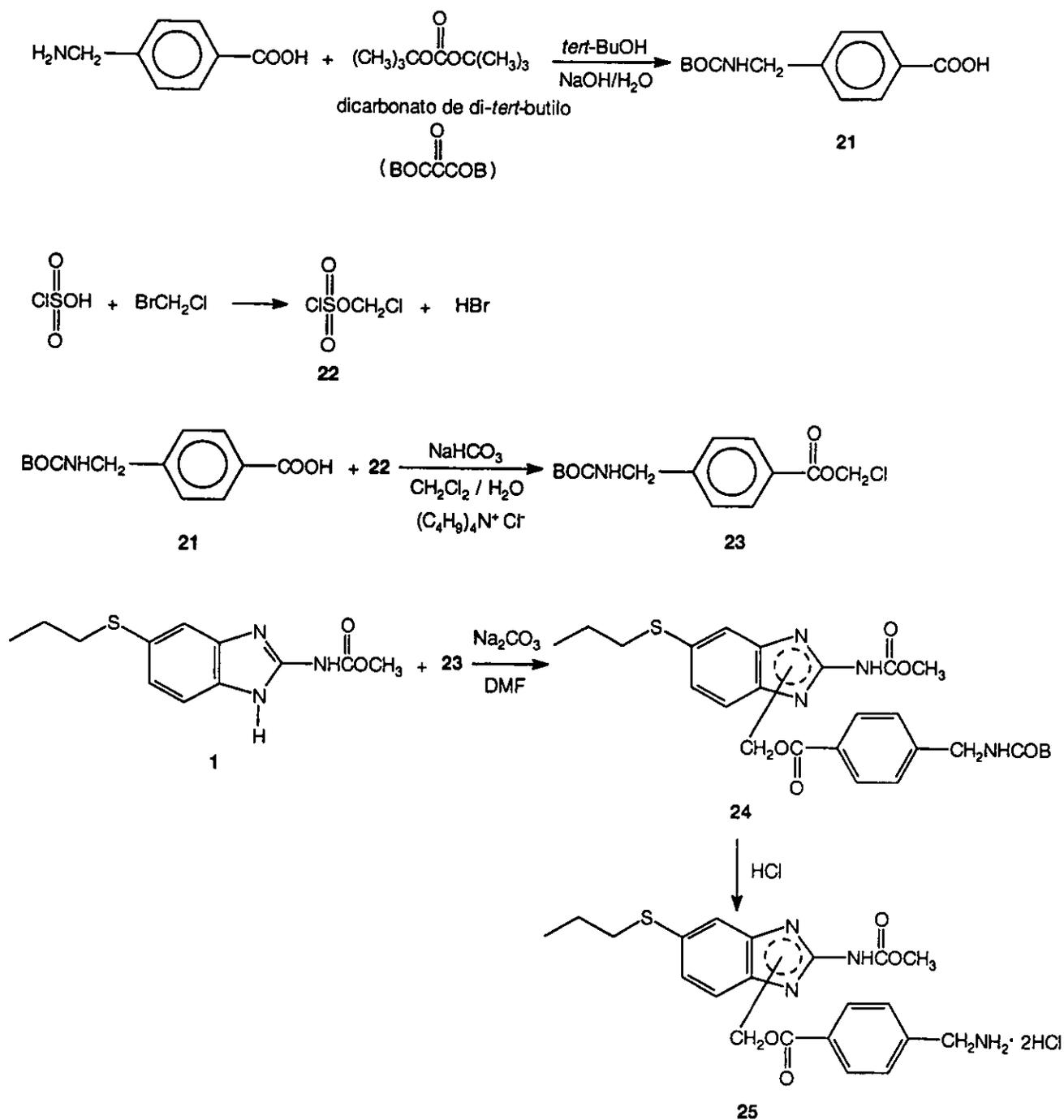
Tabla 13. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 17, 18, 19 y 20.



No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
17	nd	IR (película) ν 2989, 1766, 1203, 1049, 720 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{CDCl}_3\text{-}d_6$) δ 2.1 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 5.7 (s, 2H, $\text{ClCH}_2\text{O-}$) ppm.
18	nd	IR (película) ν 2976, 1766, 1747, 1481, 1274, 1130, 1095, 1041, 1010, 770, 711 cm^{-1}
19*	68	IR (KBr) ν 3312, 2960, 1742, 1608, 1570, 1440, 1286, 1194, 1178 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 1.027 (m, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 1.64 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 2.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.90 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 3.79 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.093 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC-}$), 7.14 (d, $J = 10$ Hz), 7.24 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz), 7.25 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz), 7.34 (d, $J = 10$ Hz), 7.44 (d, $J = 2$ Hz) ppm. ^{13}C RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 13.29, 20.64, 22.44, 37.08, 52.75, 63.46, 110.31, 111.61, 112.69, 125.98, 129.44, 131.81, 170.37 ppm. EM (IE) m/z 337 (M^+ , 21%), 305 (100%)
20*	108°C	IR (KBr) ν 3312, 2960, 1742, 1608, 1570, 1440, 1286, 1194, 1178 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 0.91 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 1.1 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CCOO-}$), 1.52 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 2.85 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 3.61 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.99 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}$), 7.14 (d, $J = 10$ Hz), 7.24 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz), 7.25 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz), 7.34 (d, $J = 10$ Hz), 7.44 (d, $J = 2$ Hz) ppm. EM (IE) m/z 379 (M^+ , 18%), 348 (100%)

*usado como mezcla posteriormente. nd = no determinado; s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete

Preparación del derivado biorreversible **25**.



Esquema 18. Preparación del derivado biorreversible con grupo ionizable, **25**.

Acido 4-[(*tert*-Butoxicarbonil)aminometil]benzoico (21).⁹⁹ A una solución, agitada por 10 min a 30 °C, de 5 g (33 mmol) de ácido 4-aminometilbenzónico y 1.4 g (35 mmol) de NaOH en 25 mL de agua y 58 mL de *tert*-butanol, se le adicionaron 8 mL (35 mmol) de dicarbonato de di-*tert*-butilo y agitó por 18 h más. Luego se agregaron 40 mL de agua y extrajo con hexano (4 x 20 mL). La fase acuosa se llevó a pH = 3 con solución concentrada de ácido cítrico y el precipitado blanco se separó por filtración al vacío, lavó con agua fría, secó y lavó de nuevo con hexano. Se obtuvieron 7.2 g (91%) de un solo compuesto por c.c.f.: $R_f = 0.37$ (CHCl₃/MeOH 90:10); p.f. 155 °C (Lit.⁹⁹ 156 °C)

Clorosulfato de clorometilo (22).¹⁰⁰ Una mezcla agitada de 200 mL (3 moles) de ácido clorosulfónico y 100 mL (1.5 mol) de bromoclorometano se llevó a reflujo y mantuvo así por 3 h. La mezcla se dejó llegar a temperatura ambiente y vertió sobre 500 g de hielo; se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 100 mL); los extractos se reunieron y lavaron con agua fría (100 mL), secaron con Na₂SO₄ anhidro y concentraron a presión reducida. El residuo se destiló a presión reducida, colectándose **22** a 59 °C, 16 mmHg (Lit.¹⁰⁰ 45-50 °C/ 9-10 mmHg). El rendimiento fue de 28% de un líquido con $d = 1.63$ g/mL.

4-[(*tert*-Butoxicarbonil)aminometil]benzoato de clorometilo (23). A una solución de 0.45 mL (4.5 mmol) de **22** en 5 mL de CH₂Cl₂ se le adicionó una mezcla de 1 g (3.98 mmol) de **21**, 1.27 g (51 mmol) de NaHCO₃, 0.135 g (0.398 mmol) de sulfato ácido de tetrabutilamonio, 10 mL de H₂O y 15 mL de CH₂Cl₂, cuidando que la temperatura no pasara de 30°C. Se agitó por 30 min más a temperatura ambiente y separaron las fases. La fase orgánica se lavó con agua fría, secó con Na₂SO₄ anhidro y concentró en rotavapor. El sólido blanco obtenido se recrystalizó de CH₃OH-H₂O para dar **23** con un 70% de rendimiento, c.c.f.: $R_f = 0.75$ (CHCl₃/MeOH 97:03), p.f. 86 °C.

1-[4-[(*tert*-Butoxicarbonil)aminometil]benzolloximetil]-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbama-to de metilo (24). Una solución de 2.52 g (7.53 mmol) de **23** en 5 mL de DMF anhidra se adicionó a una suspensión agitada por 15 min de 2 g (7.53 mmol) de albendazol y 1.5 g (14.15 mmol) de Na₂CO₃ en 15 mL de DMF anhidra, a temperatura ambiente, en condiciones anhidras. La mezcla se calentó a 40-45 °C durante 2 h y a 20 °C por 12 h; después se adicionaron 100 mL de acetato de etilo y 30 mL de agua, se agitó y separaron las fases, la orgánica se lavó con agua (5 x 30 mL) y secó con Na₂SO₄ anhidro. Por eliminación del disolvente en el rotavapor se obtuvo un líquido viscoso que solidificó después de 24 h a temperatura ambiente. La c.c.f. del producto crudo (3.62 g, 91%) mostró dos manchas de igual intensidad: $R_f = 0.26$ y $R_f = 0.31$ (CHCl₃/MeOH

97:3). La separación se logró por cromatografía en embudo de vidrio poroso, empleando gel de sílice como fase estacionaria y CHCl_3 como eluyente. Se obtuvo un 3% del compuesto con R_f 0.26 y 1.1 g (27%) del compuesto con R_f 0.31 y p.f. 228 °C; el cual fue asignado como compuesto 24.

Diclorhidrato del 1-[4-(Aminometil)benzoiloximetil]-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (25). Una solución de 2 mL de HCl 3M en metanol se adicionó a una solución de 0.5 g de 24 en 30 mL de AcOEt y la mezcla se agitó por 5 h a temperatura ambiente. Se formó un sólido blanco que se separó por filtración y lavó con CH_2Cl_2 caliente. El producto crudo (0.5 g) mostró en la c.c.f. una mancha en el origen. Una solución de 0.4 g de este producto en 6 mL de agua se trató con 2 mL de solución saturada de Na_2CO_3 y se obtuvo un sólido blanco, el cual presentó una sola mancha por c.c.f.: $R_f=0.64$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10).

Tabla 14. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 21, 22, 23, 24 y 25.

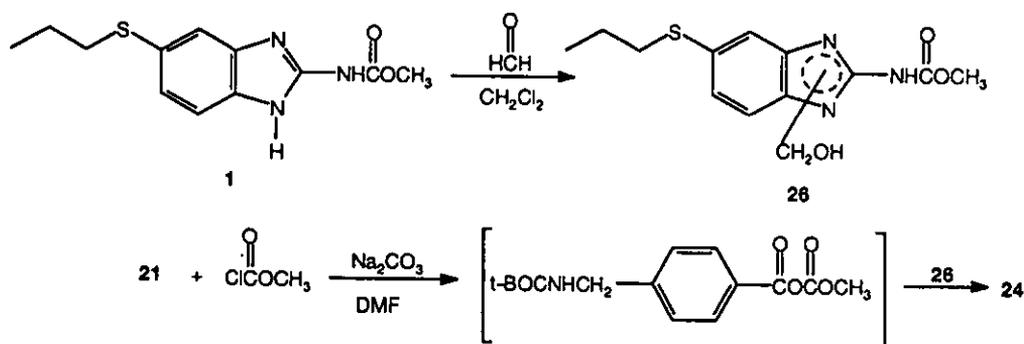
No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
21	155	IR (KBr) ν 3356, 1666, 1612, 1510 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.4 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -), 7.3 (d, $J = 10$ Hz, 2H, H-3, H-6), 7.9 (d, $J = 10$ Hz, 2H, H-2, H-6) ppm.
22	nd	^1H RMN (CDCl_3) δ 5.93 (s, 2H, ClCH_2O -) ppm.
23	86	IR (KBr) ν 3316, 2980, 1734, 1660, 1538, 1296, 1260, 1174, 1160, 1082 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.43 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -), 4.15 (d, $J = 4$ Hz, 2H, $-\text{NHCH}_2$ -), 6.95 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{Cl}$), 7.40 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.95 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-2, H-6) ppm.
24	228	IR (KBr) ν 3362, 2966, 1714, 1440, 1264, 1174, 1062 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 0.98 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.44 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -), 1.64 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.87 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.79 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.35 (d, 2H, $-\text{CH}_2\text{NH}$ -), 5.75 (t, 1H, $-\text{CH}_2\text{NH}$ -), 6.33 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}$ -), 7.21 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 7.27 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-7), 7.32 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.50 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 7.96 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-2', H-6') ppm; ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 13.87, 22.54, 28.66, 37.42, 37.45, 44.82, 53.10, 64.23, 110.34, 111.11, 111.97, 113.21, 125.97, 126.01, 127.38, 127.93, 130.20, 131.90, 145.87, 156.10, 166.03 ppm. Anal. calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$: C, 59.07; H, 6.11; N, 10.60; exp.: C, 59.11; H, 6.16; N, 10.57.

Continuación de la Tabla 14.

No.	p.f., °C	datos espectrocópicos
25	nd	IR (KBr) ν 3432, 2958, 2606, 1768, 1730, 1614, 1454, 1252, 1228, 1076 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ 1.038 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.68 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.97 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 4.03 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.17 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HCl}$), 6.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}$ -), 7.48 (dd, $J=2$ Hz, $J=10$ Hz, 1H, H-6), 7.62 (d, $J=10$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.67 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-4), 7.77 (d, $J=10$ Hz, 1H, H-7), 8.09 (d, $J=10$ Hz, 2H, H-3', H-6') ppm; ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ 13.38, 22.60, 36.41, 43.11, 54.91, 66.04, 112.44, 114.02, 127.11, 127.54, 128.79, 129.55, 129.75, 131.15, 136.94, 139.57, 145.17, 153.36, 165.45 ppm. Anal. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$: C, 50.39; H, 5.24; N, 11.20; exp.: C, 50.23; H, 5.16; N, 11.04.

nd: no determinado como clorhidrato. s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete

Preparación alternativa del intermediario 24.



Esquema 19. Preparación alternativa del intermediario 24.

1-(Hidroximetil)-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (26). Una suspensión de 1 g (3.76 mmol) de **1**, 1 mL de formaldehído al 30% y 1 g de Na_2CO_3 en 100 mL de CH_2Cl_2 , se agitó a temperatura ambiente hasta formar una disolución. la mezcla se secó con Na_2SO_4 anhidro, concentró en el rotavapor y el residuo se lavó con éter di-isopropílico. Se obtuvo 1.1 g (99%) de un sólido blanco: $R_f = 0.19$ ($\text{CHCl}_3/\text{Acetona}$ 95:05, 1 gota de NH_4OH); p.f. = 185 °C.

1-[4-[(*tert*-Butoxicarbonil)aminometil]benzoiloximetil]-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbama-to de metilo (24). A una suspensión fría de 0.42 g (1.68 mmol) de **21**, 0.5 g (4.7 mmol) de Na_2CO_3 y 3 mL de DMF, se le goteó lentamente una solución de 0.15 mL de (1.92 mmol, $d = 1.223$) cloroformiato de metilo en 1 mL de DMF. La mezcla se dejó en agitación por 3 h a la temperatura ambiente. Al término, se incorporaron 0.5 g (1.68 mmol) de **26** y se agitó por 4 h

más. Se adicionaron 100 mL de AcOEt. y lavó con agua (5 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y concentró en el rotavapor para dar 0.73 g (83%) de un sólido con 3 manchas por c.c.f.: $R_f = 0.22$, $R_f = 0.26$ y $R_f = 0.31$ (CHCl₃/MeOH 97:3). Después de separar al compuesto de mayor R_f , por cromatografía en columna, presentó el mismo p.f. del compuesto 24, con un rendimiento del 10%.

Tabla 15. Punto de fusión y datos espectroscópicos del compuesto 26

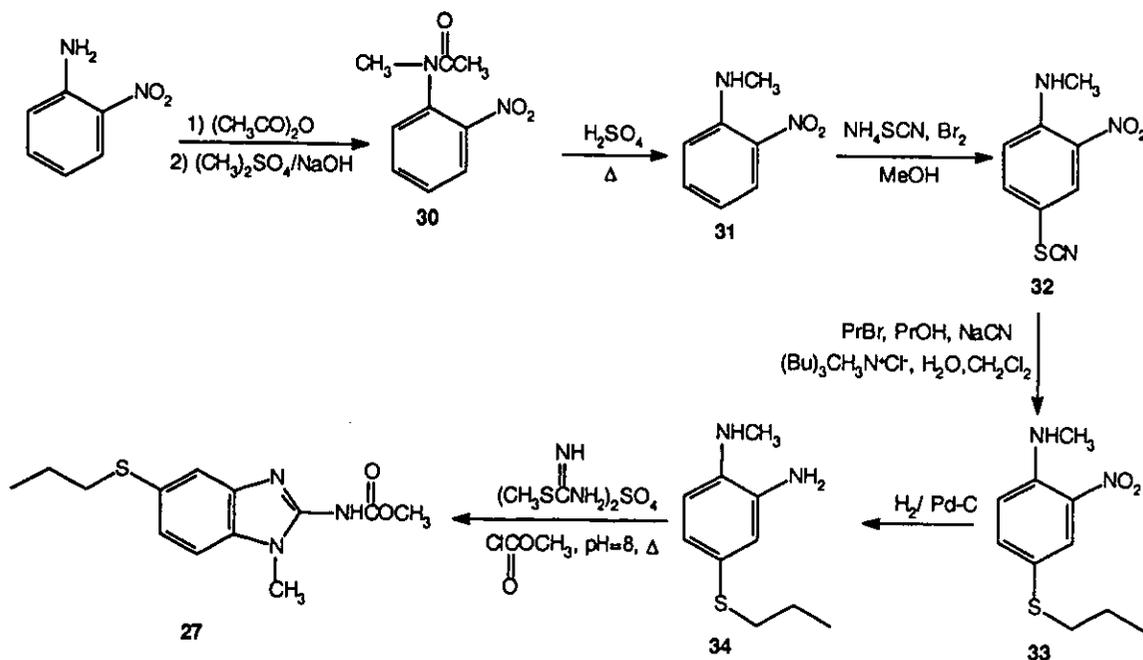
No.	p.f. °C	datos espectroscópicos
26	185	IR (KBr) ν 3432, 2958, 2606, 1768, 1730, 1614, 1454, 1252, 1228, 1076 cm ⁻¹ ; ¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.95 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ CH ₂ S-), 1.55 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂ S-), 2.8 (t, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂ S-), 3.7 (s, 3H, -OCH ₃), 3.75 (s, 2H, CH ₂ OH), 6.99 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H, H-6), 7.25 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-7), 7.32 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-6) ppm.

s: singlete; d: dobiete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete

4.1.2.3. Preparación de análogos N-monometilados del albendazol.

Para la preparación de los análogos monometilados del albendazol se siguieron los procedimientos descritos por Castillo y col.¹⁰¹ con pocas modificaciones.

Preparación del análogo 27.



Esquema 20. Preparación del análogo N-monometilado 27.

N-Metil-2-nitroacetanilida (30). Primeramente se preparó la 2-nitroacetanilida; para esto, se suspendieron 100 g (724 mmol) de 2-nitroanilina en 200 mL de anhídrido acético, se agitó y se adicionó 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado. La temperatura de la reacción subió espontáneamente hasta 60 °C y se agitó por 30 min más. La mezcla se vertió sobre hielo y el sólido formado se separó por filtración y lavó con agua hasta pH neutro. El producto crudo (101.3 g, 77.5%), mostró una sola mancha por c.c.f.: $R_f = 0.35$ (hexano/CHCl₃/AcOEt 50:35:15). Una muestra se recrystalizó de éter de petróleo dando cristales café claro con p.f. = 93 °C (Lit.¹⁰² 93-94 °C).

En una segunda etapa, se suspendieron 20 g (111 mmol) de 2-nitroacetanilida en 31.5 mL (41.9 g, 333 mmol) de sulfato de dimetilo, se agitó y calentó suavemente hasta llegar a los 30 °C. En este punto, se adicionaron lentamente y con agitación vigorosa, 20 mL de una solución de 13.3 g (333 mmol) NaOH, controlando la temperatura entre 32-37 °C. Terminada la adición, se agitó durante 30 min más y vertió sobre 50 g de hielo. Se extrajo con AcOEt (3 x 80 mL). Los extractos se lavaron con agua fría, secaron con Na₂SO₄ anhidro y concentraron en el rotavapor. Se obtuvieron 22 g (95%) de un aceite prácticamente puro por c.c.f.: $R_f = 0.08$ (hexano/CHCl₃/AcOEt 50:35:15). Este aceite no se purificó dada su pureza.

N-Metil-2-nitroanilina (31). Una mezcla de 20 g (103.01 mmol) de **30** y 4.9 g (123.62 mmol) de NaOH en agua/MeOH (20:60), se mantuvo a reflujo durante 2 h. Después se destiló el metanol a presión reducida y el líquido residual se mantuvo en refrigeración por 12 h. El sólido formado se separó por filtración y lavó con agua fría hasta pH neutro. Se obtuvieron 12 g (79%) de un sólido rojizo, prácticamente puro: $R_f = 0.60$ (hexano/CHCl₃/AcOEt 50:35:15); p.f. = 36 °C (Lit.¹⁰² 37°C).

N-Metil-2-nitro-4-tiocianoanilina (32). Una solución de 4 mL (79.64 mmol) de bromo en 25 mL de metanol anhidro, previamente saturado con NaBr, se adicionó lentamente a una solución a 0-5 °C de 11 g (72.12 mmol) de **31** y 13.2 g (173.54 mmol) de NH₄SCN en 180 mL de metanol anhidro. La mezcla se agitó por 1 h a 0-5 °C; después se llevó a 20 °C y vertió sobre 200 g de hielo. El sólido formado se separó por filtración y lavó con agua fría (3 x 50 mL). El sólido amarillo obtenido (13.1 g, 86%) se recrystalizó de tolueno para dar cristales amarillos: $R_f = 0.35$ (hexano/CHCl₃/AcOEt 50:35:15); p.f. = 109-110 °C.

N-Metil-2-Nitro-4-propiltioanilina (33). Una solución de 3.2 g (50 mmol) de KCN en 50 mL de agua se adicionó a una solución agitada a 40 °C de 6.0 g (28.70 mmol) de **32**, 11.6 mL de n-propanol, 17 mL (23 g, 187 mmol) de bromuro de n-propilo, 0.2 g de cloruro de tetrabutilamonio en 200 mL de CH₂Cl₂. La mezcla resultante se agitó por 6 h a 42-44 °C y 12 h más a temperatura

ambiente. Se separaron las fases y la acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 100 mL). Las partes orgánicas reunidas se lavaron con agua (100 mL), secaron con Na_2SO_4 anhidro y concentraron en el rotavapor. Se obtuvieron 10.93 g de un aceite rojizo con fuerte olor a cianuro. Este aceite se pasó por una columna (4 x 40 cm) con gel de sílice suspendida en éter de petróleo y eluida con el mismo disolvente. Las fracciones que contenían al compuesto rojizo se juntaron y concentraron en el rotavapor para dar 5.1 g (78%) de un líquido rojizo, prácticamente puro por c.c.f.: $R_f = 0.62$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15).

2-Amino-N-metil-4-propiltioanilina (34). En un frasco de hidrogenación Parr, primeramente se mezcló en seco 2 g (8.8 mmol) de **33** con y 200 mg de Pd-C al 10 %. Acto seguido, se adicionaron 100 mL de etanol absoluto. La mezcla se sometió a hidrogenación a temperatura ambiente entre 60 lb y 15 lb hasta que no se consumió más hidrógeno. La mezcla de hidrogenación se filtró a través de un embudo de vidrio poroso y el filtrado se concentró a presión reducida dejando 1.71 g (98.59 %) de un aceite violáceo: $R_f = 0.23$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15). Por su inestabilidad, el aceite se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción.

1-Metil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (27). A una solución fría de 2 g (8 mmol) de sulfato de 2-metil-2-tiopseudourea en 20 mL de agua, se le adicionaron 1.2 mL (16 mmol, $d = 1.223$) de cloroformiato de metilo. Enseguida se agregó, gota a gota durante 2 h, una solución de NaOH al 25%, controlando la temperatura en 15 °C y pH = 8.0. Una vez que la mezcla alcanzó la temperatura ambiente, se adicionaron 1.55 g (8 mmol) de **34** en 100 mL de agua. La suspensión se ajustó a un pH = 5 con HCl diluido, y luego calentó en baño de aceite a 92 °C durante 4 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente y la suspensión formada se separó por filtración. Después de lavar con agua fría, y suspender en metanol caliente por 2 h, el sólido obtenido se secó a temperatura ambiente. De esta forma, se obtuvieron 0.91 g (45 %) de polvo gris que se decoloró con carbón activado y recristalizó de acetona: $R_f = 0.29$ (CHCl_3 /MeOH 98:2); p.f. = 137-138 °C.

Tabla 16. Punto de fusión y datos espectroscópicos para los compuestos **30**, **31**, **32**, **33**, y **27**.

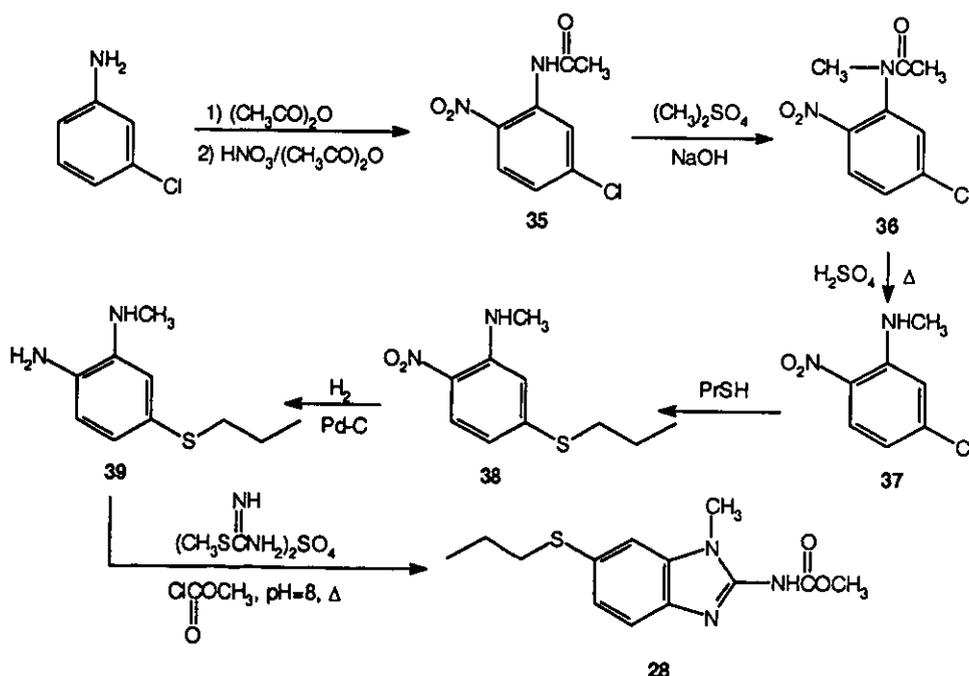
No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
30	nd	IR (KBr) ν 1664, 1602, 1526, 1348 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 1.8, 2.2 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 3.2, 3.35 (s, 3H, NCH_3), 7.2-8.0 (m, 4H, arom) ppm.
31	36	IR (KBr) ν 3396, 2918, 1620, 1572, 1514, 1444, 1352, 1264, 1234, 1178, 742 cm^{-1} ; ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 2.88, 2.91 (s, 3H, N-CH_3), 6.6 (ddd, 1H, H-3), 6.9 (d, 1H, H-6), 7.5 (ddd, 1H, H-5), 8.0 (dd, 1H, H-2) ppm; CG-EM (I.E.) m/z 152 (M^+ , 68%), 148 (100%), tr = 10.10 min

Continuación de la Tabla 16.

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
32	109-110	IR (KBr) ν 3392, 2154, 1614, 1510, 1356, 1182, 550 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 2.99, 3.01 (s, 3H, NCH_3), 7.1 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 7.75 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H, H-5), 8.3 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-3) ppm; CG-EM (I.E.) m/z 209 (M^+ , 100%), $\text{tr} = 9.38$ min.
33	nd	IR (KBr) ν 3390, 3092, 2960, 1610, 1558, 1512, 1414, 1350, 1262, 1230, 1178 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 0.95 (t, 3H, CH_3CH_2-), 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.72 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}-$), 2.95, 3.03 (s, 3H, NCH_3), 6.75 (d, $J = 9$ Hz 1H, H-6), 7.45 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H, H-5), 8.0 (m, 1H, $-\text{NH}$, intercambia con D_2O), 8.21 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-3) ppm; EM (I.E.) m/z 226 (M^+ , 100%)
27	137-138	IR (KBr) ν 3258, 2964, 2879, 1630, 1450, 1358 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.99 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 1.58 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 2.92 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 3.5 (s, 3H, NCH_3), 3.62 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 7.20 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, H-6), 7.33 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-7), 7.46 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 12.0 (s, 1H, NH , intercambiable con D_2O) ppm; ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 13, 22, 28, 36, 52, 109, 113, 124, 129, 130, 154, 162 ppm.

nd: no determinado; s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete; tr = tiempo de retención.

Preparación del análogo 28.



Esquema 21. Preparación del análogo N-monometilado 28.

5-Cloro-2-nitroacetanilida (35). En un vaso de precipitados de 2 L, se colocaron 200 mL de anhídrido acético. La solución se enfrió entre 0-5 °C y enseguida se adicionaron, gota a gota, 50 mL (78.7 g, 1250 mmol) de HNO₃ concentrado, agitando durante 30 min más. Enseguida se le agregó lentamente durante ≈45 min, una mezcla fría de 52.8 mL (63.78g, 500 mmol) de 3-cloroanilina en 100 mL de anhídrido acético. Después de agitar entre 5 a 7 °C se formó una suspensión amarilla. La mezcla de reacción fue separada por filtración y el sólido residual se lavó con agua fría. Una vez seco, el sólido pesó 43.5 g (40.5%) mostró ser un producto en c.c.f., $R_f = 0.46$ (hexano/CHCl₃/AcOEt 50:35:15). Una muestra recristalizada de etanol presentó un p.f. de 115 °C. Las aguas madres de la reacción se vertieron en hielo, con lo que formó una suspensión que se separó por filtración. El sólido se lavó hasta neutralidad. Después de secar a temperatura ambiente, el producto crudo pesó 47.1 g. En c.c.f. mostró dos productos uno de $R_f = 0.46$ y el otro de $R_f = 0.08$ (hexano/CHCl₃/AcOEt 50:35:15). Para separar esta mezcla, el sólido se lavó con benceno (3 x 150 mL). La solución bencénica se concentró al vacío en el rotavapor. El residuo se recristalizó de etanol, para obtener 18.5 g (17.24 %) del compuesto: $R_f = 0.46$; p.f. = 115 °C.

5-Cloro-N-metil-2-nitroacetanilida (36). Una suspensión de 30 g (139.8 mmol) de **35** en 40 mL (53.32 g, 422.78 mmol) de sulfato de dimetilo, se calentó lentamente en baño de agua hasta que la temperatura alcanzó los 35 °C. Enseguida, se agregaron gota a gota, 20 mL de una solución acuosa de NaOH (16.8 g, 419.8 mmol), cuidando que la temperatura no rebasara los 40 °C. Terminada la adición de la sosa, la mezcla se agitó durante 60 min, para que alcanzara la temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la mezcla se vertió sobre hielo (250 g), agitando hasta la fusión del mismo; luego la suspensión se separó por filtración y el sólido residual, lavó con agua fría y secó a temperatura ambiente. El producto crudo de color amarillo pesó 25 g (78%) y recristalizó de etanol. Los cristales amarillos mostraron ser prácticamente un solo producto en c.c.f.: $R_f = 0.21$ (hexano/CHCl₃/AcOEt 50:35:15); p.f. = 87-88°C.

5-Cloro-N-metil-2-nitroanilina (37). A 100 mL de H₂SO₄ concentrado, previamente enfriados entre 0-5 °C, se agregaron lentamente 15 g (65.6 mmol) de **36**. Terminada la adición, la mezcla se calentó a 100 °C durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y vertió lentamente sobre 400 g de hielo, agitando vigorosamente. La suspensión formada se separó por filtración y el sólido residual (7.1 g, 51.7 %) se lavó dos veces con agua carbonatada y luego con agua hasta pH neutro. Después de

recristalizar de etanol, el sólido presentó ser un sólo producto por c.c.f.: $R_f = 0.60$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15); p.f. = 103-105 °C.

N-metil-2-nitro-5-propiltioanilina (38). Una mezcla de 4 g de **37** (35.4 mmol), 100 mL de agua, 15 mL de etilenglicol, 5 g de Na_2CO_3 (47 mmol) y 4 mL de n-propanotiol, se calentó entre 95-100 °C con agitación y reflujo durante 4 h. Enseguida se dejó en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. La suspensión fue enfriada en baño de hielo para después separarla por filtración. El filtrado se recibió en una solución acuosa de NaOH. El sólido residual se lavó con agua y secó a temperatura ambiente. Al final se obtuvieron 4.5 g (92%) de un sólido amarillo, el cual recristalizó de hexano y mostró ser un solo producto por c.c.f.: $R_f = 0.31$ (hexano/AcOEt 95:5, eluida 3 veces); p.f. 62 °C.

2-Amino-N-metil-5-propiltioanilina (39). En un frasco de hidrogenación Parr, primeramente se mezcló en seco, 2 g de **38** y 200 mg de Pd-C al 10 %. Enseguida se adicionó 100 mL de etanol absoluto. La mezcla se sometió a reducción por hidrogenación catalítica a temperatura ambiente, después de cargar con H_2 a 60 lb. Cuando el consumo de H_2 llegó a 15 lb, se volvió a cargar a 60 lb nuevamente, hasta el total consumo de la materia prima. Una vez logrado esto, el catalizador se retiró por filtración en embudo de vidrio poroso. El filtrado se concentró en el rotavapor y se obtuvo 1.55 g (99.59%) de un aceite café, el cual fue utilizado inmediatamente para la siguiente reacción: $R_f = 0.21$ (hexano/ CHCl_3 /AcOEt 50:35:15).

1-Metil-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (28). A una solución fría de 2 g (8 mmol) de sulfato de 2-metil-2-tiopseudourea en 20 mL de agua, se le agregó 1.2 mL (16 mmol) de cloroformiato de metilo. Acto seguido, se adicionó gota a gota, una solución acuosa de NaOH al 25% para alcanzar un valor de pH = 8, cuidando que la temperatura no rebasara los 15 °C. La adición terminó después de 2 h, al no registrarse cambios en el valor del pH. Cuando la mezcla alcanzó la temperatura ambiente, se le adicionó 1.55g (8 mmol) de **39** en 100 mL de agua. La suspensión se ajustó a un pH = 5 con HCl diluido, y calentó a 92 °C durante 4 h. Después que la mezcla alcanzó la temperatura ambiente, se separó por filtración. El sólido residual se lavó primero con agua fría, luego con metanol caliente y secó a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvieron 1.2 g (54 %) de polvo gris el cual se recristalizó de AcOEt/éter de petróleo. El sólido blanco obtenido mostró ser un producto por c.c.f.: $R_f = 0.30$ (CHCl_3 /MeOH 98:2), p.f. = 240-241 °C.

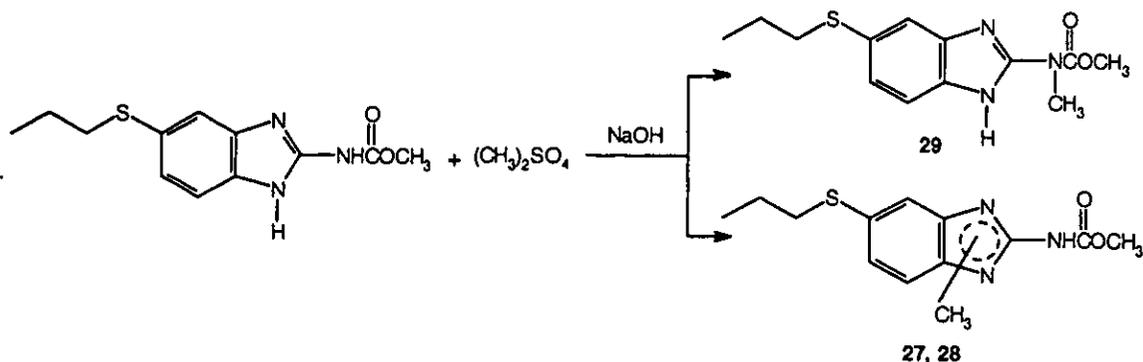
En la Tabla siguiente se presenta el p.f. y los datos espectroscópicos de 35, 36, 37 y 28.

Tabla 17. Punto de fusión y datos espectroscópicos de los compuestos 35, 36, 37, 38 y 28.

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
35	115	IR (KBr) ν 3330, 1694, 1578, 1494, 1332, 1256 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 2.1 (s, 3H, CH_3CO -), 7.39 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H, H-5), 7.81 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-2), 7.99 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-4), 11.3 (m, intercambiable con D_2O , NH) ppm.
36	87-88	IR (KBr) ν 3098, 1660, 1520, 1350, 838 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 1.7, 2.1 (s, 3H, CH_3CO -), 3.1, 3.4 (s, 3H, NCH_3), 7.5-8.2 (m, 3H, arom) ppm.
37	103-105	IR (KBr) ν 3382, 2928, 1694, 1618, 1498, 1262, 1224, 904 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 2.9, 2.99 (s, 3H, NCH_3), 6.65 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H, H-5), 7.95 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-2), 8.05 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-4), 8.17 (m, intercambiable con D_2O , NH) ppm.
38	62	IR (KBr) ν 3366, 2958, 1604, 1570, 1320, 1260, 1208, 1164, 1138, 1042, 914 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.99 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.65 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.89, 2.91 (s, 3H NCH_3), 3.1 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 6.5 (dd, $J=2$ Hz, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 6.55 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-2), 7.9 (d, $J=9$ Hz, 1H, H-4), 8.2 (m, intercambiable con D_2O , NH) ppm; CG-EM (I.E.) m/z 226 (M^+ , 100%), tr = 15.18 min.
28	240-241	IR (KBr) ν 3258, 2964, 2879, 1630, 1450, 1358 cm^{-1} ; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0.99 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 1.58 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 2.97 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -), 3.5 (s, 3H, NCH_3), 3.62 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 7.14 (dd, $J=2$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, H-5), 7.34 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-4), 7.40 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-7), 12.0 (s, 1H, NH, intercambiable con D_2O) ppm; ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 13, 22, 28, 36, 52, 110, 112, 124, 129, 131, 153, 162 ppm.

s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete; tr: tiempo de retención.

Metilación del albendazol para obtener el análogo 29.



Esquema 22. Metilación del albendazol y obtención del análogo 29.

N-Metil-5(6)-propiltio-1H-2-bencimidazolcarbamato de metilo (29). Una mezcla de 3 g de albendazol (11.8 mmol), 2 g (13.8 mmol) de K_2CO_3 y 50 mL de DMF, se calentó a 50 °C, para disolver el albendazol y después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Enseguida se colocó en baño de hielo hasta alcanzar la temperatura de 5 °C. Logrado esto, se agregaron, gota a gota, 5 mL de una solución de 1.7 g (11.8 mmol) de sulfato de dimetilo en DMF, cuidando que la temperatura no rebasara los 10 °C. Terminada la adición, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido el tiempo, se agregaron 300 mL de AcOEt y enseguida 50 mL de agua. La fase orgánica se lavó 5 veces con agua (5 x 25 mL), y secó con Na_2SO_4 anhidro. Después de separar al agente secante por filtración, la solución orgánica se concentró en el rotavapor para obtener un aceite viscoso cuyo peso fue de 2.59 g (82%). El análisis por c.c.f., mostró ser una mezcla de 3 compuestos ($CHCl_3/MeOH$ 98:2); el más polar, $R_f = 0.17$, correspondió al albendazol, el de polaridad intermedia, $R_f = 0.30$, coincidió con los compuestos 27 y 28, y el de menor polaridad, $R_f = 0.55$. La separación y aislamiento del compuesto de menor polaridad se realizó mediante cromatografía de columna con gel de sílice, con cloroformo como fase móvil. Después de identificar a las fracciones que contenían al compuesto buscado, se juntaron y concentraron en el rotavapor. De esto, se obtuvieron 150 mg de un sólido blanco: $R_f = 0.55$ ($CHCl_3/MeOH$ 98:2); p.f. 82 °C.

Tabla 18. Punto de fusión y datos espectroscópicos para el compuesto 29.

No.	p.f., °C	datos espectroscópicos
29	82	IR (KBr) ν 3334, 2958, 2873, 1704, 1546, 1454, 1282, 1198, 1166 cm^{-1} ; 1H RMN ($CDCl_3$) δ 0.99 (t, 3H, $CH_3CH_2CH_2S-$), 1.62 (m, 2H, $CH_3CH_2CH_2S-$), 2.86 (t, 2H, $CH_3CH_2CH_2S-$), 3.6 (s, 3H, NCH_3), 3.95 (s, 3H, $-OCH_3$), 7.2-7.7 (m, 3H, arom), 10.95 (s, 1H, $-NH$, intercambiable con D_2O) ppm; ^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ 13, 22, 33, 38, 54, 110, 113, 118, 121, 125.8, 125.9, 129, 131, 132.5, 140, 141.8, 149.8, 149.9, 155.5 ppm; CG-EM (I.E.) m/z 279 ($M+$, 100%), $tr = 19.70$ min.

s: singulete; d: doblete; dd: doble de dobles; t: triplete; m: multiplete; tr: tiempo de retención.

4.2. Evaluación de profármacos

4.2.1. Evaluación de los bioprecusores.

4.2.1.1. Solubilidad en agua desionizada.

A los bioprecusores sintetizados y al albendazol se les determinó su solubilidad en agua desionizada mediante el siguiente procedimiento previamente publicado.^{103,104} Se colocaron 10 mg del compuesto a evaluar en tubos de ensayo de 16 x 150 con tapa de rosca. A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua desionizada y se agitaron durante 10 min en vortex. Enseguida, se calentaron en baño maría a 37 °C durante 24 h. Tiempo en el cual se alcanzó el equilibrio de saturación de la solución acuosa. Luego se procedió a separar por filtración la suspensión que presentaba cada tubo, utilizando filtros de membrana de celulosa (Spartan-13, 0.45 μm). La primera porción del filtrado se descartó para evitar algún error en la cuantificación, por la saturación de la membrana del filtro. La concentración del compuesto en el filtrado se evaluó por triplicado, mediante espectrofotometría a la longitud de onda de máxima absorción para cada sustancia. El valor se obtuvo al interpolar de curvas de calibración previamente elaboradas y que se presentan en el apéndice.

4.2.1.2. Determinación del coeficiente de partición de 1, 2 y 3.

El coeficiente de partición ($\log P$) fue calculado y determinado experimentalmente por el reparto octanol/agua (Hanch) y por método cromatográfico.

Log P calculado. Para calcular el valor de $\log P$, en todos los casos, se utilizó el programa computacional ACDLOG P[®] corrido en una computadora PC, y se basa en la adición de los valores de π de Hansch para cada uno de los sustituyentes.

Partición octanol/agua.¹⁰⁶ Antes de determinar el coeficiente de partición de los bioprecusores, se valuó el $\log P$ del ácido acetilsalicílico y fenilbutazona con la intención de comparar los resultados obtenidos con los previamente publicados.¹⁰⁷ Por este método no se evaluó el coeficiente de partición del albendazol, por problemas de la solubilidad de este compuesto. Para esta determinación se utilizó como fase orgánica el 1-octanol y como fase acuosa, amortiguador de fosfatos, (0.02M, pH = 7.0, fuerza iónica de 0.1).¹⁰⁸ Ambos disolventes fueron previamente saturados uno con el otro, durante toda la noche.

Se pesaron cuidadosamente, 20 mg (0.060 mmol) de 2 y 3, y disolvieron en 5 mL de polietilenglicol y aforó a 10 mL con etanol. De esta solución se tomaron 2 mL y aforó a 25 mL con

solución amortiguadora de fosfatos caliente; para eliminar los residuos no disueltos, se procedió a filtrar. Enseguida se cuantificó espectrofotométricamente, la concentración (C_i) de los bioprecusores en esta solución (2: 457 μM , 3:469 μM). Para la distribución, se tomaron 10 mL de la fase acuosa y colocaron en un embudo de separación de 125 mL. Luego se agregaron 10 mL de 1-octanol. Se agitó el embudo en periodos de 3 min (5 veces) a temperatura ambiente. Se permitió que las fases se separaran y dejó en reposo durante 2 h. Posteriormente, se separó la fase acuosa, en donde se cuantificó espectrofotométricamente, la concentración de cada uno de los bioprecusores. Este procedimiento se realizó por triplicado. El P fue calculado como:¹⁰⁸

$$P = \frac{C_i - C_f}{C_f} \times \frac{V_{ac}}{V_o}$$

C_i : concentración inicial en la fase acuosa; C_f : concentración en la fase acuosa, después de la distribución; V_o : volumen de la fase orgánica; V_{ac} : volumen de la fase acuosa.

Método cromatográfico. Por este procedimiento se evaluó el log P de 1, 2 y 3. Este método tomó como referencia al factor de capacidad (k) para cada compuesto.¹⁰⁹ Este parámetro fue calculado de $[(t_r - t_o)/t_o]$, donde t_r es el tiempo de retención del compuesto problema y t_o corresponde al frente del disolvente (volumen muerto = 0.831 min). La fase móvil consistió de mezclas de metanol/agua [9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 (v/v)] y fueron utilizadas a una velocidad de flujo de 1 mL/min (~250 atm) a la temperatura de 25 ± 1 °C. La fase móvil fue previamente desgasificada por sonicación y vacío, antes de ser utilizada.¹¹⁰ El log k promediado fue graficado contra el porcentaje de metanol presente en la mezcla. El valor de log k_o fue obtenido por extrapolación al 100% de agua. La correlación entre el log k_o del compuesto de referencia y su valor, previamente publicado,¹¹¹ de log P fue determinado por análisis de regresión lineal.¹¹⁰ Los compuestos utilizados como referencias fueron benzaldehído (log k_o = 1.51, log P = 1.45), benceno (log k_o = 2.12, log P = 2.13), tolueno (log k_o = 2.57, log P = 2.73), xileno (log k_o = 3.11, log P = 3.15), antraceno (log k_o = 4.10, log P = 4.45), y DDT (log k_o = 5.60, log P = 6.91). log k_o = $m(\log P) + b$, de donde $m = 0.75186$, $b = 0.5427$. Estos valores fueron obtenidos al graficar el log k_o versus log P de los compuestos de referencia.

Con este mismo procedimiento, se evaluó el log P de 1, 2 y 3. Dichos compuestos se disolvieron en metanol (0.5 mg/mL). Enseguida se inyectaron 10 μL de cada solución en el cromatógrafo. La determinación de 1 fue a 295 nm y la de 2 y 3 a 375 nm. Se calcularon los correspondientes k en las diferentes mezclas metanol/agua (90, 80, 70, 60 %). Después se determinó el valor de k_o como se indicó anteriormente.

4.2.1.3. Conversión química de los bioprecursores

La reducción del grupo nitro de los bioprecursores se realizó mediante ditionita de sodio^a como modelo de químico para la conversión de estos compuestos.¹⁰⁵ En un matraz de bola de 500 mL de una boca (24/40), con agitador magnético, se colocaron 100 mg del bioprecursor 2 (0.30 mmol) en 300 mL de etanol absoluto, al cual previamente se le había pasado una corriente de nitrógeno durante 10 min. Al matraz se le agregó gota a gota, mediante un embudo de adición de presiones igualadas, 8 mL de una solución acuosa de 102 mg/mL (0.60 mmol/mL) de ditionita de sodio, 84.4 mg/mL (1.0 mmol/mL) de bicarbonato de sodio. La suspensión se agitó durante 2 h, bajo atmósfera de nitrógeno, a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se procedió a concentrar en el rotavapor para la obtención de un sólido blanco. El sólido obtenido se suspendió en agua para eliminarle los residuos de sales inorgánicas, y posteriormente separarlo por filtración. Enseguida el sólido residual se recristalizó de dimetilformida/agua. El producto obtenido presentó un p.f. = 207 °C, con un rendimiento del 36%. Los datos de infrarrojo y ¹H RMN concordaron con los del albendazol: IR (KBr) ν 3332, 2958, 2666, 1634, 1588, 1444, 1270, 1096 cm^{-1} ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 0.93 (t, 3H, CH₃CH₂CH₂S-), 1.52 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂S-), 2.83 (t, 2H, CH₃CH₂CH₂S-), 7.09 (dd, *J* = 2 Hz, *J* = 10Hz, 1H, H-6), 7.335 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H-7), 7.425 (d, *J* = 2Hz, 1H, H-4), 11.65 (s, 1H, intercambiable con D₂O, -NHCO-) ppm; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ 11.35, 22.00, 36.61, 52.56, 113.95, 114.89, 124.10, 127.21, 135.1, 137.00, 147.90, 154.73 ppm.

El mismo procedimiento descrito anteriormente, con las mismas cantidades de sustancias, se realizó para el bioprecursor 3. El sólido obtenido presentó un p.f. de 207 °C, con un rendimiento del 45%. Los datos de infrarrojo y ¹H RMN para este producto concordaron con los previamente presentados para el albendazol.

4.2.1.4. Comportamiento de los bioprecursores en ratas.

Las ratas utilizadas fueron Sprague Dawley de 250-300 g, las cuales fueron mantenidas en condiciones de bioterio. El estudio se llevó a cabo con dos dosificaciones diferentes, utilizando 3 grupos de 12 ratas para cada etapa. En todos los casos, se hizo una administración única empleando una cánula intragástrica. El albendazol se usó como control positivo. En la primera parte, el albendazol se administró a una dosis de 10 mg/Kg (37.7 $\mu\text{mol/Kg}$) y los bioprecursores a 10 mg/Kg (30 $\mu\text{mol/Kg}$). En la segunda parte, la dosis administrada de albendazol fue de 30 mg/Kg (113 $\mu\text{mol/Kg}$) y la de los bioprecursores de 30 mg/Kg (91.62 $\mu\text{mol/Kg}$). En cada etapa, al primer grupo se le administró albendazol, el cual se encontraba en

suspensión comercial (Zentel, Smith Klane). Al segundo grupo se le administró el bioprecursor **2**; y al tercer grupo, el bioprecursor **3**. Ambos bioprecusores se encontraban en una solución de etanol/Tween80/agua (50:25:25) a temperatura ambiente.

Se tomaron muestras de sangre de 2 mL de la vena yugular, a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h post-administración, utilizando dos ratas por cada tiempo. La muestra sanguínea heparinizada se sometió a centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, para la obtención del plasma, el cual se guardó a -20 °C hasta su análisis.

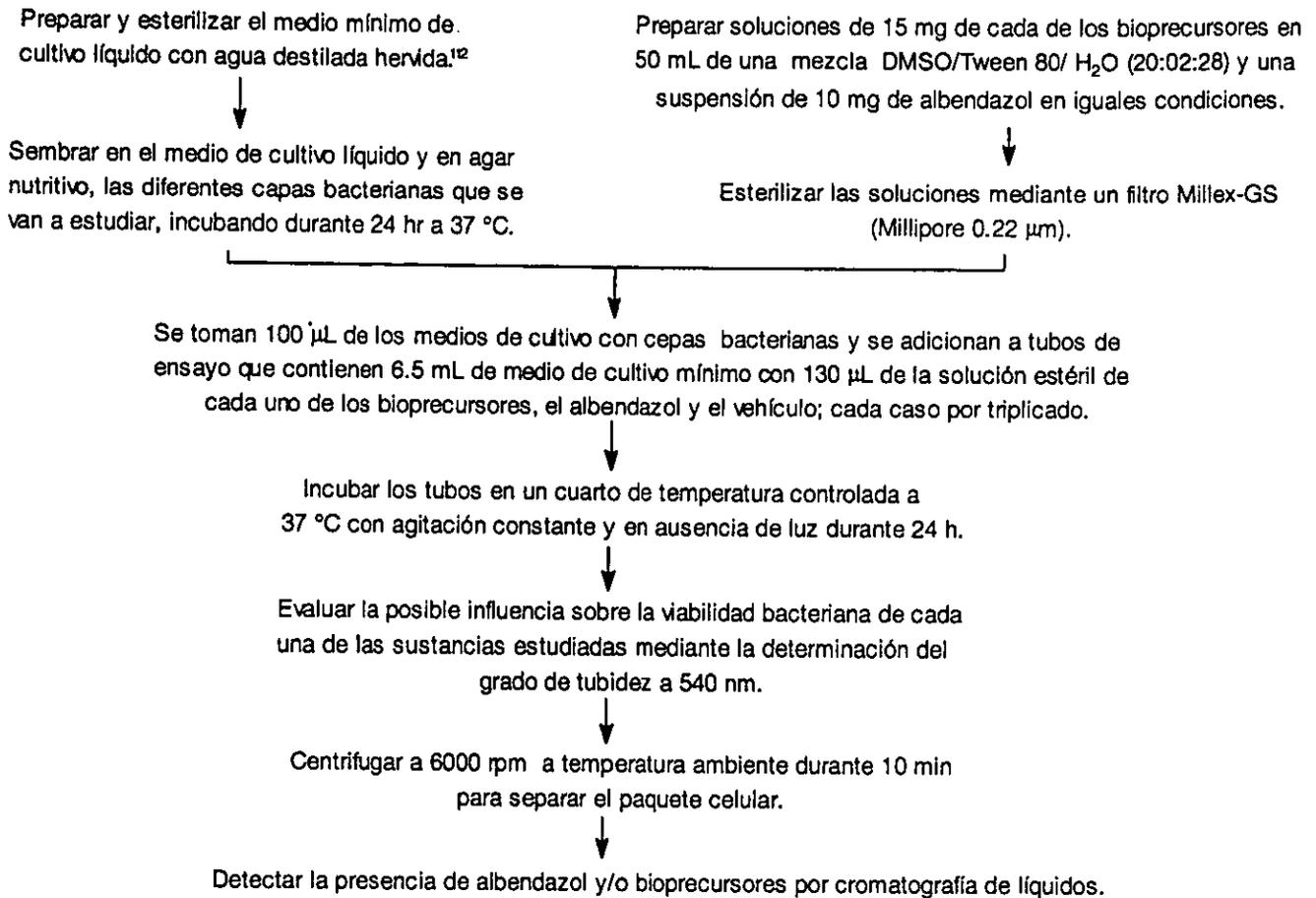
En las muestras de plasma se cuantificó albendazol, **1**, y ricobendazol (AbzSO), de acuerdo al procedimiento descrito por Hurtado y col.¹¹¹ Las muestras de plasma fueron pasadas por cartuchos Sep-Pak C18 a temperatura ambiente. Posteriormente se eluyó con metanol. De aquí se tomaron 10 µL de cada solución y fueron inyectados al HPLC. La fase móvil fue de metanol/amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH = 5.2 (60:40). El flujo se mantuvo a 1.5 mL/min. La presencia del **1** y AbzSO se detectó por absorción a 295 nm. La concentración de los mismos se determinó al relacionar el área bajo la curva en el cromatograma de las muestras problemas, en relación a áreas de concentraciones conocidas de ambos compuestos. Bajo estas condiciones el tiempo de retención fue: **1** = 11.7 min, AbzSO = 3 min, mebendazol (estandar interno) = 6.8 min. Los límites de cuantificación fueron de 6, 3, 5 ng/mL, respectivamente.

4.2.1.5. Comportamiento de los bioprecusores en ratones.

Los ratones utilizados fueron BALB/c de 4 a 6 semanas de edad y con un peso de 20-25 g. Para este estudio se utilizaron grupos de cinco animales, a los cuales se les administraron 50 mg/Kg (188 µmol/Kg) de albendazol (Zentel) como control positivo y 50 mg/Kg (152.1 µmol/Kg) de los bioprecusores **2** y **3**, en forma de suspensión como se indicó para el estudio con ratas. Los animales fueron anestesiados con éter para decapitarlos y obtener las muestras de sangre, la cual fue colectada en tubo heparinizados. Los tiempos de toma de muestra fueron a los 15, 30, 45, 90, 120, 270 y 360 min post-administración. El tratamiento de la muestra de sangre se realizó de la misma forma como se describió para las ratas. Además del **1** y AbzSO, para este estudio se cuantificó, bajo las mismas condiciones de HPLC, la presencia de los bioprecusores **2** y **3** en el plasma a 375 nm. El tiempo de retención fue de 28 min y 25.2 min, respectivamente. El límite de detección fue de 5 ng/mL para ambos compuestos.

4.2.1.6. Comportamiento de los bioprecusores 2 y 3 frente a microorganismos.

Para la realización de los experimentos de evaluación del comportamiento de los bioprecusores frente a microorganismos se siguieron los pasos propuestos en el siguiente diagrama de flujo.



Esquema 23. Procedimiento para evaluar el comportamiento de los bioprecusores frente a microorganismos.

Las concentraciones de los compuestos que se colocaron en los medios de cultivo para incubarlos a 37 °C con los microorganismos fueron las siguientes: albendazol, 1: 14.56 µM; 2: 17.6 µM; 3: 17.6 µM. Transcurridas 24 h, se midió la absorbencia de los medios de cultivo a 540 nm. La viabilidad se determinó al comparar la absorbencia de los tubos problemas, con medios de cultivo de microorganismos control, a los cuales no se les agregaron dichas sustancias.

Para determinar si los bioprecusores generaban albendazol, se determinó la presencia de este compuesto por HPLC. Para este análisis, primeramente se hicieron pasar 2 mL del medio de cultivo por un cartucho Sep-Pak C18, y luego 2 mL de agua destilada. Después de lavar, se

eluyó con 1 mL de metanol. De esta elución se tomaron 20 μL y se inyectaron al cromatógrafo Beckman 116, utilizando una columna ODS C_{18} (250 x 4.6 mm; tamaño de partícula 5 μm). La fase móvil fue metanol/amortiguador de fosfatos pH = 5.5 (60:40) con una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. La presencia de los compuestos se detectó a 295 nm para **1** ($t_r = 5.01$ min) y 375 nm para **2** y **3** ($t_r = 12.24$ min y 11.01 min, respectivamente).

4.2.1.7. Comportamiento de los bioprecursos **2**, **3** frente a Trichinella spiralis.

Con la intención de evaluar el comportamiento de los bioprecursos frente a ratones infectados con helmintos, se seleccionó a Trichinella spiralis como modelo experimental. Los experimentos fueron realizados en los laboratorios del Hospital de Pediatría del IMSS-Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez-Mulía. La cepa fue aislada de cerdos y mantenida en condiciones de laboratorio al pasarla en ratas Sprague-Dawley.¹¹³ Para el estudio se utilizaron ratones BALB/c infectados por inoculación con 800 larvas musculares (LM) de T. spiralis suspendidas en 0.1 mL de 0.2% bactoagar. Los bioprecursos **2** y **3** se administraron por vía oral a 75.98 $\mu\text{mol/Kg}$ (25 mg/Kg) y 151.97 $\mu\text{mol/Kg}$ (50 mg/Kg), a diferentes tiempos post-infección (pi) de acuerdo al estadio del parásito a evaluar. Los grupos de control negativo incluyeron animales infectados con T. spiralis a los cuales sólo se les administró el vehículo en el cual se disolvieron los bioprecursos (etanol/Tween 80/ H_2O , 50:25:25). El albendazol, **1**, se administró como control positivo en las mismas dosis (mg/Kg) que los bioprecursos.

El número (No) de parásitos contados por cada ratón fue calculado de tres experimentos, y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza. Se utilizó el rango de prueba múltiple de Duncan.¹¹⁴ En este análisis, se compararon diferentes dosis para los tres compuestos. Una probabilidad mayor de 0.05 no fue considerada como significativa. El porcentaje de eficacia obtenido con los compuestos fue referido al grupo control. En relación a la evaluación en la etapa pre-adulta, y a la capacidad de infectividad, solamente se llevó a cabo un experimento. El porcentaje obtenido con los compuestos, fue referido al grupo control, aplicandose una prueba de chi-cuadrada en estos casos.

Fase adulta. Para evaluar el comportamiento de los bioprecursos **2** y **3** contra el pre-adulto de T. spiralis, se utilizaron grupos de 6 ratones BALB/c infectados con el parásito. Se administraron dosis de 75.98 $\mu\text{mol/Kg}$ (25 mg/Kg) a diferentes tiempos: 2, 8, 16, 24, 36 y 48 h. Los animales tratados fueron sacrificados al sexto día post-infección.¹¹⁴

Para estudiar el mismo comportamiento de los bioprecusores frente a adultos de T. spiralis, grupos similares de ratones infectados fueron tratados al tercer día post-infección con una dosis única de los compuestos. Los organismos adultos en el intestino delgado fueron contados de acuerdo al procedimiento previamente publicado.¹¹⁴

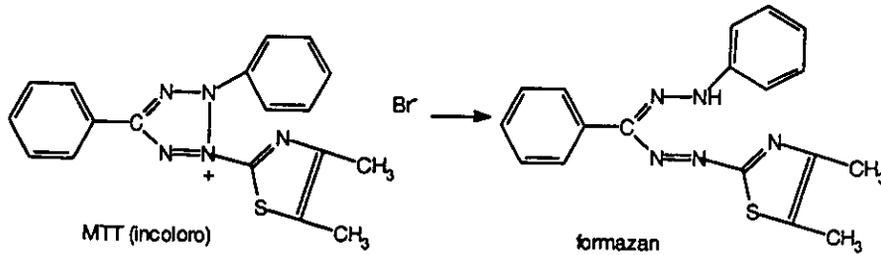
Los ensayos de fecundidad fueron realizados como han sido descritos previamente,¹¹⁵ utilizando 20 hembras de T. spiralis. Las larvas fueron separadas de los adultos mediante centrifugación diferencial a 225 g a temperatura ambiente. El número de larvas producidas por cada hembra de T. spiralis fue utilizado como medida de fecundidad.¹¹⁴

Fase larvaria muscular. Grupos de 10 ratones infectados con T. spiralis fueron tratados durante 7 días con los bioprecusores 2 y 3 a dosis de 75.98 $\mu\text{mol/Kg}$ (25 mg/Kg) y 151.97 $\mu\text{mol/Kg}$ (50 mg/Kg), iniciando el día 28 post-infección. El albendazol se utilizó como control positivo a dosis de 25 y 50 mg/Kg. Los animales fueron sacrificados 7 días después de la última administración. Las larvas musculares (LM) fueron obtenidas y contadas como previamente ha sido descrito.¹¹⁴

Para evaluar la capacidad infectiva de las LM obtenidas de animales previamente tratados con 25 mg/Kg de 1, 2 y 3, se inocularon, por vía intragástrica, 10 ratones BALB/c con 800 de estas larvas y se sacrificaron al día 35 post-infección. Las larvas se obtuvieron y fueron contadas de acuerdo al método descrito por McCracken.¹¹⁵ Se estableció el porcentaje de reducción de infectividad en relación al grupo control.

Prueba *in vitro* de los bioprecusores frente a T. spiralis.

Con el propósito de evaluar la actividad biológica intrínseca de los bioprecusores 2 y 3 frente a la fase adulta y fase larvaria muscular de T. spiralis, se realizaron experimentos *in vitro*. El medio de cultivo fue el RPMI 1640 y se utilizaron dos concentraciones de estos compuestos: 0.62 $\mu\text{g/mL}$ (1.88 μM) y 1.24 $\mu\text{g/mL}$ (3.76 μM). El ensayo se inició al colocar, en una caja de cultivo de 24 pozos (Nunclon®), 1000 larvas en cada pozo que contenía medio de cultivo con los compuestos a evaluar. Los parásitos se incubaron por 3 días a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Diariamente se cambió la solución de medio de cultivo con bioprecusores. Como control positivo se utilizaron parásitos cultivados en presencia de albendazol,¹¹⁶ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (1.88 μM) y 1 $\mu\text{g/mL}$ (3.76 μM). Como control negativo se utilizaron larvas en medio de cultivo. Después de la incubación, se evaluó, espectrofotométricamente, la viabilidad de las larvas, por la presencia de formazan, el cual se forma cuando se reduce la sal de tetrazolio MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma Co.].^{117,118}

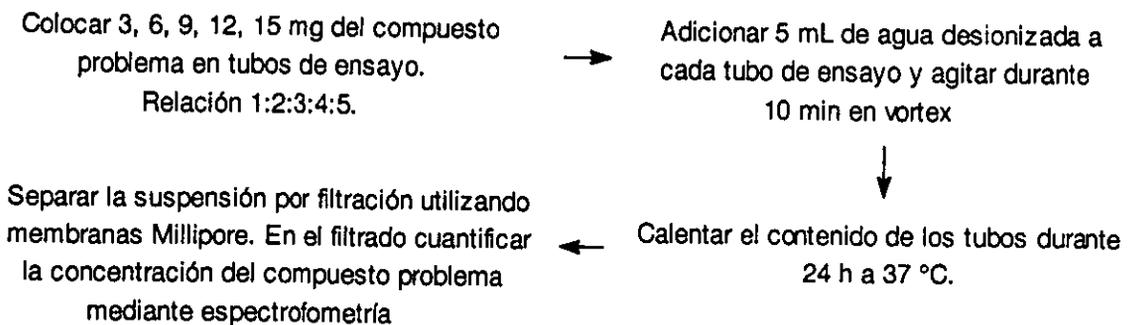


Para esta determinación, los parásitos incubados se transfirieron a tubos de 2 mL, y centrifugaron a 2500 rpm por 2 min. Posteriormente, se lavaron con solución salina/amortiguador de fosfatos, y añadieron: 1 mL de MTT al 0.75%, 50 μ L de una solución de metosulfato de fenazina al 5% (PMS, metilsulfato de N-metildibenzopirazina, Sigma Co.) y 100 μ L de DMSO. Los tubos se calentaron a 37 °C durante 50 min con agitación constante. Después de volver a lavar con solución salina, los parásitos se resuspendieron y dejaron en reposo por 1 h. Al término, los tubos se centrifugaron, y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de ELISA, para leer a 492 nm.¹¹⁹ El porcentaje de reducción se calculó en relación al control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.2.2. Evaluación de los derivados biorreversibles.

4.2.2.1. Evaluación de la solubilidad acuosa del albendazol y los análogos 27-29.

Para evaluar la solubilidad del albendazol y de sus análogos 27-29 en agua desionizada, así como la influencia que la proporción de sólido pudiese tener sobre esta propiedad, se realizó el siguiente procedimiento que se indica en el diagrama de flujo.



Esquema 24. Evaluación de la solubilidad del albendazol y análogos N-monometilados.

4.2.2.2. Determinación de la solubilidad acuosa de los derivados biorreversibles.

El procedimiento utilizado para la evaluación de la solubilidad acuosa de los diferentes derivados biorreversibles se realizó como se describió para los bioprecusores y albendazol en

agua destilada. Con la intención de evitar que la descomposición de estos compuestos no rebasara el 10%,¹²¹ se modificó el tiempo de calentamiento a 37 °C, que para estos casos, fue de 30 min,

4.2.2.3. Determinación del coeficiente de partición de los derivados biorreversibles.

Log P calculado. Se realizó con el mismo programa utilizado para los bioprecusores.

Partición octanol/agua.¹⁰⁶ Para esta determinación se repitió el procedimiento aplicado para los bioprecusores. Se pesaron 50 mg de los derivados **8**, **9**, **13a**, **13b**, **19**, **22**, y fueron disueltos en 5 mL de etanol, para luego aforar a 10 mL con este mismo disolvente. De esta solución se tomaron 3 mL y se aforaron a 25 mL con solución amortiguadora de fosfatos. Para eliminar los residuos no disueltos, se procedió a filtrar. Enseguida se cuantificó la concentración (C_i) de los compuestos en los filtrados, tomando 1 mL de los mismos y aforó a 25 mL ($C_i = 1350-1850 \mu\text{M}$). Con el derivado **25**, se tomaron 50 mg de este compuesto y se disolvió en 10 mL de metanol; de esta solución se tomó 1 mL y se aforó a 25 mL con amortiguador de acetatos, (0.02M, pH = 5.0, fuerza iónica de 0.1). Para la distribución, se tomaron 20 mL de la fase acuosa y se colocaron en un embudo de separación de 125 mL. Luego, se agregaron 20 mL de 1-octanol. Se agitó el embudo en periodos de 3 min (2 veces) a temperatura ambiente. Se permitió que las fases se separaran y dejó en reposo durante 20 min, para posteriormente separar la fase acuosa. Después se cuantificó espectrofotométricamente, la concentración de cada uno de los derivados en la fase acuosa (C_i), como se realizó con los bioprecusores.

Método cromatográfico. Para la determinación de los coeficientes de partición por este método, se siguieron los mismos pasos descritos para los bioprecusores. Se utilizó la misma ecuación con los mismo valores de intersección y pendiente.

4.2.2.4. Estabilidad de los derivados biorreversibles en soluciones amortiguadoras

4.2.2.4.1. Estimación de la estabilidad por espectrofotometría.

Para este estudio se determinó el cambio de absorbencia de los compuestos en función del tiempo a temperatura ambiente. Los compuestos utilizados fueron **10**, **13a**, **13b** y **25**, por ser los que mayor solubilidad acuosa mostraron. Para dar inicio, se prepararon soluciones patrones al pesar 12 mg de los compuestos **10**, **13a** y **13b**, y disolverlos en 50 mL de etanol absoluto. Para el compuesto **25**, 10 mg se disolvieron en 1 mL de metanol y se aforó a 50 mL con agua destilada. El estudio de la estabilidad se realizó con dos variantes en la relación soluto/disolvente.

Para la variante **A** (relación derivado/solución amortiguadora 9:1), se tomaron 5 mL de cada solución patrón y se aforaron a 50 mL con etanol absoluto. De ésta, se colocaron 0.9 mL, en la celda espectrofotométrica, y se le agregó 0.1 mL de solución amortiguadora. Las concentraciones iniciales estuvieron entre 35-78 μM . Las soluciones amortiguadoras fueron de HCl/KCl (pH = 1.0), citratos (pH = 4.0), fosfatos (pH = 7.4), para todos los casos.

En la variante **B** (relación derivado/ solución amortiguadora 1:9), se colocaron 0.9 mL de la solución amortiguadora correspondiente, en la celda espectrofotométrica, y luego se agregó 0.1 mL de la solución patrón del derivado biorreversible a evaluar. Las concentraciones estuvieron entre 39-78 μM .¹²² En todos los casos, las soluciones de los derivados se prepararon momentos antes de realizar la evaluación.

Las longitudes de onda para el registro de la estabilidad fueron las siguientes, para los compuestos **10** y **13b** a $\lambda = 317$ nm, para el compuesto **13a** fue a $\lambda = 312$ nm, y para **25** a $\lambda = 321$ nm. Para todos los casos, la prueba se realizó a temperatura ambiente (22°C).

En la evaluación, se utilizó como blanco la solución de etanol/solución amortiguadora/ albendazol (5:0.3:0.1 mg) para ajustar el equipo a 0.0 de absorbencia. El grado de estabilidad de los diversos compuestos se evaluó al determinar el cambio de la absorbencia versus el tiempo.

Al concluir la evaluación de cada derivado biorreversible, se registró un barrido para obtener el espectro de absorbencia del albendazol liberado.

Para estimar los parámetros cinéticos, se graficó el logaritmo del porcentaje de absorbencia residual ($\log \% A$) del compuesto en estudio contra el tiempo. El $\log \% A$ se calculó de la siguiente forma:¹²³

$$\log \% A = \frac{A_t}{A_0} \times 100$$

donde A_t es la absorbencia registrada a un tiempo determinado, A_0 es la absorbencia inicial.

Para el compuesto **25**, se determinaron k_{obs} adicionales para soluciones amortiguadoras con valores de pH = 2.0, 6.0, 8.0 y 12.0, con la intención de establecer la influencia del pH en el valor de esta constante. Para este estudio únicamente se utilizó la modalidad **B**.

4.2.2.4.2. Evaluación de estabilidad por HPLC

Con este método, el estudio de estabilidad se llevó a cabo al cuantificar, por HPLC, la cantidad de albendazol liberado de los derivados **13a**, **13b** y **25**. Para este trabajo se colocó 0.1 mL de solución los derivados en acetonitrilo, en 1 mL de solución amortiguadora a pH = 5.0 o 7.4. Estas soluciones se encontraban a 37 °C. Las concentraciones de las soluciones obtenidas fueron de 215 μM para **13a** y **13b**, y 181.781 μM para **25**. De estas soluciones se tomaron 20 μL para ser inyectados al HPLC, a diferentes tiempos. La determinación del albendazol se realizó a 295 nm. Las condiciones operativas del proceso fueron como previamente se han publicado.¹¹¹

Con estas condiciones, el tiempo de retención para el albendazol fue de 5.03 ± 0.09 min. Para los derivados **13a**, **13b** y **25** fueron 11.80, 12.10 y 10.27 min, respectivamente.

4.2.2.5. Liberación de 1 de los derivados biorreversibles frente a material biológico

Para esta prueba se utilizaron los derivados **13a**, **13b** y **25**. La evaluación se llevó a cabo cuando estos compuestos se pusieron en contacto con esterasa y plasma humano. En todos los casos se determinó la presencia de albendazol por HPLC. La prueba se realizó a 37 °C utilizando diferentes tiempos para la toma de muestras.

Plasma humano. Para los estudios de hidrólisis de los derivados biorreversibles se utilizó plasma humano/ amortiguador de fosfatos (pH = 7.4) en relación 8:2.¹²²

Esterasa de hígado de cerdo. Como fuente de enzimas hidrolasas se utilizó la esterasa de hígado de cerdo adquirida comercialmente (Aldrich, Co).

Proteínas totales. A cada material biológico se les determinó el contenido de proteínas totales por el método de BioRad®. Para la solución de esterasa, 0.2 mg de proteína/mL. Para el plasma al 80%, 2.46 mg de proteínas /mL.

Hidrólisis del acetato de 4-nitrofenol. Antes de ser utilizados, se evaluó la capacidad de hidrólisis enzimática de cada uno de los materiales biológicos. La evaluación se llevó a cabo utilizando como sustrato al acetato de 4-nitrofenol, como se describe a continuación.¹²⁵ Se pesaron de 18.1 mg de acetato de 4-nitrofenol y se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo. Enseguida se agregaron lentamente 10 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 100 mL (1 mM). Porciones de 0.9 mL de esta solución se colocaron en las celdas de metacrilato y se añadieron 0.1 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4. Para ajustar el

espectrofotómetro a cero de absorbencia, se dejaron pasar 60 s, por la hidrólisis espontánea del acetato. Para iniciar la hidrólisis enzimática, a la celda de prueba se le agregaron 100 μL de plasma, o de esterasa. La liberación del 4-nitrofenol se registró durante 4 min, a 405 nm.

Hidrólisis de los derivados biorreversibles. Para determinar la liberación de albendazol de los derivados biorreversibles, se colocaron 3 mL de plasma o solución de esterasa, en tubos de ensayo (13x 100) previamente calentados a 37 °C. Para cada derivado, se utilizaron 15 tubos con plasma o esterasa, a los cuales se adicionaron 200 μL de una solución de este compuesto en acetonitrilo. A determinado tiempo, se retiraron 2 mL de la muestra y se pasaron a través de cartuchos Sep-Pak C18 para eliminar proteínas. Enseguida los cartuchos se eluyeron con 1 mL de metanol absoluto, para liberar al albendazol.¹¹¹ De esta última elución se tomaron 5 μL para inyectarlo al HPLC, en todos los casos.

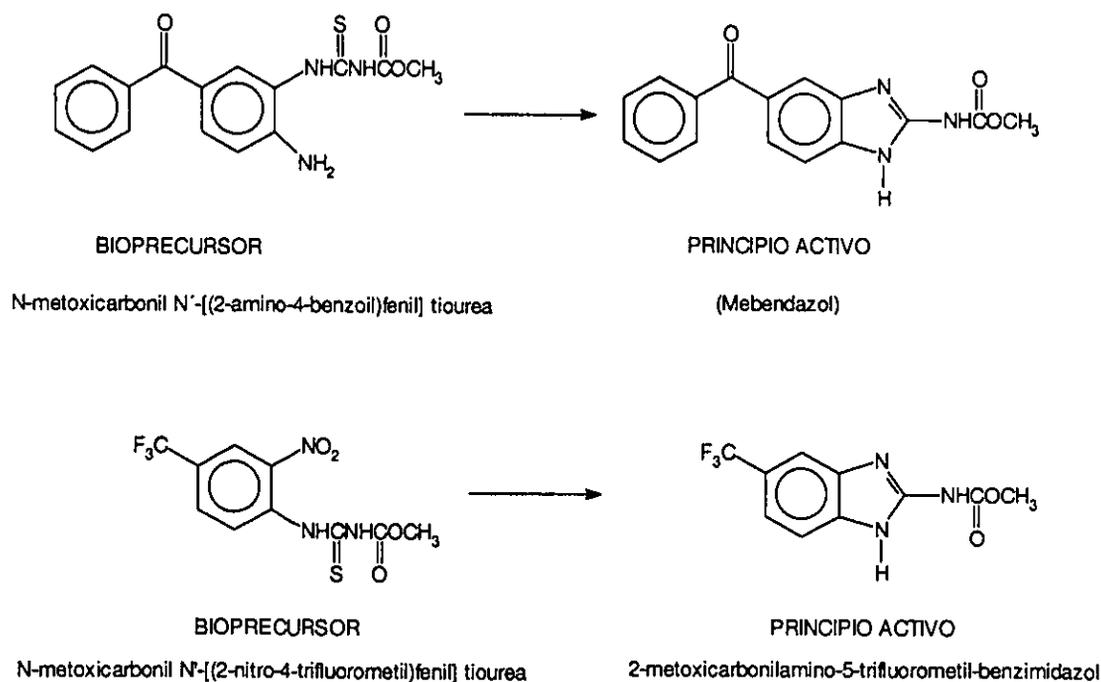
Para todos los estudios, la presencia del albendazol liberado se determinó a 295 nm. La fase móvil fue de solución amortiguadora de fosfatos (pH = 5.7)/MeOH (3:7), con un flujo de 1.2 mL/min. Con estas condiciones, el tiempo de retención del albendazol fue de 5.03 ± 0.09 .

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1. Los bioprecursores.

5.1.1. Consideraciones para el diseño

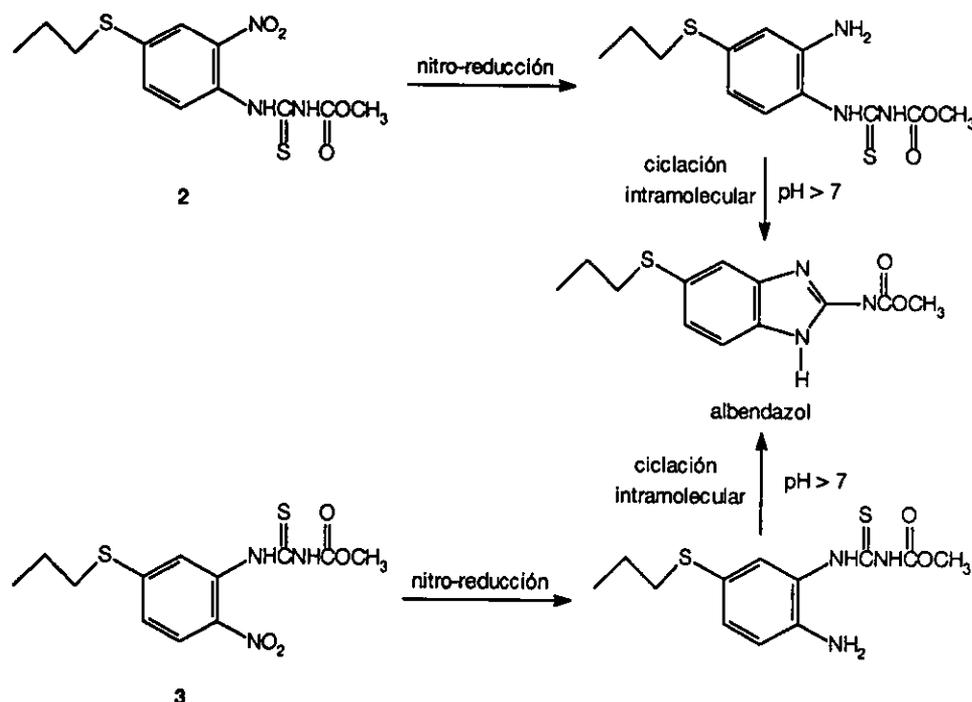
El diseño de los bioprecursores **2** y **3** se basó en los estudios realizados con dos compuestos, previamente publicados como bioprecursores de dos 2-bencimidazolcarbamatos de metilo.^{75,76} Ambos compuestos son tioureidos N,N'-disustituidos, siendo esta porción estructural la responsable de la generación del 2-bencimidazolcarbamato de metilo. En el primer caso, se estudió la conversión química de un bioprecursor del mebendazol, el cual, por una ciclación intramolecular favorecida a pH básico, generaba a este principio activo.⁷⁶ En el segundo caso, se trató de un bioprecursor del 5(6)-trifluorometil-2-bencimidazolcarbamato de metilo, cuyo diseño consideró que primero tendría que llevarse a cabo la reducción del grupo nitro hasta amino, y luego, una ciclación intramolecular para dar lugar al bencimidazol correspondiente.⁷⁵ Aunque la evaluación en este segundo caso se realizó *in vivo* utilizando gerbos infectados con Echinococcus multilocularis, no se dio evidencia de que el 2-bencimidazolcarbamato de metilo, realmente se hubiese formado y fuese el responsable del efecto antiparasitario que se presentó en los animales.



Esquema 25. Bioprecursores de 2- bencimidazolcarbamatos de metilo tomados como modelo.

Dada la relevancia de los estudios antes mencionados, se diseñaron los bioprecursores **2** y **3** cuya transformación al albendazol se llevaría a cabo en dos pasos, una nitro-reducción y una ciclación intramolecular. La intención de elegir una bioconversión en dos etapas, es para contar con moléculas estables, que no generen al principio activo por simples cambios del pH, y por ende, puedan ser administradas por vía oral.

Los compuestos isoméricos **2** y **3**; son tioureidos N,N'-disustituídos. La ubicación de los sustituyentes en el anillo aromático, podría influir para que la bioconversión de estos compuestos *in vivo* no ocurriese a la misma velocidad, o que éstos no presentasen el mismo perfil farmacocinético. Situaciones éstas, que pudiesen explotarse para tratar de incrementar la eficiencia antiparasitaria en estudios posteriores. En **2** se esperaba que la nitro-reducción se viera favorecida, en relación a **3**, porque la colocación de su grupo electrodonador propiltio, no influiría al grupo nitro en su reducción. Por otro lado, en **3**, se esperaba aprovechar la mayor naturaleza nucleofílica del amino, que resulta de la nitro-reducción, por su relación 1-4 con el grupo propiltio, para llevar a cabo con mayor rapidez la ciclación intramolecular.



Esquema 26. Bioconversión propuesta para los bioprecursores **2** y **3**.

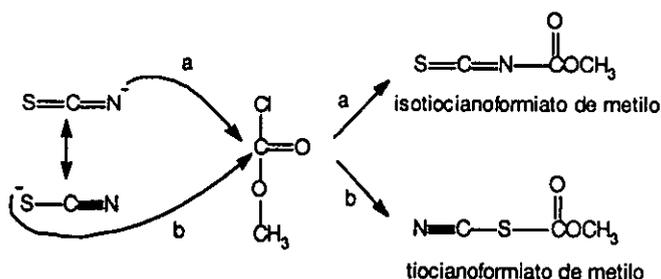
Otra característica adicional a considerar, es que el grupo propiltio puede oxidarse, para convertirse en sulfóxido y/o sulfona. Se debe recordar que el albendazol, como tal, no se detecta en fluidos biológicos, sino en forma de sulfóxido (ricobendazol).²⁷ En el caso de los

bioprecusores propuestos, la oxidación del azufre puede llevarse a cabo antes o después de que la reducción y ciclación hayan ocurrido. Dado que cualquiera de estas dos alternativas pudiesen presentarse *in vivo*, consideramos importante sintetizar ambas moléculas de bioprecusores. Si la oxidación del propiltio a sulfóxido ocurre primero, entonces la nitro-reducción de **3** se vería favorecida, y sería este el compuesto con mayor eficiencia antiparasitaria. Por el contrario, si la sulfoxidación ocurre después de la formación del 2-bencimidazolcarbamato de metilo, entonces **2**, sería el de mayor relevancia.

5.1.2. Preparación de los bioprecusores

En la elaboración de **2**, el compuesto **4** fue preparado con buenos rendimientos (90%) de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura; sin embargo, el compuesto **5** fue aislado con bajos rendimientos (47%) debido a las dificultades que se presentaron durante su purificación; en donde fue necesario realizar una filtración a través de silica gel, para eliminar las trazas de compuestos iónicos, como el cianuro, que presentaba y posterior recristalización de hexano a bajas temperaturas.

En el último paso, para la obtención del bioprecursor **2**, fue necesario agregar un exceso de tiocianato de potasio y cloroformiato de metilo, debido a que ambas sustancias al reaccionar, producen isotiocianoformiato de metilo, compuesto de nuestro interés, y tiocianoformiato de metilo, como producto secundario.



Después de dos horas de reacción del cloroformiato de metilo y el tiocianato de potasio se esperaba la formación de ambos compuestos. Se procedió a destilar la mezcla de reacción para obtener un líquido fuertemente irritante, el cual fue difícil de manejar. Por ello, se decidió hacer reaccionar a éste con anilina para registrar los datos espectroscópicos, mismos que mostraron la formación del tiureido correspondiente, confirmando con ello, la presencia del isotiocianoformiato de metilo. Con estos resultados y por las características irritantes de la mezcla de reacción, se decidió no llevar a cabo la purificación del isotiocianoformiato de metilo, sino generarlo y utilizarlo *in situ* para la preparación de los bioprecusores. Para fines de cálculos estequiométricos se consideró que el isotiocianoformiato de metilo se formaba en un 50 %.¹²⁶

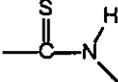
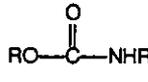
El compuesto **5** se hizo reaccionar con la mezcla anterior, utilizando como disolvente acetona.^{75,76} La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 h, lapso necesario para que la materia prima se consumiera. Por c.c.f. se detectó la presencia de un producto mayoritario y otro de muy baja intensidad, al revelar con UV o yodo. Después de recrystalizar el rendimiento en base al producto mayoritario, fue de 37 %. El producto minoritario no fue posible aislarlo para su identificación. Con la intención de reducir el tiempo de reacción y calentar ligeramente la mezcla de reacción, se cambió la acetona por el acetonitrilo. Con esto, el tiempo para el agotamiento de la materia prima ($\approx 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) se redujo a 6 h. Después de recrystalizar, el rendimiento se mantuvo en 37 %. El uso de otros disolventes apróticos, de mayor punto de ebullición, como el dimetilsulfóxido, no dieron resultados satisfactorios ya que no se obtuvo el bioprecursor **2**, después de calentar a más de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En relación al bioprecursor **3**, el compuesto **6** se preparó en un solo paso, al utilizar ácido nítrico fumante en anhídrido acético, sin que se aislara la amina intermediaria. Sin embargo, el compuesto **6** se hidrolizó con ácido sulfúrico concentrado caliente, antes de iniciar con la reacción de sustitución nucleofílica aromática, y desplazar al átomo de cloro por el *n*-propanotiol. Al efectuar la reacción de obtención del bioprecursor **3**, como se realizó para el bioprecursor **2**, la materia prima no reaccionó. Ante esta situación, se procedió a calentar la mezcla de reacción a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 h. Con este cambio, se detectó la presencia de un producto mayoritario y otro secundario, cuya intensidad se incrementó al transcurrir del tiempo. Después de aislar y purificar ambos compuestos, se pudo establecer que el mayoritario era el bioprecursor esperado **3**, y el producto minoritario, **3a**, había sido formado al reaccionar el grupo amino de **9** con el carbonilo del isotiocianoformiato de metilo. La baja reactividad del **9** se atribuye a que la nucleofilia del grupo amino está comprometida por la presencia del grupo nitro en relación 1-2, por otro lado la posible influencia electrodonadora del propiltio tampoco se favorece por su posición 1-3.

Por lo que respecta a los puntos de fusión y los espectros de IR así como los de ^1H RMN, para los compuestos **4**, **5**, **6** y **7**, fueron consistentes con los reportados en la literatura. Las estructuras de los bioprecursores **2** y **3** fueron establecidas por IR, EM, ^1H RMN, ^{13}C RMN y análisis elemental para C, H y N. En el espectro de IR, los bioprecursores **2** y **3**, presentan bandas que los identifican como tioureidos *N,N'*-disustituidos.¹²⁷

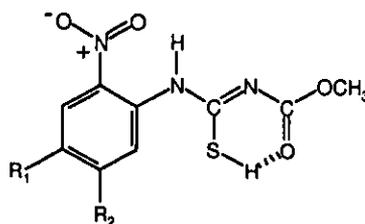
A partir de la página 135 se presentan los espectros de los productos finales obtenidos en esta tesis.

Tabla 19. Datos relevantes de IR para la elucidación de los bioprecusores 2 y 3.

Bioprecursor	tioureido	uretano	nitro
			-NO ₂
2	3170 cm ⁻¹ 1556 cm ⁻¹ (banda amida II) 1244 cm ⁻¹ (C=S)	1732 cm ⁻¹ 1510 cm ⁻¹ (banda amida II) 1048 cm ⁻¹ (C=O)	1342 cm ⁻¹
3	3186 cm ⁻¹ 1578 cm ⁻¹ (banda amida II) 1238 cm ⁻¹ (C=S)	1736 cm ⁻¹ 1528 cm ⁻¹ (banda amida II) 1038 cm ⁻¹ (C=O)	1324 cm ⁻¹

Los datos referidos se tomaron de los espectros localizados en las páginas 138 y 140.

Los datos de IR no dan señales que pudiesen presentar compuestos del tipo ROC(O)SC(NH)NHAr, tales como 1690 cm⁻¹ para RCOSR, ó 3400-3300 cm⁻¹ para C=NH. Igualmente, los datos obtenidos muestran que los tioureidos N,N'-disustituídos no se encuentran como mezcla tautomérica tioceto-tioenol por la ausencia de la banda a 2415 cm⁻¹ (amplia) en todos los casos.¹²⁷



2: R₁: -SCH₂CH₂CH₃, R₂: -H; 3: R₁: -H, R₂: -SCH₂CH₂CH₃

Para fortalecer el reconocimiento de tioureidos N, N'-disustituídos en sus espectros de IR, se sintetizaron otros bioprecusores potenciales, con la mismas características estructurales, para otros 2-benzimidazolcarbamatos de metilo, como el fenbendazol, sulfóxido de fenbendazol y el 5(6)carboxi-2-benzimidazolcarbamato de metilo.^{128,129} En todos los casos las señales fueron congruentes con lo antes mencionado para los bioprecusores 2 y 3.

En relación al espectro ¹H RMN, los dos bioprecusores mostraron dos singuletes a campos bajos (> 11 ppm), que desaparecen con D₂O, los cuales fueron asignaron a los protones unidos a los nitrógenos. Con la intención de conocer a cual protón de los nitrógenos correspondía cada señal, se registró un espectro 10 min después de adicionar el agua deuterada. Con esto se pudo establecer, que el protón a campos más bajos, correspondía al protón del amino aromático, ya que en este espectro aún se registraba. Por otro lado, la señal que desaparecía rápidamente, se asignó al protón del amino ubicado entre el tiocarbonilo y el carbonilo. Por lo que respecta a las señales correspondientes al grupo propilto, se presentaron como se esperaba en ambos

bioprecusores; triplete para el metilo, multiplete para el metileno unido al metilo, y un triplete, con mayor desplazamiento que los dos anteriores, para el metileno unido al azufre. El metoxilo se presentó como singulete a 3.4 y 3.8 ppm, para el compuesto **2** y **3** respectivamente. Para el caso de los protones aromáticos, en ambos bioprecusores se presentó el sistema ABX. En el bioprecursor **2**, el doblete centrado a 7.87 ppm y $J = 2$ Hz, se asignó a al H-3; el doblete centrado a 7.78 ppm, $J = 9$ Hz, se asignó al H-6; el doble de dobles centrado a 7.63 ppm, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, se asignó a H-5. En el bioprecursor **3**, el doblete centrado a 8 ppm, $J = 9$ Hz se asignó H-3; el doblete centrado a 7.84 ppm, $J = 2$ Hz, se asignó a H-6; el doble de dobles centrado a 7.31, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, se asignó al H-4.

Los espectros de masas de ambos bioprecusores, se realizaron por ionización química, ya que por impacto electrónico, no se logró visualizar el ión molecular. En ambos casos se presentó el $M^+ + 1$, (330, 100%).

5.1.3. La solubilidad y coeficiente de partición de los bioprecusores.

La solubilidad acuosa obtenida experimentalmente de los bioprecusores y del albendazol se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 20. Solubilidad en agua desionizada de **1**, **2** y **3**.

No.	λ_{\max} , nm	$\epsilon^a, M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	S^b , $\mu\text{M} \pm \text{DE}^c$	Relación : bioprecursor/1
1	295	11591.01 (etanol)	16.20 ± 5.42	1.00
2	375	9262.97 (etanol)	34.46 ± 2.42	2.02
3	375	12101.24 (etanol)	29.79 ± 3.34	1.74

^acoeficiente de absortividad molar. ^bS: solubilidad. ^cDE: desviación estandar.

Los datos de solubilidad se presentan en unidades micromolares, para poder hacer comparaciones, dado que el peso molecular y naturaleza química de los compuestos son diferentes. Los resultados mostraron que ambos compuestos son ligeramente más solubles que el albendazol, aunque no en la proporción que representarían una ganancia importante en esta propiedad. El bioprecursor **2** ($s = 34.46 \mu\text{M}$) fue más soluble que **3** ($s = 29.79 \mu\text{M}$). Los valores obtenidos indican que poca ganancia en la solubilidad acuosa se obtiene al preparar tioureidos como bioprecusores del albendazol.

Por lo que respecta al coeficiente de partición, los resultados que se obtuvieron tanto en el cálculo teórico como experimental se presentan a continuación.

Tabla 21. Coeficiente de partición para 1, 2 y 3.

No.	Calculado	octanol/agua	Método cromatográfico	
	log P \pm D E	log P \pm D E	log k_o \pm D E	log P
1	3.01 \pm 0.86	nd	2.853 \pm 0.46	3.07
2	3.21 \pm 0.01	4.12 \pm 0.87	3.780 \pm 0.36	4.30
3	3.21 \pm 0.01	4.52 \pm 0.69	4.159 \pm 0.45	4.80

D E: desviación estandar; nd: no determinado.

Los bioprecusores mostraron valores más altos que los calculados previamente a su preparación. Al calcular el valor de log P para las estructuras 2 y 3, se encontró que estos compuestos cumplían con una de las características operativas de los bioprecusores, que señala que la liposolubilidad que presente el principio activo sólo debe ser ligeramente modificada (vease Tabla 4, pag. 11). Sin embargo, los datos experimentales tanto en octanol/agua, como en el método cromatográfico, mostraron que ambos bioprecusores fueron 10 veces más liposolubles que el albendazol. Esta diferencia en los valores podría deberse a la influencia del medio en que se encuentran los bioprecusores en las determinaciones experimentales y que no son consideradas por el programa de cálculo. Se ha indicado que el 1-octanol es un disolvente que puede llegar a formar puentes de hidrógeno intermoleculares con los compuestos que presenten grupos susceptibles de hacerlo.¹ En el caso de los bioprecusores, la porción tioureídos puede llegar a formar puentes de hidrógeno, por lo que cabría esperar que se encontraran en mayor concentración en el 1-octanol, por su naturaleza orgánica y por la formación de dichos puentes con este disolvente. Un razonamiento similar se aplicaría para el método cromatográfico.

Con estos dos parámetros determinados, se esperarían cambios en la absorción de los bioprecusores en relación al albendazol cuando fuesen administrados por vía oral. Aunque para el tracto gastrointestinal, se ha indicado que los compuestos orgánicos deben presentar log P entre 1 y 2, para ser absorbidos por el intestino delgado;⁸⁴ es de igual importancia que estas moléculas presenten cierto grado de solubilidad acuosa para alcanzar primero las velocidades intestinales y luego, atravesar las paredes intestinales.⁷⁹ Tanto el albendazol como 2 y 3, rebasaron el valor de log P mencionado, sin embargo, en los dos últimos casos, los compuestos son ligeramente más solubles que el primero; por lo que cabría esperar que tuvieran mayor ventajas en su absorción.

5.1.4. Conversión química de los bioprecusores

Antes de iniciar la evaluación de bioconversión de los bioprecusores, se realizaron experimentos, con la intención de probar que la transformación de los bioprecusores al albendazol, podría realizarse con reactivos químicos, utilizando como agente reductor a la diotionita de sodio.¹⁰⁵ Los resultados mostraron que bajo condiciones de exceso del agente reductor, se lograba obtener el albendazol. Por lo que el planteamiento original de que mediante la nitro-reducción, se generaría al albendazol, resultaron correctas. Sin embargo, aún faltaba probar que esta conversión se realizaría en un organismo biológico.

5.1.5. Bioconversión de los bioprecusores

5.1.5.1. Estudio de bioconversión en ratas.

Para probar si los bioprecusores podrían generar al albendazol en organismos biológicos, se administró por vía oral, **2** y **3** a ratas Sprague Dawley. Para este estudio se utilizaron dos dosificaciones, con la intención de evaluar si se presentarían cambios en el comportamiento de los bioprecusores al incrementar la cantidad administrada. En ambos casos se utilizó albendazol como control positivo. Los resultados obtenidos, en la cuantificación de **1** y/o ricobendazol (AbzSO) en muestras sanguíneas de las ratas se muestran a continuación.

Tabla 22. Determinación plasmática de **1** y AbzSO después de administrar en ratas **1**, **2** y **3** a 10 mg/Kg

tiempo, h	1		2		3	
	AbzSO, µg/mL	1 , µg/mL	AbzSO, µg/mL	1 , µg/mL	AbzSO, µg/mL	1 , µg/mL
2	0.5930	0.055	0.1802	d	nd	nd
2	0.2450	d	0.1088	d	nd	nd
4	0.3084	d	0.0927	nd	0.0960	nd
4	0.1935	d	0.0958	nd	nd	nd
6	0.2875	d	nd	d	nd	0.1500
6	0.4081	d	0.1633	nd	nd	0.7450
8	0.2803	d	nd	d	d	0.0792
8	0.1113	d	nd	d	nd	nd
10	0.2696	d	nd	d	nd	d
10	0.1297	d	nd	d	0.0889	d
12	3.4802	0.0980	0.2704	d	0.1622	nd
12	0.5919	d	0.2704	d	nd	nd

d: detectable; nd: no detectable; AbzSO: ricobendazol (sulfóxido de albendazol).

Tabla 23. Determinación plasmática de 1 y AbzSO después de administrar en ratas 1, 2 y 3 a 30 mg/Kg

tiempo, h	1		2		3	
	AbzSO, $\mu\text{g/mL}$	1, $\mu\text{g/mL}$	AbzSO, $\mu\text{g/mL}$	1, $\mu\text{g/mL}$	AbzSO, $\mu\text{g/mL}$	1, $\mu\text{g/mL}$
2	0.6214	d	d	nd	d	nd
2	1.6746	nd	0.0387	nd	0.1046	nd
4	0.8987	nd	d	nd	0.0430	nd
4	2.2136	nd	0.0804	d	0.0020	nd
6	0.7372	nd	0.0606	nd	0.2108	nd
6	2.3740	nd	0.0771	nd	0.0305	nd
8	1.2093	nd	0.0828	nd	0.0709	nd
8	0.6197	nd	0.2326	nd	0.1608	nd
10	1.2753	nd	0.1080	nd	0.1061	nd
10	1.7169	nd	0.2022	nd	0.1646	nd
12	0.5177	nd	0.2026	nd	0.0701	nd
12	0.5796	nd	0.1002	nd	0.0668	nd

d: detectable; nd: no detectable. AbzSO: ricobendazol (sulfóxido de albendazol).

Los resultados indicaron que en las ratas si ocurrió la bioconversión de los bioprecusores al albendazol ya que se detectó el metabolito esperado de este principio activo (AbzSO), lo que concuerda con estudios previamente publicados sobre la administración del albendazol por vía oral.⁶⁹⁻⁷³ Se observó que al incrementar la dosis de los bioprecusores, la presencia de AbzSO se hizo más evidente. Por las cantidades de AbzSO cuantificadas, al administrar los bioprecusores, la bioconversión no fue eficiente en estos roedores como para sustituir al fármaco en cuestión.

5.1.5.2. Estudio de bioconversión en ratones.

Con los ratones, además de buscar a 1 y AbzSO, se determinó la presencia de 2 y 3 en plasma, ya que estos animales serían utilizados en el modelo del parásito con el cual se trabajaría más adelante. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 24. Determinación de AbzSO y 1 después de administrar 1 (50 mg/Kg)

tiempo, min	AbzSO, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$	1, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$
15	0.21338 \pm 0.0655	0.08314 \pm 0.05837
30	0.69066 \pm 0.1615	d
45	1.10421 \pm 0.3648	0.06057 \pm 0.00383
90	1.82383 \pm 0.4516	nd
120	3.08350 \pm 0.9751	0.07166 \pm 0.00949
180	2.12360 \pm 0.5382	0.1708 \pm 0.15451
270	1.85182 \pm 0.1900	0.22494 \pm 0.08997
360	1.54414 \pm 0.2915	0.04916 \pm 0.00533

d: detectable; nd: no detectable. AbzSO: ricobendazol (sulfóxido de albendazol). DE: desviación estandar.

En la Tabla 25 se presentan los resultados obtenidos en las muestras de plasma de los ratones a quienes se les administró el bioprecursor 2.

Tabla 25. Determinación plasmática de AbzSO, 1 y 2 después de administrar 2 (50 mg/Kg)

tiempo, min	AbzSO, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$	1, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$	2, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$
15	0.01000 \pm 0.0055	0.02506 \pm 0.00121	0.01618 \pm 0.0053
30	0.01784 \pm 0.0046	0.01101 \pm 0.00952	3.45904 \pm 2.0001
45	0.05120 \pm 0.0415	0.04215 \pm 0.01021	0.13963 \pm 0.0376
90	0.01466 \pm 0.0032	0.01218 \pm 0.01001	0.04660 \pm 0.0130
120	0.00846 \pm 0.0006	0.03289 \pm 0.01267	0.01403 \pm 0.0068
180	0.00763 \pm 0.0013	0.01519 \pm 0.08943	0.02528 \pm 0.0105
270	0.00525 \pm 0.0005	0.01147 \pm 0.01012	0.01670 \pm 0.0033
360	0.00225 \pm 0.0015	0.02151 \pm 0.01067	0.00323 \pm 0.0020

d: detectable; nd: no detectable. AbzSO: ricobendazol (sulfóxido de albendazol). DE: desviación estandar.

En la Tabla 26 se presentan los resultados obtenidos en las muestras de plasma de los ratones a quienes se les administró el bioprecursor 3.

Tabla 26. Determinación plasmática de AbzSO, 1 y 3 después de administrar 3 (50 mg/Kg)

tiempo, min	AbzSO, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$	1, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$	3, $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$
15	0.00373 \pm 0.00156	nd	5.00575 \pm 1.93625
30	0.00610 \pm 0.00217	nd	0.0258 0.00533
45	0.00602 \pm 0.00059	nd	nd
90	0.00496 \pm 0.00220	nd	nd
120	0.00407 \pm 0.00274	0.02898 \pm 0.01981	0.07468 \pm 0.03633
180	0.02129 \pm 0.00661	0.06340 \pm 0.05210	0.02394 \pm 0.00944
270	0.01465 \pm 0.01313	0.04301 \pm 0.03312	0.11001 \pm 0.03827
360	0.01522 \pm 0.00787	0.08128 \pm 0.09983	0.1897 \pm 0.06160

d: detectable; nd: no detectable. AbzSO: ricobendazol (sulfóxido de albendazol). DE: desviación estandar.

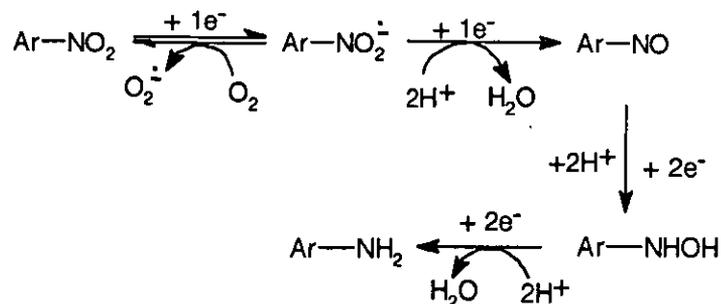
La presencia de los bioprecursores en plasma indica que éstos lograron absorberse, como se previó por el valor de su log P, aunque no de una forma representativa en relación a la dosis administrada. Un aspecto adicional que mencionar, es que en el plasma de los animales tratados con 2, se encontró la presencia de 1, situación que se presentó en los animales tratados con 3 después de 90 min. Esto probablemente podría ser explicado por la ocurrencia de dos eventos. El primero, indicaría que 2 se transformó más fácilmente en 1, con relación a 3; y el segundo, que esta conversión podría llevarse a cabo en lugares en donde 1 no se alcanzó a oxidar para transformarse en su metabolito AbzSO.

Para el primer caso, un aspecto importante a destacar entre 2 y 3, es la posición del grupo nitro. El bioprecursor 3 fue diseñado para que la reducción de este grupo funcional se

viere favorecida al oxidarse el grupo propiltio; y una vez reducido a amino, entonces se facilitaría la ciclación intramolecular. Por otro lado, en el diseño de **2**, la colocación del grupo nitro propiciaría su reducción, con o sin oxidación del grupo propiltio, sin que se afectara significativamente la velocidad de ciclación intramolecular. Los resultados obtenidos que muestran una ligera ventaja en la bioconversión de **2** en ratas concuerdan con esta consideración.

Para el segundo caso, uno de los sitios del tracto gastrointestinal, donde no se favorecen las reacciones de oxidación, es el colon. Por las condiciones de anaerobiosis preponderantes y por la presencia de la microflora intestinal allí existente, se ha indicado que en la parte transversal de esta porción intestinal se encuentran valores medios de potencial de reducción de -415 ± 72 mV,¹³¹ con lo cual se esperaba que ocurriera la reducción del grupo nitro. Aunque el colon tiene dos funciones fisiológicas principales —la absorción de agua y electrolitos, y la conservación y eliminación de material fecal—, se ha informado que varios fármacos logran absorberse a este nivel, y pasan sin sufrir alteración a la sangre.⁷⁹ Además, los fármacos que alcanzan esta porción intestinal, permanecen aproximadamente 30 h, tiempo suficiente para biotransformarse por enzimas y microorganismos.¹³¹ En el caso de los ratones, probablemente buena parte de la dosis administrada de los bioprecusores, llegó hasta el intestino grueso, en donde **2** se logró reducir y ciclar significativamente para generar a **1**, el cual se absorbió y pasó directamente al torrente sanguíneo.

Otro aspecto importante a tomar en cuenta, es el proceso de reducción del grupo nitro hasta grupo amino, en donde se requiere de una transferencia de 6 electrones.¹³⁰



Esquema 27. Reducción del grupo nitro a grupo amino

El primer paso del esquema anterior es importante por su naturaleza reversible: De hecho, para los antiparasitarios del grupo nitroimidazol (metronidazol), esta etapa ha sido propuesta como una de las responsables de la actividad biológica porque genera oxígeno superóxido, al reducir oxígeno molecular. Algunas especies de protozoarios como *Trypanosoma*

cruzi, no tienen defensa contra esta especie reactiva.¹³⁰ Por ello, no podría descartarse que los bioprecusores, pudiesen llegar a presentar actividad antiparasitaria *per se*, aunque no es este el propósito central de su diseño.

El otro punto a destacar, es la presencia de la hidroxilamina como intermediario estable, el cual se forma por una transferencia de 4 electrones al grupo nitro. Su presencia constituye una desventaja en el proceso de bioconversión de los bioprecusores; ya que si la reducción se detiene en este paso, no se podría generar el albendazol.

Con este antecedente, se planteó la posibilidad de que si la reducción realizada por la microflora intestinal, pudiese transferir los 6 electrones, entonces la bioconversión de los bioprecusores podría llevarse a cabo a nivel del intestino grueso. Por tal motivo, se realizaron experimentos que demostraran que algunas bacterias presentes en la microflora intestinal, podían llevar a cabo la transformación del grupo nitro hasta amino. Para tal efecto se utilizaron cepas de E. coli y E. aerogens, las cuales se cultivaron en condiciones de semianaerobiosis. Para el primer caso se ha publicado¹³² que esta bacteria presenta enzimas reductasas que la capacitan para realizar esta operación. Antes de determinar el papel que estos microorganismos pudiesen tener en la bioconversión de los bioprecusores, fue necesario, evaluar primeramente la viabilidad de los mismos frente a los bioprecusores y albendazol, a las concentraciones en que se iban a efectuar los estudios. Los resultados de viabilidad se presentan a continuación.

Tabla 27. Absorbencia de los medios de cultivo con 1, 2 y 3 a 540 nm.

Cepa ^a	control	1 ^c	2 ^c	3 ^c	Vehículo ^{c,d}
<u>E. coli</u> 174	0.0315	0.0304	0.0390	0.0336	0.0324
<u>E. coli</u> 175	0.0344	0.0276	0.0461	0.0430	0.0418
<u>E. coli</u> ATCC ^b 2592	0.0354	0.0360	0.0289	0.0344	0.0359
<u>E. coli</u> inf. urin.	0.0322	0.0373	0.0345	0.0337	0.0361
<u>S. typhi</u>	0.0412	0.0399	0.0429	0.0412	0.0408
<u>C. freundii</u>	0.0367	0.0478	0.0395	0.0314	0.0438
<u>E. aerogens</u> ATCC ^b 13048	0.0628	0.0562	0.0487	0.0468	0.0599

^alas cepas fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de Química, UNAM. ^bATCC: American Type Culture Collection. ^c promedio de tres determinaciones. ^dVehículo: dimetilsulfóxido/Tween 80/agua (20:02:48).

Por los resultados mostrados, ninguna de las cepas presentó sensibilidad en su viabilidad frente a las concentraciones utilizadas de 1, 2 y 3. Por ello, todas ellas fueron utilizadas para el estudio de bioconversión de los bioprecusores. Los resultados del mismo se presentan a continuación.

Tabla 28. Presencia de 1, 2 y 3 en medios de cultivo bacterianos

Cepa	1		2		3	
	1, μM^*	1, μM^*	2, μM^*	1, μM^*	3, μM^*	
<i>E. coli</i> 174	12.11	2.35	12.03	nd	16.12	
<i>E. coli</i> 175	12.34	1.22	10.07	nd	14.23	
<i>E. coli</i> ATCC2592	10.93	nd	16.18	nd	13.03	
<i>E. coli</i> inf. urin.	9.23	nd	14.33	nd	15.93	
<i>S. typhi</i>	10.56	nd	15.33	nd	14.63	
<i>C. freundii</i>	12.56	nd	13.13	nd	15.03	
<i>E. aerogens</i> ATCC13048	13.89	1.01	11.22	nd	16.37	

*promedio de tres determinaciones; nd: no detectable

Los resultados mostraron que tres de las cepas bacterianas utilizadas llevaron a cabo esta transformación con el bioprecursor 2. Con ello se refuerza la idea de que probablemente sólo el compuesto 2 es el que se alcanzó a biotransformar hasta albendazol en el intestino grueso, por la presencia de la microflora. Para el compuesto 3, es necesaria la oxidación previa del átomo de azufre del grupo propiltio para que se efectue la bioconversión. En ningún caso se detectó la presencia del ricobendazol.

5.1.6. Los bioprecursos frente a *Trichinella spiralis*.

Para evaluar el comportamiento de los bioprecursos frente a un parásito sensible al albendazol, se utilizó al helminto *Trichinella spiralis*. En este aspecto se aplicó la metodología y experiencias del grupo de la Dra. Lilian Yépez-Mullá del IMSS-Siglo XXI, quienes efectuaron la evaluación de los bioprecursos con procedimientos establecidos.¹¹³⁻¹¹⁵

Se seleccionó a *T. spiralis* como modelo porque presenta ventajas para la evaluación de agentes antiparasitarios potenciales. Primero, es un organismo que en etapa adulta se desarrolla en el tracto gastrointestinal, lo que permite estudiar el comportamiento de los bioprecursos en este nivel. Segundo, en fase larvaria, se encuentra en los músculos, por lo que da lugar a estudios para la evaluación de la actividad sistémica de antiparasitarios.

Fase adulta.

El estudio del comportamiento de los bioprecursos frente a *T. spiralis* se inició con la evaluación de los mismos y albendazol en la fase pre-adulta del parásito. En este estudio se hizo una sola administración de los compuestos a ratones parasitados. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 29. Evaluación de 1, 2 y 3 contra *Trichinella spiralis* en fase pre-adulta

tiempo pi*, h	Eficacia del tratamiento, %		
	1	2	3
2	77 ^a	12 ^b	87 ^a
8	100 ^c	15 ^b	80 ^{ag}
16	99 ^c	31 ^d	89 ^a
24	91 ^c	37 ^d	54 ^e
36	95 ^c	1 ^f	88 ^{ac}
48	58 ^g	7 ^{bf}	71 ^g

*pi:post-infección. Los compuestos se administraron a dosis de 25 mg/Kg. Los porcentajes no seguidos por el mismo superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$). El análisis estadístico fue llevado a cabo para los 3 compuestos al mismo y a diferente tiempo de pi.

Los resultados mostraron que 3, a dosis de 25 mg/Kg, presentó prácticamente la misma actividad que 1 cuando se administró a 36 y 48 h post-infección. Esto indicaría que *T. spiralis* necesita alcanzar cierto grado de desarrollo para manifestar mayor sensibilidad a 3.

En el estudio de la fase adulta del parásito, los datos obtenidos se presentan a continuación.

Tabla 30. Evaluación de 1, 2 y 3 contra *Trichinella spiralis* en fase adulta

Tratamiento	25 mg/Kg		50 mg/Kg	
	No. de parásitos/ ratón \pm DE	% reducción	No. de parásitos/ ratón \pm DE	% reducción
control	108 \pm 3 ^a		108 \pm 3 ^a	
1	89 \pm 8 ^b	17	54 \pm 5 ^c	50
2	63 \pm 6 ^c	42	92 \pm 5 ^b	15
3	93 \pm 5 ^b	14	43 \pm 5 ^c	60

DE: desviación estandar; Los promedios que no presentan el mismo superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Con una sola administración de 25 mg/Kg a las 72 h post-infección, 1 y 3 presentaron efectos similares, aunque esta vez fueron superados por 2. Cuando la dosis se incrementó a 50 mg/Kg, 2 presentó merma en su actividad, y fue superado por 1 y por 3. Es importante notar, que al menos en estos dos estudios de fase intestinal, 3 manifestó el mismo comportamiento que el albendazol, lo que podría hacernos suponer que el bioprecursor se estaba biotransformando al principio activo. Estimación que va a acotarse por los resultados de los estudios *in vitro* de 1, 2 y 3 que se presentarán más adelante. Mención particular merece el compuesto 2, el cual al incrementar su dosis, disminuye su actividad, situación que nos indicaría, que probablemente al aumentar su concentración se induce su desactivación. Fenómeno atribuido a factores biológicos que actúan sobre 2, ya que los estudios *in vitro* arrojaron resultados de actividad semejante de los tres compuestos, cuando se incrementó la concentración de 1.88 μ M a 3.76 μ M.

En la actualidad, en el campo de la investigación de antiparasitarios, se ha señalado que uno de los eventos a afectar en los diversos parásitos, es su fecundidad. Esto podría llevarnos a combatir las infecciones sin que se presenten los síntomas adversos, originados por la

desintegración de los agentes etiológicos dentro del organismo.^{6,7} Por tal razón, los compuestos 1, 2 y 3, fueron evaluados en su capacidad de afectar la fecundidad de *T. spiralis*. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Tabla 31. Actividad de 1, 2 y 3 sobre la fecundidad de *Trichinella spiralis*

Tratamiento	25 mg/Kg		50 mg/Kg	
	No. de LRN/ ratón ± DE	% reducción	No. de LRN/ ratón ± DE	% reducción
control	13 ± 3 ^a	0	13 ± 3 ^a	0
1	1.7 ± 0.6 ^b	87	2 ± 1.5 ^b	82
2	7 ± 1.5 ^c	45	1.6 ± 1 ^b	88
3	4 ± 1 ^d	69	2 ± 1 ^b	85

LRN: larva recién nacida.; DE: desviación estandar. Los promedios que no presentan el mismo superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Los datos obtenidos mostraron que a la dosis de 25 mg/Kg ninguno de los bioprecusores superó al albendazol. Sin embargo, cuando la dosis se incrementó a 50 mg/Kg, el porcentaje de reducción de la fertilidad fue equiparable para los tres compuestos. Para la manifestación de este efecto, es necesario que 2 o 3 puedan ingresar al interior del parásito como tales, o ya convertidos en 1. Para este estudio, el resultado se registró como el número de larvas/ratón, y a diferencia del ensayo sobre parásito adulto, donde se contó el número de parásitos vivos/ratón, aquí se partió de 20 hembras de las cuales se contabilizaron sus larvas. Por ello, los porcentajes de eficacia son diferentes en los dos casos, para una misma dosificación.

Fase larvaria muscular

Otro ensayo importante, fue el relacionado a evaluar el comportamiento de 1, 2 y 3 frente a la larva muscular de *T. spiralis*. Los datos obtenidos fueron los siguientes.

Tabla 32. Comportamiento de 1, 2 y 3 sobre la larva muscular de *Trichinella spiralis*

Tratamiento	25 mg/Kg		50 mg/Kg	
	No. de LM/ratón ± DE	% de reducción	No. de LM/ratón ± DE	% de reducción
control	24250 ± 6200 ^a	0	24,250 ± 6200 ^a	0
1	15328 ± 4070 ^a	37	2505 ± 978 ^b	90
2	15488 ± 1854 ^a	36	28010 ± 8657 ^a	0
3	16131 ± 4986 ^a	33	24055 ± 6366 ^a	1

LM: larva muscular; DE: desviación estandar. Los promedios que no presentan el mismo superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

En este estudio a dosis de 25 mg/Kg, ninguno de los tres compuestos mostró efectos significativos diferentes al del grupo control. Esto probablemente indica que no alcanzaron niveles plasmáticos suficientes para dañar a la larva que se encuentra en músculos, el cual de por sí es un órgano con poca perfusión sanguínea. Cuando la dosis se incrementó a 50 mg/Kg,

sólo el albendazol redujo el porcentaje de larvas en el ratón. Los bioprecusores no mostraron actividad alguna, por lo que presentan un comportamiento anómalo en su relación dosis-eficacia. En los estudios del comportamiento de 1, 2 y 3, en ratones no infectados, al administrar la misma dosis, para el caso de 1, se determinaron en todo momento concentraciones plasmáticas de AbzSO (metabolito activo) y en algunos casos al mismo albendazol. Situación que no se presentó con 2 y 3, los cuales no generaron uniformemente ni cuantitativamente AbzSO o 1.

Para complementar el estudio anterior, se evaluó la actividad de los compuestos sobre la capacidad infecciosa que pudiesen presentar las larvas de *T. spiralis*. Los resultados indicaron que 2 reduce la capacidad de las larvas, para infectar a un nuevo huésped (66%).

Tabla 33. Efecto de los bioprecusores y albendazol sobre la infectividad de LM

Tratamiento	No. de LM/ ratón	% de reducción
control	70554 ^a	0
1	35102 ^b	51
2	24293 ^c	66
3	44198 ^b	38

Los porcentajes no seguidos por el mismo superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Análisis estadístico chi-cuadrada fue realizado para los tres compuestos.

Prueba *in vitro* de los bioprecusores frente a *T. spiralis*.

Con el propósito de evaluar la actividad biológica intrínseca de los bioprecusores 2 y 3 frente a fase adulta y larvas musculares de *T. spiralis*, se realizaron experimentos *in vitro*. para determinar la actividad biológica relativa de los bioprecusores en relación al albendazol se utilizó el procedimiento 2+2 por la siguiente ecuación:

$M = A/B^d$, donde M: log de la actividad relativa

d : log de la relación entre las dosis utilizadas

A: $U_L + U_s - S_L - S_s$

B: $U_L + S_L - U_s - S_s$

U_L, U_s, S_L, S_s : son las respuestas a la dosis alta (L) y dosis menor(s) del compuesto estandar (albendazol) y el bioprecursor correspondiente.

Los resultados fueron los siguientes.

Tabla 34. Porcentaje de inhibición de la actividad metabólica de *T. spiralis*.

Compuesto	fase adulta			fase larvaria muscular	
	1.88 μM^*	3.76 μM^*	Act. rel.	1.88 μM^*	3.76 μM^*
control	0	0	---	0	0
1	5	19	1	63	67
2	8	14	0.93	12	4
3	7	15	0.89	7	31

*promedio de tres determinaciones. Act. rel.: actividad relativa

A concentraciones de 1.88 μM , los tres compuestos mostraron actividad similar contra el adulto de *T. spiralis*. Esto nos lleva a pensar que la actividad de **3**, en los estudios anteriores podría ser intrínseca al compuesto y no, al menos totalmente, a su conversión a albendazol. Asimismo, las pruebas *in vitro* indicaron que **2** y **3** no mostraron efecto intrínseco sobre larva muscular, por lo que aunque se encuentren presentes en plasma de ratón, ambos compuestos no podrían actuar de forma sistémica por sí mismos.

A manera de recapitulación, se puede decir que la actividad de los bioprecusores sobre *T. spiralis*, está dirigida principalmente hacia la fertilidad de la hembra, lo que probablemente los ubique como agentes antiparasitarios esterilizantes. En el caso de la fase adulta, **3** a una dosis de 50 mg/Kg, es tan efectivo como **1**. Asimismo, por los resultados obtenidos en fase larvaria, es evidente que los bioprecusores no alcanzaron a generar cuantitativamente a **1** ni a su metabolito activo, para dañar a este estadio del parásito; situación que limita su posible uso en actividades antiparasitarias sistémicas. Aunque se cumplió con el cometido del diseño de bioprecusores con mayor solubilidad acuosa que el principio activo, el problema más importante en este caso, radicó en la bioconversión eficiente de estos compuestos en los organismos biológicos utilizados. Al parecer la nitro-reducción fue la etapa limitante de dicho proceso, por lo que en futuros diseños este grupo funcional debería cambiarse. En los estudios *in vitro* sobre fase adulta de *T. spiralis*, los resultados obtenidos sitúan a **2** y **3** como posibles candidatos para la búsqueda de nuevos análogos, con actividad antiparasitaria.

5.2. Los derivados biorreversibles

5.2.1. Consideraciones para el diseño.

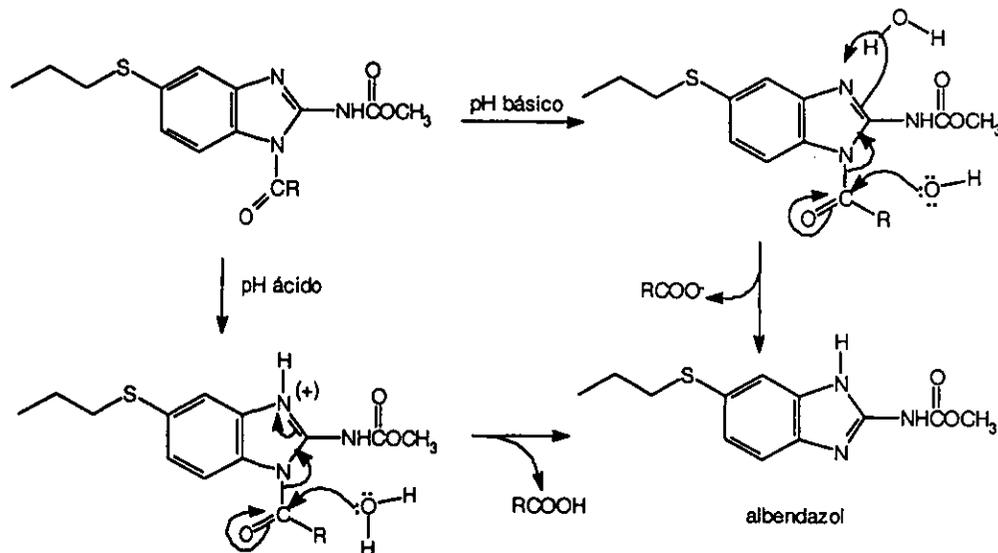
El diseño de los derivados biorreversibles, consideró las dos estrategias tradicionalmente utilizadas dentro de este rubro: la adición de una porción estructural (modificador) al principio activo para disminuir su punto de fusión y la adición de un modificador ionizable.⁸⁹ Dado que los derivados a sintetizar deberían liberar albendazol en condiciones biológicas, en todos los casos se tomó en cuenta la posibilidad de este hecho al colocar enlaces, entre el fármaco y el modificador, susceptibles a hidrolizarse enzimáticamente.

5.2.1.1. Derivados que disminuyan el punto de fusión del albendazol (206 °C)

La implementación de esta estrategia se basó en que el albendazol, en estado sólido, presenta uniones intermoleculares, por la presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares, que provocan un acomodamiento difícil de romper por las moléculas de agua.⁵⁶ Siendo las

interacciones soluto-soluto, las que predominan sobre las interacciones soluto-disolvente.⁵³ Con el propósito de cambiar este empaquetamiento, se decidió alterar la estructura de este principio activo retirándole el hidrógeno de la posición 1 o 3, y en su lugar colocar una porción estructural que evite la formación de este enlace intermolecular. Con ello se esperaba incrementar la solubilidad acuosa, sin disminuir significativamente la liposolubilidad.

Dentro de esta estrategia, se consideró primeramente contar con derivados de tipo bipartitas.³ Para tal efecto, se prepararon los derivados acilados con acetilo (10), propanoilo (11) y butanoilo (12). La elección de estos compuestos, se hizo en base a su sencillez de elaboración y, los modificadores, una vez liberados, no presentarían riesgos de toxicidad además que serían fácilmente metabolizados. La hidrólisis de estos derivados se llevaría a cabo con cierta facilidad debido a que la unión de las porciones acilos al bencimidazol no se comportarían como enlaces amidas tradicionales. Aunque no se descarta la participación de las esterasas en su descomposición, por su característica de grupo saliente, el bencimidazol favorecería su hidrólisis bajo condiciones biológicas de acidéz o basicidad. La ventaja que tiene la activación química de un profármaco, es que la naturaleza genotípica de los individuos,¹³³ no influye en la liberación del principio activo; con ello disminuye la variabilidad biológica de la respuesta.

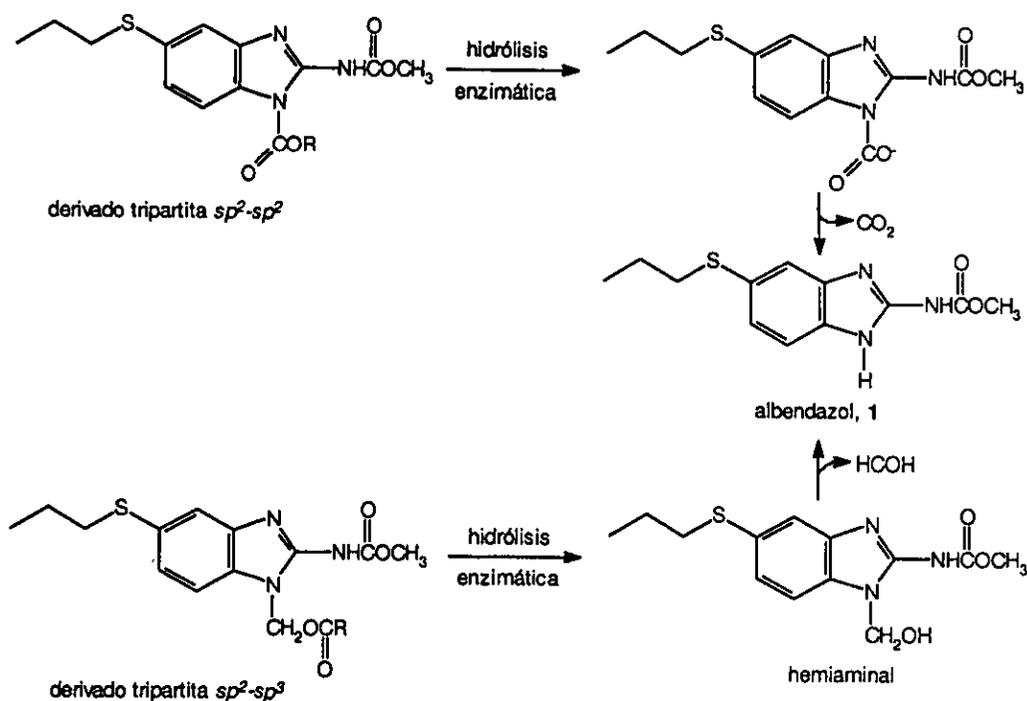


Esquema 28. Liberación de albendazol de los derivados acilados por influencia del pH.

Dado que con los modificadores propanoilo y butanoilo, la liposolubilidad se incrementa por la adición de un metileno, es probable que esta propiedad no se vea comprometida al aumentarse la solubilidad acuosa.⁸⁷ Por esta razón, si el acetilo provoca un incremento en solubilidad con una pérdida de la liposolubilidad (por el log P calculado) del albendazol, el

propanoilo y el butanoilo, tratarían de compensar esta desventaja.

El segundo grupo de derivados biorreversibles con menor punto de fusión, se diseñó con la característica estructural de profármaco tripartita, ya que presentan al albendazol, al acoplador y al modificador. La unión entre el acoplador y el modificador será mediante un enlace éster, en todos los casos. En una primera variante, compuestos **13** y **14**, se conservó la hibridación de los átomos, sp^2-sp^2 ,¹³⁴ que forman el enlace entre el albendazol y acoplador. En la segunda variante, compuestos **16**, **19** y **20**, los unión entre el albendazol y el acoplador será con átomos de hibridación sp^2-sp^3 .¹³⁵ Con la estructura tripartita se espera ganar estabilidad en solución acuosa para el derivado correspondiente. La bioconversión de estos derivados al albendazol podría llevarse a cabo en dos pasos, el primero con la participación de enzimas (activación biológica) para retirar al modificador, y el segundo por descomposición química espontánea, para liberar al albendazol del acoplador.¹³⁴

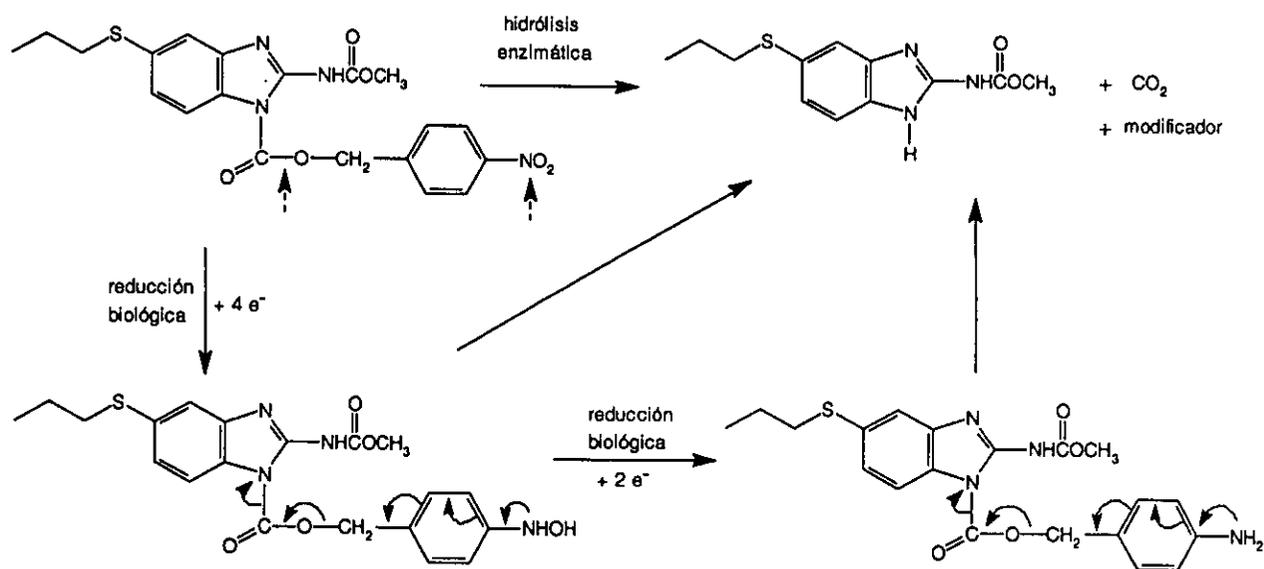


Esquema 29. Propuesta de transformación de los derivados biorreversibles tripartitas del albendazol

Una aspecto adicional para la activación de los derivados tripartitas fue utilizada al diseñar al derivado **14**. En este compuesto se incluyó un segundo punto estructural de bioactivación, el cual radica en el grupo nitro. En el apartado de los bioprecusores, se ha mencionado que este grupo funcional puede llegar a reducirse biológicamente. Sin embargo, se necesitaba una ganancia de 6 electrones para transformarse en grupo amino, con la presencia de un intermediario

estable, la hidroxilamina. Para los bioprecusores, si la reducción no llegaba hasta el grupo amino, entonces no podría generarse el principio activo. En el caso de **14**, este inconveniente no existe, ya que si la reducción se detuviese en la hidroxilamina, o llegase a grupo amino, de todos modos, se liberaría al albendazol.¹³⁵

Con esta idea de la reducción del grupo nitro, se diseñó el compuesto **16**, el cual a diferencia de **14**, es un profármaco bipartita. En este caso, la unión del modificador con el principio activo es de tipo sp^2 - sp^3 por lo que se espera presente mayor estabilidad tanto en medio acuoso como en presencia de enzimas hidrolíticas. Otra característica de **16**, es que sólo se biotransforma con reducción, situación que podría ser ventajosa si llegara a ser lo suficientemente soluble para administrarlo por vía intravenosa, ya que se sabe que algunos parásitos llegan a reducir al grupo nitro,¹³⁶ reacción que pocas veces ocurre en el organismo fuera del intestino grueso.



Esquema 30. Bioactivación del derivado **14** en dos porciones estructurales.

5.2.1.2. Derivados con modificador ionizable.

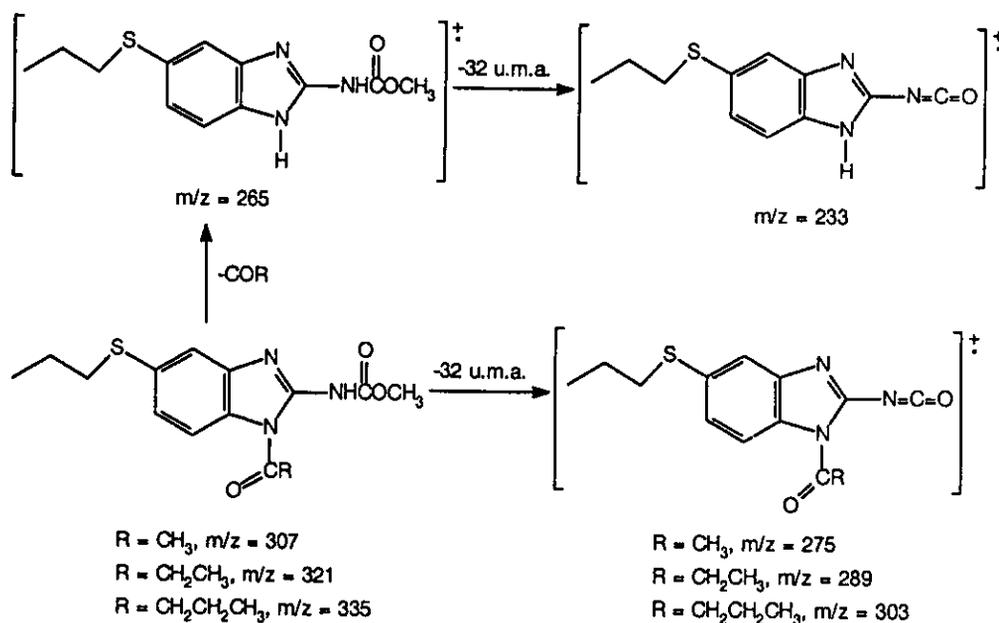
Par el diseño de este tipo, se tomó al grupo amino, como el grupo ionizable. En este contexto, muchos trabajos de investigación han utilizado a los aminoácidos como modificadores ionizables.¹³⁷⁻¹³⁸ El uso potencial de los aminoácidos con estos fines, ha sido tema de amplio estudio debido a su carácter polar y baja toxicidad, al ser liberados del principio activo dentro del organismo. Sin embargo, se ha señalado que estos derivados presentan problemas de

estabilidad en solución acuosa, inestabilidad atribuida a la cercanía del grupo α -amino, que por su carga positiva a pH ácido, favorece el ataque nucleofílico del agua al carboxilo que forma el éster con el fármaco.¹³⁹ A pesar de ello, una de las ventajas que presenta el uso del grupo alquilamino como agente ionizable, es el valor de su pKa, alrededor de 7 a 9. Esto le permite mantener un carácter iónico positivo en un rango de pH entre 5 y 6, donde la estabilidad del enlace éster es mayor.¹⁴⁰ Para tratar de evitar la inestabilidad de los derivados con α -aminoácidos, se diseñó el compuesto **25**, en donde el modificador presenta al grupo amino lo más alejado del grupo carboxilo. En este modificador se colocó al amino en posición alquímica, para conservar el pKa entre 7-9. Con la intención de que **25** tuviese estabilidad en solución acuosa, su estructura es de tipo tripartita sp^2-sp^3 . La bioactivación de este derivado seguirá las mismas pautas indicadas para los derivados de este tipo.

Un aspecto importante a considerar en el diseño de los derivados biorreversibles es la toxicidad. Como se ha indicado en los antecedentes, el albendazol a las dosis administradas clínicamente (15 mg/Kg, 56 μ mol/Kg) es generalmente bien tolerado; y el hecho de no utilizarlo por tiempos prolongados, abre un mayor margen de maniobra en la selección de los modificadores. Para los derivados **10**, **11** y **12**, los modificadores liberados no presentan problemas por ser fácilmente metabolizados por el organismo. En relación al derivado **13**, libera etanol y CO₂, compuestos que no tienen problemas de biotransformación a las dosis administradas. Por lo que respecta, a los derivados tripartitas sp^2-sp^3 , **19**, **20** y **25**, liberarían al acoplador en forma de formaldehído, compuesto clasificado como moderadamente tóxico por el valor de su DL₅₀ en ratas (26666.6 μ mol/Kg, 0.8 g/Kg, vía oral),¹⁴¹ sin embargo, al administrar estos derivados en relación equimolecular al albendazol (15 mg/kg, 56 μ mol/Kg), la cantidad liberada de formaldehído (56 μ mol/Kg), no alcanza el valor numérico antes citado. Para esta diferencia en la DL₅₀, y pocas administraciones, la liberación de formaldehído ha sido previamente utilizada en el diseño de otros profármacos que no se administran por tiempos prolongados, tales como la pivampicilina.¹⁴² Por otro lado, cuando se requiera administrar a los profármacos tripartitas del albendazol, por largos periodos (> 3 meses), se deberán tomar precauciones porque en estas condiciones, la toxicidad del formaldehído se manifestaría, aún a 56 μ mol/kg. Un elemento adicional a tomar en cuenta, es que al incrementarse la solubilidad acuosa del albendazol, probablemente la dosis administrada sería menor.

5.2.2. Preparación de los derivados.

Para la preparación del derivado **10** se adaptó una técnica publicada previamente para alcoxicarbonilbencimidazoles.⁹⁵ Con este mismo procedimiento se prepararon los derivados **11** y **12**. En los tres casos se logró detectar, por c.c.f., la presencia de dos productos en la mezcla de reacción. Estos dos compuestos probablemente corresponderían a los isómeros sustituidos en el anillo del bencimidazol. Para el caso de **10**, serían el 1-acetil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo y el 1-acetil-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo. Sin embargo, al momento de separar o purificar, el compuesto de menor polaridad, se descompuso a albendazol. Los espectros de masas para **10**, **11** y **12**, confirman la monosustitución del albendazol. En los tres casos, el pico base, se presentó a $m/z = 265$, que corresponde al ión molecular del albendazol. Una pérdida de 32 u.m.a. (10-15%) se presentó en estos derivados, la cual corresponde a $[\text{HOCH}_3]$ de la porción $\text{C}^2\text{-NHCOOCH}_3$ del albendazol.

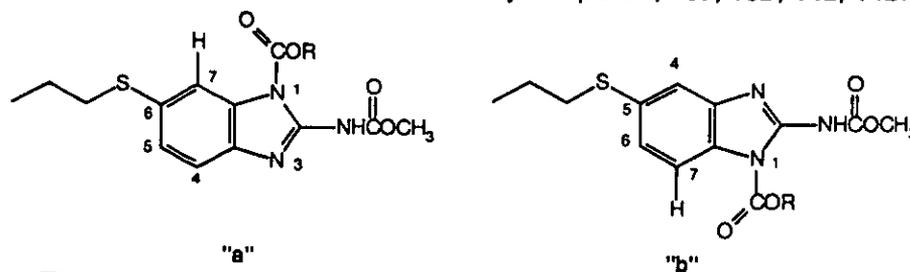


Esquema 31. Pérdida de 32 u.m.a. (unidades de masa atómica) de **1**, **10**, **11** y **12**.

En la preparación del derivado **13** y **14**, se detectaron igualmente la presencia de dos productos en cada reacción. A diferencia del caso anterior, se logró aislar a ambos compuestos, los cuales fueron isómeros estructurales. Para poder establecer la estructura de cada isómero se utilizó ^1H RMN, la cual tomó en cuenta que en solución estos compuestos adoptan la conformación *endo* que coloca al grupo carbonilo del modificador, en posición para provocar un desplazamiento a campos bajos del protón (H-7) del bencimidazol.^{143, 144} La diferenciación entre

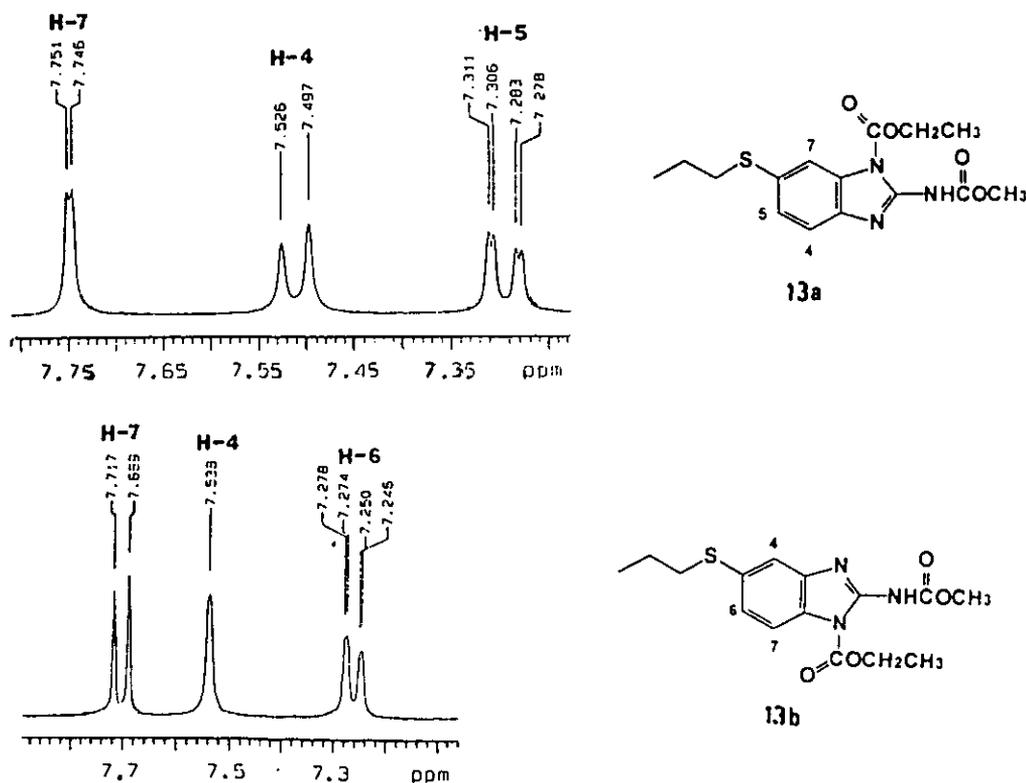
ambos isómeros se llevó a cabo por el valor de la constante de acoplamiento (J) del H-7.⁹² Para el isómero "a", la J para H-7, se encontró de 2 Hz; por su parte, para el isómero "b", la J se presentó entre 9-10 Hz.

Tabla 35. Asignación en ¹HRMN de H-7 y H-4 para 1, 13a, 13b, 14a, 14b.



No.	¹ H RMN	
	H-7, ppm (Hz)	H-4, ppm (Hz)
1	7.33 ($J = 10$)	7.42 ($J = 2$)
13a	7.75 ($J = 2$)	7.51 ($J = 9$)
13b	7.70 ($J = 9$)	7.53 ($J = 1.8$)
14a	7.75 ($J = 2$)	7.51 ($J = 10$)
14b	7.71 ($J = 10$)	7.54 ($J = 2$)

A continuación se ilustran estos desplazamientos para H-7 de 13a y 13b.



Esquema 32. Desplazamiento a campos bajos de H-7 para 13a y 13b.

Con este mismo criterio se logró elucidar la posición del modificador en **10**, **11** y **12**, los cuales mostraron a H-7 a 7.99 ($J = 10$ Hz), 7.95 ($J = 9$ Hz), 8.01 ($J = 9$ Hz) ppm, respectivamente

El espectro de IR mostró bandas que indican la presencia del carbamato producido y el carbamato de metilo, perteneciente al principio activo.

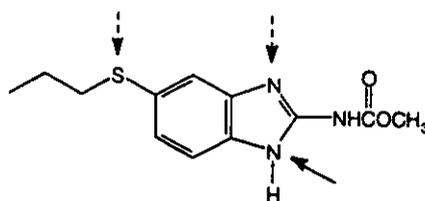
Tabla 36. Señales de IR para los carbonilos de los compuestos enlistados

No.	IR, cm^{-1}		
	$\text{N}^1\text{-COOR}$	$\text{C}^2\text{-NHCOOCH}_3$	$\text{C}^2\text{-NHCOOCH}_3$
1	—	1634	332
13a	1764	1736	3314
13b	1774	1731	3300
14a	1782	1730	3318
14b	1770	1732	3332

Los datos referidos se tomaron de los espectros en las páginas 136,147,149,151,154.

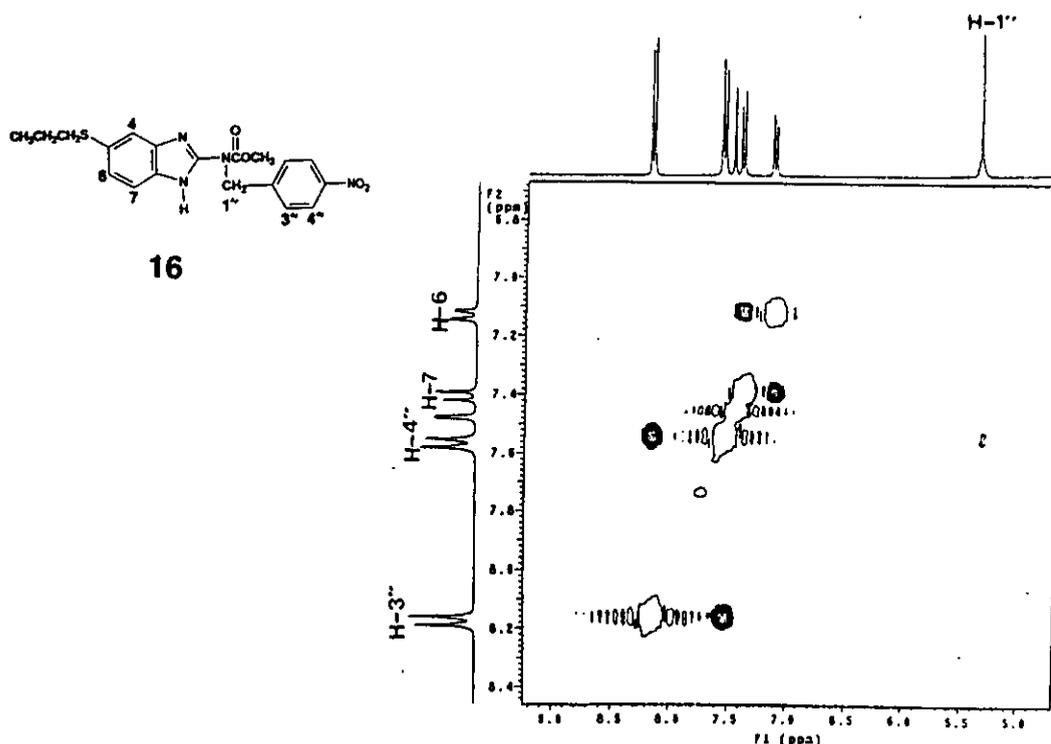
Los espectros de masas, indicaron que en todos los casos, se realizó una monosustitución sobre el albendazol. Y en todos ellos se presentó la pérdida de 32 u.m.a., semejante al de los compuestos **10**, **11** y **12**. Para **13a** y **13b**, el ión molecular fue el pico base, para **14a** y **14b**, el pico base fue m/z 265 (que corresponde al ión molecular de **1**).

En cuanto a la preparación del derivado **16**, el intermediario **15** fue obtenido con rendimiento aceptable (65%) y en la víspera de su utilización. La naturaleza fuertemente irritante de la reacción demandó la mayor precaución operativa posible. Para hacer reaccionar a **15** con **1**, al principio se utilizaron bases fuertes como el NaH^{98} o granallas de KOH^{145} y dimetilformamida como disolvente. La reacción se realizaba en frío o a temperatura ambiente, por 6-8 h. Las c.c.f. mostraron la presencia de tres productos de R_f muy cercanos, y de difícil separación. Por la naturaleza de las materias primas, el albendazol presentará dos protones ácidos, el $\text{N}^1\text{-H}$ y el $\text{C}^2\text{-NHCO-}$, los cuales podrían reaccionar con el NaH o KOH . Por su parte **15**, presenta protones ácidos, $\text{ClCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$, los cuales podrían reaccionar con las bases antes mencionadas. Por último, el albendazol, presenta al grupo carbamato que podría hidrolizarse. Por estos antecedentes, se decidió cambiar la base, preservando al disolvente. La base utilizada fue el Na_2CO_3 , incrementado la temperatura a 50°C por 3 h, con lo cuál se obtuvo prácticamente un producto mayoritario. En este caso, consideramos que probablemente el carbonato no reaccionó con los protones de **1** o **15**; sino únicamente sirvió para neutralizar al HCl generado. Con ello el albendazol prácticamente actúa por cualquiera de sus sitios nucleofílicos.



La alquilación en el átomo de azufre, daría lugar a un producto inestable, el cual al descomponerse, podría regenerar albendazol o producir un compuesto sin la porción propilo. La sustitución en los nitrógenos del benzimidazol, por su parte, llevaría a dos compuestos más estables y de interés en la búsqueda de derivados hidrosolubles.

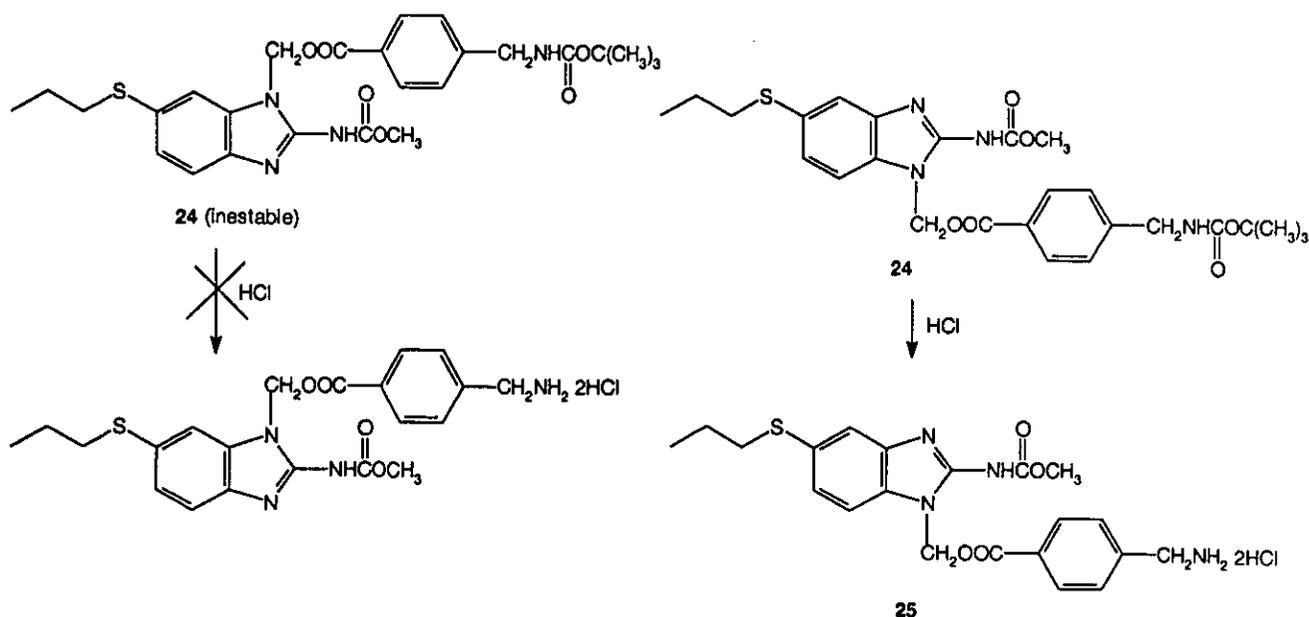
Después de concluida la reacción, el aislamiento y purificación del compuesto mayoritario obtenido, disminuyó el rendimiento del mismo. Para la elucidación de este compuesto, el espectro de masas presentó un valor de $m/z = 400$, que indica que el producto está monosustituido. La asignación de la posición de la sustitución no se hizo de forma similar a **13** y **14**, porque en **16** no se tiene el carbonilo unido directamente al benzimidazol. Por tal motivo, se recurrió al experimento NOESY, el cual puede relacionar dos protones a 5 enlaces de distancia. Los resultados mostraron que el protón del metileno del modificador, no interrelacionaba con ninguno de los protones del anillo aromático. Por lo que se llegó a la conclusión de que **16**, estaba sustituido en el nitrógeno del carbamato de metilo.



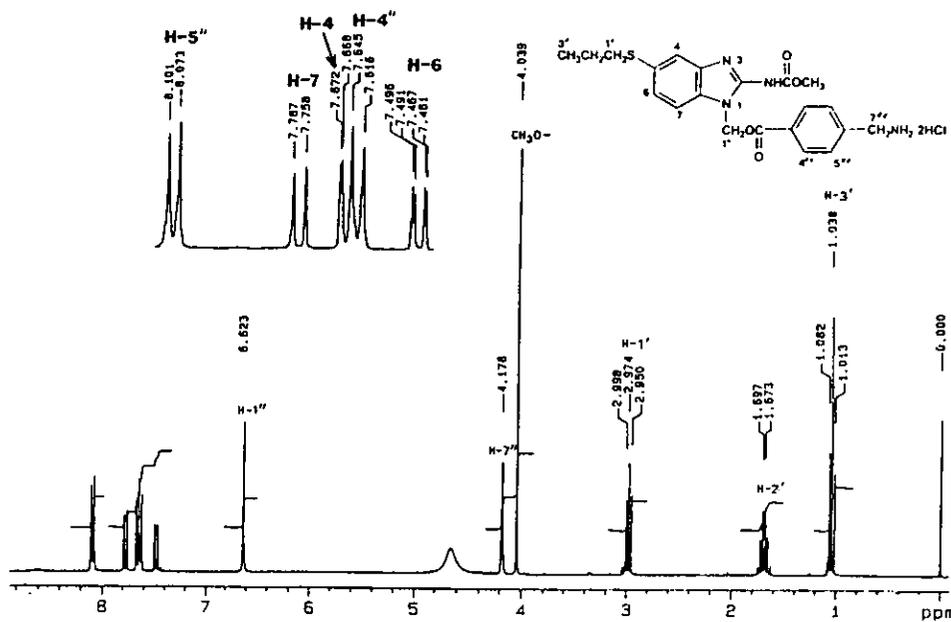
Esquema 33. Experimento NOESY para el derivado **16**.

Para la preparación de los compuestos **19**, **20** y **25**, se utilizó el Na_2CO_3 como la base de la reacción. En los compuestos **19** y **20**, la espectrometría de masas, indicó la monosustitución; sin embargo, por c.c.f. se detectó la presencia de una mezcla de dos compuestos con valores de R_f prácticamente similares, en varios sistemas de elución cromatográfica. Por las dificultades de su separación se optó por mantenerlos como mezcla para los estudios posteriores de solubilidad.

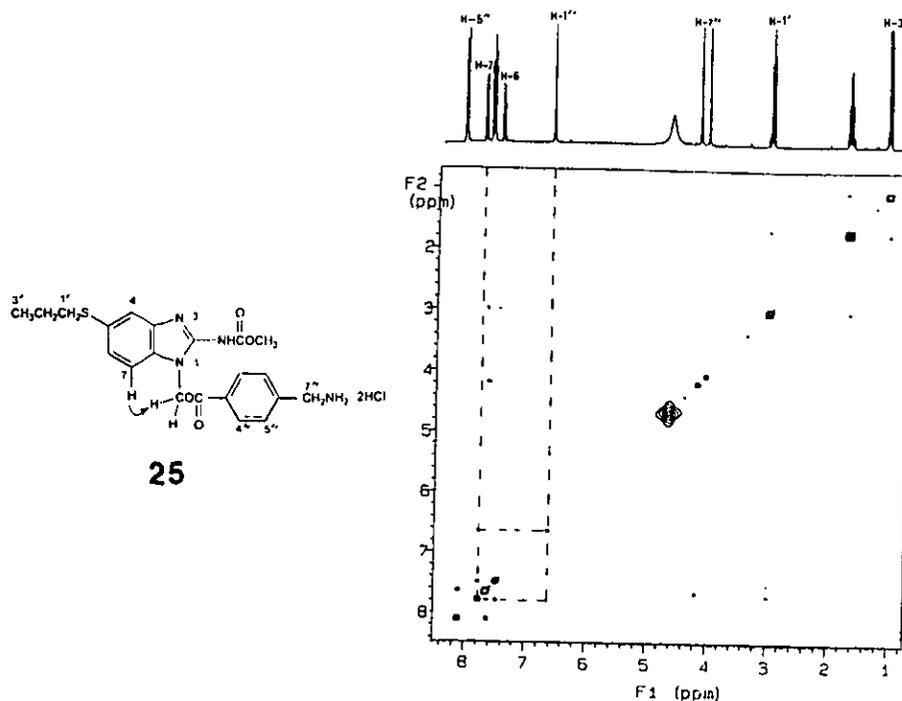
En la preparación de **25**, primeramente se hizo reaccionar al intermediario **23** con **1**, para obtener **24**, con las mismas condiciones de base, disolvente y tiempo, que las reacciones de sustitución anteriores. El seguimiento de esta reacción por c.c.f. mostró la presencia de dos productos principales. Los intentos de separación por recrystalización fueron infructuosos; lograndose este cometido por cromatografía en columna. La espectrometría de masas, indicó que se trataba de dos compuestos monosustituídos, y con el experimento NOESY se asignó la posición de dicha sustitución. Cuando los isómeros **24**, fueron sometidos a hidrólisis ácida para la obtención de los isómeros **25** correspondientes, uno de ellos mostró un alto grado de inestabilidad, liberando albendazol en aproximadamente 50 %. El otro isómero fue hidrolizado y obtenido en forma de clorhidrato. El experimento NOESY, mostró la sustitución del modificador en la molécula del albendazol.



Esquema 34. Obtención del isómero **25** a partir de **24** por hidrólisis ácida

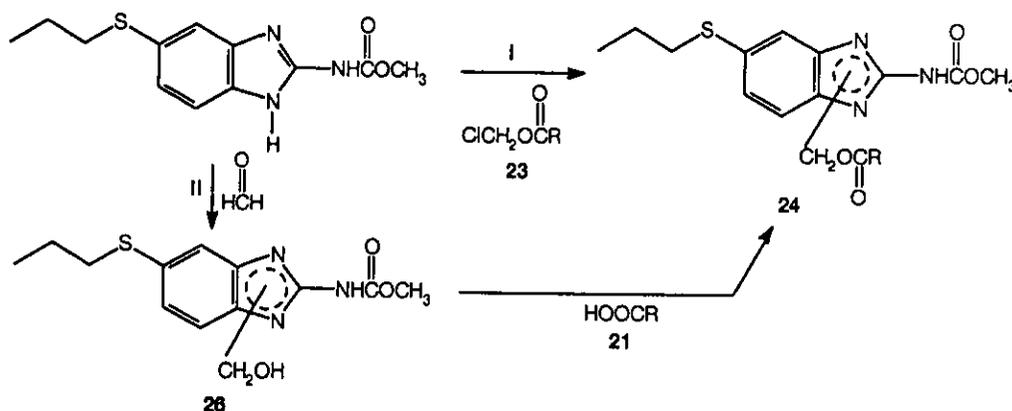


Esquema 35. ^1H RMN para 25



Esquema 36. Experimento NOESY para 25.

Una de las desventajas en la preparación de **25** por las reacciones mostradas en el Esquema 18 (pag. 47), fue la obtención de **22** a partir de bromoclorometano y ácido clorosulfónico. La realización de esta reacción presentó dificultades y demandó cuidados en el manejo del bromo generado y en la neutralización del exceso de ácido clorosulfónico. El rendimiento de este paso fue del 28%. Ante esta situación se planteó una segunda alternativa de preparación (II) de **24**, en la cual, a diferencia de la primera (I), no utiliza el intermediario **22**, sino al hemiaminal **26**.

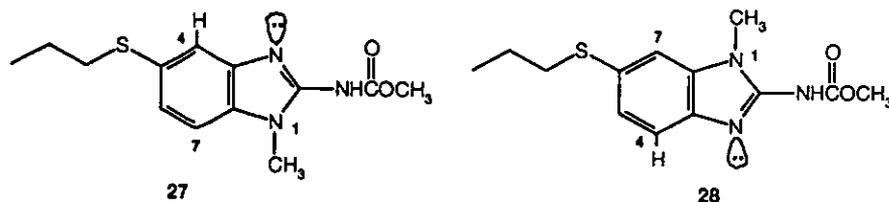


Esquema 37. Rutas para la preparación del intermediario **24**.

En este caso, el intermediario **26** no se separa en sus isómeros, por su inestabilidad, y se utiliza como tal para la siguiente reacción. Los resultados obtenidos por esta secuencia, mostraron rendimientos menores para la obtención de **25**, por lo que no constituye una alternativa para sustituir a la ruta originalmente realizada. Adicionalmente se realizaron experimentos utilizando al cloroformiato de isoprenilo ($\text{ClCOOC} \cdot (\text{CH}_3)=\text{CH}_2$) o al clorhidrato de 2-cloro-N-metilpiridinio,¹⁴⁶ en lugar del cloroformiato de metilo, sin que por ello se lograra incrementar el rendimiento de la reacción.

Con los análogos del albendazol, **27**, **28**, **29**, la preparación se llevó a cabo de forma separada. Los compuestos **27** y **28** fueron sintetizados por rutas diferentes, con intermediarios que nos llevaron a los compuestos monometilados esperados. El compuesto **29**, se obtuvo de la metilación directa del albendazol, al descartar la mezcla de **27** y **28**, los cuales no fueron disponibles de esta forma por presentar el mismo valor de R_f . Los espectros de IR para **27** y **28**, no mostraron la señal correspondiente al hidrógeno bencimidazolico, unido a nitrógeno.

En relación a los espectros de ^1H RMN para **27** y **28**, se presentaron las señales correspondientes a la parte propiltio y al metoxilo. En la porción aromática, se esperaba que el par de electrones no enlazantes del nitrógeno provocaría un desplazamiento a campos bajos de H-4,⁹⁵ en relación al presentado por el albendazol.



Los datos obtenidos de los espectros fueron concordantes con lo esperado para ambos análogos, como se muestra en la Tabla 37. Sin embargo, la influencia de los electrones no es tan notable, ya que las diferencias en los desplazamientos no fueron muy marcadas; por lo que no podríamos utilizar este criterio para asignar la posición de sustitución en otros derivados monosustituídos del albendazol.

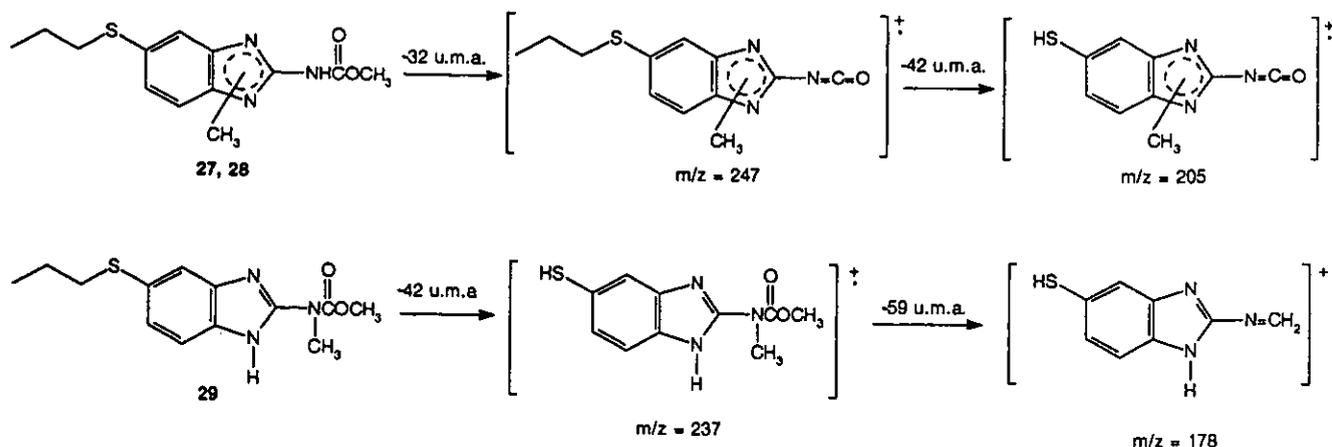
Tabla 37. Valores de ppm y J (Hz) para H-4 y H-7 de **27** y **28**.

No.	^1H RMN	
	H-7, ppm (Hz)	H-4, ppm (Hz)
1	7.3345 ($J = 10$)	7.4250 ($J = 2$)
27	7.3397 ($J = 10$)	7.4625 ($J = 3$)
28	7.4027 ($J = 3$)	7.3414 ($J = 10$)

Los datos referidos se tomaron de los espectros localizados en las páginas 136,167,169.

En relación a los espectros de **29**, este compuesto se presentó como una mezcla de tautómeros, similar al albendazol, por el intercambio del protón del bencimidazol.

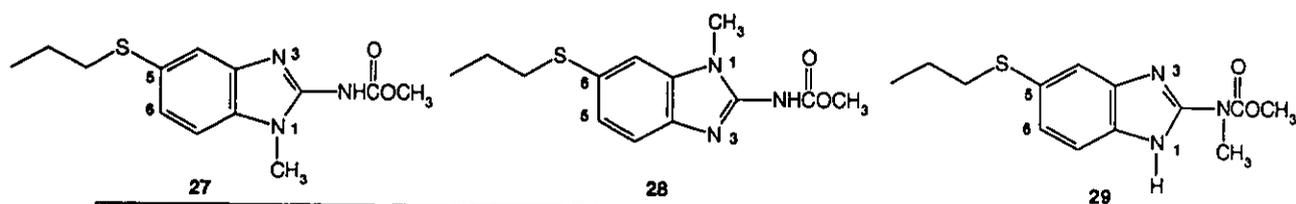
Los espectros de masas, para todos los casos, mostraron que la monometilación se había llevado a cabo. Aunque los espectros de masas de **27** y de **28**, no permitieron establecer diferencias entre ambos compuestos, para el caso de **29**, se presentó una fragmentación característica. Para los dos primeros, se presentó la pérdida de 32 u.m.a., la cual dio lugar al pico base, y luego una pérdida de 42 u.m.a. En **29**, el pico base fue el ión molecular, luego una pérdida de 42 u.m.a., seguida de una pérdida de 59 u.m.a. La pérdida de 32 u.m.a. no se presentó en este compuesto.

Esquema 38. Pérdidas mayoritarias propuestas para los análogos **27**, **28** y **29**.

5.2.3. La solubilidad acuosa y la liposolubilidad

5.2.3.1. Evaluación de la solubilidad acuosa del albendazol y los análogos **27-29**.

Para probar la hipótesis que considera, que al alterar la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares en el albendazol, se podría favorecer una mayor interacción soluto/disolvente y por ende, aumentar la solubilidad acuosa, se prepararon tres análogos monometilados de este principio activo, **27**, **28** y **29**. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 38.

Tabla 38. Solubilidad a diferente relación sólido/agua desionizada del albendazol y sus análogos **27-29**

No.	λ_{\max} , nm	ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Solubilidad, $\mu M^a \pm DE$ (relación sólido/agua)			
			1:1	2:1	3:1	4:1
1	295	11591.01 (etanol)	16.2 \pm 5.36	18.7 \pm 4.37	15.1 \pm 6.78	18.3 \pm 7.13
27	306	18435.75 (etanol)	88.2 \pm 11.6	82.3 \pm 12.45	89.2 \pm 6.9	88.3 \pm 15.3
28	306	18011.17 (etanol)	58.0 \pm 6.24	54.9 \pm 4.52	59.9 \pm 3.15	50.8 \pm 3.79
29	299	14801.79 (etanol)	20.4 \pm 4.34	25.7 \pm 3.21	26.3 \pm 2.18	24.2 \pm 5.14

coeficiente de absorptividad molar. ^aSe utilizan estas unidades debido a que los compuestos referidos presentan diferentes pesos moleculares. Los datos de solubilidad son un promedio de tres determinaciones. DE: desviación estándar. Para **1** y **29** no se encontró diferencia significativa para $p < 0.05$.

De los datos obtenidos se puede decir que al retirar el átomo de hidrógeno del bencimidazol, se incrementó la solubilidad del compuesto en cuestión. Al aparecer el mayor efecto se logró en **27**, en donde la solubilidad se incrementó en mayor proporción que los otros análogos. Esto podría indicarnos que los derivados biorreversibles con similar patrón de sustitución, presentarían la mayor solubilidad en relación a sus isómeros, con patrón de sustitución similar a **28** o **29**.

El propósito que se utilizaran diferentes relaciones sólido/agua (1:1, 2:1, 3:1, 4:1), fue para conocer si la solubilidad se incrementaba o disminuía bajo estas circunstancias. Si se hubiese incrementado, nos indicaría que la cantidad de sólido presente influiría en la solubilización, probablemente por alguna especie de "efecto surfactante". En caso de que la solubilidad no cambiase al variar la cantidad de sólido, indicaría que la saturación se había alcanzado en todos los casos, sin que se manifestara alguna desviación a este comportamiento.¹⁰³ Para **1** y sus derivados, se presentó el segundo caso, lo que permitió utilizar diferentes dosificaciones, sin que prácticamente la solubilidad mostrara cambio alguno.

5.2.3.2. Determinación de la solubilidad acuosa de los derivados biorreversibles.

En la determinación de la solubilidad acuosa de los derivados sintetizados, se utilizó agua desionizada. Esto se realizó con la intención de seleccionar sólo aquellos de mayor solubilidad en estas condiciones, mismos que presentarían mejores perspectivas al incrementar la fuerza iónica del disolvente por la adición de sales inorgánicas. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 39. Solubilidad a diferente relación sólido/agua desionizada de los derivados biorreversibles

No.	λ_{\max} , nm	ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹	S, $\mu\text{M} \pm \text{DE}$ (relación sólido:agua)			
			1:1	2:1	3:1	4:1
1	295	11591.01	16.2 \pm 5.36	18.7 \pm 4.37	15.1 \pm 6.78	18.3 \pm 7.13
10	332	13142.06	58.2 \pm 2.33	56.5 \pm 4.12	57.9 \pm 4.35	59.1 \pm 1.23
11	328	12931.86	42.9 \pm 5.22	33.6 \pm 6.42	39.3 \pm 5.34	45.4 \pm 4.55
12	334	10521.76	17.4 \pm 1.27	18.8 \pm 2.10	18.4 \pm 2.78	16.8 \pm 3.12
13a	312	20349.12	83.6 \pm 5.43	87.3 \pm 3.68	85.9 \pm 6.12	79.2 \pm 5.64
13b	317	13452.10	85.3 \pm 4.32	82.8 \pm 5.23	87.3 \pm 3.98	84.6 \pm 2.56
14a	287	10023.92	10.3 \pm 1.23	11.7 \pm 2.10	13.2 \pm 1.67	10.45 \pm 1.89
14b	291	11892.45	11.91 \pm 0.99	13.25 \pm 1.22	14.02 \pm 1.45	10.21 \pm 1.24

Continuación de la Tabla 39

No.	λ_{\max} , nm	ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹	S, $\mu\text{M} \pm \text{DE}$ (relación sólido:agua)			
			1:1	2:1	3:1	4:1
16	312	15835.23	13.2 \pm 1.76	12.4 \pm 2.17	16.9 \pm 1.34	11.1 \pm 1.45
19	321	21835.89	33.2 \pm 0.96	42.8 \pm 0.91	30.4 \pm 1.10	37.9 \pm 0.89
20	316	17390.12	9.3 \pm 0.93	8.7 \pm 1.20	8.2 \pm 0.83	9.1 \pm 0.78
25	322	29555.49	114.12 \pm 8.34	129.34 \pm 7.23	147.18 \pm 6.89	144.94 \pm 5.12

ϵ : coeficiente de absorptividad molar (determinado en etanol, con excepción de 25, el cual se determinó en metanol). S: solubilidad. Los datos de solubilidad en cada columna, son un promedio de tres determinaciones. DE: desviación estándar. En cada relación sólido/agua de cada uno de los derivados no se presentaron diferencias significativas para una $p < 0.05$.

Para los siguientes apartados del presente trabajo, se tomará el valor de la columna 1:1 (Tabla 39) como la solubilidad de los diferentes compuestos. La relación en la solubilidad molar de los derivados biorreversibles y análogos con el albendazol se presenta a continuación.

Tabla 40. Relación de solubilidad (der/1): derivado biorreversible/albendazol o análogo/albendazol

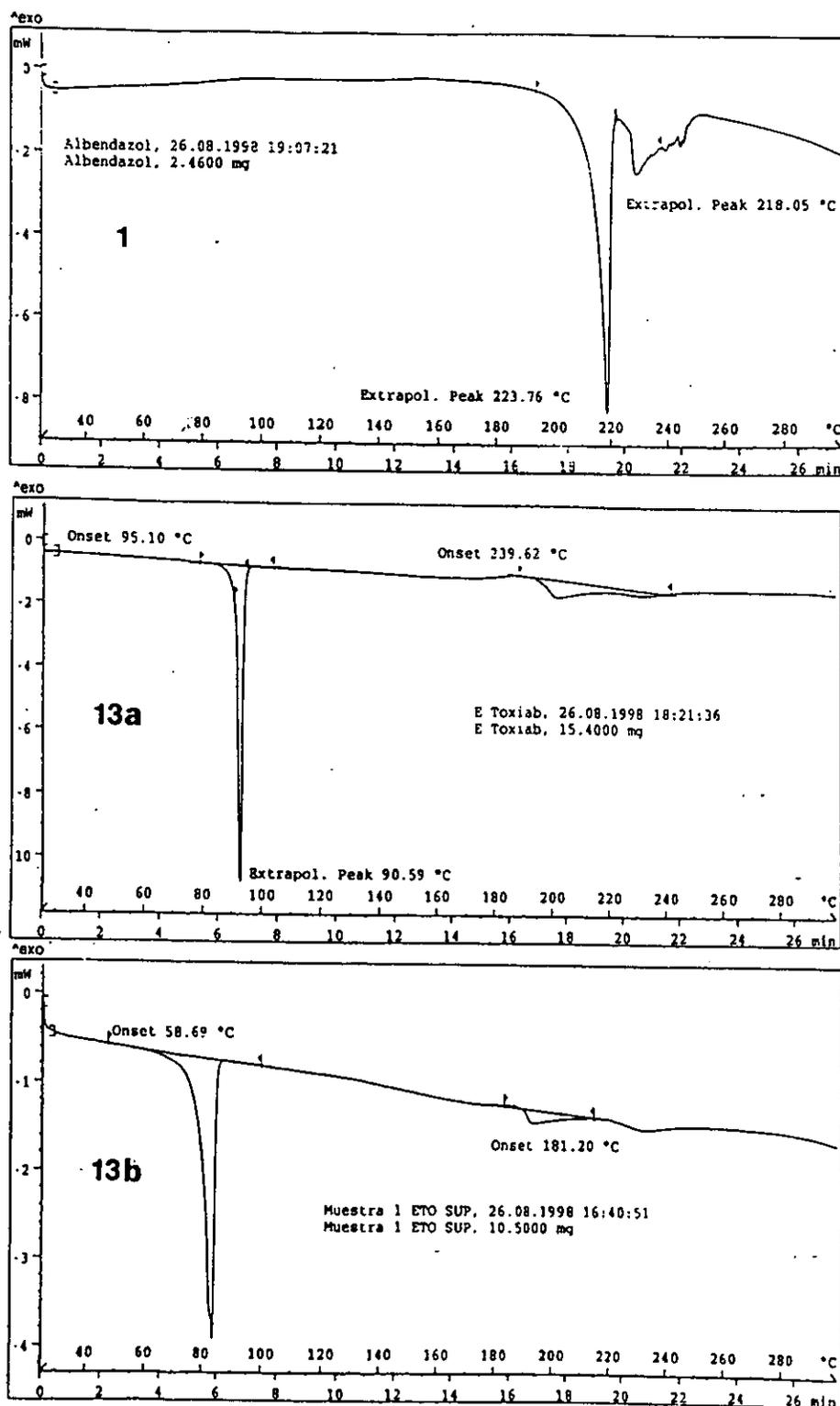
No.	S, $\mu\text{M} \pm \text{DE}$	der/1	P.M.	S, mg/mL	No.	S, $\mu\text{M} \pm \text{DE}$	der/1	P.M.	S, mg/mL
1	16.2 \pm 5.36	1.00	265.33	0.0042	16*	13.2 \pm 1.76	0.82	337.39	0.0085
10*	58.2 \pm 2.33	3.57	307.09	0.0177	19*	33.2 \pm 0.96	2.22	379.47	0.0050
11*	42.9 \pm 5.22	2.48	321.11	0.0130	20*	9.3 \pm 0.93	0.67	400.15	0.0037
12*	17.4 \pm 1.27	1.10	335.13	0.0058	25*	114.1 \pm 8.34	8.26	500.10	0.0570
13a*	83.6 \pm 5.43	5.18	337.39	0.0283	27**	88.2 \pm 11.6	5.36	279.10	0.0240
13b*	85.3 \pm 4.32	5.25	337.39	0.0287	28**	58.0 \pm 6.24	3.41	279.10	0.0150
14a*	10.3 \pm 1.23	0.70	444.10	0.0050	29**	20.4 \pm 4.34	1.49	279.10	0.0066
14b*	11.9 \pm 0.99	0.76	444.10	0.0054					

*derivado biorreversible; **análogo. DE: desviación estándar. S: solubilidad. P.M.: peso molecular.

Par este caso, los derivados más solubles fueron el 10, 13a, 13b y 25. La mayor solubilidad de los derivados biorreversible con grupo no ionizable, en relación al albendazol, puede ser atribuida a una disminución de red cristalina de éste último, la cual se logró al remover un protón en la parte del bencimidazol y manifestada en una disminución pronunciada en el punto de fusión del principio activo (206 °C).

Con la intención de descartar que el incremento en solubilidad no se debía a la presencia de formas polimórficas, sino a consecuencia de la modificación estructural, se registró un termograma de calorimetría diferencial para 1, 13a y 13b, respectivamente. En los derivados, la

endoterma denotó que estos compuestos no presentaban formas cristalinas metaestables que pudiesen influir en la solubilidad acuosa determinada experimentalmente.



Esquema 39. Termogramas para 1, 13a y 13b

5.2.3.3. La liposolubilidad.

Después de calcular y determinar experimentalmente el log P de los derivados biorreversibles, los datos obtenidos se presentan a continuación.

Tabla 41. Coeficiente de partición para **1**, derivados biorreversibles y análogos

No.	Calculado	octanol/H ₂ O	Método cromatográfico	
	log P ± DE	log P ± DE	log k ₀ ± DE	log P ± DE
1	3.01 ± 0.86	nd	2.8537 ± 0.12	3.07 ± 0.36
10	2.75 ± 0.91	2.74 ± 0.48	2.691 ± 0.23	2.82 ± 0.28
11	3.28 ± 0.91	3.09 ± 1.22	2.977 ± 0.15	3.17 ± 0.26
12	3.81 ± 0.91	nd	3.598 ± 0.16	3.92 ± 0.31
13a	3.73 ± 0.91	3.20 ± 0.55	2.995 ± 0.22	3.19 ± 0.57
13b	3.73 ± 0.91	3.26 ± 0.42	3.105 ± 0.16	3.32 ± 0.48
14a	4.71 ± 0.93	nd	4.236 ± 0.41	4.69 ± 0.99
14b	4.71 ± 0.93	nd	4.209 ± 0.36	4.65 ± 0.89
16	4.64 ± 0.88	nd	4.124 ± 0.29	4.55 ± 0.95
19	3.23 ± 0.95	3.22 ± 1.12	3.015 ± 0.17	3.21 ± 0.56
20	4.46 ± 0.91	nd	4.071 ± 0.34	4.49 ± 0.75
25	4.32* ± 0.90	2.01** ± 0.92	2.733 ± 0.64	2.91 ± 0.42
27	3.13 ± 0.87	3.07 ± 0.78	2.918 ± 0.12	3.10 ± 0.22
28	3.13 ± 0.87	3.09 ± 0.89	2.931 ± 0.14	3.11 ± 0.27
29	3.26 ± 0.87	nd	2.999 ± 0.18	3.39 ± 0.38

DE: desviación estandar. nd: no determinado. *calculado como base; **fase acuosa a pH = 6.0. Para los diferentes métodos, los valores de log P para cada compuesto no presentaron diferencias significativas para un $p < 0.05$.

El valor de log P de los derivados biorreversibles, tanto teórico como experimental, no presentaron diferencias significativas con el log P del albendazol, por lo que podría pensarse que el paso a través de las membranas biológicas no se vería alterado por las modificaciones estructurales realizadas. Para el derivado **25**, lo que se determinó en realidad fue el log D_{pH=6}, por la naturaleza iónica de este compuesto. Este valor difiere del log P calculado por aproximadamente 1.5 unidades; sin embargo, la cantidad determinada aún se encuentra dentro del rango aceptable para su absorción intestinal.⁸⁴

Como ha sido publicado por Yalkowsky et al,⁸⁰ la relación entre la solubilidad acuosa (S, en concentración molar) y el log P para muchos compuestos, incluye al punto de fusión en la siguiente ecuación:

$$\log S = -a \log P - b \text{ p.f.} + c$$

donde a , b y c son constantes las cuales pueden variar para diferentes tipos de estructura química, a usualmente tiene un valor cerca a la unidad, b es alrededor de 0.01 y c de 0.5. Con estos valores, se ha podido prever que una disminución en 100 °C en el punto de fusión de un principio activo, podría provocar un incremento de 10 veces en su solubilidad acuosa, para un mismo valor de $\log P$.

Estos antecedentes, refuerzan el diseño de los derivados **10**, **11**, **12**, **13** y **19**. Con estos modificadores se alteró la estructura de red cristalina del albendazol, y como en todos ellos no se presentaba la presencia de un grupo ionizable, el coeficiente de partición no sufriría grandes cambios en su valor. Los cálculos realizados para este parámetro así lo demostraron. Desafortunadamente, el compuesto **19** al no obtenerse puro, se descartó, y su lugar lo tomó el compuesto **14** para tratar de establecer una relación entre la solubilidad, el $\log P$ y el p.f. de los compuestos sintetizados. Los valores de estos parámetros se presentan a continuación.

Tabla 42. Valores de S, $\log P$ y p.f. para 10-14

No.	S, μM	$\log S$	$\log P$	p.f., °C	No.	S, μM	$\log S$	$\log P$	p.f., °C
10	57.95	1.763	2.82	128	13a	84.00	1.924	3.19	89
11	40.30	1.605	3.17	145	13b	85.11	1.93	3.32	75
12	17.85	1.251	3.92	138	14a	11.40	1.057	4.69	139
					14b	12.35	1.092	4.65	105

S: solubilidad. p.f.: punto de fusión.

Después de someter los valores anteriores al análisis de regresión múltiple, la ecuación obtenida quedó de la siguiente manera:

$$\log S = -0.421 \log P - 0.00563 \text{ p.f.} + 3.727 \quad r^2 = 0.972, n = 7$$

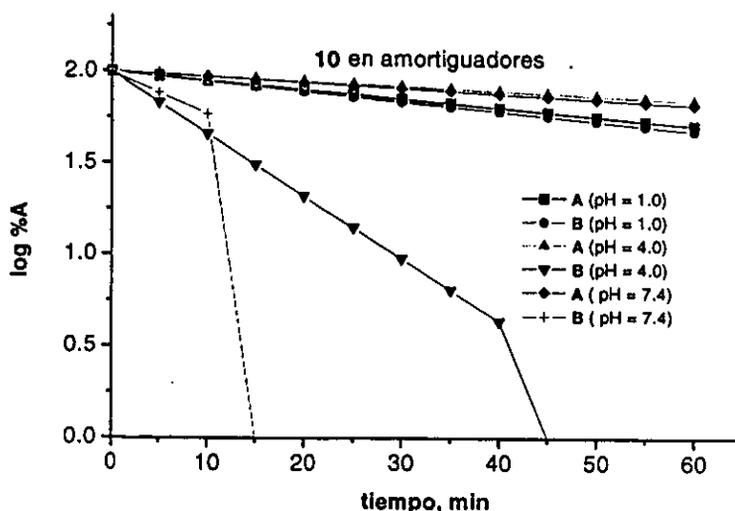
Aplicando esta ecuación para calcular la solubilidad del albendazol (p.f. =206 °C y $\log P = 3.01$) se obtiene un valor de 19.97 μM . La solubilidad determinada experimentalmente fue de $16.20 \pm 5.42 \mu\text{M}$. En el contexto de los trabajos de Yalkowsky, si se contara con un derivado biorreversible con el mismo valor de $\log P$ que el albendazol pero con un punto de fusión 100 veces menor, su solubilidad calculada sería de 78.84 mM, lo que representaría una ganancia de 4 veces en esta propiedad. Asimismo, para una ganancia de 10 veces en la solubilidad, se tendría que contar con un derivado de $\log P = 2.0$ y p.f. de 100 °C.

5.2.4. Estabilidad de los derivados en soluciones amortiguadoras.

La determinación de este parámetro se realizó por espectrofotometría y por HPLC. Para el primer caso, se midió el porcentaje de desaparición del derivado biorreversible a temperatura ambiente (22°C); y para el segundo caso, se cuantificó la liberación del albendazol a 37 °C. En éste último, se contó con la preeminencia del método analítico desarrollado y validado por el grupo de la Dra. Helgi Jung, de la Facultad de Química, UNAM.

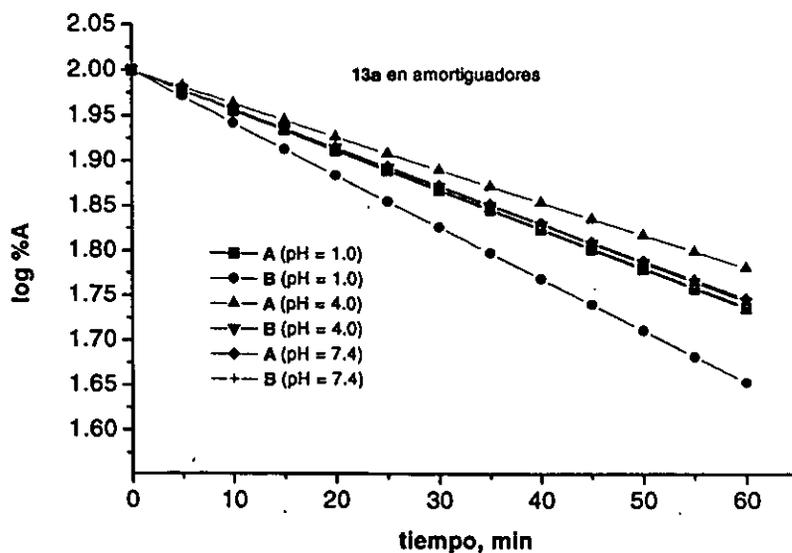
5.2.4.1. Evaluación de la estabilidad por espectrofotometría.

Una de las ventajas de utilizar el método espectrofotométrico, es su accesibilidad para evaluar varios compuestos en el menor tiempo posible, situación importante en el campo de la Química Farmacéutica, por la cantidad de compuestos sintetizados. Sin embargo, la desventaja para este caso, es la limitación de no poder determinar la liberación de albendazol, ya que dicho compuesto, por sus problemas de solubilidad, provoca intensa turbidez en las celdas utilizadas para tal fin. De hecho, cuando se utilizó esta técnica en los derivados, la cuantificación de la desaparición de los mismos, se detuvo en el momento en que la turbidez, por la presencia del albendazol, se hacía manifiesta. Para este estudio, se utilizaron dos variantes en la relación soluto/solución amortiguadora. La intención de esto fue conocer como influía, además del valor del pH, la cantidad de amortiguador en la estabilidad de los derivados. Los resultados obtenidos para los compuestos 10, 13a, 13b, y 25, se presentan en las gráficas siguientes:



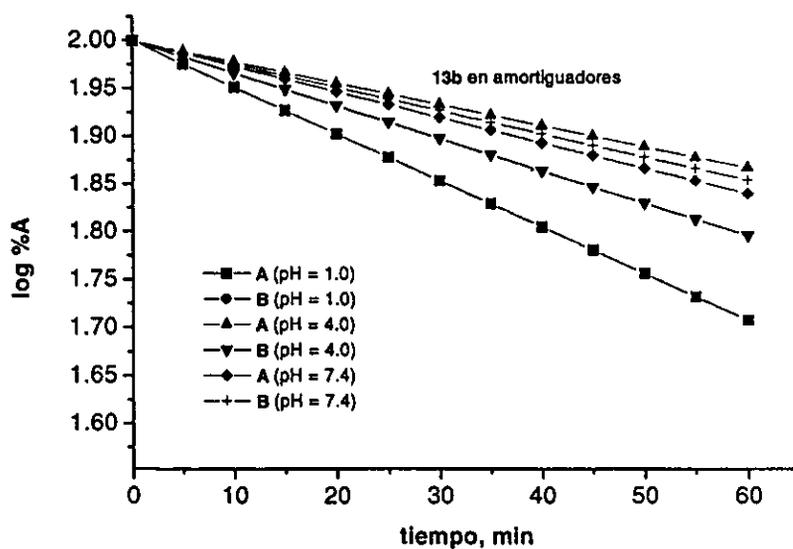
Esquema 40. Estabilidad de 10 en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0 y 7.4 (T = 22 °C)

A: derivado/solución amortiguadora 9:1; B: derivado/solución amortiguadora 1:9.



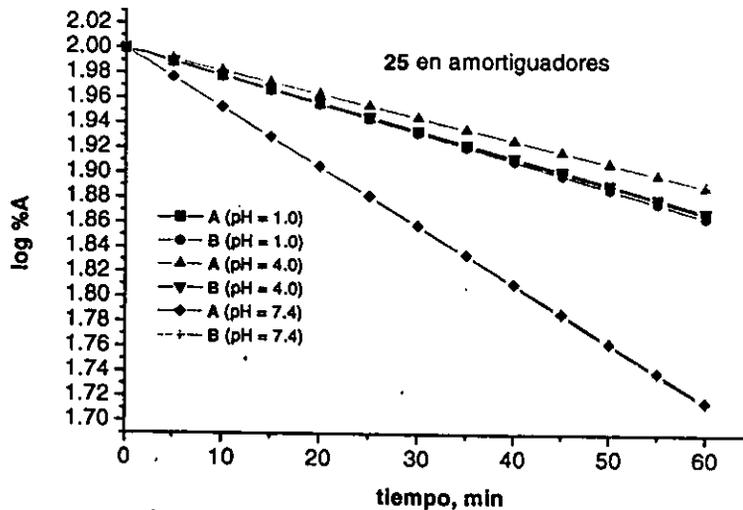
Esquema 41. Estabilidad de 13a en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0 y 7.4 (T = 22 °C)

A: derivado/solución amortiguadora 9:1; B: derivado/solución amortiguadora 1:9.



Esquema 42. Estabilidad de 13b en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0 y 7.4 (T = 22 °C)

A: derivado/solución amortiguadora 9:1; B: derivado/solución amortiguadora 1:9.



Esquema 43. Estabilidad de 25 en soluciones amortiguadoras de pH = 1.0, 4.0, 7.4 (T = 22 °C)

A: derivado/solución amortiguadora 9:1; B: derivado/solución amortiguadora 1:9.

Los resultados mostraron que los compuestos 13a, 13b y 25, presentaron una cinética de pseudo-primer orden al hidrolizarse y no se presentaron diferencias significativas al cambiar la cantidad de amortiguador; situación que constituye una ventaja para los mismos. Las cosas no fueron igual para 10, el cual al incrementar la cantidad de amortiguador de pH 4.0 y 7.4, presentó una mayor descomposición. Dado que en condiciones biológicas, la proporción de amortiguador siempre será mayor que la del compuesto administrado, se decidió no continuar con 10 para los siguientes estudios.

En todos los casos, después de ajustar por mínimos cuadrados, al graficar log % A versus tiempo, se determinó el valor de k_{obs} , como la constante de velocidad de la descomposición para una cinética de primer orden.^{123,124}

$$\log \% A = 2 - k_{obs} t$$

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se calculó de la siguiente ecuación $t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{obs}}$,

Tabla 43. Valores de k_{obs} para los derivados 10, 13a, 13b y 25 (T = 22 °C).

No.	k_{obs}, min^{-1}					
	pH = 1.0		pH = 4.0		pH = 7.4	
	A	B	A	B	A	B
10	0.00483	0.00532	0.00260	nd	0.00299	nd
13a	0.00439	0.00577	0.00364	0.00526	0.00321	0.00435
13b	0.00487	0.00486	0.00221	0.00340	0.00266	0.00242
25	0.00250	0.00265	0.00184	0.00217	0.00473	0.00476

nd: no determinado. A: derivado/solución amortiguadora 9:1; B: derivado/solución amortiguadora 1:9.

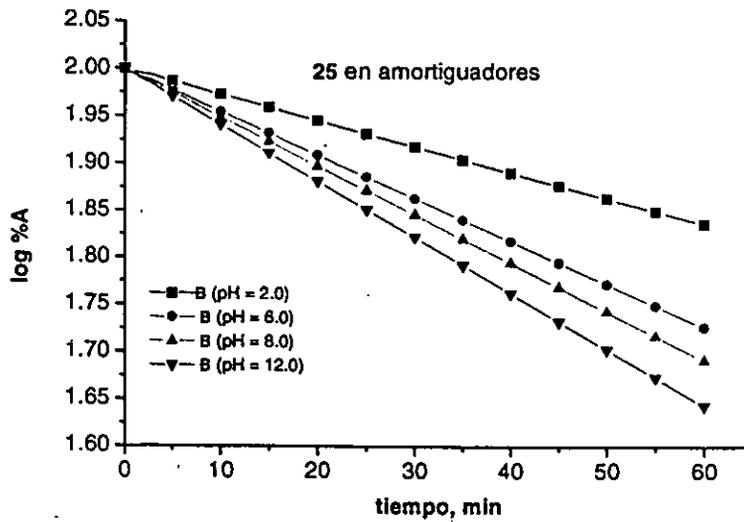
Tabla 44. Valores de $t_{1/2}$ para los derivados 10, 13a, 13b y 25 (T = 22 °C).

No.	$t_{1/2}, \text{min}$					
	pH = 1.0		pH = 4.0		pH = 7.4	
	A	B	A	B	A	B
10	143.47	130.26	266.53	nd	231.77	nd
13a	157.85	120.10	190.38	131.74	215.88	159.31
13b	142.29	142.59	313.57	203.82	260.52	286.36
25	288.75	261.50	376.63	319.35	146.51	145.58

nd: no determinado. A: derivado/solución amortiguadora 9:1; B: derivado/solución amortiguadora 1:9.

Los resultados presentados indicaron que la mayor estabilidad de los compuestos 13a, 13b y 25 se presentó a pH = 4.0. Esto concuerda con lo publicado para la estabilidad de compuestos esterificados.

Para dar una visión más completa de la estabilidad a diferentes valores de pH, se utilizó al compuesto 25, por ser el que presentó mayor solubilidad acuosa. Los resultados mostraron que efectivamente, la mayor estabilidad se presentó entre los pH = 3.5 a 4.5, y una mayor inestabilidad a valores de pH mayores de 6.0. Esto justifica el haber seleccionado al grupo amino como el responsable de la solubilidad acuosa, ya que como se ha publicado previamente, para ésteres del ácido 4-aminometilbenzoico, el valor de su pKa se encuentra entre 8.9-9.0. Con ello, al pH de mayor estabilidad, tendríamos una mayor proporción de la especie iónica del derivado 25, lo que sin duda podría influir en su absorción a nivel intestinal.



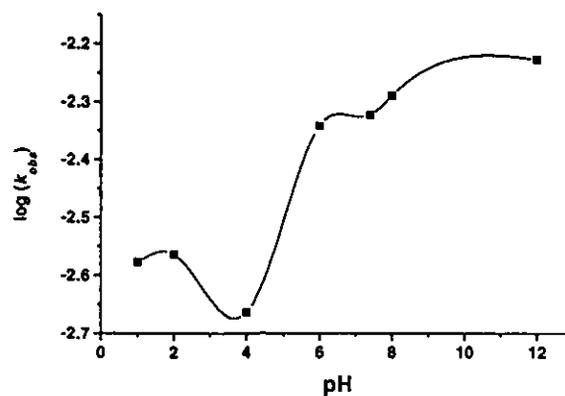
Esquema 44. Estabilidad de 25 en soluciones amortiguadoras de pH = 2.0, 6.0, 8.0 y 12.0 (T = 22 °C)

Después de ajustar los datos anteriores se procedió a calcular k_{obs} y $t_{1/2}$ como se realizó previamente. Los valores encontrados se presentan a continuación.

Tabla 45. K_{obs} y $t_{1/2}$ de 25 a diferentes valores de pH (T = 22 °C)

pH	$k_{obs}, \text{min}^{-1} \pm \text{DE}$	$\log K_{obs}$	$t_{1/2}, \text{min}$	pH	$k_{obs}, \text{min}^{-1} \pm \text{DE}$	$\log K_{obs}$	$t_{1/2}, \text{min}$
1.0	0.00265 ± 0.00027	-2.5767	261.50	7.4	0.00476 ± 0.00033	-2.3223	145.58
2.0	0.00273 ± 0.00025	-2.5638	253.84	8.0	0.00514 ± 0.00050	-2.2890	134.82
4.0	0.00217 ± 0.00042	-2.6635	319.35	12.0	0.00594 ± 0.00043	-2.2262	116.66
6.0	0.00456 ± 0.00046	-2.3410	151.97				

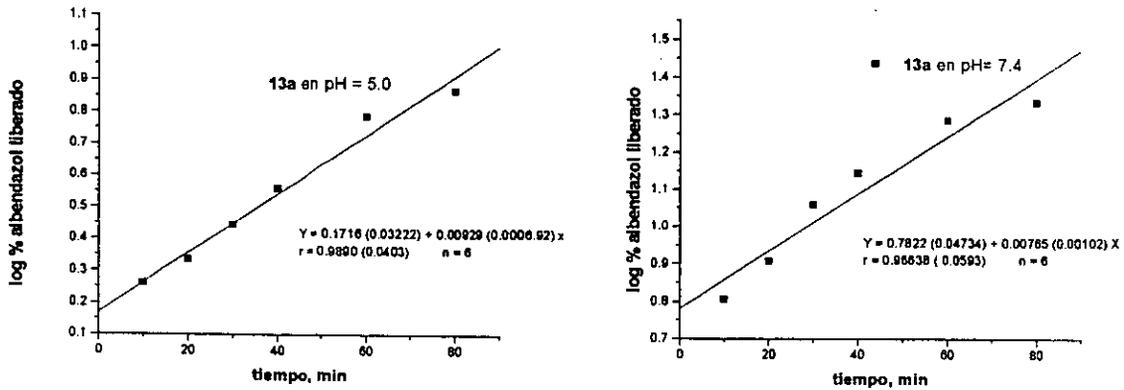
La relación que presenta la k_{obs} a diferentes valores de pH se presenta a continuación



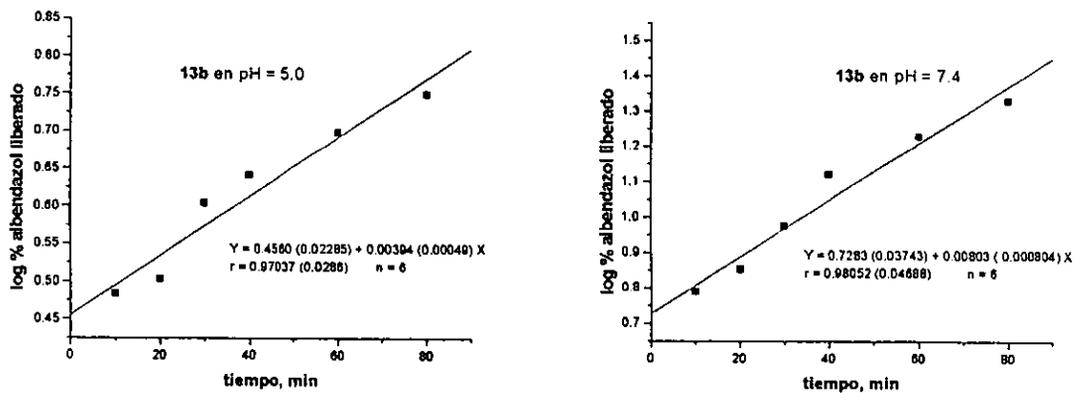
Esquema 45. Influencia del pH en los valores de K_{obs} para el compuesto 25.

5.2.4.2. Evaluación de la estabilidad por HPLC

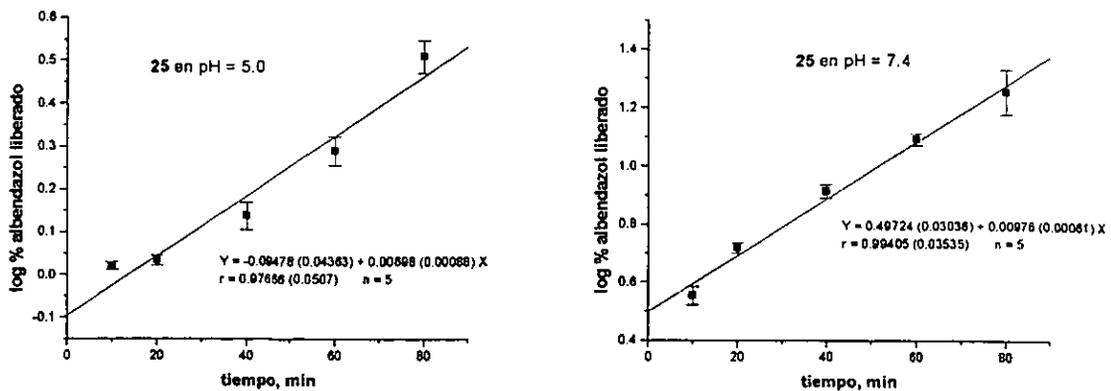
El estudio de estabilidad arrojó los siguientes resultados presentados gráficamente.



Esquema 46. Estabilidad de 13a en amortiguadores de pH = 5.0 y 7.4 (T = 37 °C).



Esquema 47. Estabilidad de 13b en amortiguadores de pH = 5.0 y 7.4 (T = 37 °C).



Esquema 48. Estabilidad de 25 en amortiguadores de pH = 5.0 y 7.4 (T = 37 °C).

Después de calcular el $t_{1/2}$ de las ecuaciones propuestas para cada derivado ($\log 50\% = 1.6989 = Y$) y posterior determinación de k_{obs} , para una cinética de primer orden, los valores encontrados se presentan a continuación.

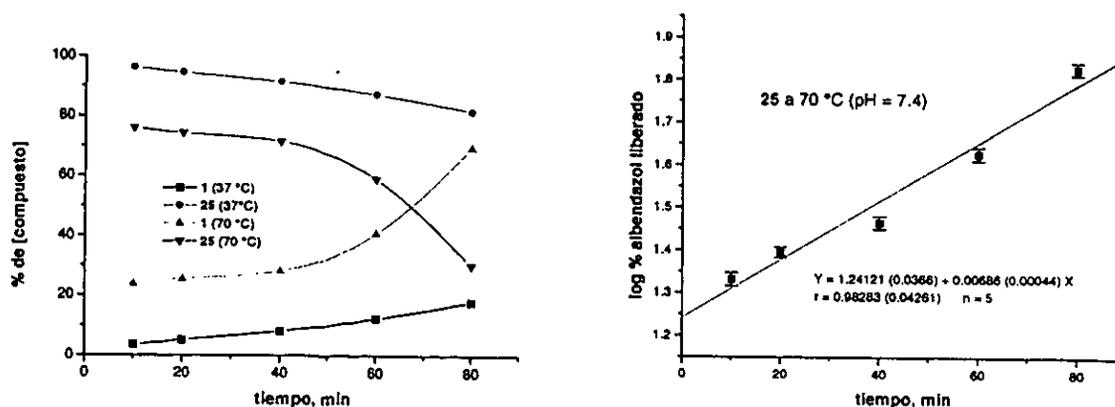
Tabla 46. Valores de k_{obs} , y $t_{1/2}$ para 13a, 13b y 25 ($T = 37\text{ °C}$).

No.	$k_{obs}, 10^{-3} \text{ min}^{-1}$		$t_{1/2}, \text{min}$	
	pH = 5.0	pH = 7.4	pH = 5.0	pH = 7.4
13a	4.2199	5.7831	164.22	119.83
13b	2.1967	5.7329	315.47	120.88
25	3.0154	5.6282	229.82	123.12

En la aplicación del HPLC, en las pruebas de estabilidad para los compuestos 13a, 13b y 25 a pH 5.0 y 7.4, la liberación de albendazol mostró una cinética de pseudo-primer orden. Los valores de k_{obs} y $t_{1/2}$ mostraron que la mayor estabilidad a 37 °C se presentó a pH de 5.0.

Con la intención de estudiar el cambio en la estabilidad de 25 a diferentes temperaturas, se evaluó el valor de k_{obs} para el albendazol liberado a 70 °C , en amortiguador de pH = 7.4, mediante HPLC. Las condiciones de trabajo (fase móvil, velocidad de flujo) fueron las mismas que para estudios anteriores.¹¹¹

En la gráfica siguiente se presenta el porcentaje de la concentración remanente de 25 frente al porcentaje de la concentración de albendazol, 1, que se ha formado, ambos en función del tiempo.



Esquema 49. Comportamiento de 25 en soluciones de pH = 7.4 a dos temperaturas diferentes

Para este caso el $t_{1/2}$ y k_{obs} presentaron el valor de 66.72 min y 0.01038 min^{-1} , respectivamente.

Aplicando la ecuación de Arrhenius para calcular la E_a , entonces tenemos:

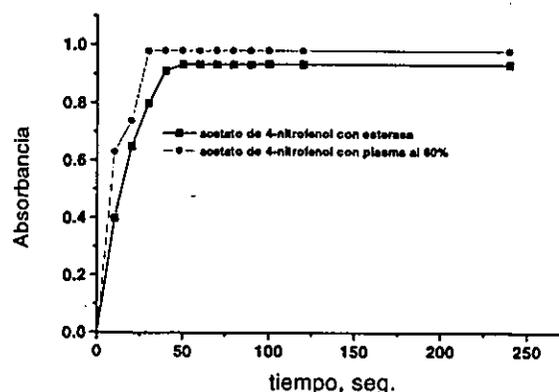
$$\log k_{obs\ 1} - \log k_{obs\ 2} = \frac{E_a}{2.303 R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

donde $k_{obs\ 1} = 5.6283 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ a 37°C (310 K); $k_{obs\ 2} = 0.01038 \text{ min}^{-1}$ a 70°C (343 K); $R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Despejando E_a y sustituyendo para los valores indicados, tenemos, $E_a = 1639.58 \text{ J mol}^{-1}$. Aplicando este valor de E_a para determinar el valor de k_{obs} y $t_{1/2}$ para una temperatura de 25°C se tiene: $k_{obs} = 4.3570 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 159.05 \text{ min}^{-1}$.

Después de aplicar la ecuación de Arrhenius, para calcular el valor de la energía de activación (E_a), se llegó a determinar la estabilidad a 25°C , el cual no resultó del todo satisfactoria, pues no rebasó el valor de los dos años de almacén, como se ha fijado para otros profármacos.⁶⁹ Sin embargo, el $t_{1/2}$ calculado 159 min (~2.5 h), si resulta práctico para la preparación de soluciones acuosas de **25** para administración inmediata en animales para posteriores estudios.

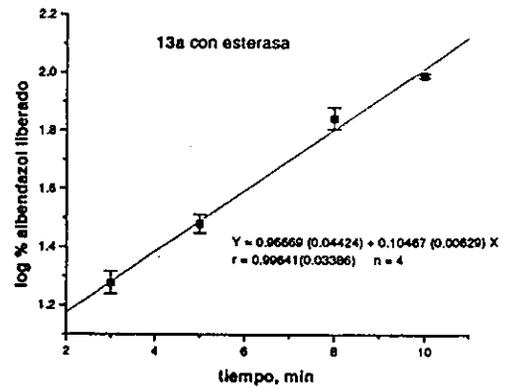
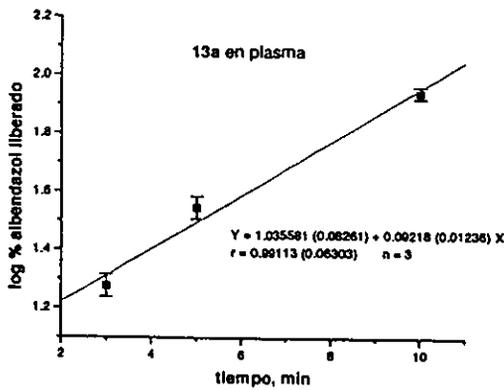
5.2.5. Liberación del albendazol de los derivados frente a material biológico.

Para este estudio se utilizaron dos especímenes biológicos, el plasma y enzima esterasa de hígado de cerdo. Los compuestos sometidos a esta evaluación fueron el **13a**, **13b** y **25**. La liberación del albendazol se cuantificó por HPLC. Antes de utilizar el plasma y la enzima, se les determinó la cantidad de proteínas totales, para referir su actividad a mg de las mismas, y su capacidad hidrolítica frente al acetato de 4-nitrofenol, con la intención de verificar la funcionalidad de las enzimas hidrolíticas. Los resultados sobre la actividad hidrolíticas del plasma y enzima, mostrados en la siguiente gráfica, indican que ambos materiales biológicos cumplieron con este requerimiento para ser utilizados posteriormente.



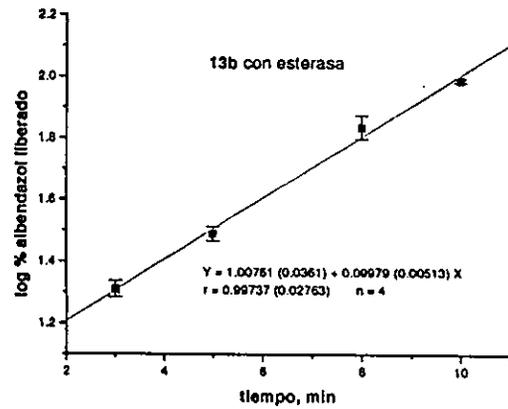
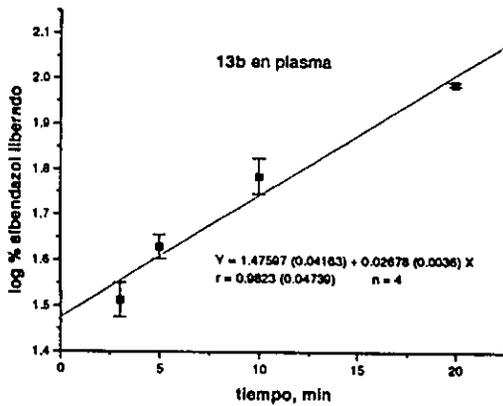
Esquema 50. Liberación de 4-nitrofenol del acetato de 4-nitrofenol por el material biológico.

Hidrólisis de 13a en material biológico. Concentración inicial de 13a : 180.9 µM



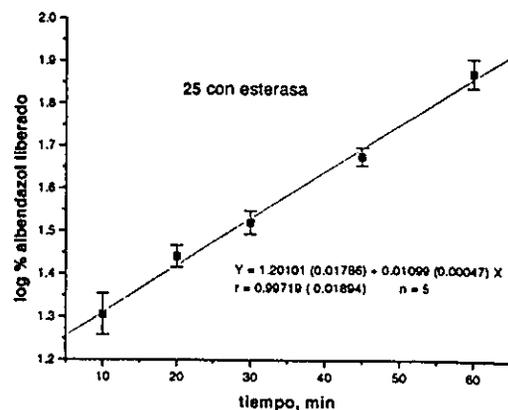
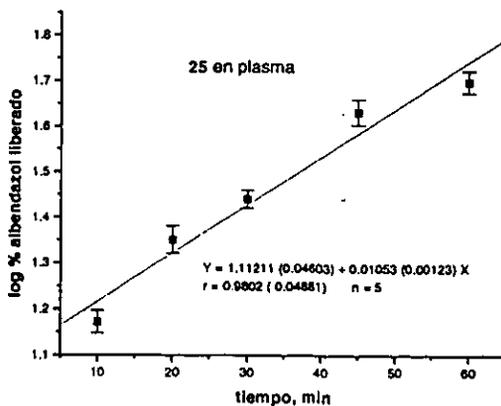
Esquema 51. Liberación del albendazol de 13a en presencia de plasma humano y esterasa de cerdo.

Hidrólisis de 13b en material biológico. Concentración inicial de 13b : 180.9 µM



Esquema 52. Liberación del albendazol de 13b en presencia de plasma humano y esterasa de cerdo.

Hidrólisis de 25 en material biológico. Solución inicial de 25: 181.8 µM



Esquema 53. Liberación del albendazol de 25 en presencia de plasma humano y esterasa de cerdo.

La liberación de albendazol, en todos los casos siguió una cinética de pseudo-primer orden. Después de calcular k_{obs} y $t_{1/2}$ se encontraron diferencias significativas entre la descomposición de los derivados en plasma y esterasa, en relación a la solución amortiguadora de pH = 7.4

Tabla 47. Valores de k_{obs} y $t_{1/2}$, para **13a**, **13b** y **25** en plasma, esterasa y solución amortiguadora (T = 37 °C)

No.	$k_{obs} \text{ min}^{-1}$			$t_{1/2}, \text{ min}$		
	plasma	esterasa	pH = 7.4	plasma	esterasa	pH = 7.4
13a	0.09633 ^a	0.09914 ^a	0.0057831 ^b	7.19 ^d	6.99 ^d	119.83 ^g
13b	0.08329 ^a	0.10014 ^a	0.0057329 ^b	8.32 ^d	6.92 ^d	120.88 ^g
25	0.01243 ^c	0.01529 ^c	0.0056282 ^b	55.73 ^o	45.31 ^f	123.128 ^g

Las columnas y renglones con la misma letra de exponente no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Cabe resaltar que **13a** y **13b** fueron los más sensibles a la presencia del material biológico, y prácticamente presentaron la misma estabilidad en solución amortiguadora, que **25**. Aunque este último mostró el mayor valor de $t_{1/2}$ en plasma y esterasa, hay que puntualizar que fue el compuesto más soluble en agua. Para la aplicación de estos derivados en estudios de comportamiento antiparasitario sistémico, quizá no sea un parámetro determinante la rapidéz con que un compuesto alcance el plasma, sino que mantenga por más tiempo, una concentración que pueda dañar al parásito en cuestión. Por esta razón **25**, no podrá ser descartado para estudios posteriores.

6. CONCLUSIONES

Después de diseñar y preparar profármacos para incrementar la solubilidad acuosa del albendazol, los resultados alcanzados en el presente trabajo indicaron que de las dos variantes del diseño aplicado, los bioprecusores y los derivados biorreversibles, sólo este último presentó los resultados que los ubican con mejores perspectivas para dicho cometido.

Para probar la primera hipótesis de trabajo, se prepararon dos isómeros de naturaleza no bencimidazólica, **2** y **3**. La síntesis de tales compuestos se llevó a cabo con rendimientos aceptables, aunque en la reacción final disminuyó, por problemas de purificación. Una de las primeras cosas a demostrar fue si **2** y **3** presentaban mayor solubilidad acuosa que el albendazol; los resultados mostraron que, en relación equimolecular, ambos presentaron casi el doble de solubilidad acuosa que el fármaco; característica atribuida a su naturaleza de tioureidos N,N'-disustituidos. El segundo punto, consistió en probar si estos compuestos podrían generar al principio activo. Por ello, tanto **2** como **3**, se hicieron reaccionar con ditionita, para provocar la reducción del grupo nitro a amino, y enseguida una ciclación intermolecular que diera lugar al albendazol. Con los resultados favorables, solo restaba comprobar que esta transformación se llevaba a cabo en condiciones biológicas. Con tal intención, **2** y **3** se administraron a ratas y ratones, detectandose la presencia del producto metabólico esperado, que comprobaba que la bioconversión se había llevado a cabo, aunque no con la eficiencia esperada. Estos experimentos demostraron que **2** y **3** cumplieron con los requisitos para ser considerados como bioprecusores del albendazol.

Uno de los cambios en el patrón de comportamiento biológico esperado, se presentó en los ratones, cuando en las muestras de plasma de **2**, se detectó la presencia de albendazol, **1**. Este fármaco generalmente no se encuentra como tal, sino como su metabolito oxidado (AbzSO). El resultado nos llevó a pensar que en esta biotransformación participaba la microflora del colon; y en este lugar, el albendazol generado, pasaba directamente al torrente sanguíneo, sin sufrir el metabolismo de primer paso. Estudios realizados con bacterias de la flora intestinal, mostraron que éstas lograban transformar **2** al principio activo en condiciones de semianaerobiosis. Lo que demostró que al menos buena parte de **2** administrado, se metabolizaba a nivel de colon.

Para estudiar el comportamiento de los bioprecusores frente algún parásito sensible al fármaco, se llevaron a cabo estudios con ratones infectados de *Trichinella spiralis*. Los resultados mostraron que ambos compuestos presentaron actividad equivalente al albendazol en la fecundidad de este helminto. Sin embargo, en la evaluación frente a la larva del parásito, los

resultados no fueron alentadores. Con la intención de evaluar la actividad intrínseca de los tioureidos frente a *T. spiralis*, se llevaron a cabo estudios *in vitro* con parásito en fase adulta y larvaria. Los resultados indicaron que los tioureidos por sí mismos, fueron activos contra el adulto pero no contra la larva. Por todo esto, podemos decir que los tioureidos N, N'-disustituidos no presentan una alternativa para ser utilizados como bioprecusores con mejores características de solubilidad que el principio activo. Aunque por los resultados *in vitro*, son atractivos para iniciar la búsqueda de análogos con mayor potencia antiparasitaria contra *T. spiralis* en fase adulta.

Antes iniciar la aplicación de la variante de derivados biorreversibles, primero se sometió a prueba la hipótesis que sostenía que al retirar un átomo de hidrógeno de la molécula del albendazol, se incrementaría su solubilidad acuosa. Por ello se prepararon los análogos monometilados **27**, **28** y **29**. Los resultados obtenidos probaron que dicha hipótesis resultó verdadera, ya que los tres análogos fueron más solubles en agua desionizada que el albendazol. Estos resultados dieron soporte al diseño y preparación de derivados, los cuales además de sustituir al átomo de hidrógeno del albendazol, presentarían la posibilidad de liberar a este principio activo en condiciones biológicas.

En el diseño de estos derivados biorreversibles se consideró a aquellos derivados con menor punto de fusión que el albendazol y a los derivados con modificador ionizable. Con excepción de **25**, la preparación de los derivados fue prácticamente en un solo paso; cumpliendo con ello la premisa de que la obtención de este tipo de compuestos no debe ser compleja y laboriosa, para tener perspectiva de llegar a sustituir al fármaco en cuestión. Aunque todos los compuestos sintetizados presentaron características aceptables de liposolubilidad, las pruebas de solubilidad en agua desionizada, mostraron que sólo 4 de ellos (**10**, **13a**, **13b** y **25**) resultaron ser atractivos para ser tomados en cuenta en estudios posteriores. De todos ellos, **25** presentó una solubilidad de ocho veces más que el albendazol. Los compuestos se evaluaron posteriormente en su estabilidad con solución amortiguadora. Los resultados indicaron que **10**, presentó inestabilidad significativa al incrementar la cantidad de amortiguador, por lo que no fue considerado para la última parte del estudio. Para **25** se llevaron a cabo estudios de estabilidad a diferentes valores de pH, mostrando la mayor estabilidad entre pH 4-5. Cuando se puso a **13a**, **13b** y **25** frente a material biológico (plasma y esterasa), los tres compuestos fueron más rápidamente hidrolizados en relación a su descomposición en amortiguador a pH 7.4. Estos resultados colocan a dichos derivados como profármacos potenciales del albendazol. En la descomposición frente a material biológico, **13a** y **13b** fueron los que más rápidamente liberaron

albendazol en relación a **25**; sin embargo, este último fue el más soluble de todo los derivados preparados. Dado que lo más importante en la aplicación de profármacos de albendazol, es la solubilidad y bioconversión, el compuesto **25** no se descarta para estudios posteriores. Al parecer la variante de los derivados biorreversible resultó ser la más adecuada para resolver el problema de la insolubilidad del albendazol. Por lo que esta línea sería la indicada a seguir cuando se inicien estudios con otros bencimidazoles que presentan el mismo problema de insolubilidad que el albendazol.

Una consideración adicional es la concerniente a los análogos **27** y **28**, los cuales pueden llegar a comportarse como derivados biorreversibles, si biológicamente sufren una reacción de N-desmetilación, por lo que no deben descartarse estudios en esta línea.

A manera de recomendación para los derivados biorreversibles obtenidos, será importante desarrollar métodos analíticos valorados para cuantificar la presencia de **13a**, **13b** o **25**, en muestras plasmáticas de animales, a los cuales se les han administrado dichos compuestos. Una vez logrado esto, iniciar estudios de comportamiento en animales infectados con algún parásito sensible al fármaco. Los resultados darían un perfil del comportamiento de estos profármacos para ser utilizados en el tratamiento de enfermedades parasitarias sistémicas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Wermuth, C.G. *The practice of Medicinal Chemistry*. Academic Press. Great Britain. 1996; 3-5,371.
2. Stevens, G. Medicinal Chemistry: A support or driving force in drug research?. *Progress Drug Research* 1990; 34: 343-358.
3. Korolkovas, A. Drug development. En *Essentials of Medicinal Chemistry*. John Wiley Sons. Segunda Edición. U.S.A. 1988; 97-118.
4. Theodorides, V.J.; Gyurik, R.J.; Kingbury, W.D.; Parish, R.C. Anthelmintic activity of albendazole against liver flukes, tapeworms, lung and gastrointestinal roundworms. *Experientia* 1976; 32 (6): 702-703.
5. Sharma, S. Design of new drugs for helminth disease: lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research* 1994; 25: 103-172.
6. Singh, S.K.; Sharma, S. Current status of medicinal research in helminth disease. *Medicinal Research Reviews* 1991; 11 (6): 581-615.
7. Sharma, S. Drugs for filariasis: four decades of research. *Advances in Drug Research* 1993; 24: 215-217.
8. Cruz, M.C.; Bartlett, M.S.; Edlind, T.D. In vitro susceptibility of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans* to anthelmintic benzimidazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 29: 579-583.
9. de Silva, N; Guyatt, H.; Bundy, D. Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs* 1997; 53(5): 769-788.
10. Jung, H.; Hurtado, M.; Sanchez, M.; Medina, M.T.; Sotelo, J. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *Journal Clinical Pharmacology* 1992; 32 (1): 28-31.
11. Frayha, G.J.; Smyth, J.G.; Savel J. The mechanism of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *General Pharmacology* 1997; 28(2): 273-299.
12. Bell, A.; Roberts, H.C.; Chappell, L. The antiparasite effects of cyclosporin A: Possible drug targets and clinical applications. *General Pharmacology* 1996; 27(6): 963-971.
13. Webe, G. Human cysticercosis: Parasitology, pathology, clinical manifestation and available treatment. *Pharmacology Therapy* 1994; 64: 175-200.
14. Flisser, H.; Willms, K. Lacleite, J.P. *Cysticercosis. Present states of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York 1992; 201-234.
15. Cook, G.C. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiasis: indications and efficacy. *Parasitology Today* 1990; 6 (4): 133-136.
16. Rosentein, E. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. Ed. PLM. México 1989; 1160.
17. Casado, N; Perez-Serrano, J.; Denegri, G.; Rodriguez-Cabeiro, F. Development of chemotherapeutic model for the in vitro screening of drugs against *Echinococcus granulosus* cyst: the effects of an albendazole-albendazole sulphoxide combination. *International Journal Parasitology* 1996; 26 (1): 59-65.
18. Pungpak, S.; Singhasivanon, V.; Bunnang, D.; Radomyos, B.; Nibaddhasopon, P.; Harinasuta, K.T. Albendazole as a treatment for *Giardia* infection. *Annals Tropical Medicine Parasitology* 1996; 90: 563-565.
19. Awadzi, K.; Hero, M.; Opoku, O.; Buttner, D.W.; Gilles, H.M. The chemotherapy of onchocerciasis. XV. Studies with albendazole. *Tropical Medicine Parasitology* 1991; 42(4): 356-360.
20. Jung, H.; Medina, L.; García, L.; Fuentes, I.; Esparza-Moreno, R. Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolites albendazole sulphoxide. *Journal Pharmaceutical Pharmacology* 1998; 50: 43-48.
21. Villaverde, C.; Alvarez, A.I.; del-Estal, J.L.; Prieto, J.G. Albendazole and mebendazole uptake by isolated enterocytes. *Development Pharmacology Therapy* 1992; 19 (1): 27-31.
22. Lifschitz, A.; Virkel, G.; Mastromarino, M.; Lanusse, C. Enhanced plasma availability of the metabolites of albendazole in fasted adult sheep. *Veterinary Research Communication* 1997; 23(3): 201-211.
23. Sanchez, S.F.; Alvarez, L.I.; Lanusse, C.E. Fasting-induced changes to the pharmacokinetic behaviour of albendazole and its metabolites in calves. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutic* 1997; 20 (1): 38-47.
24. Lange, H.; Eggers, R.; Birchers, J. Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1988; 34: 315-317.
25. Alvarez, L.I.; Saumuell, C.A.; Sanchez, S.F.; Lanusse, C.E. Plasma disposition kinetics of albendazole metabolites in pigs fed different diets. *Research Veterinary Science* 1996; 60 (2): 152-156.
26. Villaverde, C.; Alvarez, A.I.; Redondo, P.; Voces, J.; del-Estal, J.L.; Prieto, J.G. Small intestinal sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica* 1995; 25: 433-441.

27. Gottschall, D.W.; Theodorides, V.J.; Wang, R. The metabolism of benzimidazole anthelmintic. *Parasitology Today* 1990; 6 (4): 121-122.
28. Dominguez, L.; Fagiolino, P.; Gordon, S.; Manta, E. Bioavailability comparison between albendazole and albendazole sulphoxide in rats and man. *Farmaco* 1995; 50 (10): 697-702.
29. Hennessy, D.R.; Steel, J.W.; Lacey, E.; Eagleson, G.K.; Prichard, R.K. The disposition of albendazole in sheep. *Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics* 1989; 12: 421-429.
30. Lanusse, C.E.; Prichard, R.K. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology* 1993; 49 (2-4): 123-158.
31. Douch, P.G.C.; Buchanan, L.L.; Some properties of the sulphoxidases and sulphoxide reductases of the cestode *Montezia expansa* and nematode *Ascaris suum* and mouse liver. *Xenobiotica* 1979; 9: 675-679.
32. Jung, H.; Hurtado, M.; Tulio-Medina, M.; Sanchez, M.; Sotelo, J. Dexamethasone increases plasma levels of albendazole. *Journal of Neurology* 1990; 237: 279-280.
33. Jung, H.; Hurtado, M.; Sanchez, M.; Medina, M. T.; Sotelo, J. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *Journal Clinical Pharmacology* 1992; 32: 28-31.
34. Wen, H.; New, R.R.; Muhmut, M.; Wang, J.H.; Wang, Y.H.; Zhang, J.H.; Shao, Y.M.; Craig, P.S. Pharmacology and efficacy of liposome-entrapped albendazole in experimental secondary alveolar echinococcosis and effect of co-administration with cimetidine. *Parasitology* 1996; 113 (Pt 2): 111-121.
35. Lanusse, C.E.; Nare, B.; Prichard, R.K. Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole. *Xenobiotica* 1993; 23 (3): 285-295.
36. Sarciron, M.E.; Walchosfer, N.; Walbaum, S.; Arsc, C.; Descotes, J.; Petavy, A.F.; Paris, J. Increases in the effects of albendazole on *Echinococcus multilocularis* metacestodes by dipeptide methyl ester (Phe-Phe-OCH₃). *American Journal Tropical Medicinal Hygiene* 1997; 56 (2): 226-230.
37. Justel, A.; Alvarez, A.I.; Alonso, M.L.; del-Estal, J.L.; Villaverde, C.; Barrio, J.P.; Prieto, J.G. Influence of ethanol on gastric absorption and metabolism of albendazole and mebendazole. *Drug Alcohol Dependence* 1994; 36 (1): 49-55.
38. Delatour, P.; Benoit, E.; Besse, S.; Boukraa, A. Comparative enantioselectivity in the sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica* 1991, 21, 217-221.
39. Delatour, P.; Garnier, F.; Benoit, E.; Caudé, I. Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep, goats and cattle. *Research in Veterinary Science* 1991; 50: 134-138
40. Jimenez-Gonzalez, A.; De-Armas, S.C.; Criado-Fornelio, A.; Casado-Escribano, N.; Rodriguez-Caabeiro; Díez, J.C. Preliminary characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. *Veterinary Parasitology* 1991; 39 (1-2): 89-99.
41. Katiyar, S.K.; Gordon, V.R.; McLaughlin, G.L.; Edlind, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β -tubulin sequence. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1994; 39 (9): 2086-2090.
42. Lacey, E.; Watson, T.R. Structure-Activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, in vitro. *Biochemical Pharmacology* 1985; 34(7): 1073-1077.
43. Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* 1988; 15 (7): 886-927.
44. McCracken, R.O.; Stillwell, W.H. A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. *International Journal for Parasitology* 1991; 21 (1): 99-104
45. Hurtado, P. M. Farmacocinética clínica del albendazol. Tesis de Maestría en Biofarmacia. Facultad de Química, U.N.A.M. 1991: 4-52.
46. Escobedo, F. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Archives International Medicine* 1987; 147: 738-741.
47. Macedo, N.A.; Pineyro, M.I.; Carmona, C. Contact urticaria and contact dermatitis from albendazole. *Contact Dermatitis* 1991; 25 (1): 73-75.
48. Souhaili-El, A.H.; Fergentton, X.; Etienne, B.; Totis, M.; Batt, A.M. Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. *Toxicology Applied Pharmacology* 1988; 92: 141-149.
49. Whittaker, S.G.; Faustman, E.M. Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicology Applied Pharmacology* 1992; 113 (1): 144-151.
50. Cristofol, C.; Navarro, M.; Franquelo, C.; Valladares, J.E.; Carretero, A.; Rubente, J.; Arboix, M. Disposition of netobimin, albendazole, and its metabolites in the pregnant rat: Developmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1997; 144 (1): 56-61.
51. Kesterson, J.W. Preclinical drug discovery and development. En *Clinical Drug Trial and Tribulations*. Allen E. Cato Edit. Marcel Dekker Inc. New York; 1988, 34, 17-49.

52. Riley, Thomas N. The prodrug concept and new drug design and development. *Journal Chemical Education* **1988**; 65 (11): 947-953.
53. Sinkula, A.A.; Yalkowski, S.H. Rationale for design of biologically reversible drug derivatives: Prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1975**; 64: 183-205.
54. Bundgaard H. Design and application of prodrug. En *A textbook of Drug Design and Development*. Editado por Krogsgaard-Larsen P., Bundgaard H. Harwood Academic Publishers. Great Britain. **1991**, 173-191.
55. Kellway, I.W. The Influence of formulation on drug availability. En *Introduction to the Principles of Drug Design*. Editado por Smith J., Williams H. Wright. Psg. Great Britain. **1983**, 39-52
56. del-Estal, J.L.; Alvarez, A.I.; Villaverde, C.; Prieto, J.G. Comparative effects of anionic, natural bile acid surfactants and mixed micelles on the intestinal absorption of the anthelmintic albendazole. *International Journal of Pharmaceutics* **1993**; 91: 105-109.
57. Hrcckova, G.; Velebny, S.; Horak, J. A morphological study of the effects of lipomized albendazole on the muscle phase of *Trichinella spiralis* in mice. *Journal of Helminthology* **1993**; 67: 24-30.
58. Rodriguez, J.M.; Bories C.; Emery I.; Fessi, H.; Devissaguet J.P.; Liance, M.; Development of the injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *International Journal Parasitology* **1995**; 25 (12): 1437-1441.
59. Balant, L.P.; Doelker, E. Metabolic consideration in prodrug design. En *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Quinta edición. Editado por Manfred E. Wolff. John Wiley and Sons, Inc. USA. **1995**; 1: 949-982.
60. Austel V. The medicinal chemist's approach. En *Modern Drug Research. Path to better and safe drugs*. Editado por Connolly Martin. Medicinal Research Ser. Marcel Dekker, Inc. USA, **1989**; 12: 266-307.
61. Lien E.J. Improvement of therapeutic agents by molecular modification. En *SAR. Side effects and drug design*. Medicinal Research Ser. Marcel Dekker, Inc. USA. **1987**; 11: 25-38.
62. Macdonald, C.M., Turcan, G.R. Sites of drug metabolism, prodrug activation. En *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Editado por Hanch, Sammer, Taylor. Pergamon Press. Great Britain. **1990**; 5: 122-138.
63. Collis A. J. Drug access and prodrugs. En *Medicinal Chemistry. The role of organic chemistry in drug research*. Editado por Ganellin, C.R.; Roberts, S.M. Segunda edición. Academic Press. Great Britain. **1993**; 61-81.
64. Bodor, N. Design of biologically safer chemicals. *Chemtech* **1995**: 22-32.
65. Testa, B.; Caldwell, J. Prodrugs revisited: The "ad hoc" approach as a complement to ligand design. *Medicinal Research Reviews* **1996**; 16 (3): 233-241.
66. Wermuth C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. En *Drug Design. Fact or Fantasy*. Editado por Jolles G. Academic Press. U.S.A. **1984**: 47-72.
67. Hernández-Luis, F.; Castillo, R. Los Profármacos. Una alternativa en la investigación química farmacéutica. Parte 1. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **1993**; 24 (2): 25-30.
68. Bundgaard, H.; The double prodrug concept and its applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1989**; 3: 39-65.
69. Delatour, P.; Cure, M.C.; Benoit, E.; Garnier, F. Netobimin (totabin-SCH) preliminary investigation on metabolism and pharmacology. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutics* **1986**; 9:230-234.
70. Benchaoui, H.A.; Scott E.W.; McKellar, Q.A. Pharmacokinetics of albendazole, albendazole sulphoxide and netobimin in goats. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutics* **1993**; 16: 237-240.
71. Lanusse, C.E.; Gascon, L.H.; Prichard, R.K. Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutics* **1993**; 16: 38-47.
72. McKellar, Q.A.; Jackson, F.; Coop, R.L.; Baggot, J.D. Plasma profiles of albendazole metabolites after administration of netobimin and albendazole in sheep: effects of parasitism and age. *British Veterinary Journal* **1993**; 149: 101-113.
73. Lanusse, C.E.; Trudeau, C.; Ranjan, U.S.; Prichard, R.K. Pharmacokinetic profiles of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulation of netobimin to cattle. *Journal Veterinary Pharmacological Therapeutics* **1991**; 14: 101-106.
74. Dawson, M.; Watson, T.R. 4-Amino-3-(3'-methoxycarbonyl-2'-thioureido)benzophenone a prodrug of mebendazole. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **1983**; 8 (4): 329-334.
75. Welchshofer, N.; Delabre-Defayolle, I.; Paris, J.; Petavy, A.F. In vivo morphological damage induced by a new benzimidazole prodrug in *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1990**; 79 (7): 606-608.

76. Nielsen, L.S. Improved peroral bioavailability of mebendazole in rabbits by administration of various N-alkoxycarbonyl derivatives of mebendazole. *International Journal of Pharmaceutics* **1994**; *104*: 175-179.
77. Bozler, G.; Schmid, J.; Principles of pharmacokinetics and drug metabolism. En *Modern Drug Research. Path to better and safe drugs*. Editado por Connolly Martin. Medicinal Research Ser. Marcel Dekker, Inc. USA, **1989**; *12*: 77-79.
78. Hillgren, K.M.; Kato, A.; Borchardt, R.T. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews* **1995**; *15*(2): 83-109.
79. Dennis, M.J. Absorption processes. En *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Editado por Hanch, Sammer, Taylor. Pergamon Press. Great Britain. **1990**; *5*: 2-35.
80. Yalkowsky, S.H.; Morozowich, W.; A physical chemical basis for the design of orally active prodrugs. En *Drug Design*. Academic Press. Netherlands. **1980**; *IX*: 122-183.
81. Leo, A.J. Methods of calculating partition coefficients. En *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Editado por Hanch, Sammer, Taylor. Pergamon Press. Great Britain. **1990**; *5*: 295-317.
82. Bodor, N.; Huang, M.J. An extended version of a novel method for the estimation of partition coefficient. *Journal Pharmaceutical Sciences* **1992**; *81*: 273-281.
83. Leo, A.J. Calculating log P_{oct} from structures. *Chemical Reviews* **1993**; *93* (4): 1281-1305.
84. Takacs-Novak, K.; Miklos, J.; Szasz, G.; Lipophilicity of amphoteric molecules expressed by true partition coefficient. *International Journal of Pharmaceutics* **1995**; *113*: 47-55.
85. Torrado, S.; Cadorniga, R.; Torrado, J.J. Formulation parameters of albendazole solution. *International Journal Pharmaceutics* **1996**; *140* (1): 45-50.
86. Torrado, S.; López, M.L.; Torrado, G.; Bolas, F.; Cadorniga, R. A novel formulation of albendazole solution-oral bioavailability and efficacy evaluation. *International Journal Pharmaceutics* **1997**; *156* (2): 181-187.
87. Yalkowsky S.H.; Banerjee S. *Aqueous Solubility. Methods of Estimation for Organic Compounds*. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. **1992**; 2-12, 41-47.
88. Wells, J.I. Solubility. En *Pharmaceutical preformulation: The physicochemical properties of drug substances*. John Wiley and Sons. Great Britain. **1988**; 21-85
89. Amidon G.L. Drug derivatization as a means of solubilization: Physicochemical and biochemical strategies. En *Techniques of Solubilization of Drugs*. Editado por Yalkowsky S. H. Drugs and Pharmaceutical Sciences. Marcel Dekker Inc. USA. **1981**; *12*: 183-211.
90. Mertin, L.A.; Pandha, H.S.; Sikora, K. Genetic prodrug activation therapy: a novel treatment for cancer. *Drugs of the Future* **1998**; *23* (3): 279-298.
91. Gyurik, R.J.; Brandywine, W.; Vasillios, J.T.; Chester, W. Methyl 5-propylthio-2-benzimidazolecarbamate. U.S. patent 3 915 986, 1975; *Chem. Abstr.* **1975**; *84*: 31074r.
92. Takamizawa, A.; Hirai, K.; Matsui, K. Studies of the pyrimidine derivatives. XXV. The reaction of alkoxycarbonylthiocyanates and related compounds with the sodium salt of thiamine. *Bulletin Chemical Society Japan* **1963**; *36*: 1214-1220.
93. Lewellyn, M.E.; Wang, S.S.; Strydom, P.T. Preparation of ethoxycarbonyl isothiocyanate using pyridine or quinoline catalyst. *Journal Organic Chemistry* **1990**; *55*: 5230-5231.
94. Walter, T.J.; Balton-Rouge, La. Process for the preparation of 2-benzimidazole carbamates. U.S. patent 4 152 522, 1979; *Chem. Abstr.* **1979**; *91*: 57014r.
95. Viswanathan, N.; Sidhaye, A.R. 1-Alkoxycarbonylbenzimidazole-2-carbamates. *Indian Journal of Chemistry* **1985**; *24B*: 948-951.
96. Giral, F. Productos químicos y farmacéuticos. Edit. Atlante S.A., México. Vol. 2. **1956**, pp. 765-766.
97. Cheronis, N.D.; Enrikin, J.B. Identification of Organic Compounds. Interscience Pub. USA. **1967**, p. 415.
98. Nielsen, L.S.; Bundgaard, H.; Falch, E. Prodrugs of thiabendazole with increased water-solubility. *Acta Pharmaceutica Nordica* **1992**; *4*(1): 43-49.
99. Svahn, C.M.; Merenyi, F.; Karlson, L.; Widlung, L.; Gralls, M. Tranexamic acid derivatives with enhanced absorption. *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**; *29*: 448-453.
100. Binderup, E.; Hansen, E.T.; Chlorosulfates as reagents in the synthesis of carboxylic acid esters under phase-transfer conditions. *Synthetic Communications* **1984**; *14* (9): 857-864.
101. Orea-Esparza, E.P. Estudio sobre la síntesis del 1-metilalbendazol. Tesis de la Universidad Femenina de México. **1994**.
102. Buckinghamman, J. *Dictionary of Organic Compounds*. 5th Ed. Chapman and Hall. New York, USA. **1982**; 4 ,pp 4221-4222

103. James Wells. *Pharmaceutical Preformulation. The Physicochemical properties of drug substances*. John Wiley and Sons. Great Britain. **1988**; pp 21-25.
104. Peter Taylor. Hydrophobic properties of drugs. En *Comprehensive Medicinal Chemistry*. edit Hansch, Sammer, Taylor. Pergamon Press. Great Britain. **1990**; 5: p.p. 268-269
105. L. Kedderis, L.S. Argenbright, G.T. Miwa. Mechanism of reductive activation of a 5-nitroimidazole by flavoproteins: model studies with dithionite. *Archives Biochemistry and Biophysics* **1988**; 262: 40.
106. Purcell, W.P. Experimental determination of partition coefficient. en *Strategy of Drug Design Guide to Biological Activity*. Apéndice I. John Wiley Sons. New York, USA. **1973**; 126-142
107. Hansch Corwin, Leo Albert, Hoekman D. Exploring QSAR. Hydrophobic, electronic and steric constants. ACS Professional Reference Book. ACS. USA **1995**.
108. Ezumi, K. et al Simultaneous determination of acid dissociation constants and true partition coefficient by analysis the apparent partition coefficient. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **1990**; 28: 85-91.
109. Stefan, H.; Unger, J. R.; Cook, J. S.; Hollenberg H.B. Simple procedure for determining octanol-aqueous partition, distribution, and ionization coefficient by reverse-phase high- pressure liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1978**; 67 (10): 1364-1367.
110. McCall, J.M. Liquid-liquid coefficients by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Medicinal Chemistry* **1975**; 18 (6): 549-552.
111. Hurtado, M.; Sanchez, M.; Jung, H.; Medina, M.T.; Sotelo, J. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for albendazole and its main metabolite albendazole sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid. *Journal Chromatography* **1989**; 494: 403-407.
112. Atlas, R.M.; Parks, L.C.; Handbook of Microbiological Media. Segunda edición. CRC Press. USA. **1997**; pp. 18-19.
113. Pozio, E.; La Rosa, G.; Murell, D.; Lichtenfels, J.R.; Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology* **1992**; 78: 654-659.
114. McCracken, R.O.; Nierste, D.M.; Moss, J.; García, A. Oxfendazole: regimen-dependent expression of drug efficacy against *Trichinella spiralis*. *International Journal of Parasitology* **1984**; 14: 277-281.
115. McCracken, R.O. Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Journal of Parasitology* **1978**; 64(2): 214-219.
116. López-García, M.L.; Torrado-Durán, S.; Martínez-Fernández, R.A.; Bolás-Fernández, F. Albendazole versus ricobendazole (albendazole sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. *International of Journal Parasitology* **1997**; 27(7): 781-785.
117. Stewart, G.L.; Kramar, G.W.; Reddington, J.J.; Hamilton, A.M. Studies on in vitro larvavosition by adult of *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology* **1980**; 66: 84-89.
118. Dutka, B.J.; Bitton, G. Toxicity test using microorganism. Vol. I, CRC Press. USA. **1986**, pp. 32-34
119. Cedillo-Rivera, R.; Ramírez, A.; Muñoz, O.A. Rapid colorimetric assay with tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* **1992**; 23: 59-61.
120. Perrin, D.D.; Dempsey, B. Buffer for pH and metal ion control. Chapman and Hall Ltd. Great Britain. **1974**, pp. 129-153.
121. Beall, H.D.; Getz, J.J.; Sloan, K.B. The estimation of relative water solubility for prodrugs that are unstable in water. *International Journal of Pharmaceutics* **1993**; 93: 37-43.
122. Bundgaard, H.; Nielsen, N.M.; Buur, A. Aspirin prodrugs: synthesis and hydrolysis of 2-acetoxybenzoate ester of various N-(hydroxyalkyl)amides. *International Journal of Pharmaceutics* **1988**; 44: 151-158.
123. Beall, H.D.; Prankerd, R.J.; Sloan, K.B. 1-Alkylcarbonyl-5-fluorouracil prodrugs: synthesis, thermal and hydrolytic stability. *Drug Development Industrial Pharmacy* **1996**; 22(2): 85-90.
124. Yoshimura, Y; Tada, N.; Kubo, K.; Miyamoto, M.; Inada, Y.; Nishikawa, K.; Naka, T. Evaluation and improvement of bioavailability of a new angiotensin II receptor antagonist, 2-buthyl-1-[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid by making prodrug. *International Journal of Pharmaceutics* **1994**; 103; 1-7.
125. Heymann E.; Mentlen R. Carboxylesterasas-Amidasas. en *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. USA. **1981**, 77, pp 333-335.
126. Takamizawa, A.; Hirai, K.; Matsui, K. Studies of the pyrimidine derivatives. XXV. The reaction of alkoxy-carbonylthiocyanates and related compounds with sodium salt of thiamine. *Chemical Pharmaceutica Bulletin* **1963**; 36: 1214-1220.
127. Nakamishi K. Infrared absorption spectroscopy. Quinta edición. Holden-Day, Inc. Japón. **1969**. p.54

128. Garrido-Hernández, H. Síntesis de bioprecusores potenciales del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-carbamato de metilo. Tesis para licenciatura de la Facultad de Química, UNAM. México. 1997.
129. Maximiliano-López A. Síntesis de bioprecusores potenciales del fenbendazol y oxfendazol. Tesis para licenciatura de la Facultad de Química, UNAM. México. 1997
130. Tocher J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *General Pharmacology* 1997; 28: 485-487.
131. Wilding, I.R.; Davis, S.S.; O'Hagan, D.T. Targeting of drugs and vaccines to the gut. *Pharmacological Therapeutics* 1994; 62: 103-107.
132. Knox, R.J.; Friedlos, F.; Jarman, M.; Davies, L.C.; Godard, P.; Anlezark, G.M.; Melton, R.G.; Sherwood, R.F. Virtual cofactors for an *Escherichia coli* nitroreductase enzyme: relevance to reductively activated prodrugs in antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochemical Pharmacology* 1995; 49 (11): 1641-1647.
133. Mucklow J.C. Environmental factors affecting drug metabolism. *Pharmacological Therapeutics* 1988; 36: 105-117.
134. Nielsen L.S.; Improved peroral bioavailability of mebendazole in rabbits by administration of various N-alkoxycarbonyl derivatives of mebendazole. *International Journal of Pharmaceutics* 1994; 104: 175-179.
135. Bundgaard, H.; Falch, E.; Jensen, E. A novel solution-stable, water-soluble prodrug type for drugs containing hydroxyl or an NH-acidic group. *Journal of Medicinal Chemistry* 1989; 32 (12): 2503-2506
136. Hetherington, L.H.; Livingstone, D.R.; Walker, C.H. Two- and One-electron dependent in vitro reductive metabolism of nitroaromatics by *Mytilus edulis*, *Carcinus maenas*, and *Asterias rubens*. *Comparative Biochemical Physiology* 1996; 113C (2): 231-239.
137. Toth, I.; Hillery, A.M.; Wood, I.P.; Magnusson, Ch.; Artursson, P. Oral absorption of lipidic amino acid conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* 1994; 102: 223-230.
138. Bai, J.P.; Hu, M.; Subramanian, P.; Mosberg, H.I.; Gordon, L. Utilization of peptide carrier system to improve intestinal absorption: targeting prolidase as a prodrug-converting enzyme. *Journal Pharmaceutical Science* 1992; 81 (2): 113-116.
139. Jensen, E.; Bundgaard, H.; Falch, E. Design of a water-soluble, solution-stable and biolabile prodrug of metronidazole for parenteral administration: N-substituted aminomethylbenzoate ester. *International Journal of Pharmaceutics* 1990; 58: 143-153.
140. Sinkula, A.A.; Yalkowsky, S.H. Rationale for design of biologically reversible drug derivatives: prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1975; 64(2): 181-210.
141. Budavari S. The Merck Index, 12 edición. Merck and Co., Inc: USA. 1996, 717.
142. Ferres, H. Prodrugs of β -lactam antibiotics. *Chemistry and Industry*. 1980; 435-440
143. Haddadin, M.J.; Jarrar, A.A. Conformation of 1,3-diacil and 1,3-diaroylbenzimidazolones. *Tetrahedron Letters* 1971; (20): 1651-1652.
144. Ibrahim, M.R.; Jarrar A.A.; Sabri, S.S. Conformations of monoacyl and 1,3-diacylbenzimidazoline-2-thiones and dihydrobenzimidazoles. *Journal Heterocycles Chemistry* 1975; 12: 11-13.
145. Seela, F.; Bourgeois, W.; Rosemeyer, H.; Wenzel, T. Synthesis of 4-substituted 1H-benzimidazole 2'-deoxyribonucleosides and utility of the 4-nitro compounds as universal bases. *Helvetica Chimica Acta* 1996; 79: 488-498.
146. Haslam, E. Recent developments in methods for the esterification and protection of the carboxyl group. *Tetrahedron* 1980 36: 2415

APENDICE

A. Preparación de las soluciones amortiguadoras con fuerza iónica de 0.5.

Amortiguador de HCl, KCl. Para la preparación de las soluciones amortiguadoras de HCl, KCl, se partió de las soluciones patrones de HCl 0.2 M y KCl 0.2M (1.49 g de KCl en 100 mL de agua destilada).

Para la preparación de las siguientes soluciones amortiguadoras:

- i) 100 mL a pH 1.0 con una concentración de 0.18
- ii) 100 mL a pH 2.0 con una concentración de 0.11

se procedió con las siguientes combinaciones y diluciones:

pH	HCl	KCl	aforo
1.0	67.0 mL	25.0 mL	100 mL
2.0	6.5 mL	50.0 mL	100 mL

Amortiguador de citratos. Para la preparación de las soluciones amortiguadoras de citratos, se partió de las soluciones patrones de ácido cítrico 0.1 M (21.01 g de $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ en 1 L de agua destilada) y citrato de sodio 0.1 M (29.41 g de $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ en 1 L de agua destilada).

Para la preparación de las siguientes soluciones amortiguadoras:

- i) 100 mL a pH 3.0 con una concentración de 0.05 y fuerza iónica de 0.5
- ii) 100 mL a pH 4.0 con una concentración de 0.05 y fuerza iónica de 0.5
- iii) 100 mL a pH 5.0 con una concentración de 0.05 y fuerza iónica de 0.5

se procedió con las siguientes combinaciones y diluciones:

pH	ácido cítrico	citrato de sodio	aforo	KCl agregados
3.0	46.5 mL	3.5 mL	100 mL	3.22 g
4.0	33.0 mL	17.0 mL	100 mL	2.72 g
5.0	20.5 mL	29.5 mL	100 mL	2.25 g

Amortiguador de fosfatos. Para la preparación de las soluciones amortiguadoras de fosfatos se partió de las soluciones patrones de Na_2HPO_4 0.2 M (28.39 g de Na_2HPO_4 en 1 L de agua destilada) y NaH_2PO_4 0.2 M (27.60 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ en 1 L de agua destilada). Las soluciones se conservaron en refrigeración y protegidas de la luz.

Para la preparación de las siguientes soluciones amortiguadoras:

- i) 100 mL a pH 6.0, 7.0, y 8.0 con concentración 0.05 y fuerza iónica de 0.5; y
- ii) 500 mL a pH 7.4 con una concentración de 0.02

se procedió con las siguientes combinaciones y diluciones:

pH	Na ₂ HPO ₄ (0.2 M)	NaH ₂ PO ₄ (0.2 M)	aforo	dilución	KCl agregados
6.0	6.10 mL	43.90 mL	100 mL	50/ 100 mL	3.26 g
7.0	30.50 mL	19.50 mL	100 mL	50/ 100 mL	2.85 g
7.4	40.50 mL	9.50 mL	500 mL	-----	-----
8.0	47.35 mL	2.65 mL	100 mL	50/ 100 mL	2.64 g

Conservar en refrigeración los amortiguadores preparados.

Amortiguador de Na₂CO₃, NaHCO₃. Para la preparación de estas soluciones amortiguadoras se partió de las soluciones patrones de Na₂CO₃ 0.1 M (10.62 g de Na₂CO₃ en 1 L de agua destilada) y de NaHCO₃ 0.1 M (8.40 g en 1 L de agua destilada).

Para la preparación de las siguientes soluciones amortiguadoras:

i) 100 mL a pH 9.0 con una concentración de 0.05 y fuerza iónica de 0.5, y

ii) 100 mL a pH 10.0 con una concentración de 0.05 y fuerza iónica de 0.5

se procedió con las siguientes combinaciones y diluciones:

pH	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃	aforo	KCl agregados
9.0	5 mL	45 mL	100 mL	3.28 g
10.0	30 mL	20 mL	100 mL	2.90 g

Conservar en refrigeración los amortiguadores preparados.

Amortiguador de NaOH, Na₂HPO₄. Para la preparación de los amortiguadores se partió de las soluciones patrones de Na₂HPO₄ 0.1 M (14.20 g de Na₂HPO₄ en 1 L de agua destilada) y NaOH 0.1 M (4 g de NaOH en 1 L de agua destilada).

Para la preparación de las siguientes soluciones amortiguadoras:

i) 100 mL de amortiguador a pH 11.0 con una fuerza iónica de 0.5; y

ii) 100 mL de amortiguador a pH 12.0 con una fuerza iónica de 0.5

se procedió con las siguientes combinaciones y diluciones:

pH	Na ₂ HPO ₄	NaOH	aforo	KCl agregados
11.0	50 mL	4.1 mL	100 mL	2.54 g
12.0	25 mL	26.9 mL	100 mL	2.96 g

La fuerza iónica (μ), en todos los casos, se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot [X_1^-] (z^2) + [M_1^+] (z^2) + \dots + [X_n^-] (z^2) + [M_n^+] (z^2) \quad \text{donde } [] \text{ es la concentración molar de la}$$

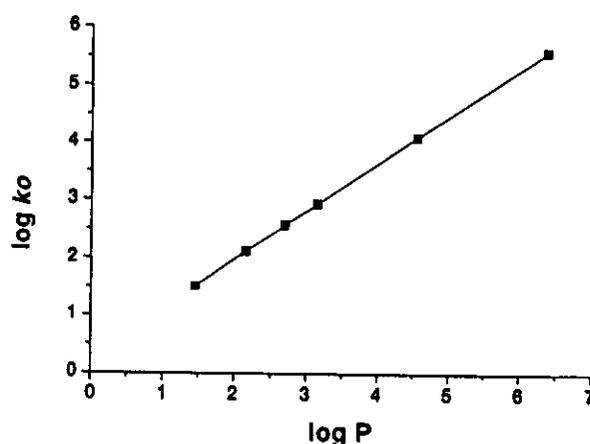
especie iónica y (z) es el valor de su carga eléctrica.

Los valores de pH fueron verificados con el potenciómetro debidamente ajustado con soluciones amortiguadoras estándar pH = 4.0, pH = 7.0, pH = 10 (Aldrich).

B. Datos para la determinación experimental del coeficiente de partición (log P) por HPLC.

Referencia	log P	log $k_o \pm DE$
benzaldehído	1.45	1.51 \pm 0.073
benceno	2.15	2.12 \pm 0.045
tolueno	2.69	2.57 \pm 0.096
xileno	3.14	2.93 \pm 0.069
antraceno	4.55	4.10 \pm 0.095
DDT	6.38	5.60 \pm 0.089

DE: desviación estandar



$$\log k_o = m(\log P) + b; \quad m = 0.83, \quad b = 0.3426$$

C. Medio de cultivo mínimo y procedimiento para el cultivo de microorganismos (medio A 5X)

Ingredientes	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
K ₂ HPO ₄	52.5 g
KH ₂ PO ₄	22.5 g
Citrato de sodio 2H ₂ O	2.5 g
Fuente de carbono	10.0 mL
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.0 mL
Agua hervida c.b.p.	1.0 L

1. En un matraz erlenmeyer de 1500 mL, con agitador magnético y 600 mL de agua, se agregaron el sulfato de amonio, el fosfato de potasio dibásico y monobásico y el citrato de sodio. Se agitó a temperatura ambiente.

2. En un vaso de precipitados de 250 mL con 100 mL de agua, se disolvieron 20 g de glucosa. De esta solución, (fuente de carbono), se tomaron 10.0 mL y se agregaron a la solución anterior.
3. En un vaso de 250 mL con 100 mL de agua, se disolvieron 24.5 g de sulfato de magnesio. Posteriormente, se tomaron 1.0 mL y se agregó a la solución del paso 1.
4. Después de agregar todos los ingredientes, se registró el valor de pH, el cual fue de 7.2. En caso contrario, se ajustó a este valor con solución acuosa de NaOH. Una vez realizado esto, se añadió la cantidad suficiente de agua para tener 1 L de medio de cultivo.
5. En matraces de 125 mL se colocaron 100 mL del medio para esterilizarlos en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Inoculación de microorganismos y adición de los bioprecursores.

6. En condiciones asépticas, a los matraces que contenían medio de cultivo esterilizados, se les adicionaron inóculos de una cepa bacteriana diferente en cada matraz.. Se taparon los matraces con una torunda de algodón-gasa, y se colocaron en un agitador mecánico, dentro de un cuarto con temperatura controlada a 37°C, durante 24 h. Del mismo modo se sembraron las cepas de bacterias en medios de cultivo sólido, e incubaron bajo las mismas condiciones, para ser utilizadas en estudios posteriores.
7. Transcurrido el tiempo, se colocaron 0.5 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo, que contenían 1 mL de agua destilada. Se procedió a registrar la absorbancia de estas soluciones a 540 nm. Se utilizó medio de cultivo como blanco.
8. En un matraz erlenmeyer de 1000 mL, se colocaron 600 mL de medio de cultivo al cual se le pasó una corriente de nitrógeno durante 10 min. Enseguida se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 20 min. En condiciones asépticas, se colocaron 6.5 mL de medio de cultivo previamente esterilizado en tubos de ensayo de 13 x 100.
9. Se procedió a esterilizar soluciones de bioprecursores y albendazol por filtración en Millipore. Se tomaron 130 µL de cada solución y se agregaron a los tubos de ensayo anteriores. La distribución se realizó de tal manera que se tuviesen muestras por triplicado para cada microorganismo.
10. Una vez que se distribuyeron los compuestos a evaluar, se agregaron, en condiciones asépticas, 100 µL de medio de cultivo obtenido en el paso 6.
11. Se taparon los tubos de ensayo y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo se evaluó la viabilidad de los microorganismos como se realizó en el paso 7. Se procedió a centrifugar a 6000 rpm durante 10 min para separar el paquete celular.
12. Se tomaron 2 mL del sobrenadante y se procedió a determinar la presencia del albendazol y/o bioprecursores por HPLC.¹¹¹

D. Datos para la elaboración de la curva estándar de los bioprecursores

Bioprecursor 2

Longitud de onda de lectura: 375 nm

Solución patrón 0.1 mg/mL etanol (303 μM)

2, μM	2, 10 ⁻² mg/mL	Abs.*
24.31	0.8	0.185
27.35	0.9	0.210
30.39	1.0	0.231
45.59	1.5	0.375
60.79	2.0	0.476
75.98	2.5	0.627
91.18	3.0	0.772
106.30	3.5	0.974

Abs.: absorbencia; *promedio de tres determinaciones

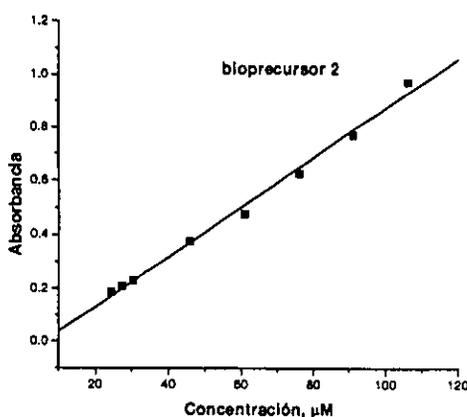
El cálculo de e (absortividad molar) se realizó mediante la ecuación de Lambert-Beer

$$A = \epsilon l [\text{concentración}]$$

donde A : absorbencia, l : longitud de la celda (1 cm), ε: coeficiente de absortividad molar

Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de

$$\epsilon = 9262.97 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



Bioprecursor 3

Longitud de onda de lectura: 375 nm

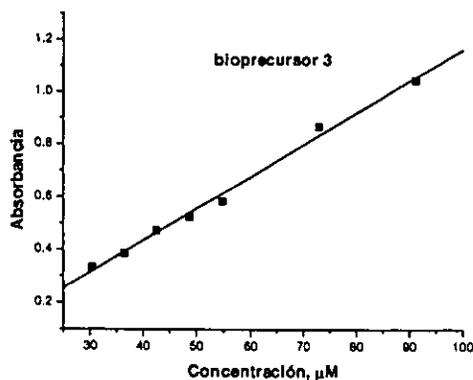
Solución patrón 0.1 mg/mL etanol (303 μM)

3, μM	3, 10 ⁻² mg/mL	Abs.*
30.39	1	0.333
36.47	1.2	0.386
42.55	1.4	0.473
48.63	1.6	0.524
54.71	1.8	0.585
72.94	2.4	0.865
91.18	3	1.044

Abs.: absorbencia. *promedio de tres determinaciones

Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de

$$\epsilon = 12101.24 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



E. Datos para la elaboración de la curva estándar del albendazol, 1.

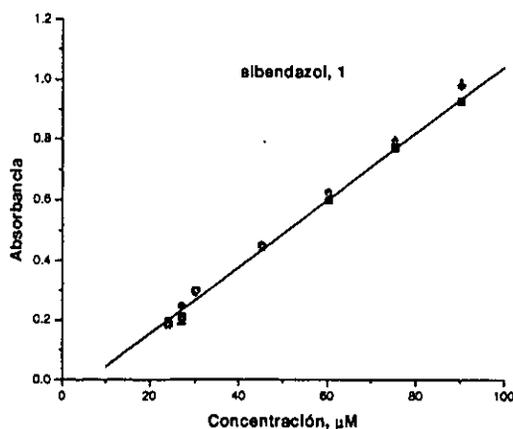
Longitud de onda de lectura: 295 nm.

Solución patrón 0.1 mg/mL etanol (376.88 μM)

1, μM	Abs.	Abs.	Abs.	promedio	DE	EE
24.12	0.185	0.196	0.179	0.18667	0.00862	0.00498
27.13	0.210	0.245	0.190	0.21500	0.02784	0.01607
30.15	0.298	0.289	0.295	0.294	0.00458	0.00265
45.22	0.444	0.449	0.439	0.444	0.00500	0.00289
60.30	0.600	0.625	0.611	0.611	0.01258	0.00726
75.37	0.771	0.789	0.796	0.785	0.0129	0.00745
90.40	0.929	0.979	0.990	0.966	0.0325	0.01877

Abs: absorbancia; DE: desviación estandar; EE: error estandar

Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de $\epsilon = 11591.01 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



F. Datos para la elaboración de la curva estándar de los análogos 27-29

Análogo 27

Longitud de onda de lectura: 306 nm.

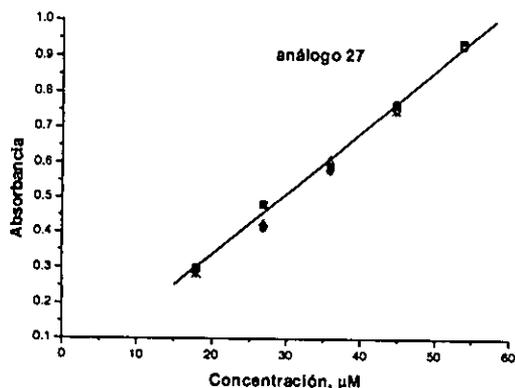
Solución patrón 0.5 mg/mL etanol (1789.99 μM)

27, μM	Abs.	Abs.	Abs.	promedio	DE	EE
17.89	0.298	0.287	0.279	0.288	0.00995	0.00551
26.84	0.481	0.410	0.425	0.438	0.03686	0.02128
35.79	0.590	0.578	0.610	0.592	0.01617	0.00933
44.74	0.761	0.770	0.745	0.758	0.01258	0.00726
53.69	0.968	0.956	0.937	0.953	0.00586	0.00338

Abs: absorbencia; DE: desviación estandar; EE: error estandar

Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de

$$\epsilon = 18435.75 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



Análogo 28.

Longitud de onda de lectura: 306 nm.

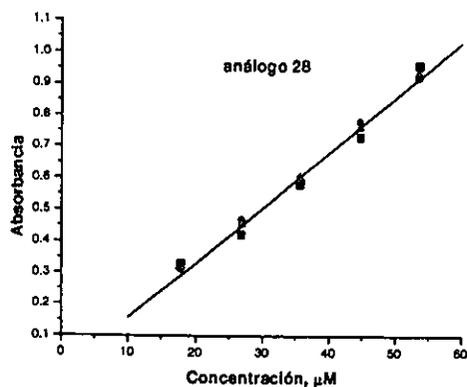
Solución patrón 0.5 mg/mL etanol (1789.99 μM)

28, μM	Abs.	Abs.	Abs.	promedio	DE	EE
17.89	0.33	0.31	0.32	0.32	0.01	0.00577
26.84	0.422	0.467	0.455	0.448	0.023	0.01345
35.79	0.581	0.601	0.600	0.594	0.011	0.00651
44.74	0.730	0.780	0.760	0.756	0.025	0.01453
53.69	0.958	0.977	0.982	0.972	0.020	0.01198

Abs: absorbencia; DE: desviación estandar; EE: error estandar

Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de

$$\epsilon = 18011.12 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



Análogo 29

Longitud de onda de lectura: 300 nm.

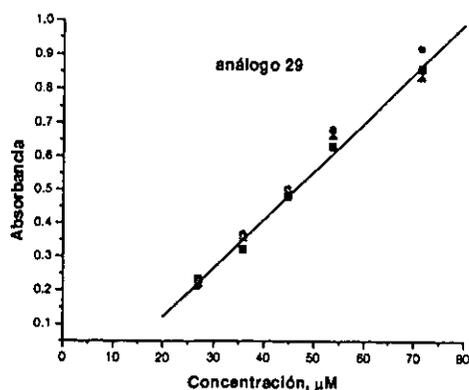
Solución patrón 0.5 mg/mL etanol (1319.26 µM)

29, µM	Abs.	Abs.	Abs.	promedio	DE	EE
26.84	0.233	0.210	0.221	0.220	0.010	0.00577
35.79	0.322	0.367	0.355	0.348	0.023	0.01345
44.74	0.481	0.501	0.500	0.494	0.011	0.00651
53.69	0.630	0.680	0.660	0.656	0.025	0.01453
71.52	0.858	0.917	0.832	0.869	0.020	0.01198

Abs: absorbancia; DE: desviación estandar; EE: error estandar

Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de

$$\epsilon = 14801.79 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



G. Datos para la elaboración de la curva estándar del derivado biorreversible 25

Longitud de onda de lectura: 322 nm.

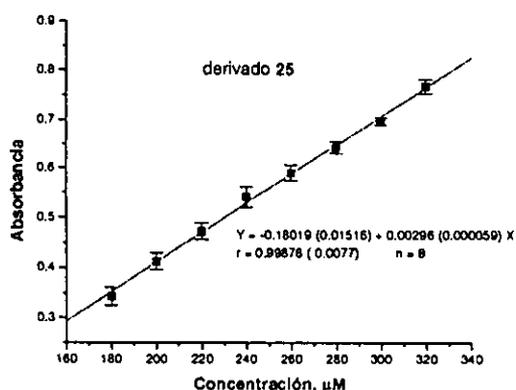
Solución patrón 0.2 mg/mL etanol (399.92 µM)

25, µM	Abs.	Abs.	Abs.	promedio	DE	EE
179.96	0.378	0.32	0.33	0.34267	0.03101	0.0179
199.96	0.444	0.387	0.407	0.41267	0.02892	0.0167
219.95	0.485	0.441	0.491	0.47233	0.0273	0.01576
239.95	0.552	0.501	0.571	0.54133	0.0362	0.0209
259.94	0.61	0.559	0.604	0.591	0.02787	0.01609
279.94	0.65	0.659	0.618	0.64233	0.02155	0.01244
299.94	0.693	0.688	0.712	0.69767	0.01266	0.00731
319.93	0.741	0.779	0.785	0.76833	0.02386	0.01378

Abs.: absorbencia; DE: desviación estandar; EE: error estandar

Después de ajustar los valores con mínimos cuadrados se obtuvo un valor de

$$\epsilon = 29655.49 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



H. Elaboración de la curva para la cuantificación de albendazol por HPLC.

Solución patrón: 0.2 mg de albendazol/mL de etanol absoluto (753.778 µM)

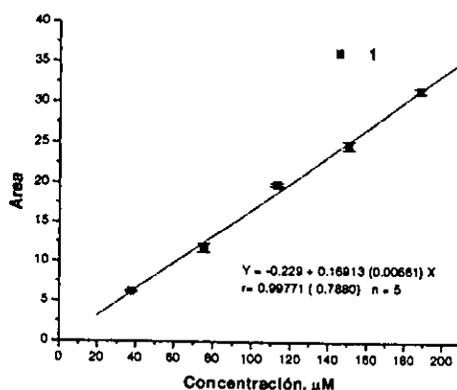
Cantidad de inyección a la columna: 20 µL

Tiempo de retención para el albendazol: 5.70±0.02 min

1, µM	área	área	área	promedio	DE	EE
188.4	31.0279	32.2289	31.56903	31.60861	0.60148	0.34726
150.74	24.1946	25.8946	24.3989	24.82937	0.92816	0.53587
113.03	19.54015	20.1267	20.1946	19.95382	0.35985	0.20776
75.37	12.92439	11.2903	11.1733	11.796	0.97897	0.56521
37.68	6.41394	6.00123	6.3659	6.26036	0.22569	0.1303

DE: desviación estandar; EE: error estandar.

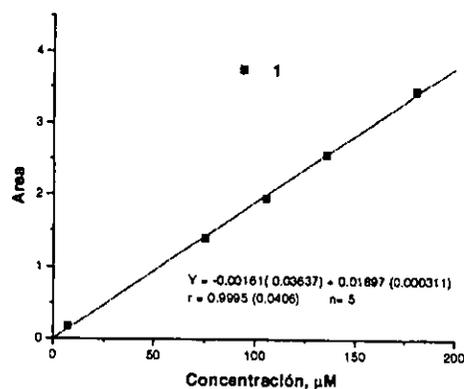
Después de ajustar por mínimos cuadrados $k = 0.1691 \mu\text{M}^{-1}$



Solución patrón: 0.2 mg de albendazol/mL de etanol absoluto (753.778 μM)

Cantidad de inyección a la columna: 5 μL

Tiempo de retención para el albendazol: 5.20 \pm 0.12 min



Después de ajustar por mínimos cuadrados $k = 0.01897 \mu\text{M}^{-1}$

I. Determinación de proteínas totales.

Para este ensayo se utilizó el Kit BIO RAD® (catálogo 500-0002), el cual utiliza el método de Bradford para la cuantificación de proteínas.

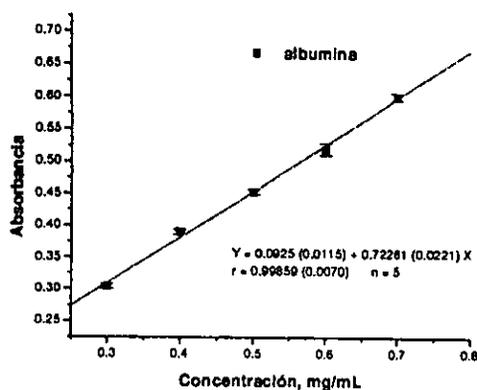
1. Se preparó la dilución de 1 parte del colorante BIO-RAD con 4 partes de agua desionizada. La solución se pasó por un papel filtro Whatman #1 para la remoción de partículas suspendidas.
2. La concentración de la solución patrón de albumina (Sigma) fue de 2.0 mg/mL. Para la preparación de las soluciones de la curva patrón, se hicieron diluciones tomando 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL de la solución patrón y se aforaron a 10 mL con agua desionizada. Con esto se obtuvieron las siguientes concentraciones: 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mg/mL.

- En series de tres tubos de ensayo se colocaron 100 μL de cada solución de la curva patrón, así como de la muestra problema. Luego se adicionaron 5.0 mL del colorante diluido de BIO-RAD y se agitaron mediante un vortex durante 30 s.
- Se incubaron los tubos de ensayo a temperatura ambiente durante 5 min y no más de 30 min (la absorbencia se incrementa con el transcurso de tiempo). Se leyeron las muestras a 595 nm en celdas de poliestireno de 1 cm de longitud y 1.5 mL de capacidad (catálogo BIO-RAD 223-9955).

albumina, mg/mL	Abs	Abs	Abs	promedio	DE	EE
0.3	0.312	0.3024	0.2989	0.30443	0.00678	0.00392
0.4	0.382	0.3918	0.3976	0.39047	0.00789	0.00455
0.5	0.45	0.46153	0.4485	0.45334	0.00713	0.00412
0.6	0.52	0.50348	0.5365	0.51999	0.01651	0.00953
0.7	0.59	0.6029	0.61003	0.60098	0.01015	0.00586

Abs: absorbencia; DE: desviación estandar; EE: error estandar

Después de ajustar con mínimos cuadrados, $k = 0.7226 \text{ cm}^{-1} \text{ mg/mL}^{-1}$

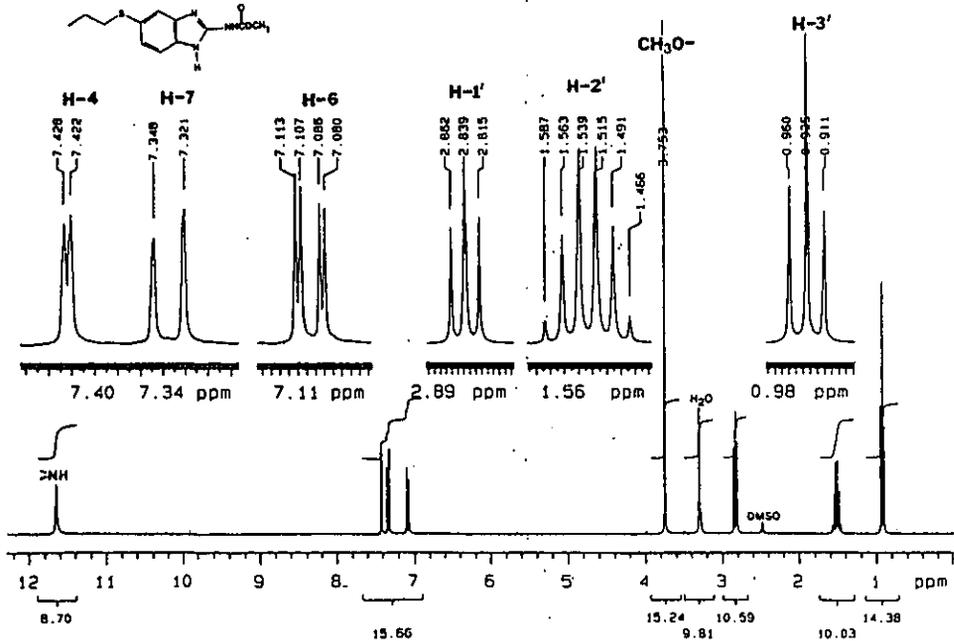
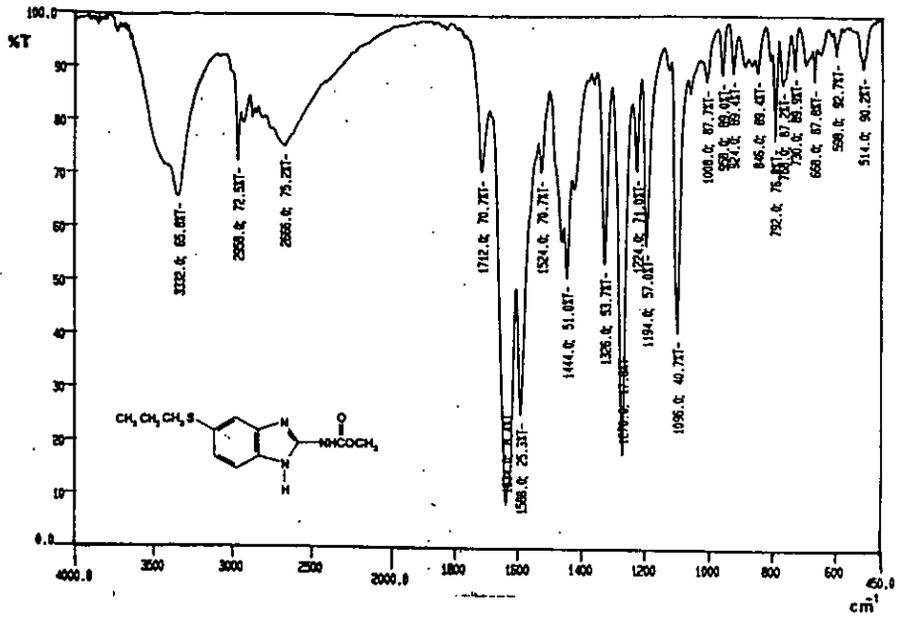


J. Espectros.

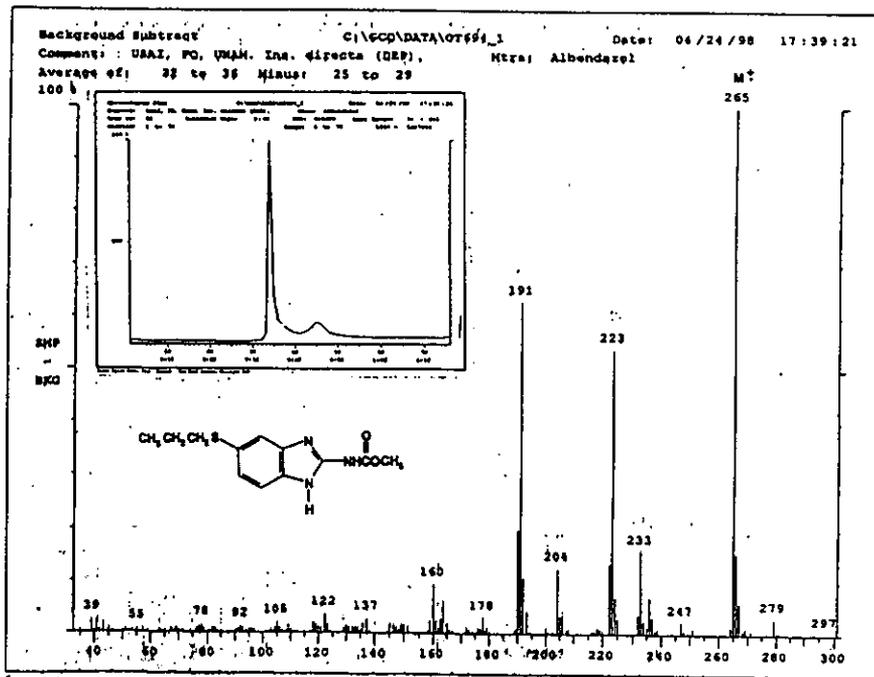
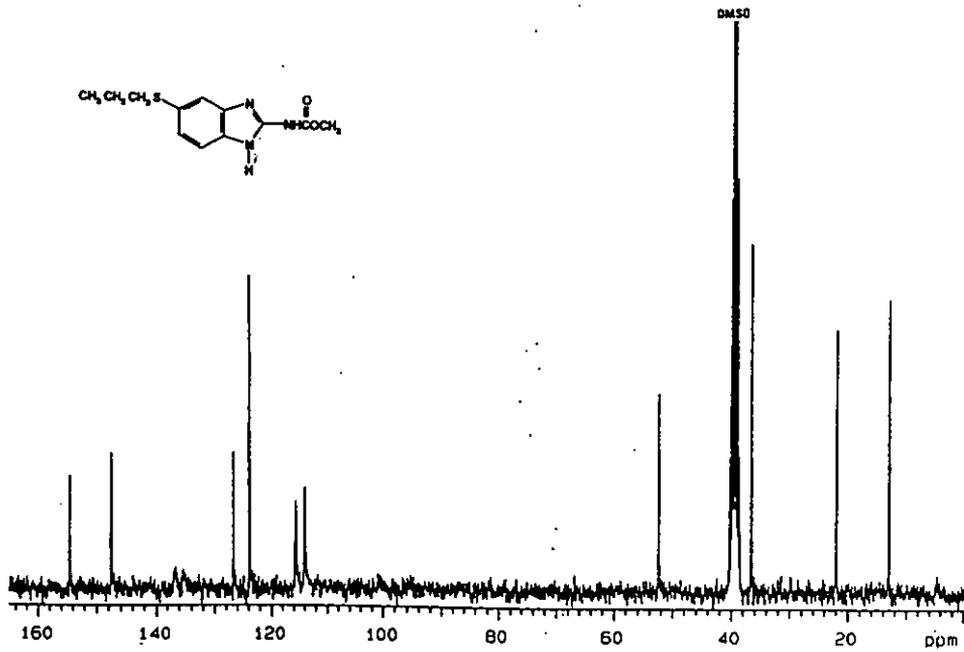
A continuación se presentan sólo los espectros de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) y de carbono-13 (^{13}C RMN), de los productos finales que se obtuvieron en el presente trabajo de tesis. Para facilitar la localización de los mismos, en la siguiente página se encuentra un listado con el número de los compuestos y las páginas agrupadas de sus espectros.

Listado para los espectros de los productos finales

Compuesto	páginas
1.....	136 - 137
2.....	138 - 139
3.....	140 - 141
3a.....	142 - 143
10.....	144
11.....	145
12.....	146
13a.....	147 - 148
13b.....	149 - 150
14a.....	151 - 153
14b.....	154 - 155
16.....	156 - 158
19.....	159 - 160
20.....	161
24 (inestable).....	162 - 163
25.....	164 - 165
26.....	166
27.....	167 - 168
28.....	169 - 170
29.....	171 - 172

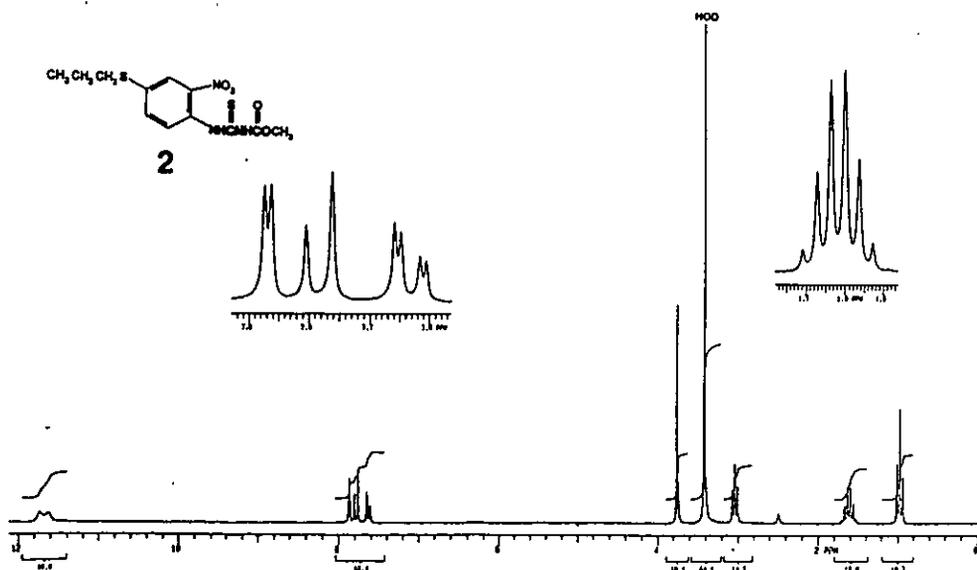
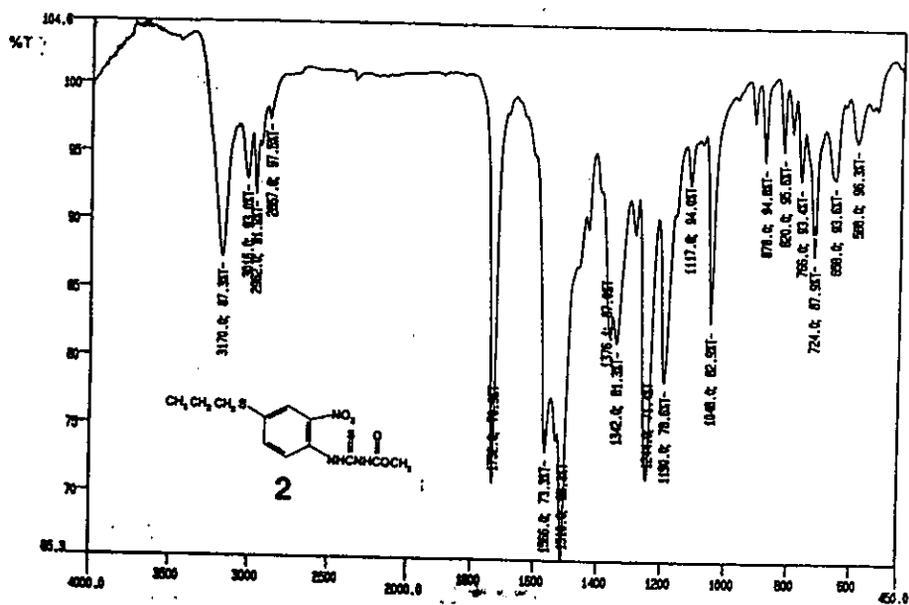


Espectro IR (KBr) y ^1H RMN del albendazol, 1

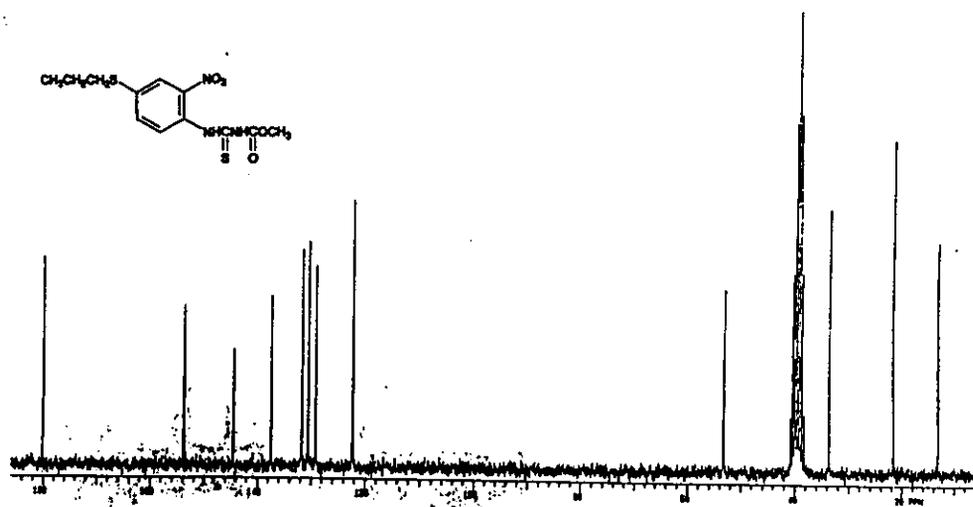


Cromatografía de gases-Espectro de masas

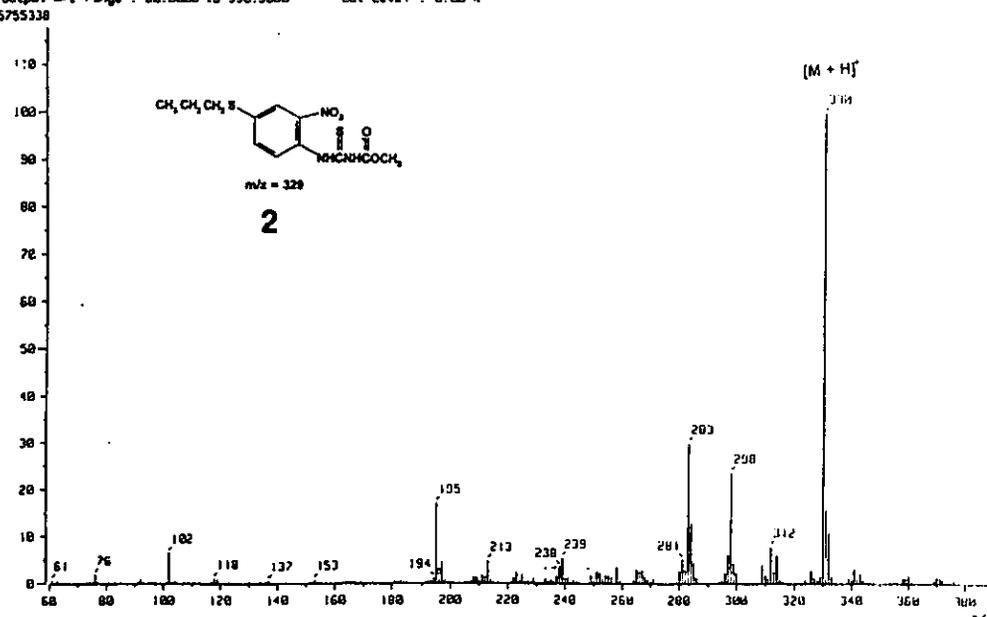
Espectro ^{13}C RMN y Masas del albendazol, 1



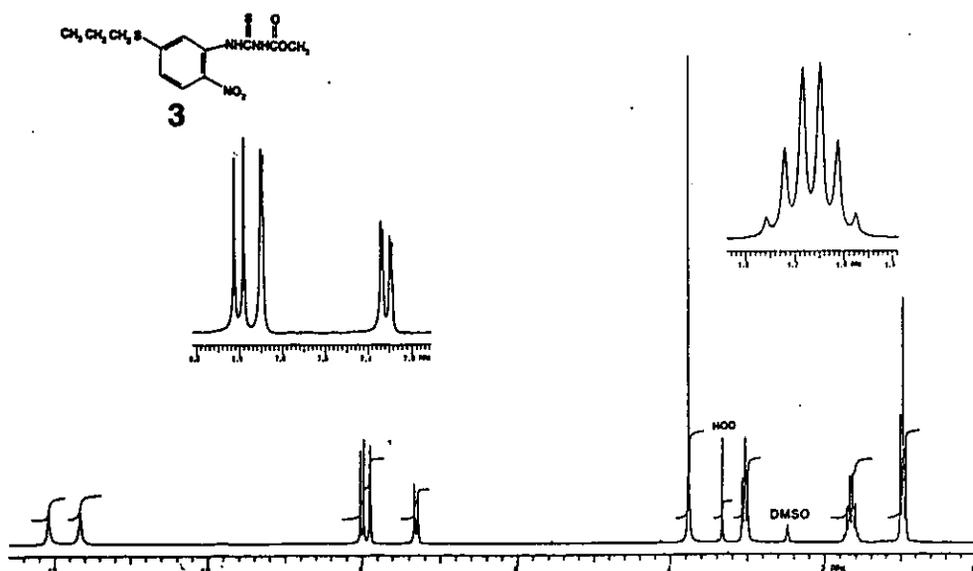
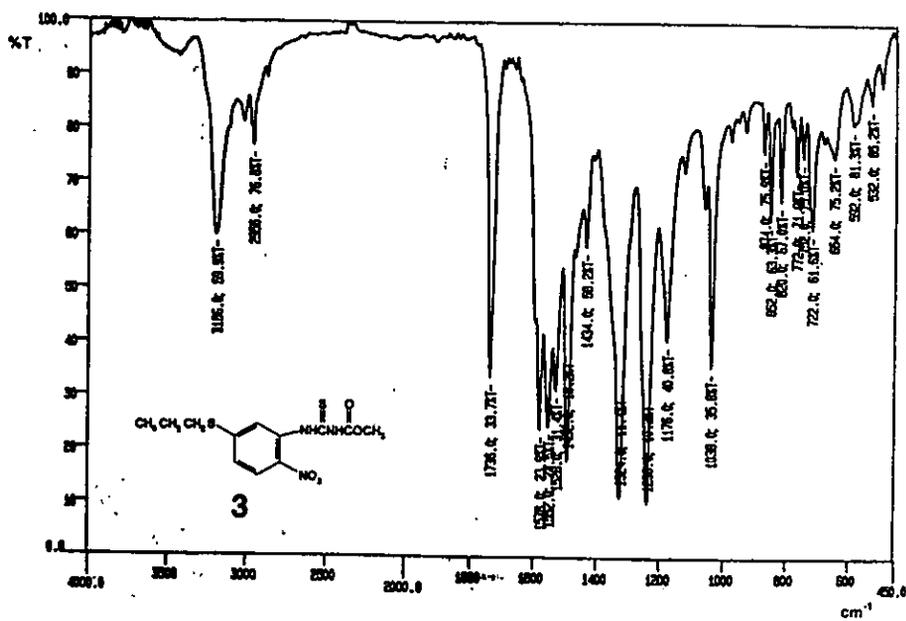
Espectro IR (KBr) y ¹H RMN del N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-4-propiltio)fenil]tiourea, 2



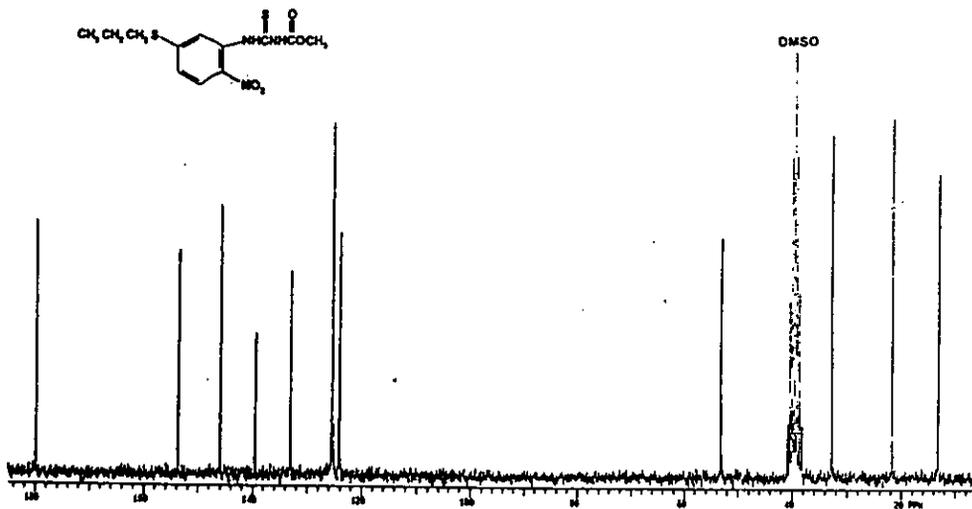
(Mass Spectrum)
 Date : 22-Aug-94 16:32
 Data : G-2
 Sampler: G-2
 Note : #
 Inlet : Direct Ion Mode : CI+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 RT : 1.25 min Scan : (24, 28) Temp : 114.2 deg. C
 BP : m/z 319.0000 Int. : 465.88
 Output m/z range : 60.0000 to 390.0000 Cut Level : 0.00 %
 5755338



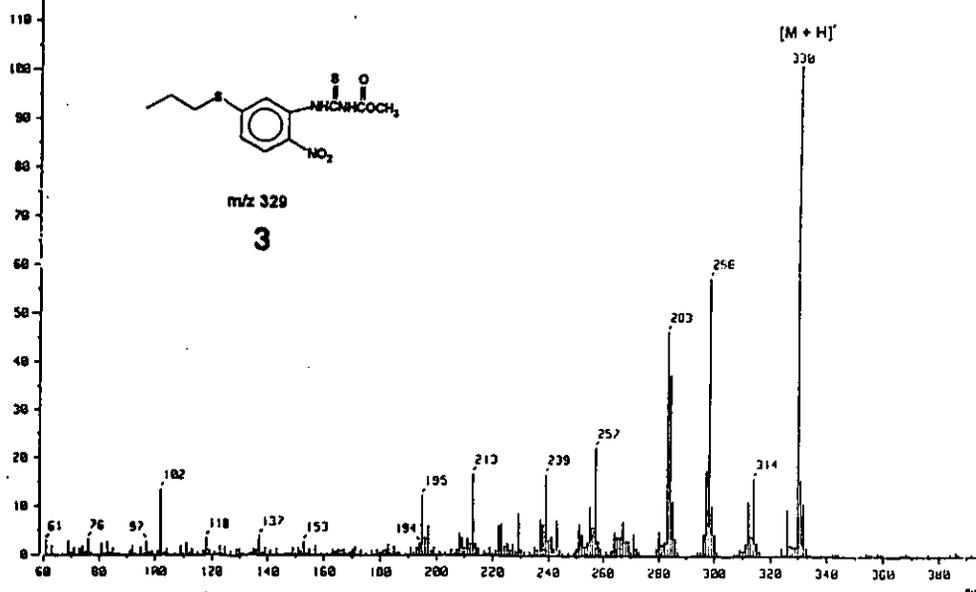
Espectro ¹³C RMN y Masas del N-metoxicarbonil-N'-((2-nitro-4-propiltilio)fenil]tiourea, 2



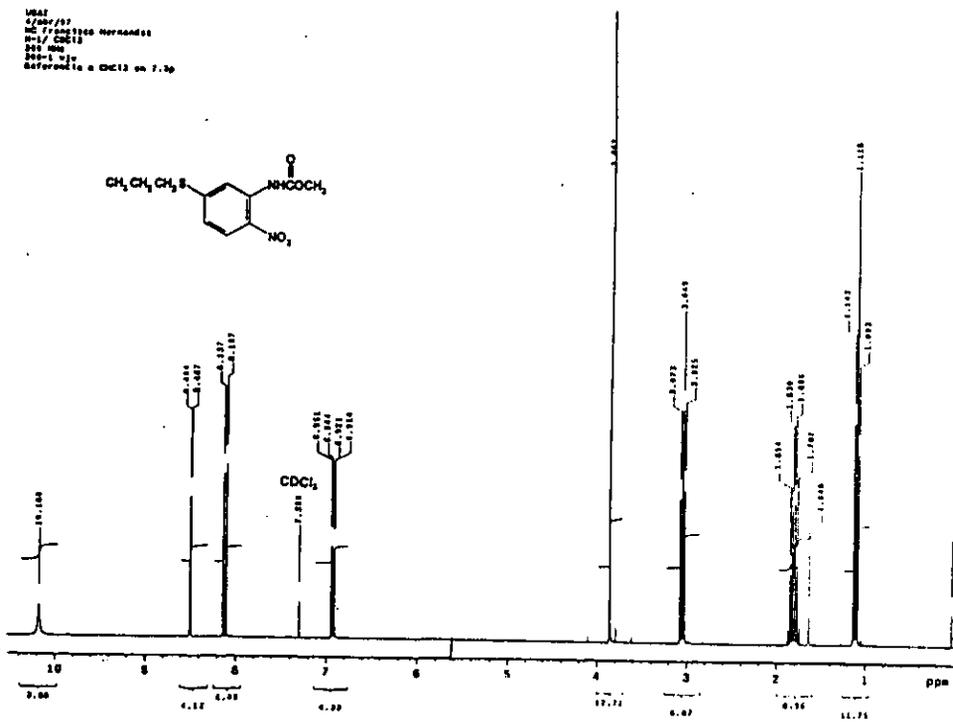
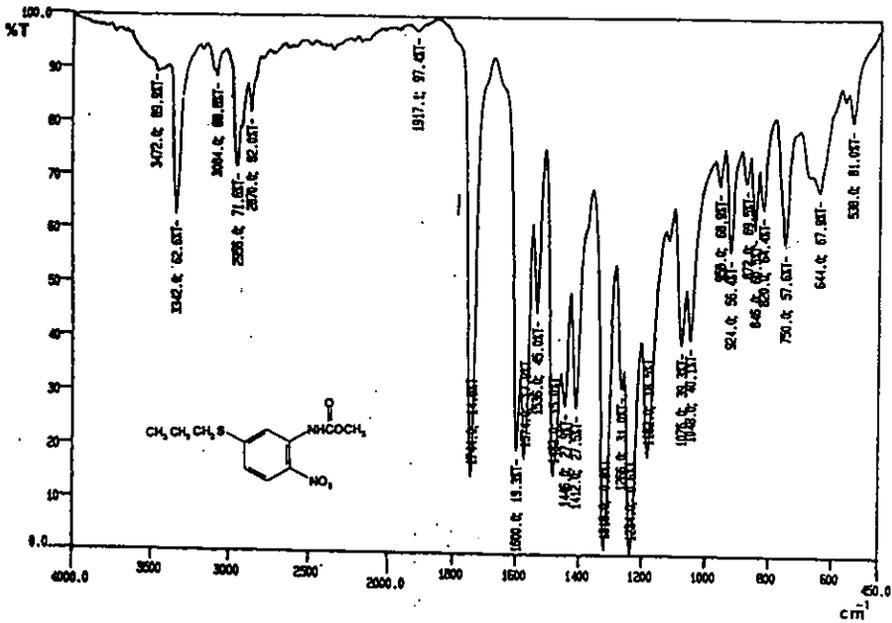
Espectro IR (KBr) y ^1H RMN del N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil]tiourea, 3



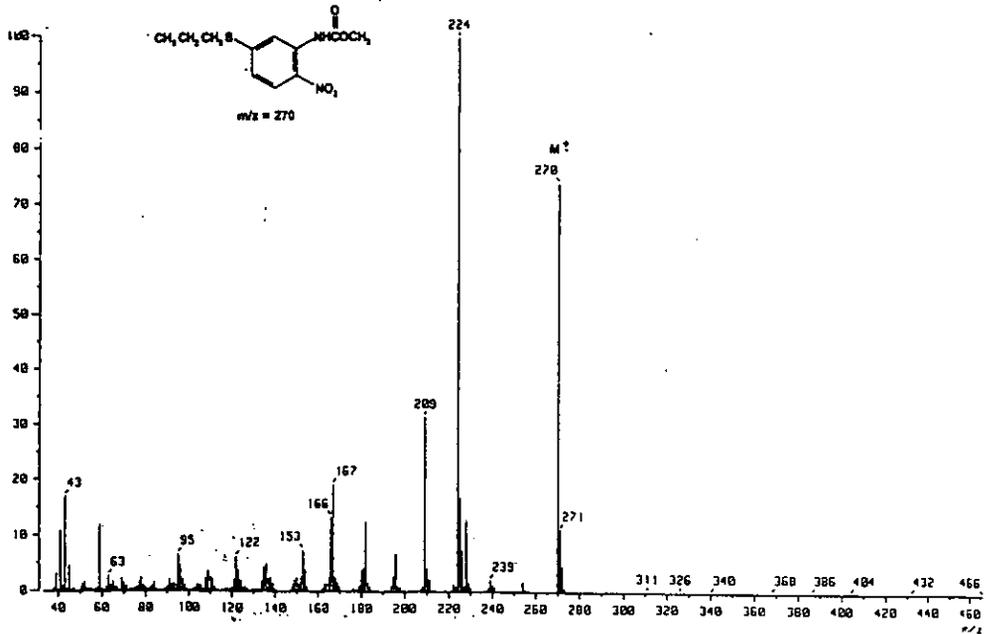
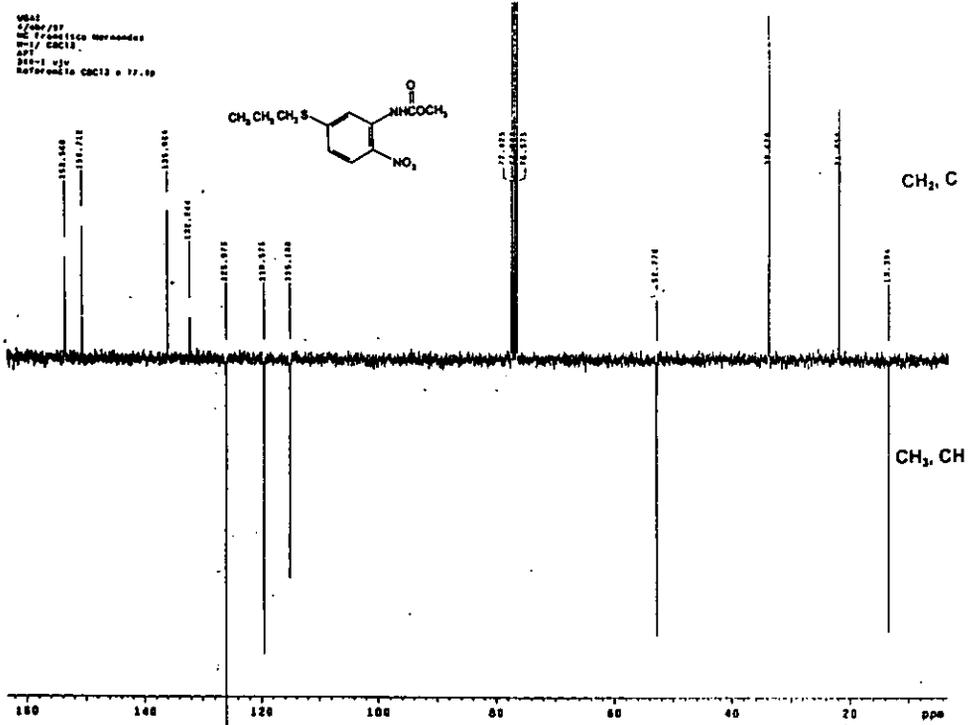
[Mass Spectrum]
 Data : (-química) Date : 22-Aug-04 16:46
 Sample: M-3
 Note : *
 Inlet : Direct Ion Mode : CI+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 RT : 0.85 min Scan : (16,20) Temp : 89.8 deg.C
 BP : m/z 330.0000 Int. : 162.90
 Output m/z range : 60.0000 to 357.6000 Cut Level : 0.00 %
 1958487



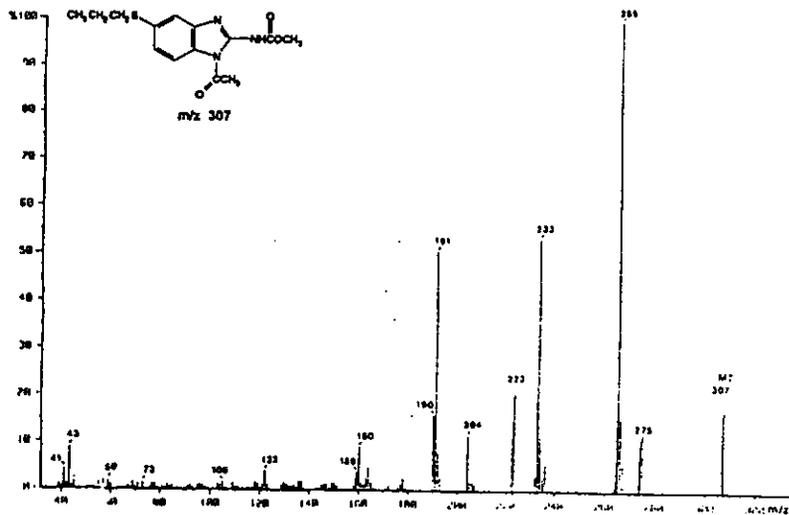
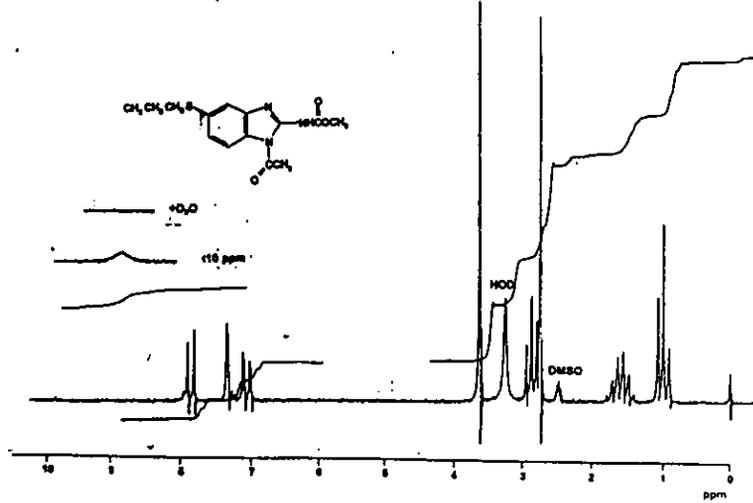
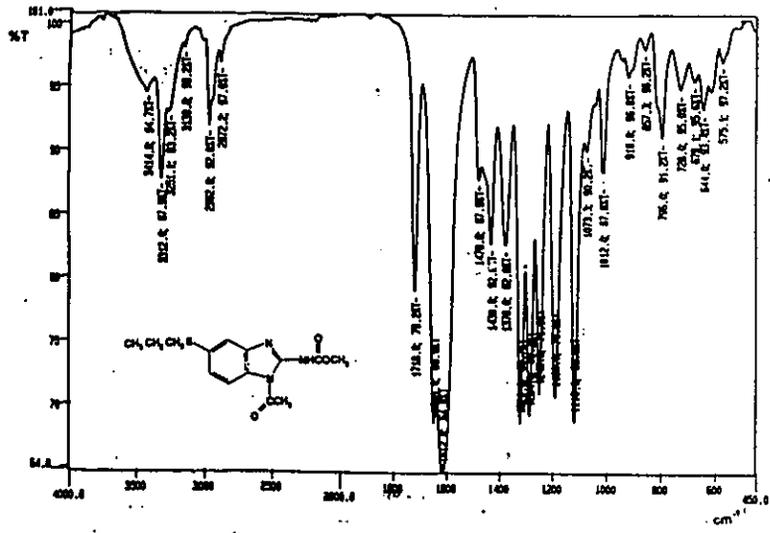
Espectro ¹³C RMN y Masas del N-metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil]tiourea, 3



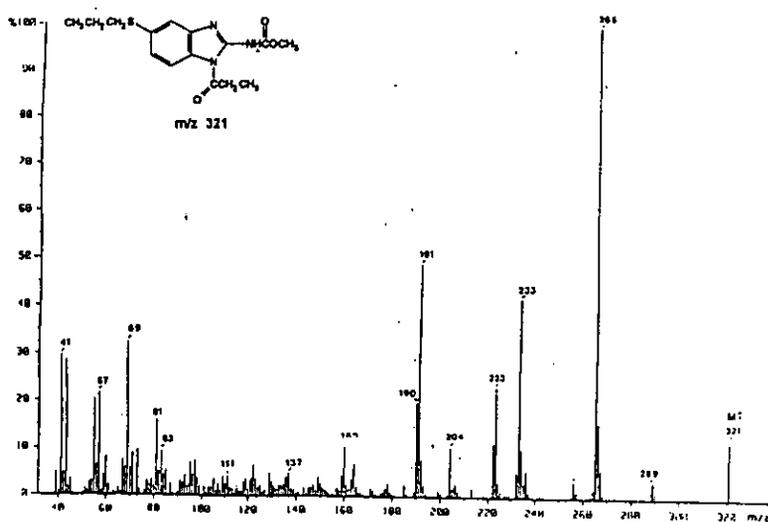
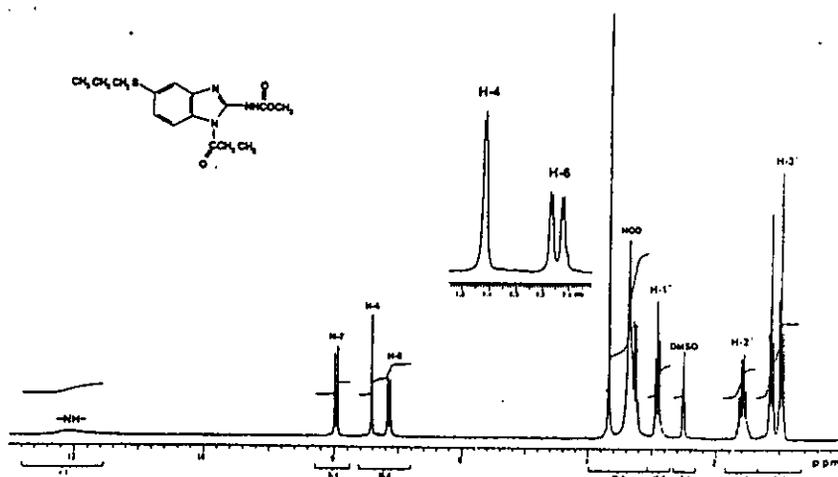
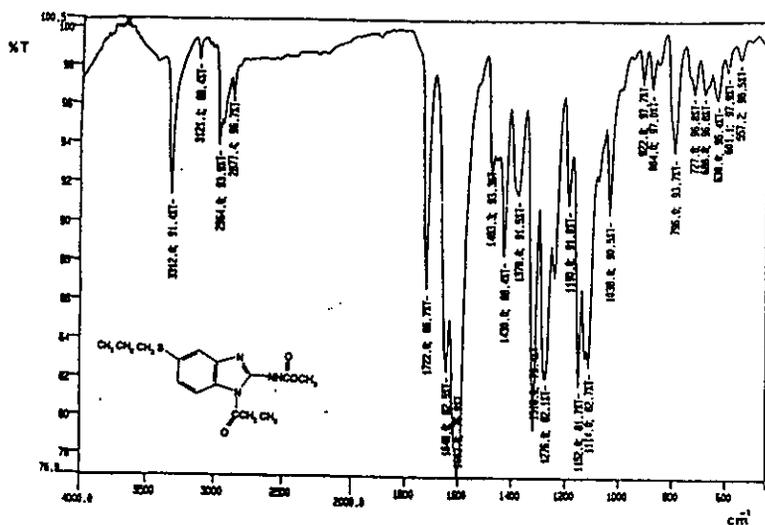
Espectro IR (KBr) y ^1H RMN del N-[(2-Nitro-5-propilto)fenil]carbamato de metilo, 3a



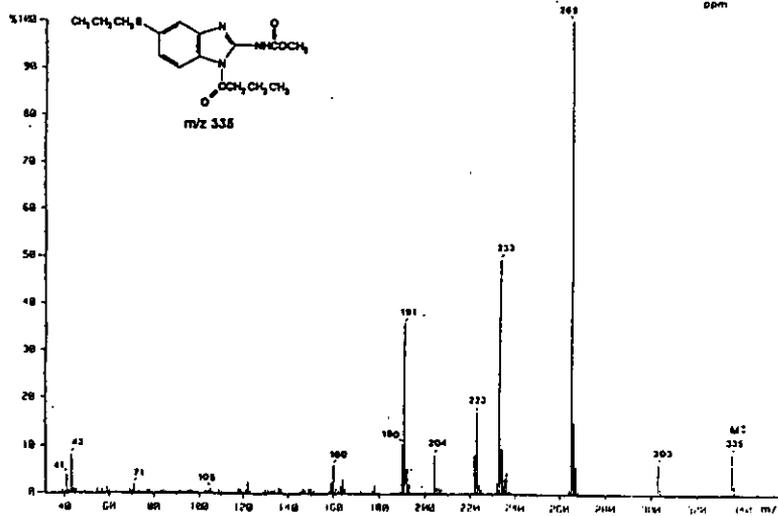
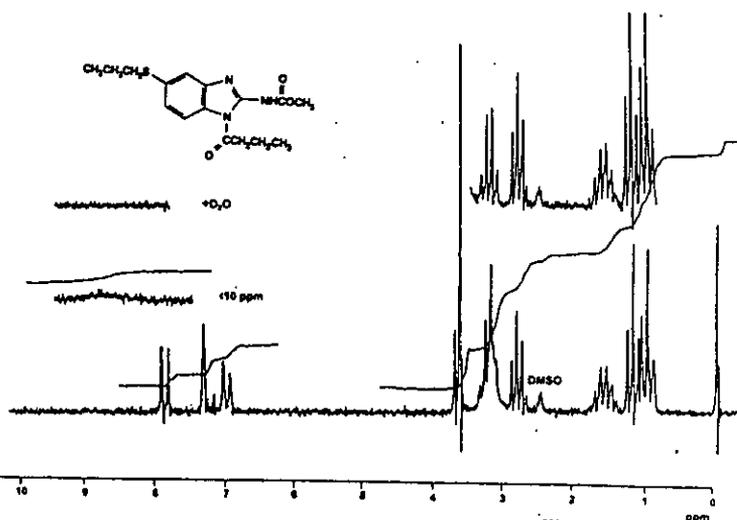
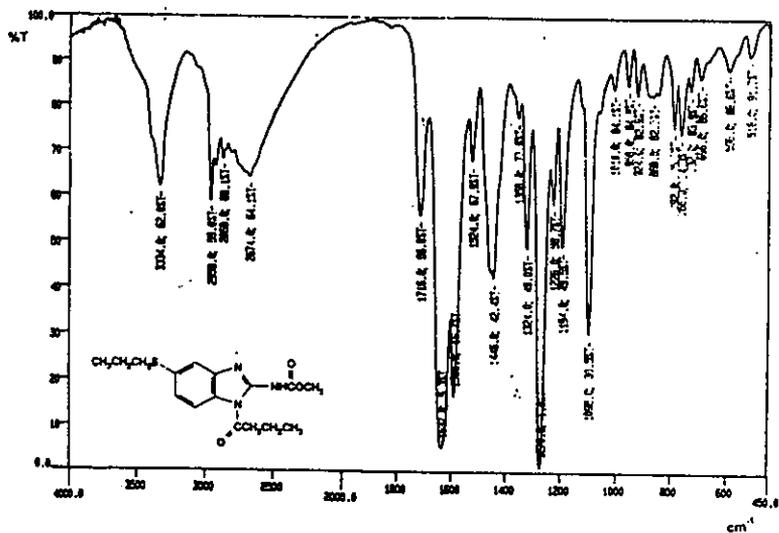
Espectro ¹³C RMN y Masas del N-[(2-Nitro-5-propiltio)fenil]carbamato de metilo, 3a



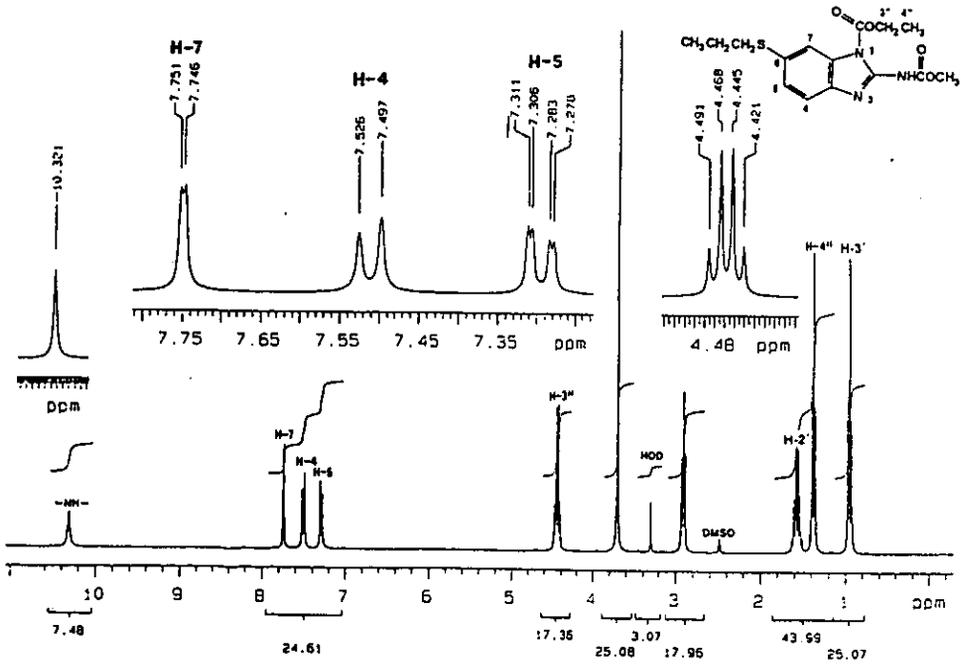
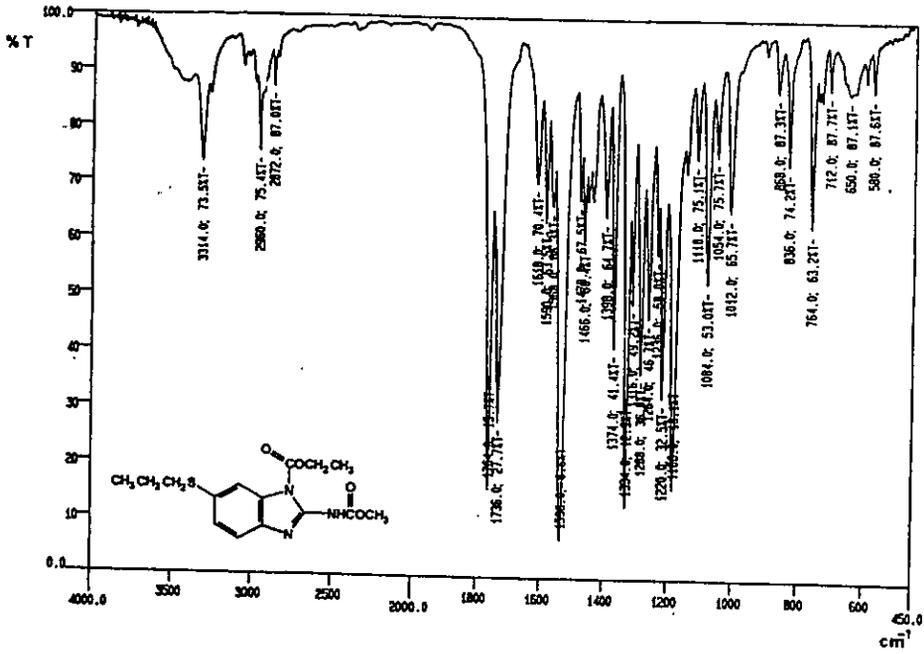
Espectro IR (KBr), ^1H RMN y Masas del 1-Acetil-5-propil-2-benzimidazolcarbamato de metilo, 10



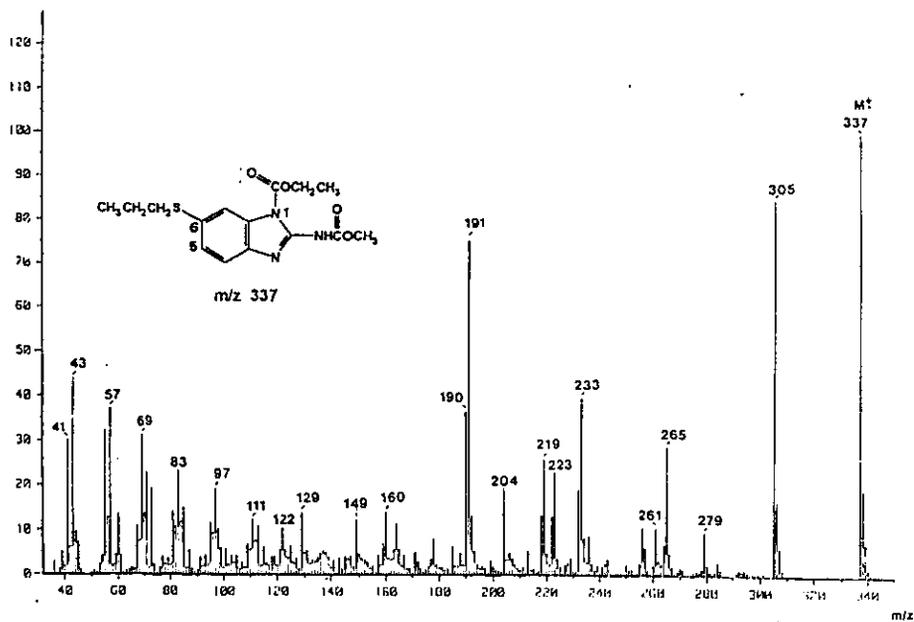
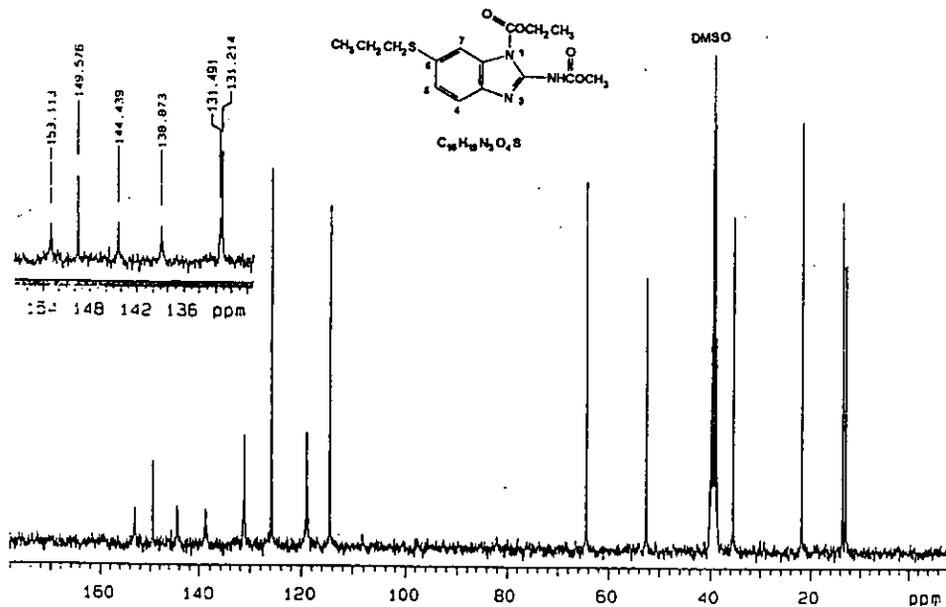
Espectro IR (KBr), ¹H RMN y Masas del 1-Propanoil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 11



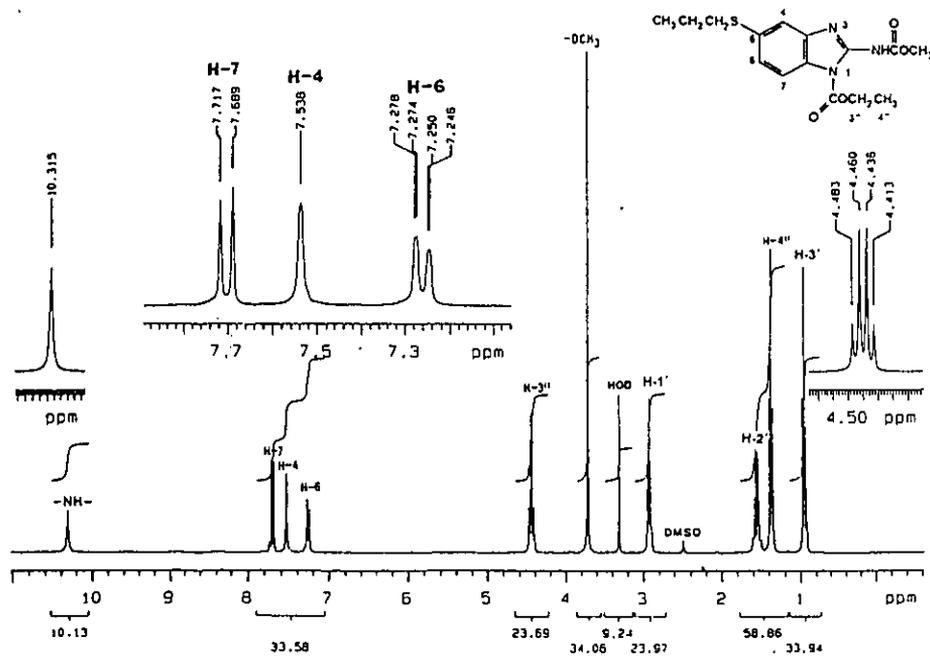
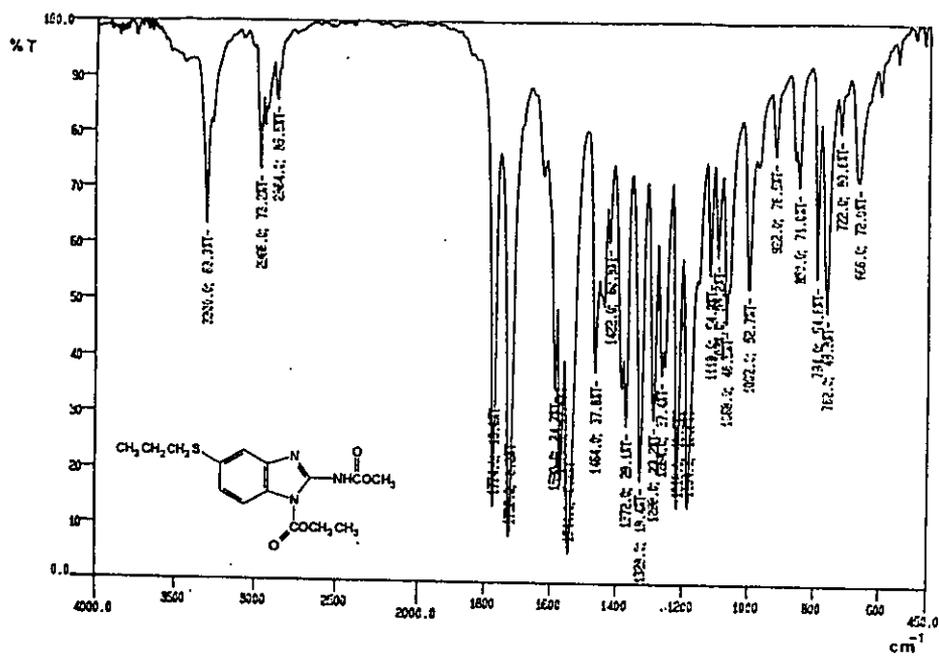
Espectro IR (KBr), ¹H RMN y Masas del 1-Butanoil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 12



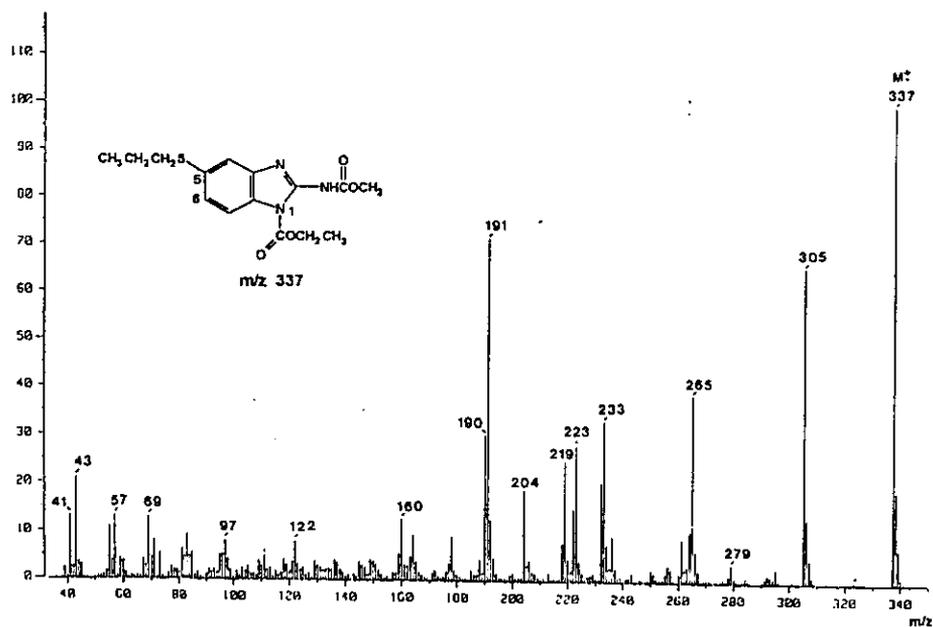
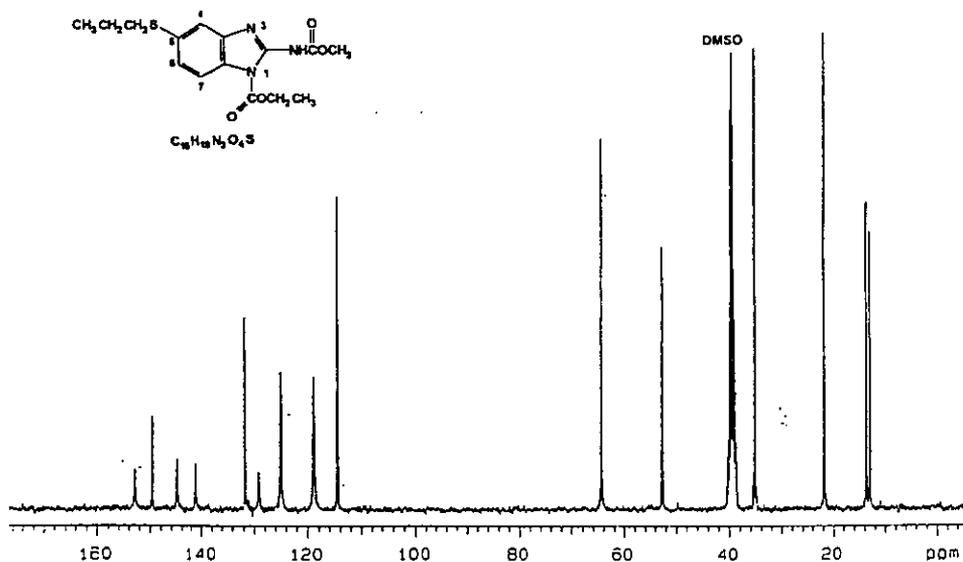
Espectro IR (KBr) y ^1H RMN del 1-Etoxicarbonil-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 13a



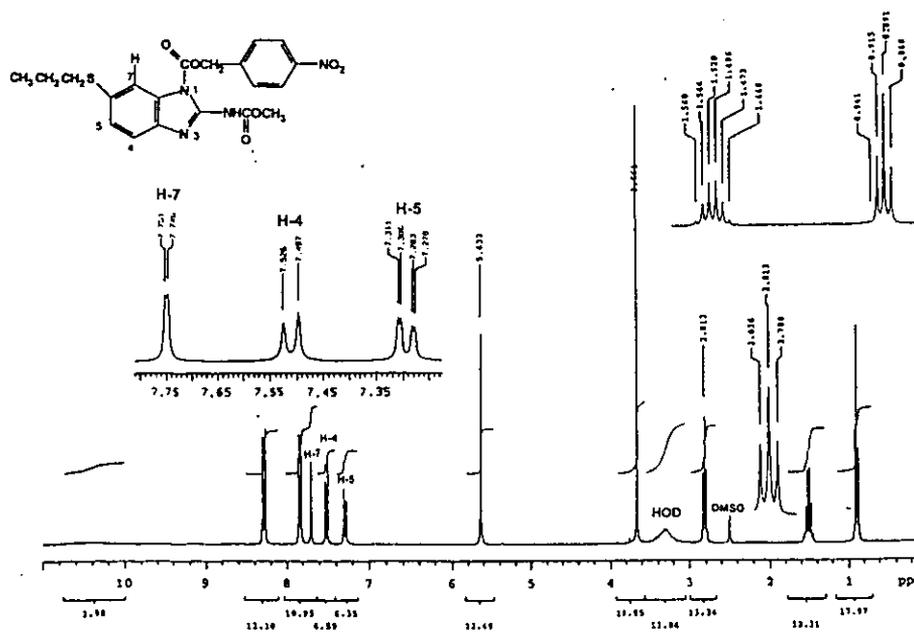
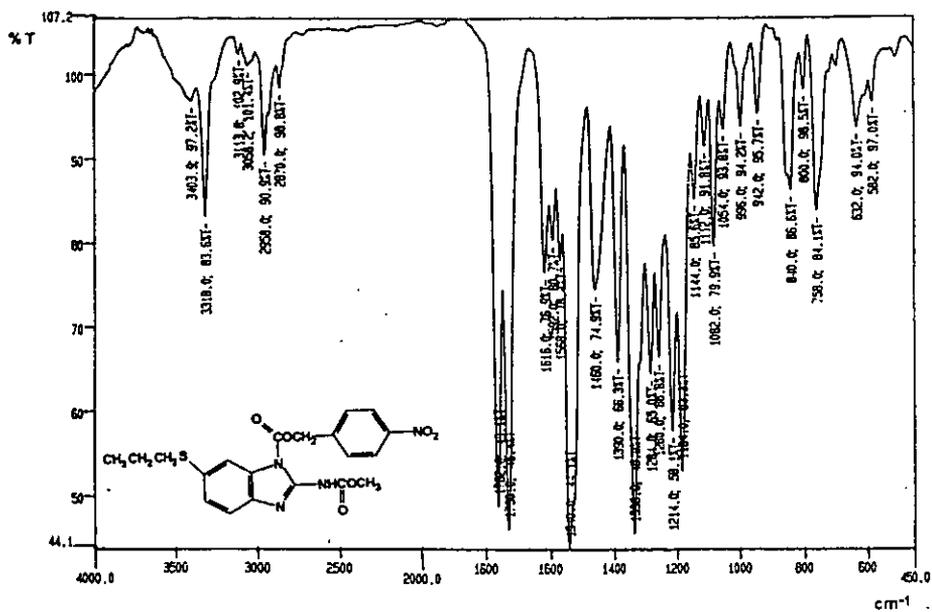
Espectro ^{13}C RMN y Masas del 1-Etoxicarbonil-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 13a



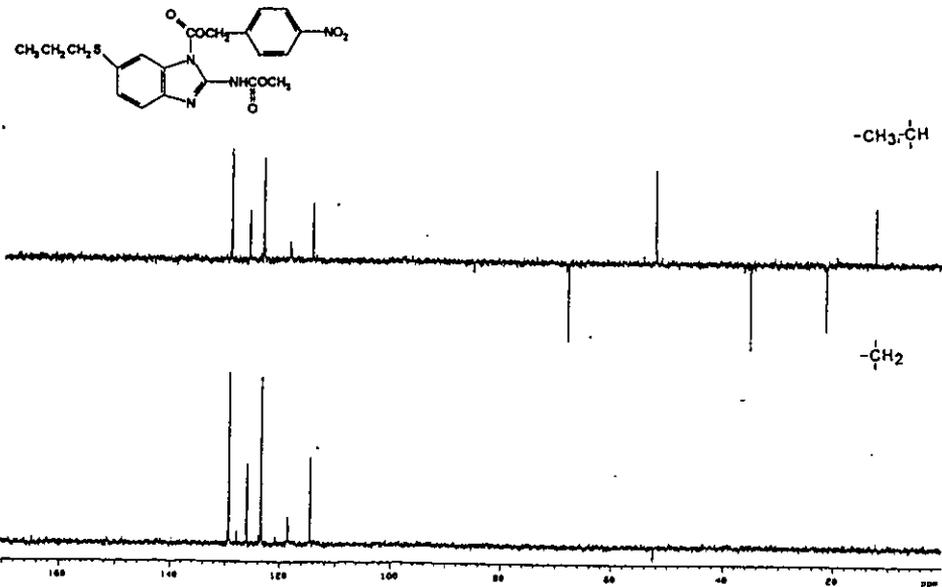
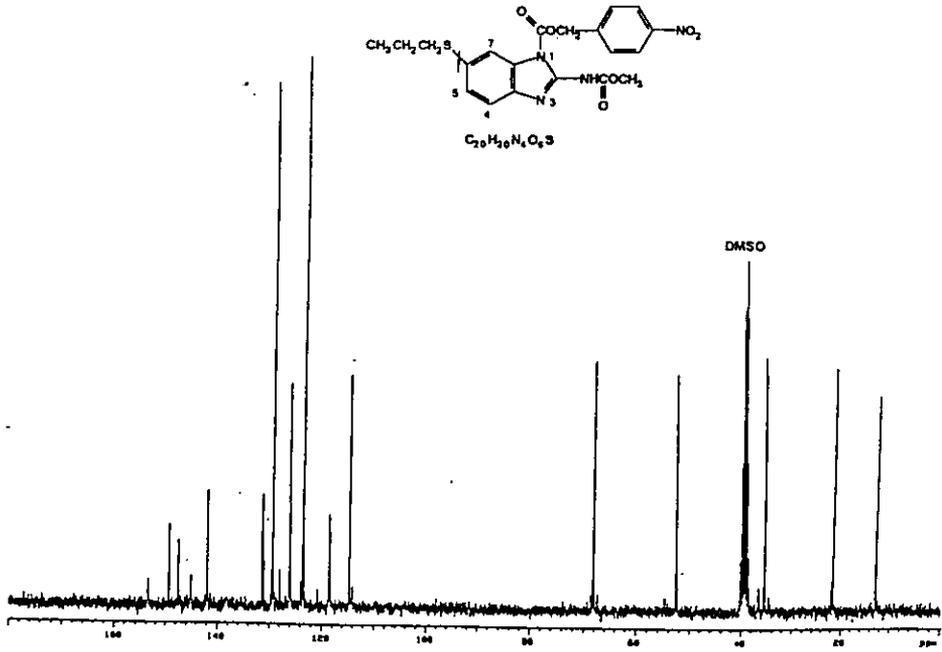
Espectro IR (KBr) y ¹H RMN del 1-Etoxicarbonil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 13b



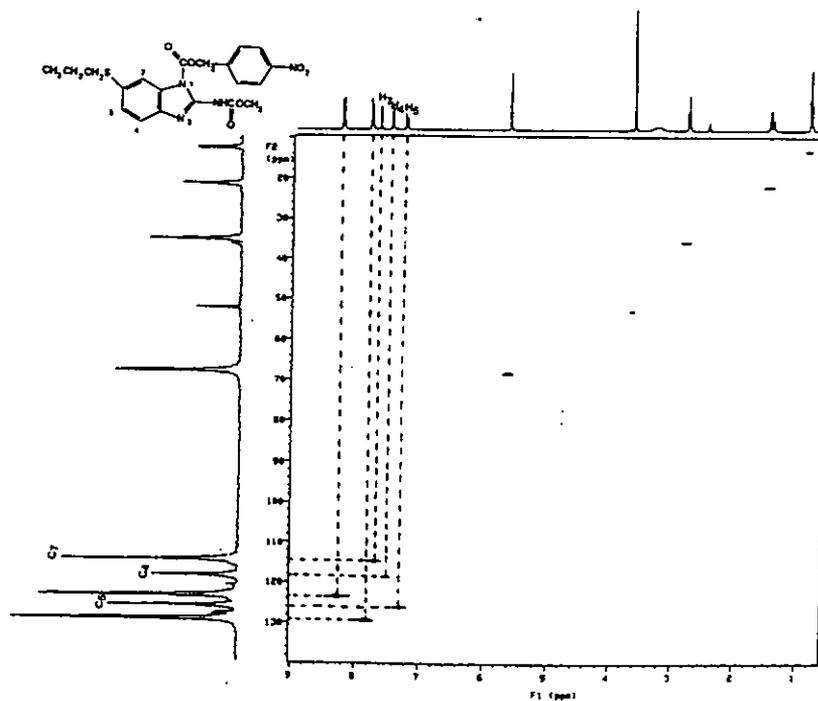
Espectro ^{13}C RMN y Masas del 1-Etoxicarbonil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 13b



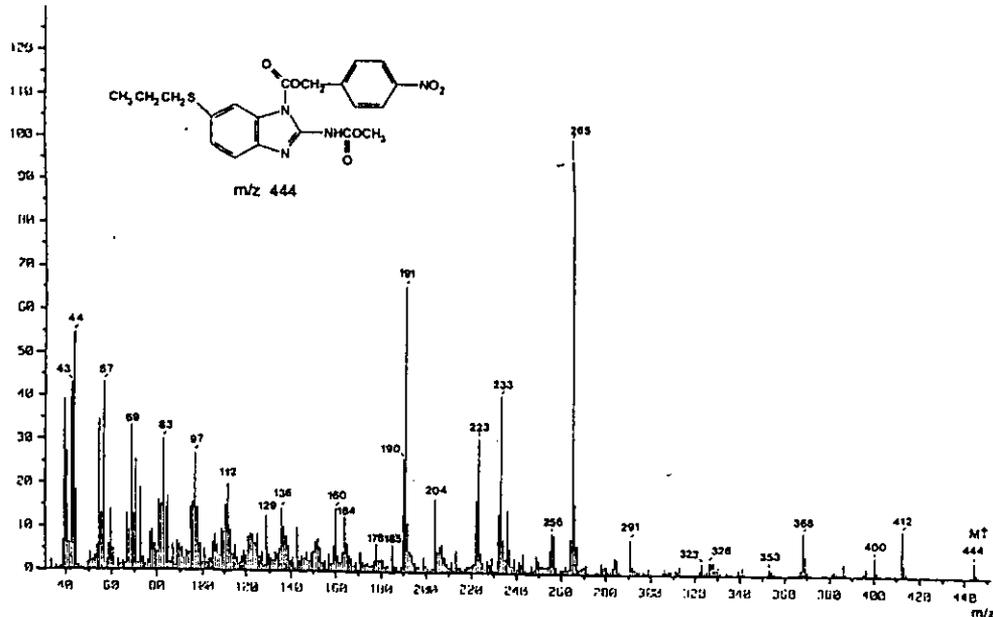
Espectro IR (KBr) y ¹H RMN del 1-[(4-Nitrobenil)oxicarbonil]-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 14a



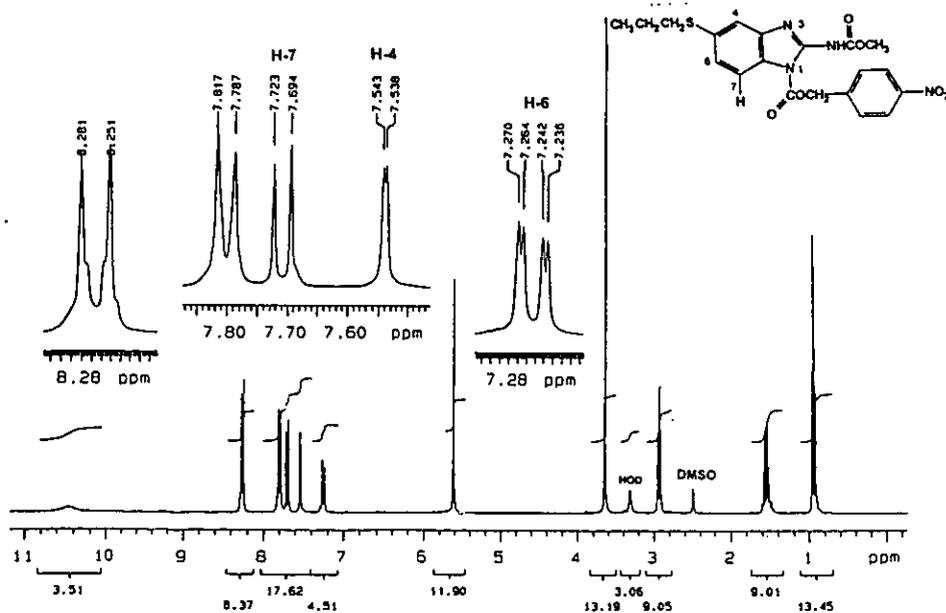
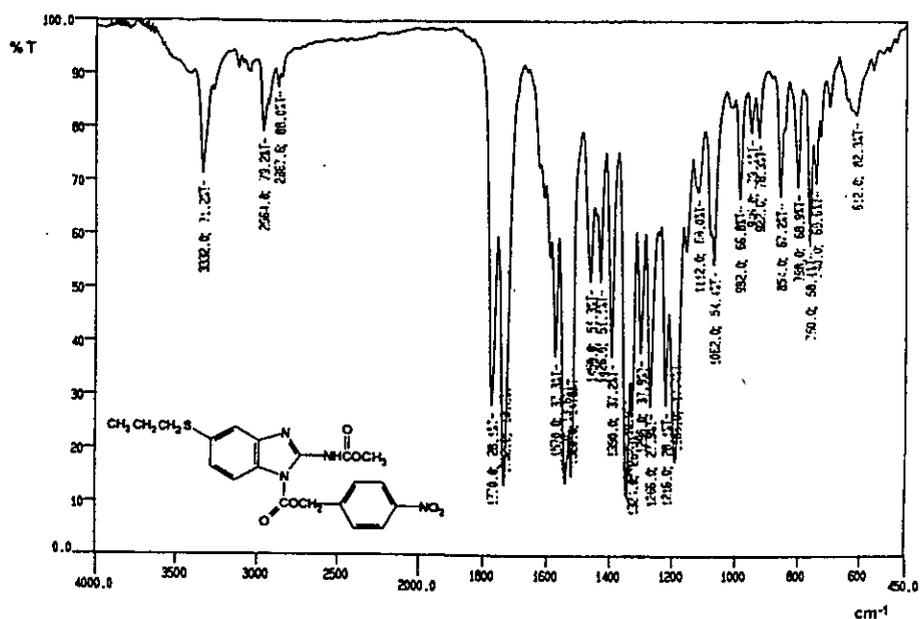
Espectro ¹³C RMN del 1-[(4-Nitrobenzil)oxicarbonil]-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, **14a**



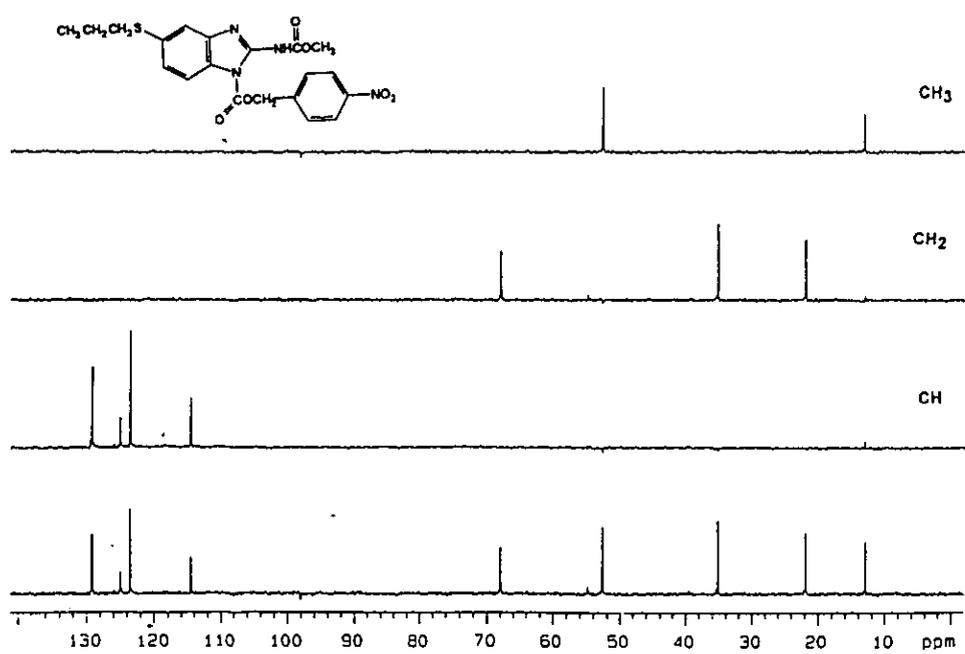
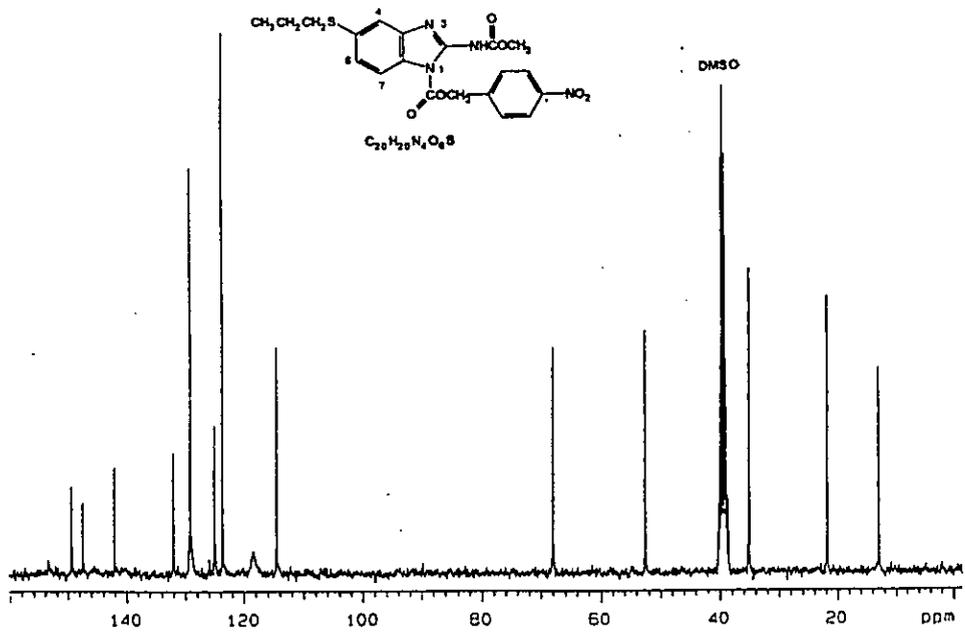
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Regular [M+-Linear]
 RT : 1.65 min Scan# : (32,36) Temp : 64.0 deg.C
 BP : m/z 255.0000 Int. : 119.22
 Output m/z range : 33.0000 to 467.0070 Cut Level : 0.00 %
 162436



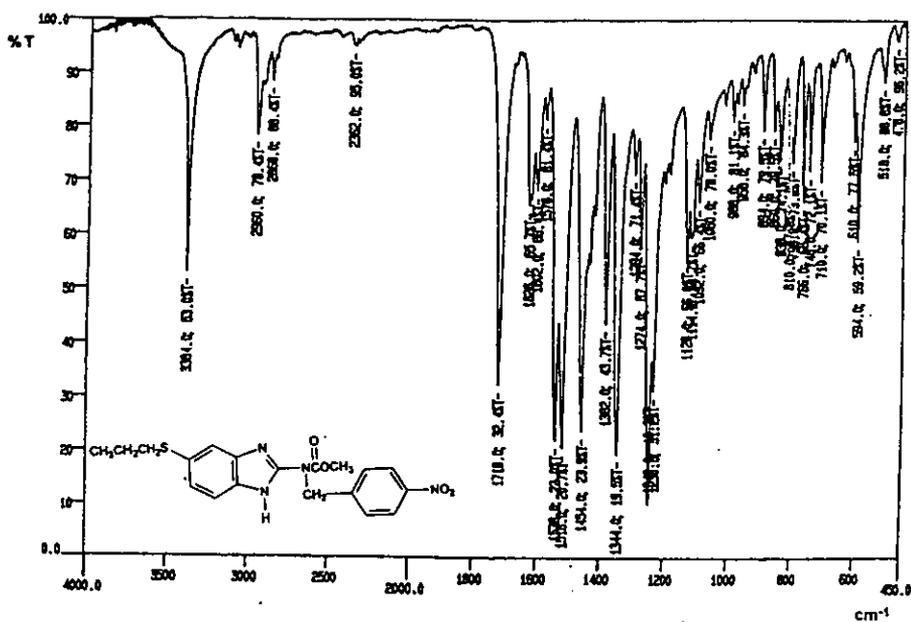
Espectro HETCOR y Masas del 1-[(4-Nitrobenil)oxicarbonil]-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 14a



Espectro IR (KBr) y ¹H RMN del 1-[(4-Nitrobenz)oxicarbonil]-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 14b

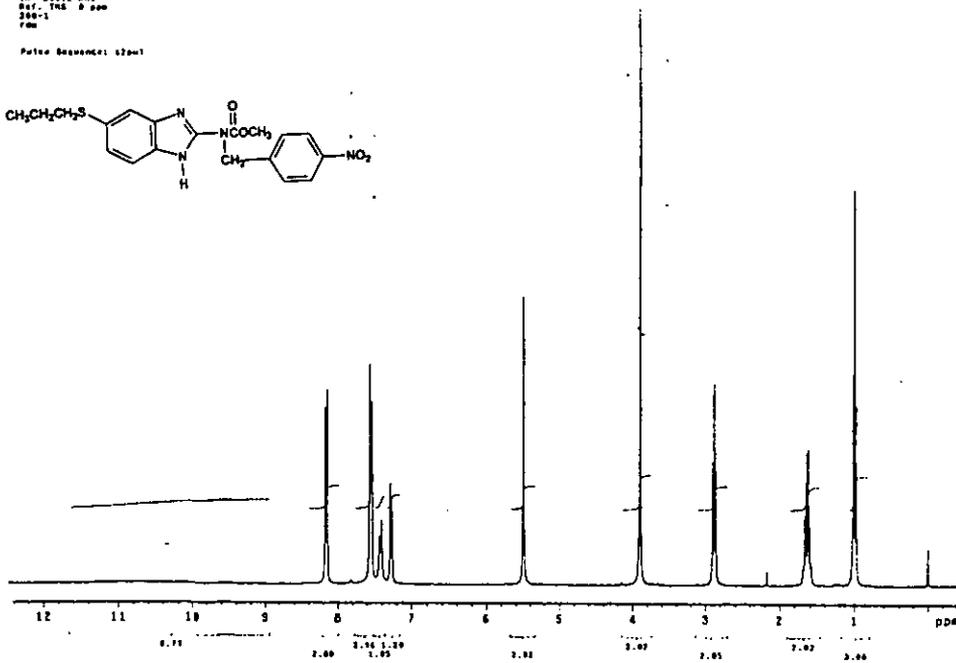
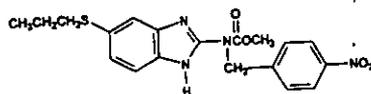


Espectro ¹³C RMN del 1-[(4-Nitrobenzil)oxicarbonil]-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 14b

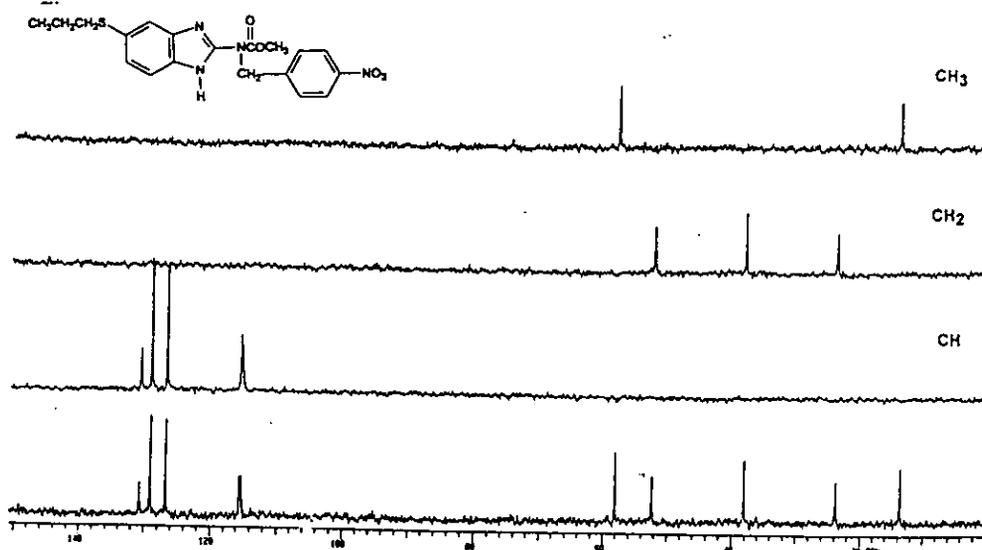


US41
 25/06/2008/1156
 R.C. Francisco Hernandez
 447002/0033
 10 300.0 gms
 Ref. TMS 0 ppm
 300-1
 Fm

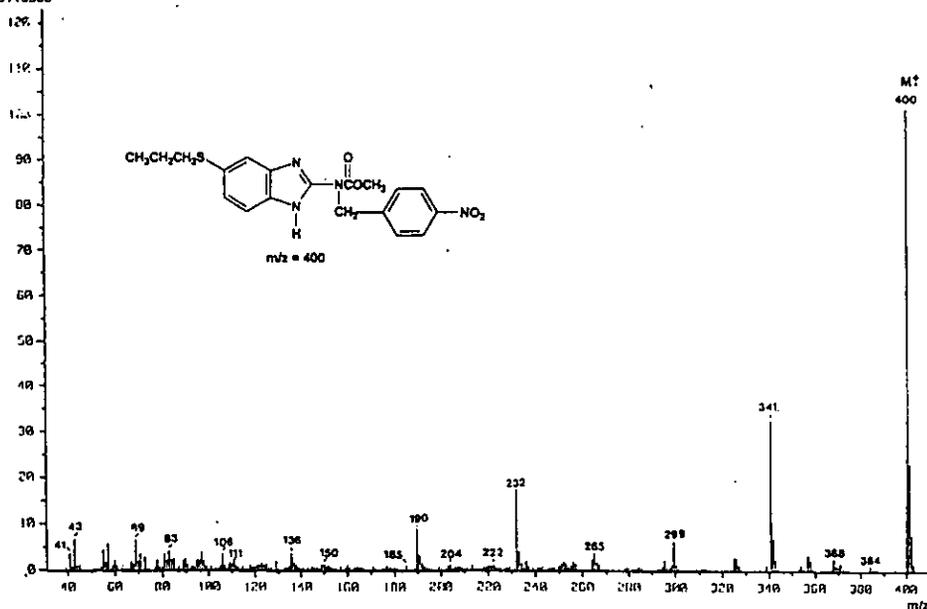
Pulse Sequence: zgpg30



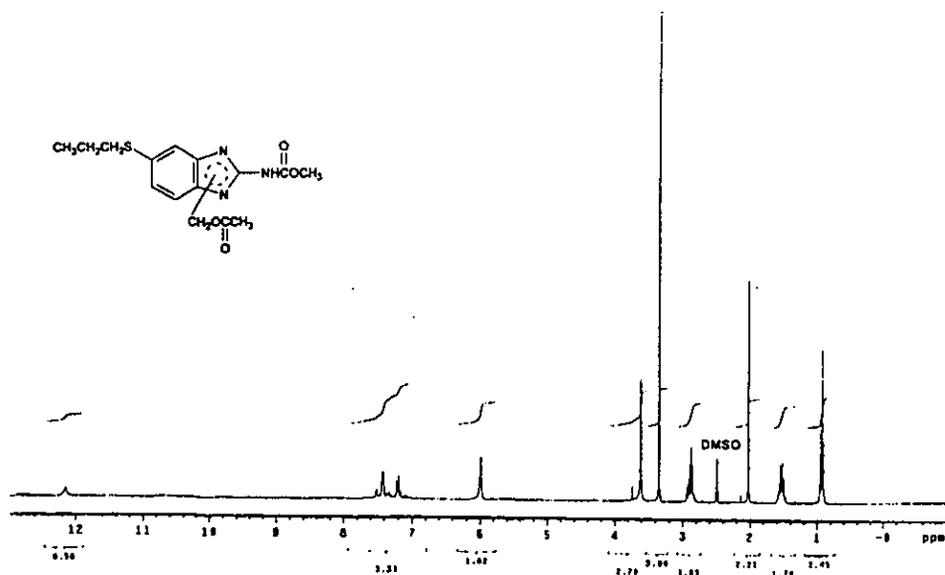
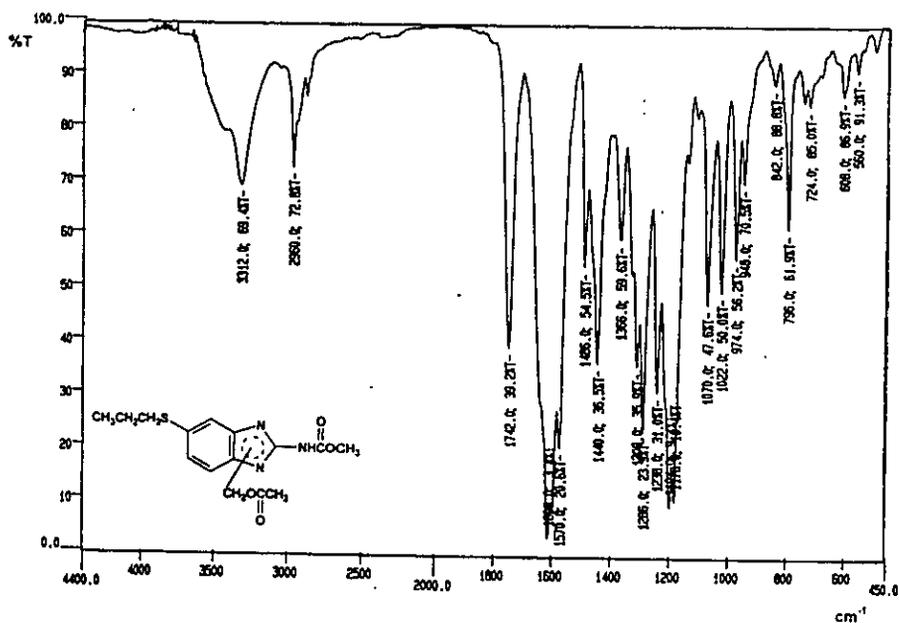
Espectro IR (KBr) y ^1H RMN de N-(4-nitrobenzyl)-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 16



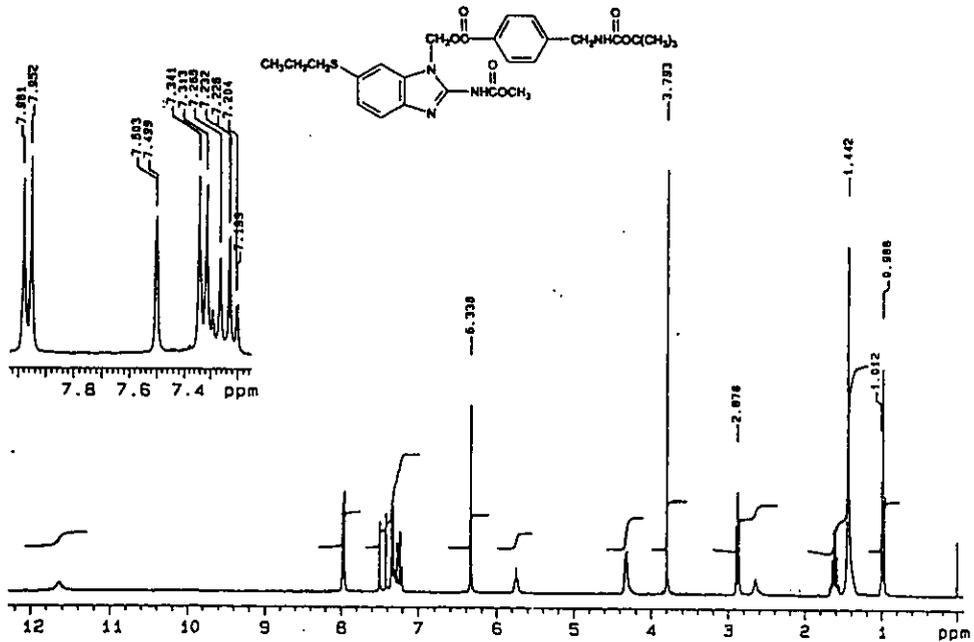
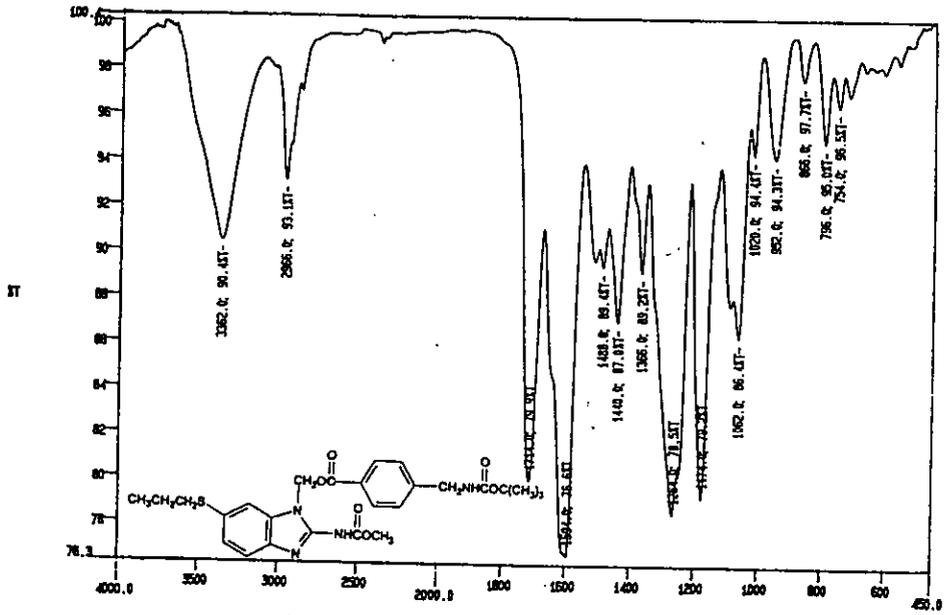
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Regular (F-Linnar)
 RT : 1.48 min Scan# : (20,31)
 DT : m/z 400.0000 Int. : 1617.33 Temp : 67.4 deg.C
 Output m/z range : 33.0000 to 446.2018 Cut Level : 0.00 %
 13112503



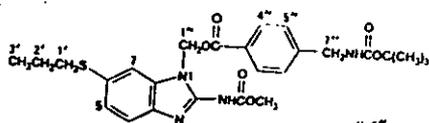
Espectro ¹³C RMN y Masas de N-(4-nitrobenzyl)-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 16



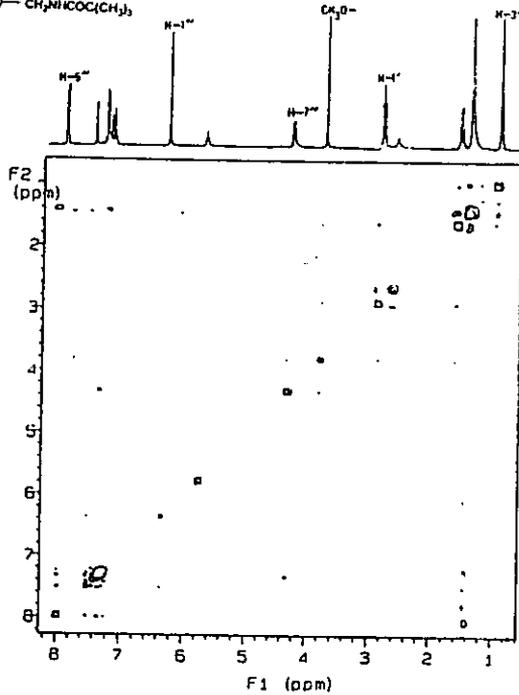
Espectro IR (KBr) y ^1H RMN del 1-Acetiloximetil-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 19



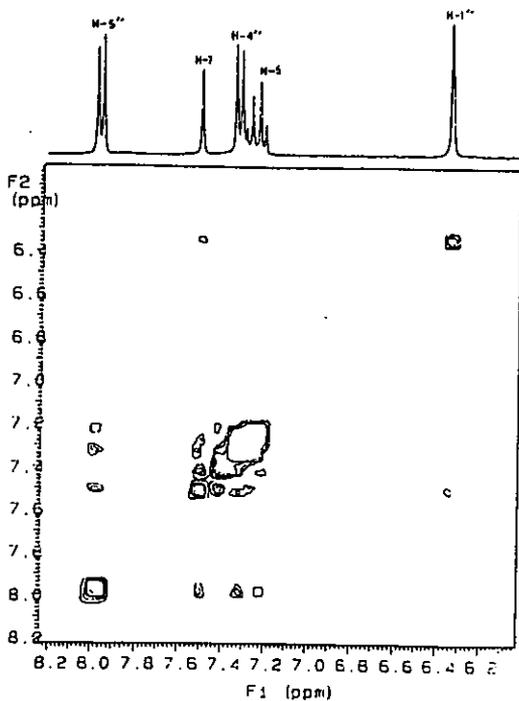
Espectro IR (KBr) y ¹H RMN 1-[4-(*tert*-Butoxicarbonyl)aminometil]benzoximetil]-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (inestable), 24



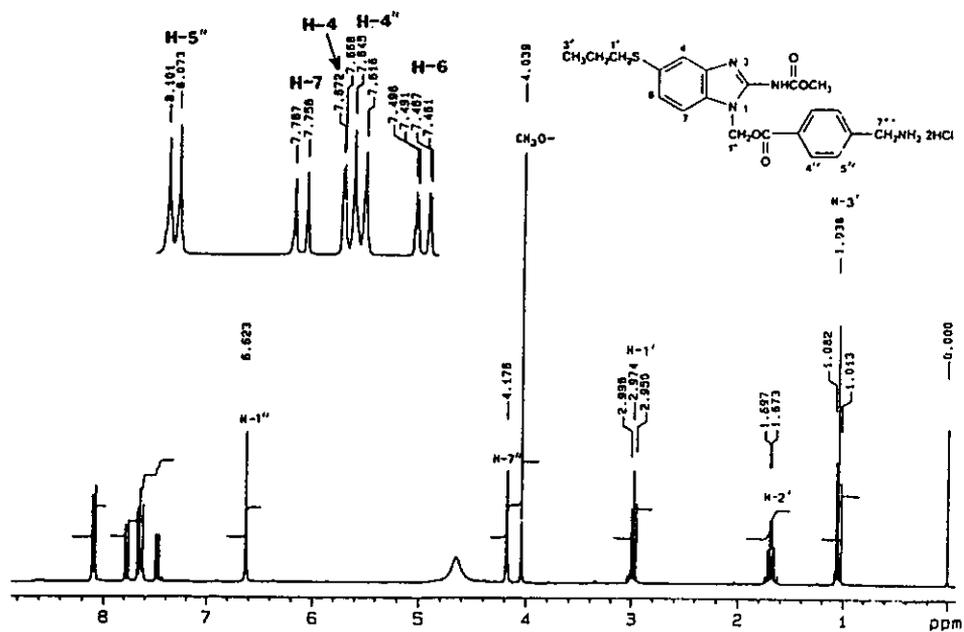
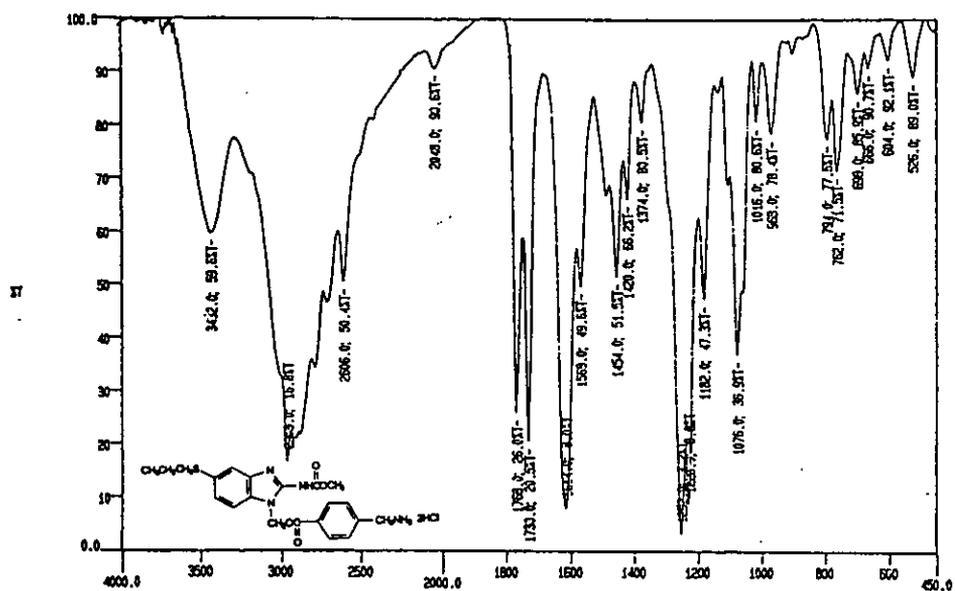
PULSE SEQUENCE nhsy
 OBSERVE M1
 FREQUENCY 299.849 MHz
 SPECTRAL WIDTH 2608.4 Hz
 2D SPECTRAL WIDTH 2608.4 Hz
 ACQUISITION TIME 0.196 sec
 RELAXATION DELAY 2.000 sec
 MIXING TIME 1.000 sec
 PULSE WIDTH 21.8 usec
 TEMPERATURE 25.0 deg. C.
 NO. REPEATITIONS 28
 NO. INCREMENTS 128 X2
 DATA PROCESSING
 GAUSSIAN APOIZATION 0.091 sec
 FT SIZE 1024
 F1 DATA PROCESSING
 GAUSSIAN APOIZATION 0.023 sec
 FT SIZE 1024
 TOTAL ACQUISITION TIME 7.8 hours



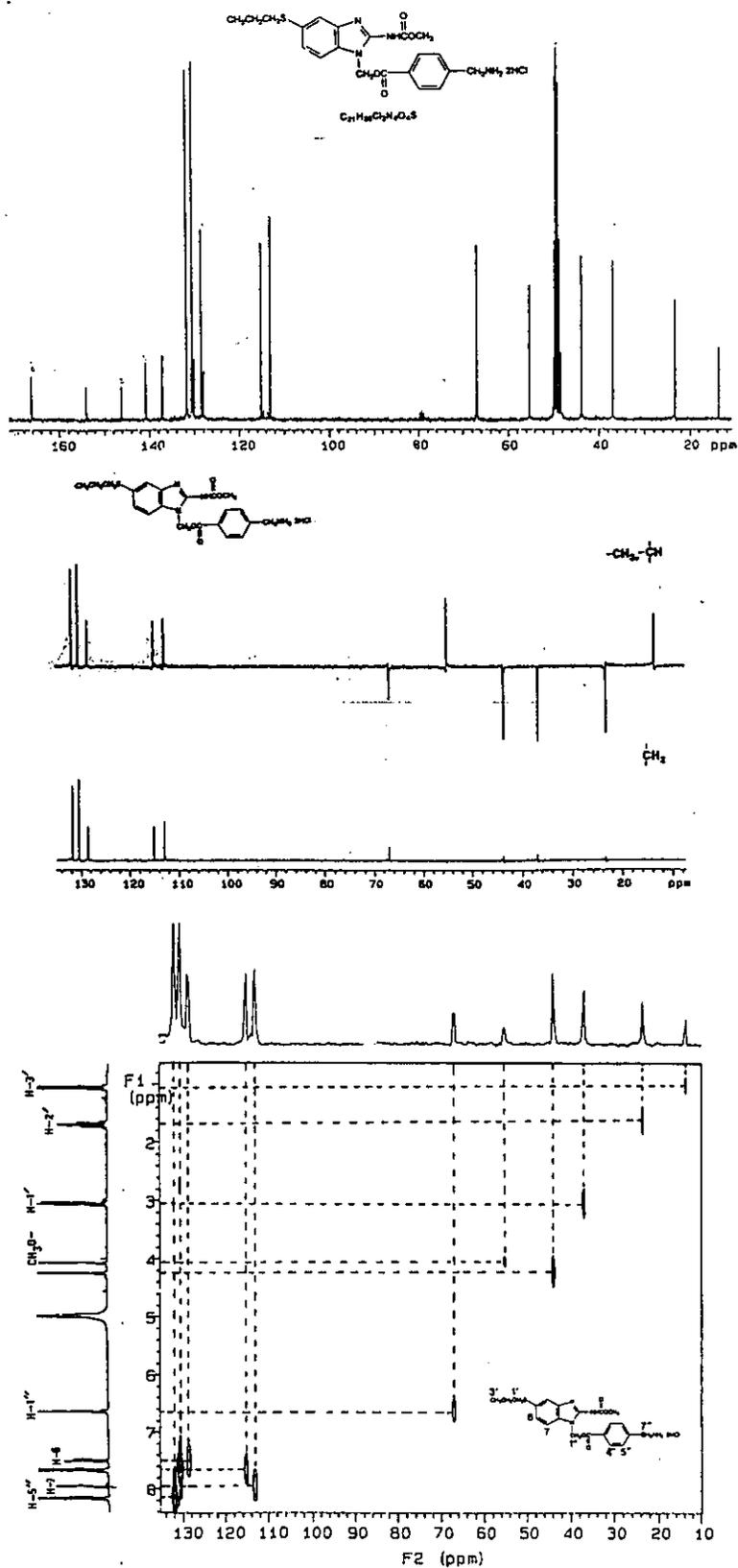
PULSE SEQUENCE nhsy
 OBSERVE M1
 FREQUENCY 299.849 MHz
 SPECTRAL WIDTH 2608.4 Hz
 2D SPECTRAL WIDTH 2608.4 Hz
 ACQUISITION TIME 0.196 sec
 RELAXATION DELAY 2.000 sec
 MIXING TIME 1.000 sec
 PULSE WIDTH 21.8 usec
 TEMPERATURE 25.0 deg. C.
 NO. REPEATITIONS 28
 NO. INCREMENTS 128 X2
 DATA PROCESSING
 GAUSSIAN APOIZATION 0.091 sec
 FT SIZE 1024
 F1 DATA PROCESSING
 GAUSSIAN APOIZATION 0.023 sec
 FT SIZE 1024
 TOTAL ACQUISITION TIME 7.8 hours



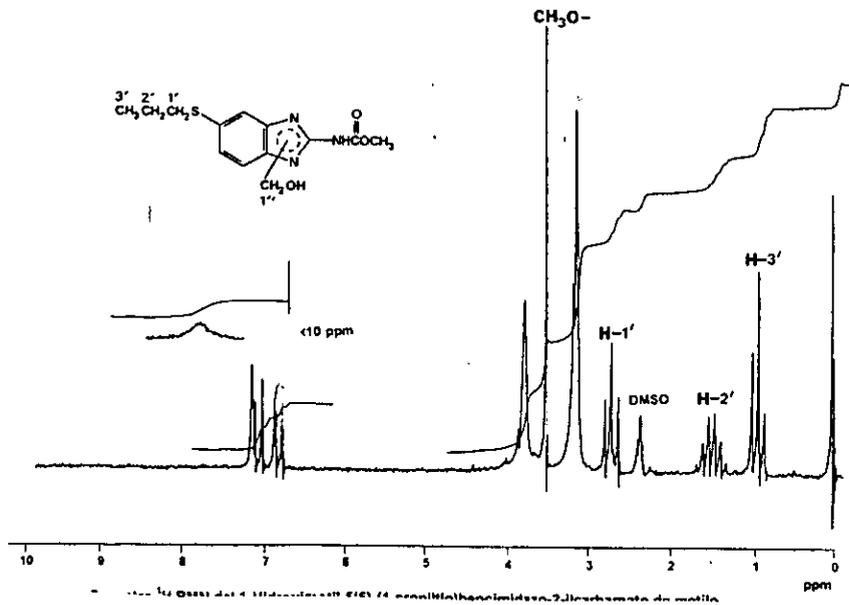
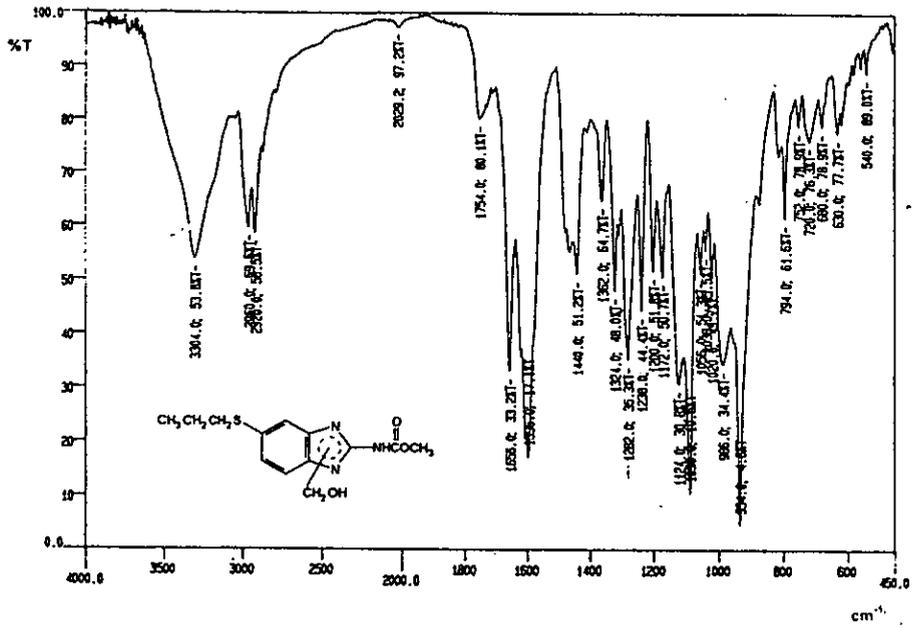
Espectro ¹H RMN (NOESY) de 1-[4-[*tert*-Butoxicarbonyl]aminometil]benzofloximetil]-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo (inestable), 24



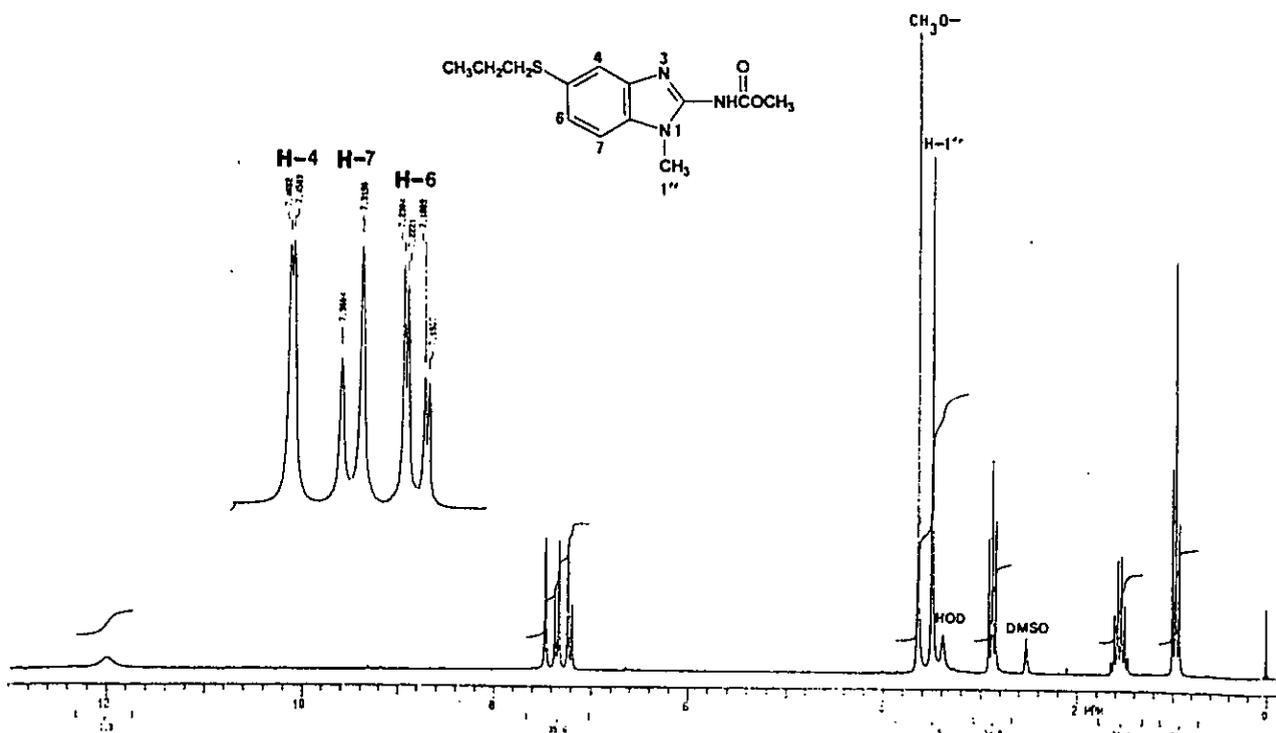
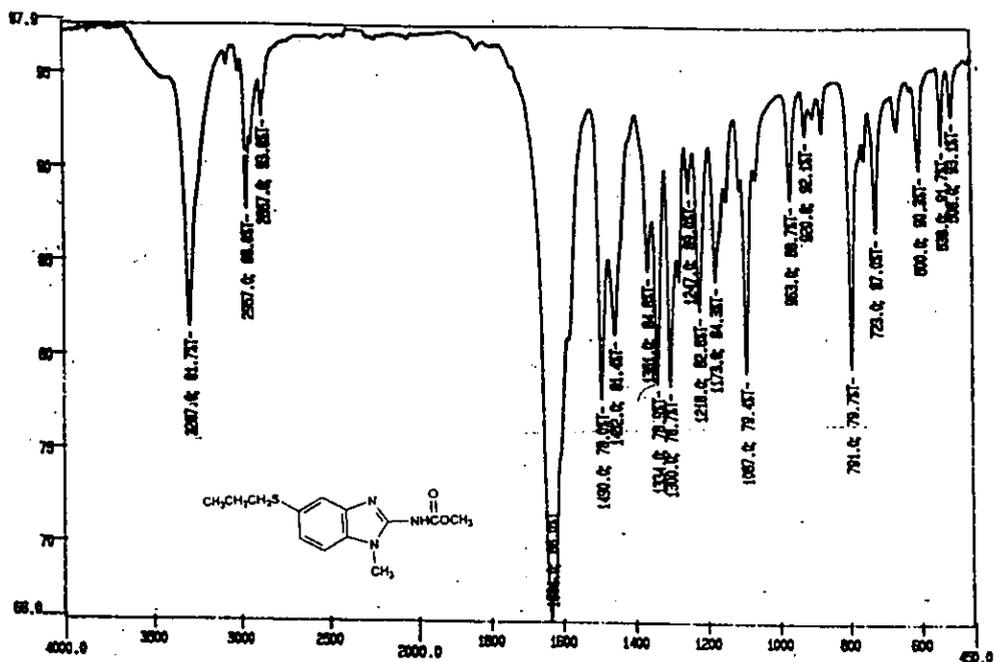
Espectro IR (KBr) y ^1H RMN de Diclorhidrato del 1-[4-(Aminometil)benzoiloximetil]-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 25



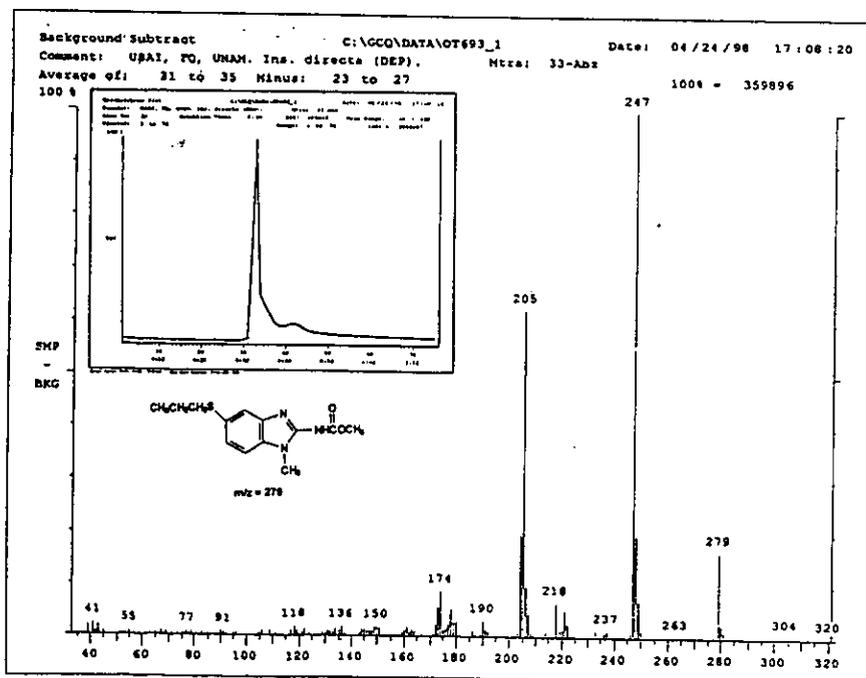
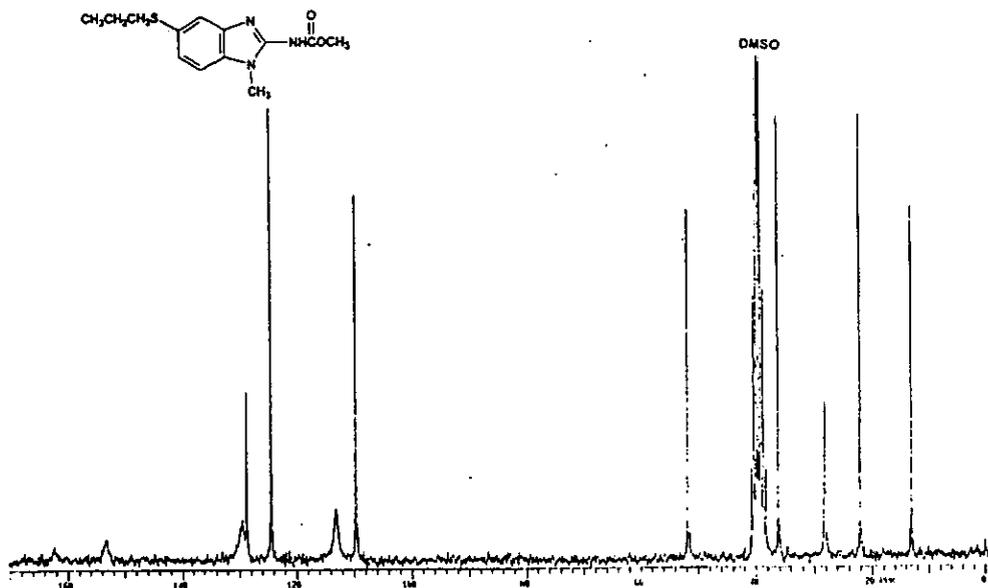
Espectro ^{13}C RMN (DEPT), HETCOR de Diclorohidrato del 1-[4-(Aminometil)benzoiloximetil]-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 25



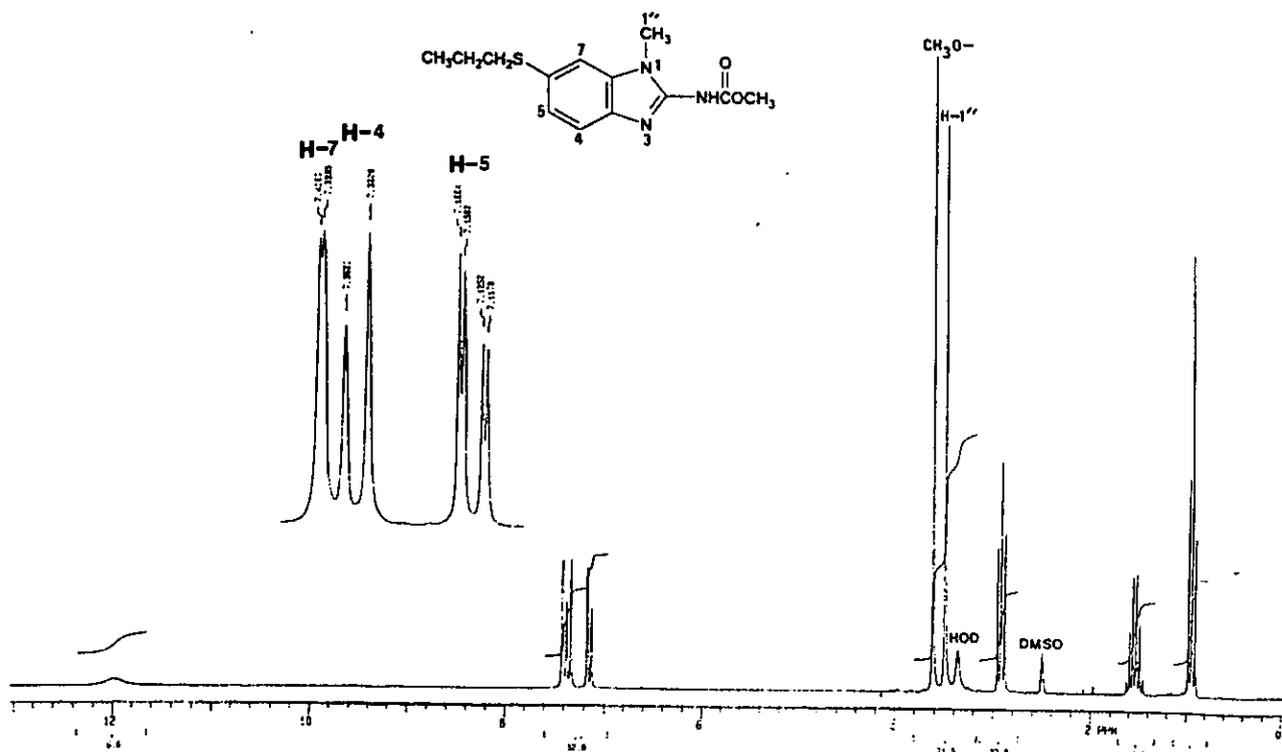
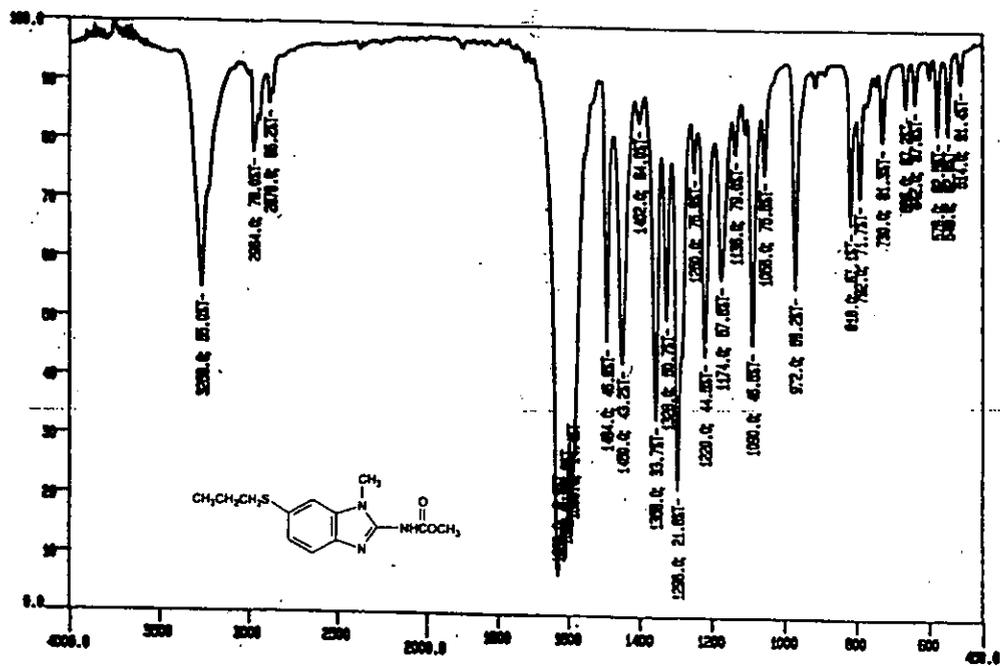
Espectro IR (KBr) y ^1H RMN de 1-(Hidroximetil)-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 26



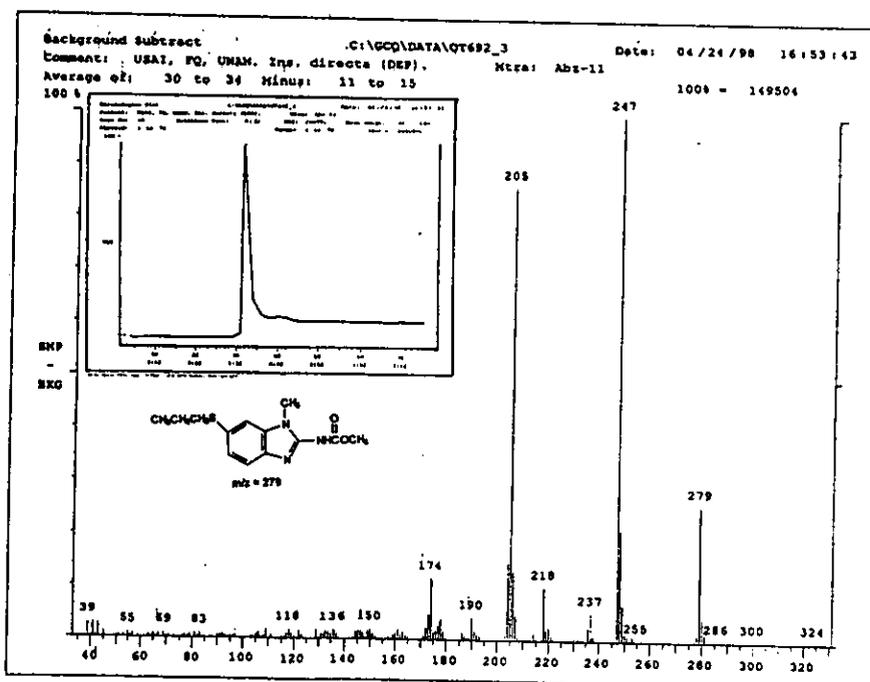
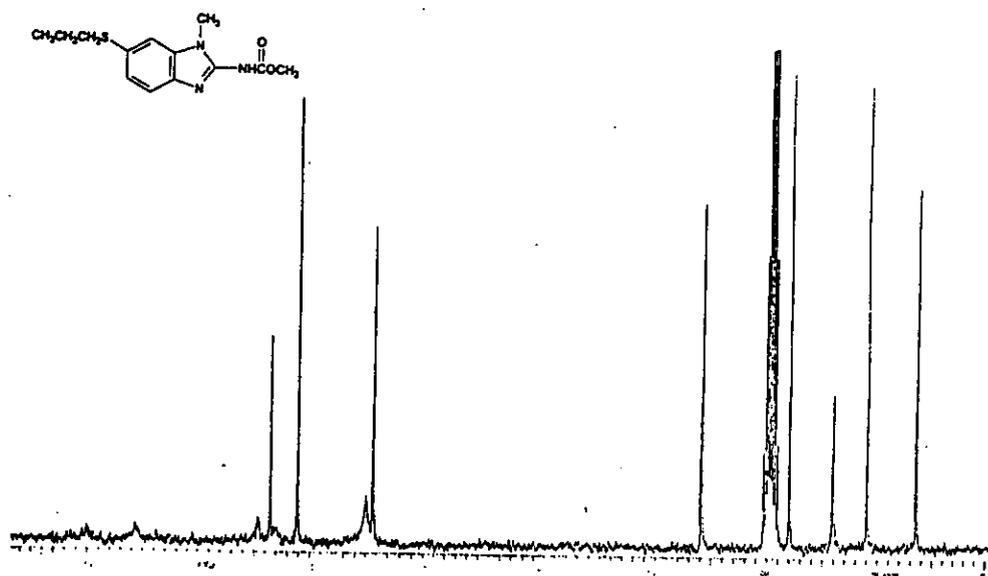
Espectro IR (KBr) y ¹H RMN de 1-Metil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 27



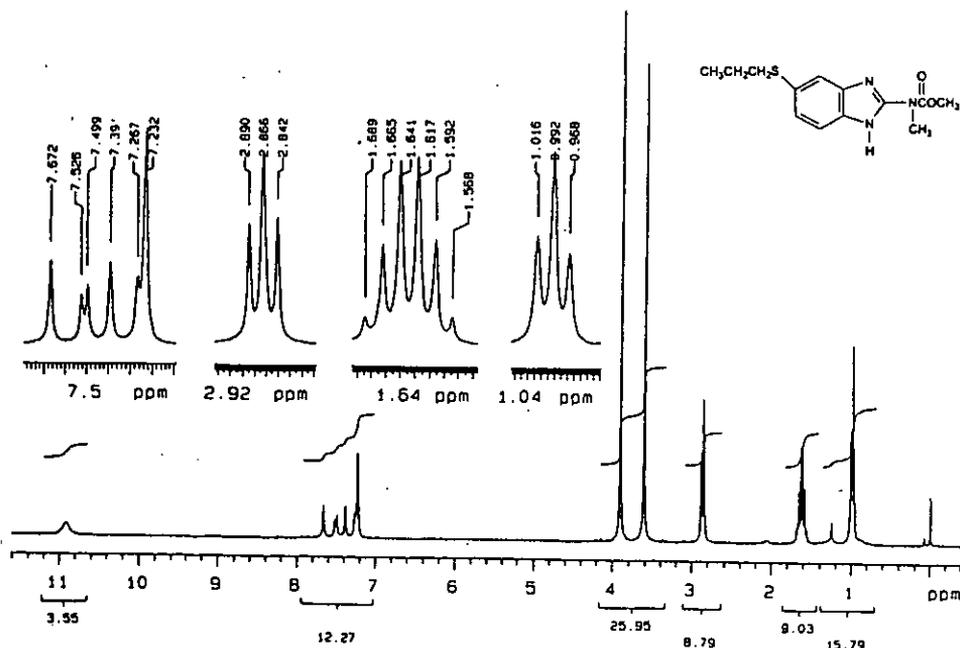
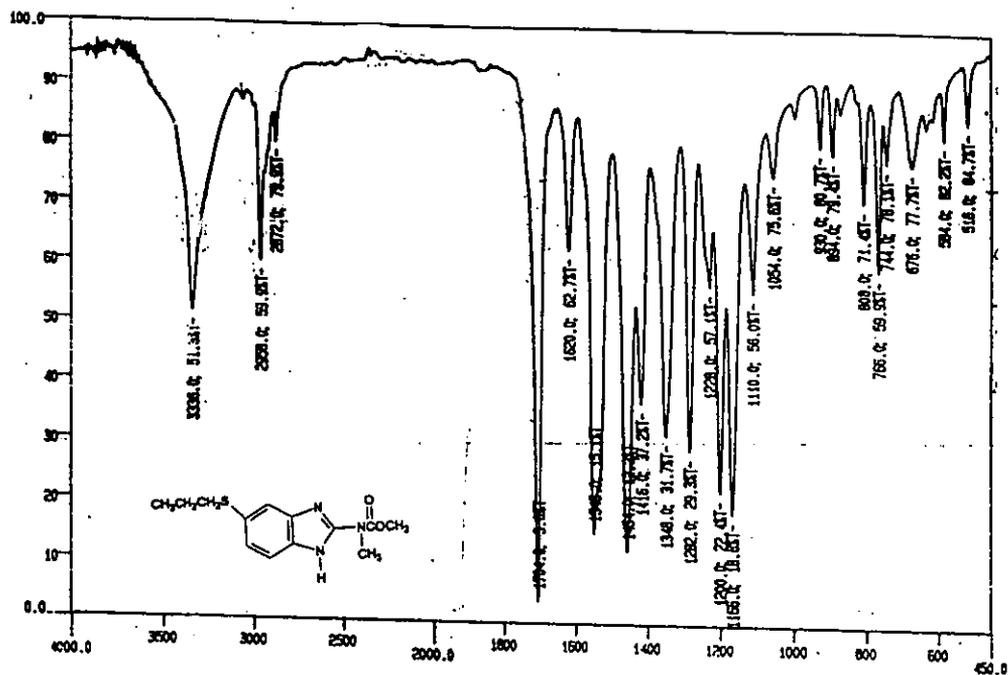
Espectro ¹³C RMN y Masas de 1-Metil-5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 27



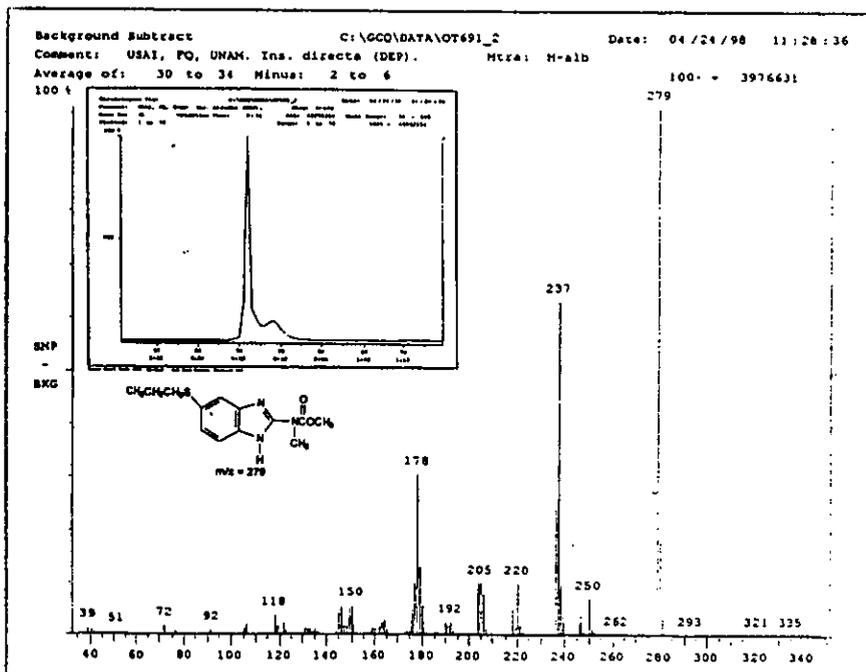
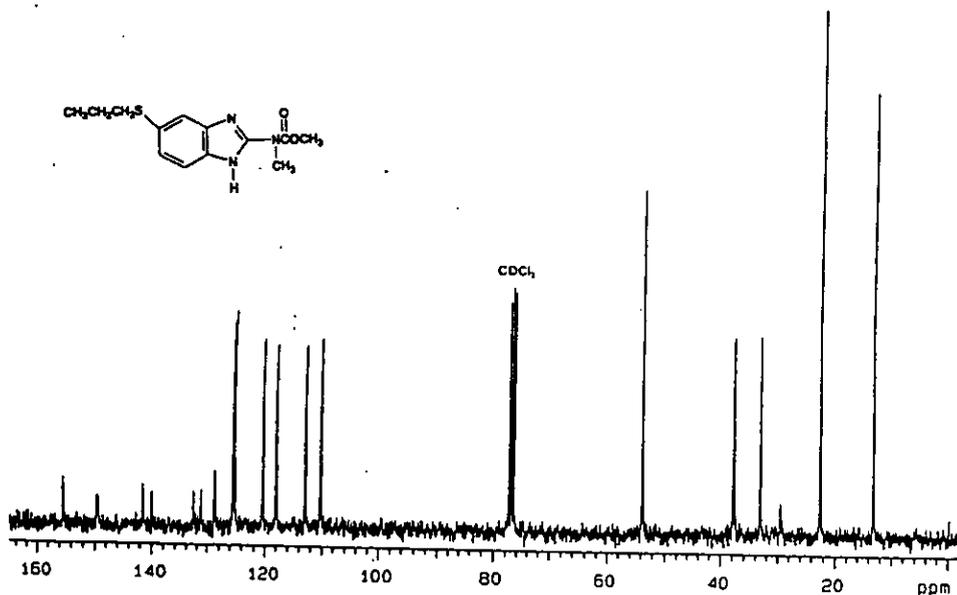
Espectro IR (KBr) y ¹H RMN de 1-Metil-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 28



Espectro ¹³C RMN y Masas de 1-Metil-6-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 28



Espectro IR (KBr) y ¹H RMN de N-Metil-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 29



Espectro ¹³C RMN y Masas de N-Metil-5(6)-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo, 29

PREPARATION OF N-METHOXYCARBONYL-N'-[2-NITRO-4(5)-PROPYL-THIOPHENYL]THIOUREA AS PRODRUGS OF ALBENDAZOLE.

Francisco Hernández-Luis,^a Rafael Castillo,^{a*} Lilian Yépez-Mulia,^b Roberto Cedillo-Rivera,^b Gabriel Martínez-Vázquez,^a Raúl Morales-Hurtado,^b Helgi Jung,^a Mónica Sánchez,^c Alicia Hernández-Campos,^a Noemí Viveros,^b and Onofre Muñoz^b

^a*Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM. C.U., México D.F. México, 04510.*

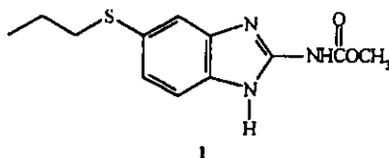
^b*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS. México D.F. México.*

^c*Instituto Nacional de Neurología. Insurgentes Sur. México D.F. México.*

Abstract: N-methoxycarbonyl-N'-(2-nitro-4-propylthiophenyl)thiourea and N-methoxycarbonyl-N'-(2-nitro-5-propylthiophenyl)thiourea, prodrugs of albendazole, have been synthesized. The biotransformation in rats, after oral administration of these prodrugs to albendazole and albendazole sulphoxide, is described.

Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd

Introduction. In the chemotherapy of many human and veterinary parasitic diseases scientists have widely used benzimidazoles,¹ among which albendazole (ABZ, 1) has been successfully used in the treatment of enteral helminthic infections^{2,3} as well as some tissue-dwelling parasitosis, such as trichinellosis,⁴ echinococcosis⁵ and neurocysticercosis.^{2,6} Despite its anthelmintic activity, albendazole has poor oral bioavailability as a result of its low aqueous solubility (ca. 0.5 mg/L)⁷ and its extensive first pass metabolism in the small intestine⁸ and the liver,⁹ where it is rapidly transformed into its main metabolite—albendazole sulphoxide derivative (ricobendazole).^{2,8,9} In the plasma of men, dogs, rats, cattle, and sheep,^{10,11} albendazole is undetectable and the levels of albendazole sulphoxide have shown great intraindividual variability;¹² therefore, high doses and long treatments are necessary to reach therapeutic effects.



An approach to increase the oral bioavailability of benzimidazoles is the production of prodrugs (probenzimidazoles) with higher solubility and adequate lipophilicity.^{13,14} In a previous report, Walchshofer et al.¹⁵ demonstrated that N-methoxycarbonyl-N'-[2-nitro-4-trifluoromethylphenyl]thiourea undergo nitroreduction and cyclization in gerbils to give their corresponding benzimidazole-2-carbamate (Figure 1). In addition, this compound shows anthelmintic activity against *Echinococcus multilocularis*.¹⁵

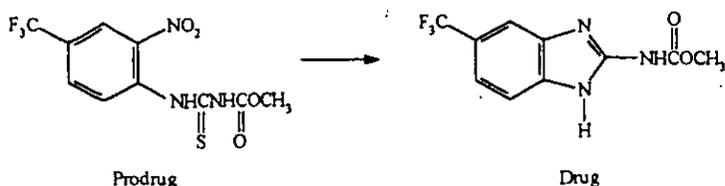


Figure 1

This observation stimulated us to design prodrug **2** (Figure 2), based on an analogy to the phenyl thiourea described above. On the other hand, prodrug **3** was designed in order to find out if there is any preference in the reduction of the nitro group and hence cyclization to give albendazole sulphoxide. In this paper, we report the synthesis of phenyl thioureas **2** and **3** and the bioconversion of these compounds into ABZ and albendazole sulphoxide in rats.

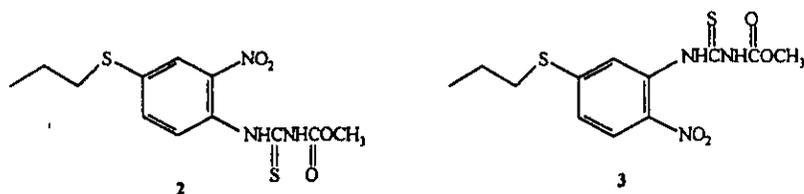


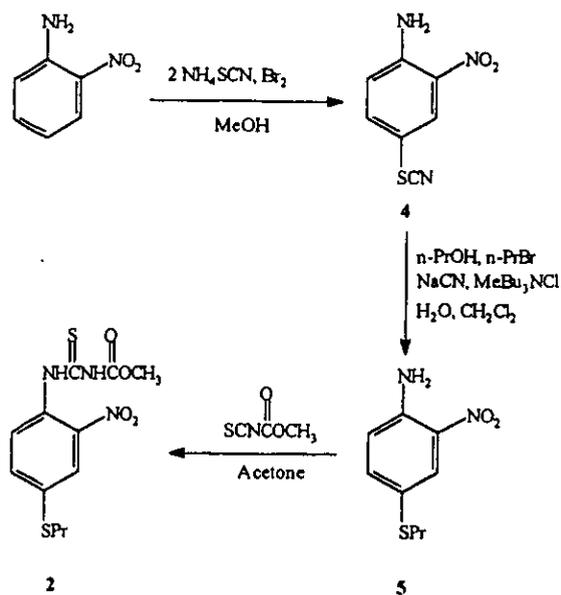
Figure 2

Chemistry. The routes used to synthesize prodrugs **2** and **3** are depicted in Schemes 1 and 2.

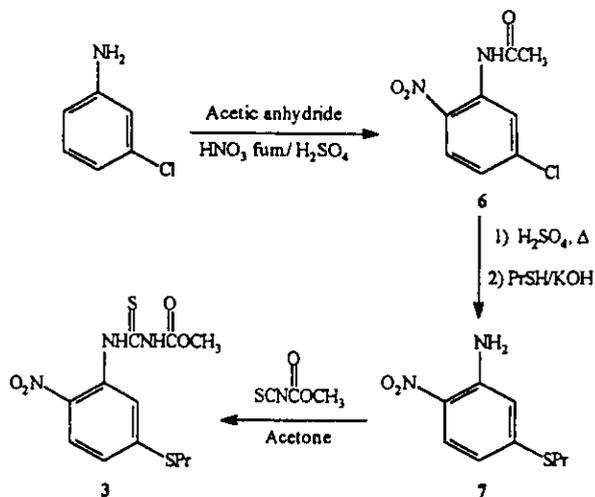
Preparation of N-Methoxycarbonyl-N'-(2-Nitro-4-Propylthiophenyl)Thiourea (2). The synthesis began with the heating of a mixture of 2-nitroaniline, NH_4SCN , and Br_2 in methanol under a nitrogen atmosphere at reflux for an extended period of time.¹⁶ This procedure gave an excellent yield of **4**. The reaction of **4** with a mixture of *n*-PrOH, *n*-PrBr, NaCN, MeBu_3NCl , H_2O , and CH_2Cl_2 gave **5**.¹⁶ The methoxycarbonyl isothiocyanate,¹⁵ formed in situ from potassium thiocyanate and methyl chloroformate in acetone, was allowed to react with **5** to produce the phenyl thiourea **2**.

Preparation of N-Methoxycarbonyl-N'-(2-Nitro-5-Propylthiophenyl)Thiourea (3). The synthesis of this prodrug began with the nitration of 3-chloroaniline by using fuming nitric acid and acetic anhydride to give **6**.¹⁷ The reaction of **6** in hot H_2SO_4 gave 3-chloro-6-nitroaniline, which was reacted with PrSH/NaOH in ethylene glycol to give **7**.¹⁷ The methoxycarbonyl isothiocyanate,¹⁵ formed as above, was allowed to react with **7** to produce the phenyl thiourea **3**. Both prodrugs, **2** and **3**, were recrystallized from EtOH- H_2O .

Scheme 1.



Scheme 2.



Biological Assay. ABZ was administered as a commercial suspension (Zentel), and the solutions of prodrug 2 and prodrug 3 were freshly prepared in ethanol, Tween 80, water (50:25:25) at room temperature. Doses of 0.037 mmol/Kg of each compound were given orally to Sprague Dawley rats. Blood samples were obtained

from the external jugular of 2 rat/group, each from 2 h to 12 h post-dose. The plasma was separated by centrifugation and extracted with a Sep-Pak C18 cartridge. Samples were analyzed by HPLC, as previously described by Hurtado *et al.*¹⁸

Results and Discussion

The mp, IR, and ¹H NMR data of compounds 4, 5, 6, and 7 were consistent with those reported in the literature.^{16,17} The structures of prodrugs 2 and 3 were established by IR, MS, ¹H NMR, and ¹³C NMR. Elementary analyses were within ± 0.4% of calculated values.

Table 1. Physical data of the prodrugs 2 and 3.

Prodrug	Yield (%)	mp (°C)	Spectroscopic data
2	35	121-122	IR (KBr) ν : 3170, 1732, 1566, 1048, cm^{-1} . ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ : 1 (t, 3H, -CH ₃), 1.7 (m, 2H, -CH ₂ -), 3.1 (t, 3H, -CH ₂ S), 3.7 (s, 3H, CH ₃ O-), 7.6 (dd, 1H, H-C5), 7.8 (d, 1H, H-C6), 7.9 (d, 1H, H-C3), 11.6 (s, 1H, -NH), 11.7 (s, 1H, NH), ppm. ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ : 13.14 (CH ₃ -), 21.66 (-CH ₂ -), 33.56(-CH ₂ S-), 53.19 (CH ₃ O-), 122.29 (C6), 129.14 (C1), 130.50 (C3), 131.71 (C5), 137.40 (C4), 144.45 (C2), 153.85 (C=O carbamate), 180.137 (C=S thiourea). MS (CI, CH ₄), m/z : 330 (M ⁺ +1) (100%). Anal. (C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂) C, H, N.
3	48	122	IR (KBr) ν : 3186, 1736, 1578, 1038, cm^{-1} . ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ : 1.0 (t, 3H, CH ₃), 1.7 (m, 2H, -CH ₂ -), 3.1 (t, 2H, -CH ₂ S), 3.8 (s, 3H, CH ₃ O-), 7.3 (dd, 1H, H-C4), 7.9 (d, 1H, H-C6), 8.0 (d, 1H, H-C3), 11.6 (s, 1H, -NH-), 12.1 (s, 1H, -NH-), ppm. ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ : 13.117 (CH ₃ -), 21.67 (-CH ₂ -), 32.66 (CH ₂ S-), 53.14 (CH ₃ O-), 124.03 (C6), 125.5 (C4, C3), 132.97 (C1), 139.50 (C2), 145.96 (C5), 153.67 (C=O carbamate), 179.80 (C=S thiourea). MS (CI, CH ₄), m/z : 330 (M ⁺ +1) (100%). Anal. (C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂) C, H, N.

Compound 4 was prepared in good yield (90%) according to the procedure described in the literature.¹⁶ However, compound 5 was isolated in low yield (47%) due to difficulties that appeared during the purification by recrystallization from hexane of this low-melting compound. The last compound of this series, prodrug 2, gave low yields (37%), probably due to the diminished nucleophilic character of the amino group conjugated to the *o*-nitro group. Another problem encountered was the formation of a less polar secondary product which was eliminated during the recrystallization. In an effort to increase the yield of prodrug 2 the solvent and temperature of the reaction were changed, but the same results were obtained.

Compound 6 was prepared with an excellent yield in the one-step reaction by using fuming nitric acid in acetic anhydride without isolation of the intermediate amide. However, 6 had to be hydrolyzed with hot concentrated

H₂SO₄ before the nucleophilic substitution with 1-propanethiolate in ethylene glycol. Prodrug 3 was obtained in low yield (30%) due to the same difficulties presented in the preparation of 2.

In relation to the biotransformation studies, all rats survived after the administration of prodrugs, and no signs of toxicity were observed. It was evident by HPLC that prodrugs 2 and 3 suffered bioconversion to ABZ and its metabolite (Table 2).

Table 2. Bioconversion of prodrugs in rats.

Time (h)	1		2		3	
	ABZ-S (µg/mL)	ABZ (µg/mL)	ABZ-S (µg/mL)	ABZ (µg/mL)	ABZ-S (µg/mL)	ABZ (µg/mL)
2	0.5930	0.055	0.1802	d	nd	nd
2	0.2450	d	0.1088	d	nd	nd
4	0.3084	d	0.0927	nd	0.0960	nd
4	0.1935	d	0.0958	nd	nd	nd
6	0.2875	d	nd	d	nd	0.1500
6	0.4081	d	0.1633	nd	nd	0.7450
8	0.2803	d	nd	d	d	0.0792
8	0.1113	d	nd	d	nd	nd
10	0.2696	d	nd	d	nd	d
10	0.1297	d	nd	d	0.0889	d
12	3.4802	0.0980	0.2704	d	0.1622	nd
12	0.5919	d	0.2704	d	nd	nd

ABZ: albendazole; ABZ-S: albendazole sulphoxide; d = detectable; nd = not detectable.

Although prodrugs 2 and 3 did not reach an equivalent concentration of ABZ and ABZ sulphoxide as ABZ itself, prodrug 2 was more efficiently biotransformed than prodrug 3. Also, the production of ABZ and its metabolite from prodrug 2 resembles ABZ itself. In addition, a great variability in the amount of ABZ detected/ ABZ sulphoxide in plasma samples taken at the same time from animals treated with the prodrugs was evident. However, the same variability was observed with ABZ itself. The data obtained in this study show that prodrug 3 produced ABZ after 6 h and albendazole sulphoxide after 10 h. This suggests that the reduction of the nitro group is diminished by the electron-donating capacity of the propylthio group in the para position, effect that is not exerted in prodrug 2. It is likely then, that the biotransformation of prodrugs 2 and 3 is initiated with the reduction of the nitro group by the intestinal microflora followed by intramolecular cyclization of the molecules. Studies are currently being carried out in order to evaluate the anthelmintic activity of these prodrugs.

Acknowledgment. This study was sponsored by project PADEP-UNAM 05358. We are very thankful to: Alejandrina Acosta, Irene Audelo, Graciela Chávez, Marcela Gutiérrez from Chemistry School, UNAM and the Chemistry Institute, UNAM, for the determination of all spectra.

References.

1. Singh, K. S.; Sharma, S. *Med. Res. Rev.* 1991, 11, 581.
2. Sharma, S. *Adv. Drug Res.* 1994, 25, 104.
3. Albonico, M.; Smith, P.G.; Hall, A.; Chwaya, H.M.; Alawi, K.S.; Savioli, L. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994, 88, 585.
4. Bany, J.; Lach, J.; Golinska, Z. *Wiad. Parazytol.* 1992, 38, 143.
5. Wen, H.; Zhang, H.W.; Muhmut, M.; Zou, P.F.; Craig, P.S. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994, 88, 49.
6. Webbe, G. *Pharmacol. Ther.* 1994, 64, 175.
7. del Estal, J.L.; Alvarez, A.I.; Villaverde, C.; Prieto, J.G. *Int. J. Pharm.* 1993, 91, 105.
8. Villaverde, C.; Alvarez, A.I.; Redondo, P.; Voces, J.; del Estal, J.L.; Prieto, J.G. *Xenobiotica* 1995, 25, 433.
9. Galtier, P.; Alvinerie, M.; Delatour, P. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47, 447.
10. Delatour, P.; Benoit, E.; Besse, S.; Boukra A. *Xenobiotica* 1991, 21, 217.
11. Lanusse, C.E.; Nare, B.; Prichard, R.K. *Xenobiotica* 1993, 23, 285.
12. Prieto, J.G.; Justel, A.; del Estal, J.L.; Barrio, J.P.; Alvarez, A.I. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, 100C, 397.
13. Lacey, E. *Int. J. Parasitol.* 1988, 25, 886.
14. Delatour, P.; Cure, M.C.; Benoit, E.; Garnier, F. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1986, 9, 230.
15. Walchshofer, N.; Delabre-Defayolle, I.; Paris, J. *J. Pharm. Sci.* 1990, 79, 606.
16. Walter, T.J.; Balton-Rouge, La. U.S. Patent 4 152 522, 1979; *Chem. Abstr.* 1979, 91, 57014r
17. Gyurik, R.J.; Theodorides, V.J. U.S. Patent 3 915 986, 1975; *Chem. Abstr.* 1975, 84, 31074r
18. Hurtado, M.; Sanchez, M.; Jung, H.; Medina, M.T.; Sotelo, J. *J. Chromatogr.* 1989, 494, 403.

(Received in USA 24 June 1996; accepted 23 August 1996)