



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 1-FOSFONOOXIMETILBENCIMIDAZOL,
COMO MODELO DE PROFÁRMACOS ANTIPARASITARIOS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Norma Beatriz Olguín López



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Rafael Castillo Bocanegra
VOCAL: Profa. Margarita Chávez Martínez
SECRETARIO: Profa. Elena Guadalupe Ramírez López
1er. SUPLENTE: Prof. José Guadalupe López Cortés
2° SUPLENTE: Prof. Rubén Antonio Romo Mancillas.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

**FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, UNAM
EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, LABORATORIO 122, CONJUNTO E.
CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, DF.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Rubén Antonio Romo Mancillas.

SUSTENTANTE:

Norma Beatriz Olguín López

AGRADECIMIENTOS

“La gratitud, como ciertas flores, no se da en la altura y mejor reverdece en la tierra buena de los humildes”

José Martí

A la mejor fuente de conocimiento que pude haber tenido, a mi segunda casa: a la UNAM

Al Dr. Rafael Castillo. Por la confianza al permitirme incorporarme a su equipo de trabajo, por todo el apoyo recibido durante mi estancia en el 122, pero sobre todo por ser el mejor ejemplo de profesionalismo y de vida.

Al personal de la Unidad de Servicios de apoyo a la Investigación por la realización de las pruebas espectrométricas y espectroscópicas de este trabajo.

A DGAPA-PAPIIT por los apoyos recibidos para este proyecto IN227610.

A Antonio Romo por el gran apoyo para la realización de este trabajo, por su paciencia y las geniales ideas aportadas.

A Miguel Flores por su apoyo para la realización de los espectros de RMN y también por su valiosa amistad.

A Lalo y Silvia por brindarme su amistad y por los inolvidables momentos que pase con ustedes.

A Gisela, Norma A, Rodrigo Aguayo, Carlos, Irene, Peter, Pedro, Paulina, Oscar, Rodrigo Arroyo y todo el grupo del 122, porque sin duda hicieron especial mi estancia en el laboratorio.

DEDICATORIAS

“Todo aquel que está seriamente comprometido con el cultivo de la ciencia, llega a convencerse de que en todas las leyes del universo esta de manifiesto un espíritu infinitamente superior al hombre, y ante el cual, nosotros con nuestros poderes debemos sentirnos humildes”. Albert Einstein

- A Dios por la vida y por todo cuanto poseo.

“Cuán grande riqueza es, aun entre los pobres, el ser hijo de buen padre”. [Juan Luis Vives](#)

- A mi papá
Por el constante apoyo, los enormes sacrificios, la gran paciencia, la inigualable confianza, los sabios consejos, los múltiples e incomparables abrazos y el amor inmenso que siempre nos has demostrado a tu familia. Eres el mejor papá del mundo.

“Muchas maravillas hay en el universo; pero la obra maestra de la creación es el corazón materno”. [Ernest Bersot](#)

- A mi mamita:
Por ser el mejor ejemplo de mujer, hija y madre; el mejor ejemplo de fortaleza, de valor, de tenacidad, de confianza y de amor. Por todos los sacrificios, el enorme esfuerzo y los constantes regañones (ah, perdón..los constantes consejos); porque gracias a ti soy lo que soy ahora. Pero sobre todo, por ser el pilar que nunca ha dejado caer a nuestra familia.
- A Bary
Por ser mi compañera de alegrías, de juegos, de aventuras, de locuras, de tristezas y mi confidente. Por estar ahí cuando te he necesitado, por escucharme, por el cariño inmenso que me has demostrado y el gran ejemplo de fortaleza y valor que siempre has sido.
- A Ari
Por llegar a alegrar nuestras vidas y darnos a todos el motivo para seguir adelante. Por los inigualables momentos que hemos pasado contigo. Por ser mi gran amiga y enseñarme a reír y llorar con las cosas más insignificantes pero con mayor valor, y sobre todo por el enorme cariño que siempre nos hemos tenido.

Porque Dios me dio a la mejor familia que pude haber tenido sin duda alguna, gracias familia porque sin ustedes nada de esto sería posible, el sacrificio de todos ha rendido frutos y hoy solo me queda agradecerles y recordarles que este es un triunfo colectivo.

- A mi abuelita Irene, a mi tía Bary, a mi tío Güero, a Chabe, a mi abuelo Miguel, a mi tío Alejandro, a Viry, Aarón, Edwin, Liz y a toda la familia por el enorme apoyo y las palabras de aliento que siempre tuvieron para mí.

“Un verdadero amigo es alguien que te conoce tal como eres, comprende dónde has estado, te acompaña en tus logros y tus fracasos, celebra tus alegrías, comparte tu dolor y jamás te juzga por tus errores”.

- A la familia que me llevo de mi segunda casa.
 - ✓ Adrixxx, por estar siempre a mi lado cuando más te necesite apoyándome y escuchándome. Por el sin fin de pláticas, de risas, de bostezos, de reflexiones y de locuras que vivimos juntas. Ah! y por las que nos faltan.

- ✓ Julián, por compartir y dejarme compartir una importante etapa de nuestras vidas, por saber escucharme y decirme, en muchas ocasiones, el consejo que necesitaba escuchar.
- ✓ Ranaaaaa, (aquí está tu dedicatoria especial), por compartir toda una filosofía de vida (oye ya podemos escribir un libro, jajajajaja, bueno otro porque recuerda que yo ya tengo uno). Por la incontable cantidad de veces que me hiciste reír y me escuchaste.
- ✓ Mony, por ser esa gran amiga incondicional que todos deseamos tener.
- ✓ Robert, Marquito, Nidia, Sergio, Lily, Darío, Jazmín, Curiel, Nancy, Sayra, Edgar y seguramente olvide a alguno, que más que compañeros de clase llegaron a ser grandes amigos.

“Al verdadero amor no se le conoce por lo que exige, sino por lo que ofrece”. Jacinto Benavente

- A Luis.
Por ser la persona que regresó para quedarse y cambiarme la vida con su amor. Por el inmenso amor que despertó en mí en el momento indicado.

ÍNDICE

1.0. INTRODUCCIÓN	1
2.0. ANTECEDENTES	2
2.1. Fasciolosis	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i>	3
2.1.3. Importancia de la fasciolosis	4
2.1.4. Tratamiento y control de la fasciolosis	5
2.2. Profármacos y el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos	6
2.2.1. Definición de profármaco	8
2.2.2. Clasificación de los profármacos	8
2.2.3. Grupos funcionales ideales susceptibles para el diseño de profármacos	9
2.3. La estrategia profármaco como una solución a los problemas de solubilidad de los carbamatos bencimidazólicos	12
2.4. Las ventajas de usar grupos fosfato en los profármacos	13
2.5. Los profármacos en la actualidad	14
3.0. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	15
3.1. Planteamiento del problema	15
3.2. Hipótesis	15
3.3. Objetivos	16
4.0. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
4.1. Instrumentación y materiales	17
4.2. Preparación del derivado fosfonoximetilbencimidazol NOR-1	18
4.2.1. Procedimiento experimental para la síntesis de NOR-1	19
4.3. Preparación del derivado fosfonoximetilbencimidazol NOR-2	23
4.3.1. Procedimiento experimental para la síntesis de NOR-2	24
5.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. Síntesis de materias primas como precursores de los modelos de profármacos.	29
5.2. Identificación de las materias primas	31
5.3. Síntesis del [2-(Metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metanol (IV)	31
5.4. Síntesis del [5,6-Dicloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metanol	33
5.5. Identificación de los intermediarios hidroxilados	35
5.6. Síntesis del modelo de profármaco NOR-1	36
5.6.1. Síntesis e identificación de NOR-1	38
5.6.2. Síntesis e identificación de NOR-2	43
6.0. CONCLUSIONES	45

7.0. EXPECTATIVAS	46
8.0. REFERENCIAS	47
9.0. ESPECTROS	52

Índice de Figuras, Esquemas y Tablas

Figura 1. <i>Fasciola hepatica</i> en edad adulta.....	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i>	4
Figura 3. Ejemplos de fármacos bencimidazólicos.....	5
Figura 4. El concepto de profármaco usando un modificador	8
Figura 5. Resumen de los grupos susceptibles a ser derivatizados.....	11
Figura 6. Mecanismo de activación de los profármacos que contienen el grupo fosfato.....	14
Figura 7. Modelos de profármacos a sintetizar.....	16
Figura 8. Resumen de los principales compuestos en esta tesis.....	29
Figura 9. Rangos de desplazamiento químico de fósforo de acuerdo a su entorno químico.	38
Figura 10. Ejemplos de algunos grupos fosfato y sus desplazamientos.	40
Figura 11. Formas de los desplazamientos de fosforo según el entorno químico en que se encuentran	41
Esquema 1.	18
Esquema 2.	21
Esquema 3.	22
Esquema 4.	24
Esquema 5.	27
Esquema 6.	28
Esquema 7. Mecanismo propuesto para la formación del intermediario xantato de etilo.....	29
Esquema 8. Mecanismo propuesto para la ciclocondensación de la <i>o</i> -fenilendiamina con el intermediario xantato de etilo..	30
Esquema 9. Mecanismo propuesto para la <i>S</i> -metilación del 2-Mercapto-1 <i>H</i> -bencimidazol.	30
Esquema 10.	37
Esquema 11.	37
Tabla 1. Eficacia de los fármacos usados en el tratamiento de la Fasciolosis.....	6
Tabla 2. Caracterización de las materias primas.....	31
Tabla 3. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los intermediarios 1-(hidrometilo) IV y XII	35

1.0. INTRODUCCIÓN

La química farmacéutica tiene como principal objetivo la identificación, la síntesis y el desarrollo de nuevos compuestos químicos que sean adecuados para el uso terapéutico. En los últimos años el diseño de nuevos fármacos ha explorado nuevos espacios de la química y, usando herramientas como la química computacional, ha llevado a moléculas más complejas y de mayor peso molecular que a menudo tienen una limitada solubilidad acuosa y baja biodisponibilidad.

Dicha problemática se ve reflejada en los fármacos antihelmínticos derivados del bencimidazol, en especial los bencimidazol 2-carbamatos, los cuales ocupan un lugar importante por su amplio espectro de acción y su baja toxicidad, y en los cuales se ha observado que la efectividad se ve severamente disminuida in vivo por la pobre absorción de los agentes activos.

Las estadísticas indican que en México las infecciones parasitarias se consideran enfermedades emergentes entre la población, además de encontrarse entre las causas más frecuentes e importantes que ocasionan una ineficiencia biológica y económica en los sistemas pecuarios del país. Por ello resulta muy importante buscar alternativas que ayuden a la mejora de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de dichos compuestos.

El desarrollo de profármacos es una estrategia para incrementar la solubilidad de moléculas en medio acuoso, lo que permite que las nuevas entidades puedan atravesar las membranas biológicas en mayor grado y de esta forma lograr que sean más efectivas a nivel sistémico. Se aprecia esta necesidad en la creación de profármacos contra *Fasciola hepatica*, un parásito que se encuentra alojado en el hígado, y cuyo fármaco de elección, el triclabendazol, es escasamente soluble en agua.

Por ello, en este trabajo se fijó el propósito de sintetizar la sal disódica de dos derivados del 1-fosfonoximetilbencimidazol, como modelos de profármacos. Los resultados fueron la obtención de dos productos finales con mayor solubilidad acuosa, aunque con una estabilidad acuosa muy limitada. Los resultados obtenidos permiten plantear la expectativa de extrapolar dicha ruta de síntesis a fármacos antiparasitarios con gran actividad biológica y con un mayor tamaño, pero pobre solubilidad acuosa, como es el caso del triclabendazol.



2.0. ANTECEDENTES

2.1. Fasciolosis

2.1.1 Generalidades

Las “enfermedades parasitarias desatendidas” (Parasitic Neglected Diseases) se definen como aquellas infecciones parasitarias que reciben poca atención y se ven postergadas en las prioridades de la salud pública. Este tipo de padecimientos predomina en zonas rurales o barrios suburbanos pobres, con climas templados o tropicales, escasas instalaciones sanitarias y malos hábitos de higiene. Siendo la pobreza un común denominador en la prevalencia de las infecciones parasitarias, el interés por desarrollar y fortalecer la investigación clínica y farmacéutica, así como la innovación en métodos de diagnóstico eficaces es limitado, ya que las empresas farmacéuticas se ven impedidas para desarrollar investigación por el alto costo de tiempo y dinero. Es por esto que resulta importante realizar investigación básica que permita sentar las bases para la creación de fármacos que tanto se necesitan para el tratamiento de estos padecimientos olvidados. Un gran número de enfermedades desatendidas corresponden a infecciones parasitarias, esto debido a que el interés por desarrollar y fortalecer la investigación clínica y farmacéutica es limitado, y la innovación es muy escasa en métodos diagnósticos eficaces, es decir, tienen como característica común la poca inversión para su control y manejo.

Hacia 2011, la OMS emitió una lista de enfermedades desatendidas entre las que se encuentran la lepra o enfermedad de Hansen, leptospirosis, peste, tracoma, úlcera de Buruli, enfermedad de Chagas, tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño), leishmaniasis cutánea y visceral, oncocercosis, dengue, rabia humana, dracunculiasis, **fasciolosis**, cólera, esquistosomiasis, filariasis linfática, geohelmintiasis y accidente ofídico; e informó que cerca de 1.0 millón de personas en el mundo sufren de al menos una enfermedad desatendida.¹

La fasciolosis es una enfermedad causada por los trematodos del género *Fasciola*, referidos comúnmente como trematodos hepáticos, siendo *F. hepática* y *F. gigantica* las dos especies implicadas comúnmente como agentes etiológicos de esta enfermedad. Se ha observado que *F. hepática* tiene una distribución mundial predominantemente en zonas templadas, mientras que *F. gigantica* solo se ha encontrado en algunas zonas tropicales y generalmente solapándose con *F. hepática*,² sobre todo en China (específicamente en la Provincia de Taiwán), Japón, República de Corea y Filipinas.³

La *Fasciola* adulta es aplanada, de forma lanceolada, como hoja carnosa, color café parduzco (**Figura 1**) y mide alrededor de 3 x 1.5 cm.⁴





Figura 1. *Fasciola hepatica* en edad adulta.⁴

2.1.2. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*

El ciclo de vida de *F. hepatica* consiste de cinco fases, como se muestra en la **Figura 2**. La primera fase incluye la ingesta de las metacercarias por su huésped definitivo, un mamífero (vacas, ovejas, humanos, etc), las cuales eclosionan generalmente en el lumen del intestino y migran hacia el hígado donde se alimentan de las células del parénquima hepático, causando fuertes hemorragias. *F. hepatica* crece lentamente y alcanza la madurez sexual a los dos meses de haberse alojado en los conductos biliares. Por ser un organismo hermafrodita, produce sus huevecillos que pasan de los conductos biliares al duodeno y a continuación a las heces fecales aproximadamente después de una semana de desarrollo. Estos huevecillos deben depositarse en agua fresca para completar su desarrollo y eclosión, misma que puede ocurrir después de 10 días o incluso meses después, dependiendo de la temperatura del medio. Después de haber eclosionado a miracidios ciliados, éstos nadan en busca de su huésped intermedio, un molusco gastrópodo (caracoles, babosas, etc), al que penetran para su posterior reproducción asexual. En este estadio se da la morfogénesis de miracidio a esporocisto y luego a redia, y cada redia da origen a muchas cercarías que salen del molusco al agua, que se enquistan cerca de plantas acuáticas o incluso en el mismo medio acuoso, ya que son resistentes a cambios de temperatura. Se cierra el ciclo cuando las metacercarias son consumidas por el huésped definitivo de plantas o agua contaminada.⁵



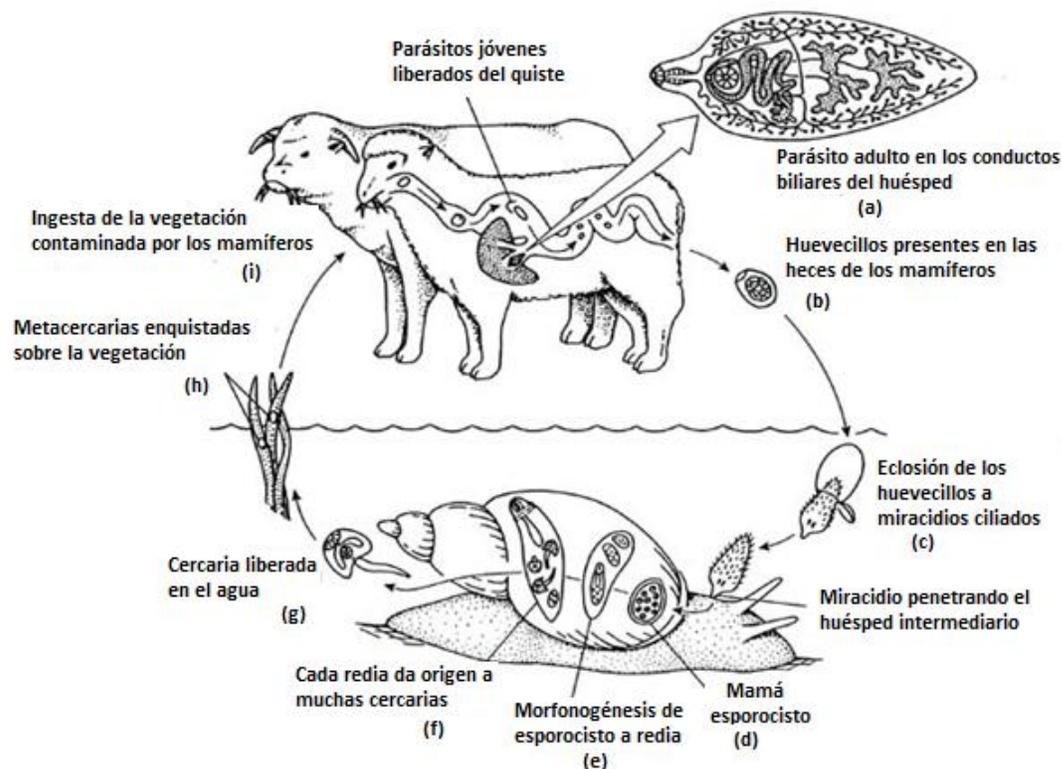


Figura 2. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*.⁶

2.1.3. Importancia de la fasciolosis

La fasciolosis es una enfermedad veterinaria importante debido que provoca pérdidas productivas y económicas entre el ganado, principalmente ovino y bovino⁷ además, también puede infectar al ser humano.

Esta parasitosis es de distribución global. Se estima que 2.4 millones de personas están infectadas, y más de 180 millones están en riesgo de contraer la infección.⁷ Los problemas sanitarios más graves asociados a la fasciolosis se encuentran en los países andinos de América del Sur, África septentrional, Irán y Europa occidental.⁸

La importancia de la fasciolosis en México se da principalmente en el ganado, generando un proceso inflamatorio, generalmente crónico, del hígado y conductos biliares que provoca en los mamíferos que infecta (ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, animales silvestres y el ser humano), trastornos digestivos y de la nutrición, retardando el proceso de crecimiento, disminución de la producción láctea, baja calidad y rendimiento de lana, disminución de resistencia a otras enfermedades, además del elevado decomiso de hígados en rastros, lo cual se refleja en cuantiosas pérdidas económicas.⁹



2.1.4. Tratamiento y control de la fasciolosis

Los carbamatos bencimidazólicos (albendazol, mebendazol y triclabendazol) y metabolitos como el sulfóxido de albendazol, que se aprecian en la **Figura 3**, se desarrollaron en la década de 1970 para uso veterinario, comprobándose después su eficacia y seguridad para su uso en medicina humana. Se ha propuesto que estas moléculas se fijan a los microtúbulos del parásito,¹⁰ provocando cambios degenerativos en las células tegumentarias e intestinales no solo de helmintos,¹¹ sino también de protozoarios,¹² bloqueando el ensamblaje de las tubulinas que, una vez polimerizadas, van a formar las proteínas microtubulares de los helmintos, responsables del normal funcionamiento celular.¹⁰

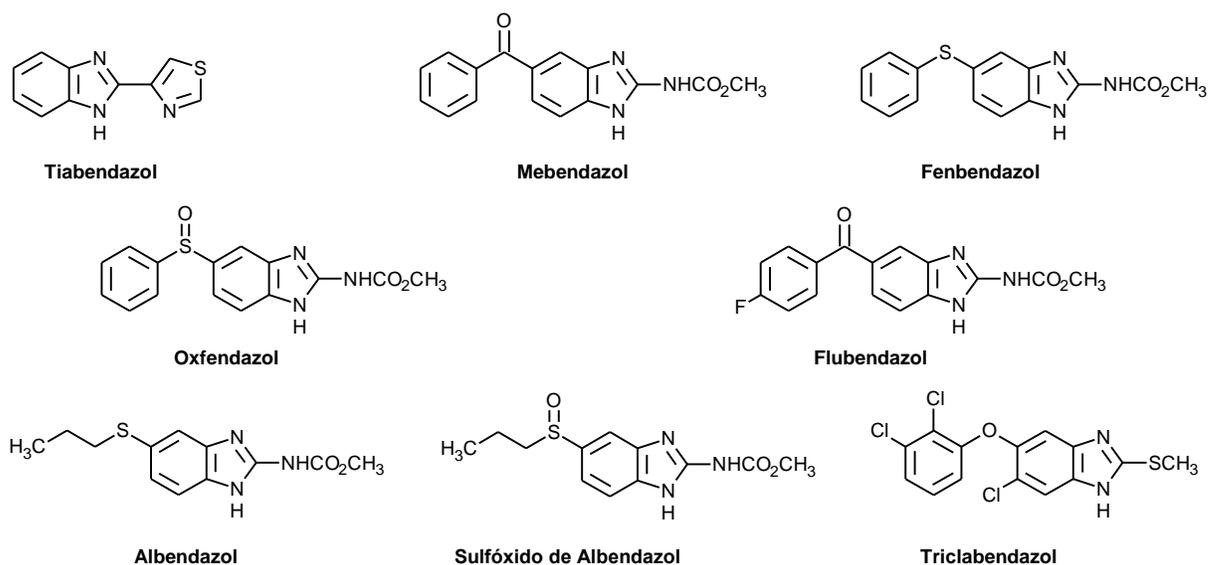


Figura 3. Ejemplos de fármacos bencimidazólicos.¹³

El triclabendazol es un compuesto bencimidazólico usado en veterinaria desde 1983 para el control de la fasciolosis, aprobándose su uso en humanos desde 1989,⁷ debido a la eficacia que presenta en todos los estadios de *Fasciola hepatica* comparado con otros fármacos activos contra este parásito, como se aprecia en la **Tabla 1**.¹⁴



Tabla 1. Eficacia de los fármacos usados en el tratamiento de la Fasciolosis

Espectro de eficacia de fármacos a las dosis recomendadas en ovejas

Edad del parásito en semanas

Fármaco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
Biotinol, Hexaclorofeno																		
Oxiclonazida, Niclofolano																		
Albendazol																		
Clorsulon+ivermectina										50-70%		80-99%						
Clorsulon (oral)										90-99%								
Nitroxinil, Closantel										50-90%			91-99%					
Rafoxanida										50-90%			91-99%					
Triclabendazol		90-99%		99-100%														
Diamfenetina	91-100%									50-80%								

A pesar de que el triclabendazol se puede usar en todas las etapas de la fasciolosis, tiene varias desventajas. Una de ellas es incapaz de prevenir o controlar el desarrollo de resistencia en las poblaciones parasitarias, definida como la disminución de la eficacia contra una población de parásitos que es sensible a este fármaco y es de naturaleza genética.¹⁵ Otra de las desventajas que presentan la mayoría de los fármacos antiparasitarios bencimidazólicos es su limitada solubilidad en agua, por lo que tienen que ser administrados por vía oral como suspensiones, polvos o bolos intrarumiales o soluciones inyectables usando agentes complejantes que solo necrosan el sitio de administración.

La baja solubilidad de estos compuestos también se ve reflejada en que solo un porcentaje menor al 5% del fármaco administrado es absorbido; esta característica resulta muy benéfica cuando los parásitos se encuentran en el tracto gastrointestinal, puesto que es ahí donde se requiere una alta concentración del fármaco, pero cuando los parásitos son sistémicos o se encuentran alojados en algún órgano, como en el caso de *Fasciola hepatica*, se requiere que el compuesto activo se absorba.¹⁶

2.2. Profármacos y el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos

El descubrimiento de un nuevo medicamento y su desarrollo posterior son dos fases que condicionan el éxito de un nuevo producto que sea útil en la terapéutica. El descubrimiento debe ser diferenciado del desarrollo. Se ha acordado de manera general que el descubrimiento comprende toda la fase de investigación en la que se asegura que el compuesto tiene un deseable perfil de actividad y comprende desde la síntesis, el aislamiento de la fuente natural, o la obtención biotecnológica y toda la fase preclínica, incluida la toxicología.

El proceso de descubrimiento de nuevos fármacos es variado y complejo. No existe un método que garantice la obtención de una molécula activa que llegue a ser parte de un medicamento. Sin embargo, se han obtenido sustancias medicamentosas a partir de productos naturales, por las técnicas de diseño racional de fármacos sobre la base de un modelo receptor, por enfoques de química combinatoria, etc. Se estima que el descubrimiento de una molécula activa puede durar en promedio cinco o seis años. La fase de desarrollo



comprende la de los estudios clínicos y la del registro farmacéutico, y se estima que éstos toman entre 68.6 meses y 30.3 meses, respectivamente.²²

La aplicación de nuevas tecnologías, como la química combinatoria, ha resultado en un gran número de agentes farmacológicamente activos, pero con propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas que no son adecuadas para ser considerados fármacos.²³

Los fármacos son definidos como aquellos compuestos que tienen propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad suficientemente aceptables para lograr sobrevivir a la Fase I de ensayos clínicos.²⁴ En el sentido farmacopéico, los fármacos son los principios activos de los medicamentos.

Los agentes farmacológicamente activos obtenidos mediante las nuevas tecnologías se caracterizan por un aumento en la complejidad y el tamaño de las moléculas. Con el aumento de tamaño se obtiene un mayor número de enlaces y altos valores de log P, lo que se refleja en una disminución considerable de la solubilidad acuosa y un aumento en el porcentaje de unión a proteínas, pobre absorción, además de mayor susceptibilidad a metabolismo y excreción biliar.^{18,25}

Con esta situación los farmacéuticos se enfrentan con grandes problemas para continuar con la etapa de desarrollo, y superar solo con ayuda de la tecnología farmacéutica los problemas de solubilidad y estabilidad de los nuevos candidatos,²⁹ tomando alternativas limitadas como la formación de sales estables,²⁶ la reducción del tamaño de partículas sólidas por micronización, como la molienda o la formación de nanosuspensiones,²⁷ o el uso de agentes complejantes como las ciclodextrinas,²⁸ que si bien estas técnicas pueden conducir a una mejora significativa, el éxito puede ser incierto y lento de lograr.²⁹

La historia de los profármacos se remite a 1958, cuando Adrien Albert introduce por primera vez el término *pro-drug* en su artículo *Chemical aspects of selective toxicity*, en la revista *Nature*, para describir los compuestos que se tienen que someter a una o más biotransformaciones para obtener el efecto farmacológico, es decir, agentes terapéuticamente inactivos pero que se transforman en uno o más metabolitos activos.¹⁷⁻¹⁹

El primer registro de la existencia de profármacos que se tiene, incluso antes de que se acuñara el término, es la metenamina introducida en 1899 por Schering, como un profármaco que al metabolizarse en el tracto urinario genera el formaldehído antibacteriano; en el mismo año es introducido el ácido acetilsalicílico como una forma menos irritante del salicilato de sodio, un agente antiinflamatorio, y el prontosil, la primera sulfamida, como profármaco de sulfanilamida.^{17, 20-21}

El desarrollo de profármacos se ha consolidado como una estrategia para la mejora de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los agentes farmacológicamente activos que debe ser incluida en la etapa de descubrimiento de los fármacos.³⁰



2.2.1. Definición de profármaco

Los profármacos se definen como compuestos químicos que carecen de actividad farmacológica y que deben someterse a una transformación enzimática y/o química para liberar un metabolito activo (fármaco).^{18,30-33} Una representación gráfica del concepto de profármaco se muestra en la **Figura 4**.

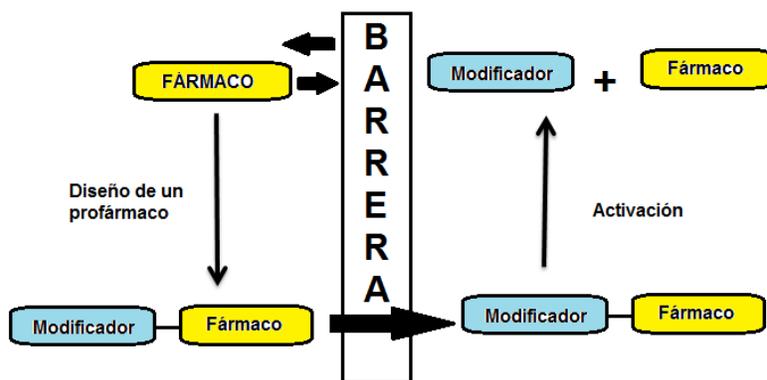


Figura 4. El concepto de profármaco usando un modificador.¹⁸

El modificador es un grupo funcional que cambia la estructura del agente farmacológicamente activo y que por lo tanto, también provoca un cambio en sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas.^{18,33}

Los principales objetivos que se pretenden alcanzar cuando se plantea el diseño de profármacos son.³⁴⁻³⁶

- Mejorar la biodisponibilidad.
- **Mejorar la solubilidad acuosa.**
- Mejorar la absorción intestinal pasiva.
- Mejorar la absorción intestinal mediada por transportadores.
- Proteger al fármaco contra el metabolismo.
- Brindar al fármaco una entrega selectiva.

2.2.2. Clasificación de los profármacos

Actualmente se puede clasificar a los profármacos de acuerdo a dos criterios:³⁰

1. Químico

- a. El fármaco está unido a un modificador; la activación de este tipo de profármacos se produce por hidrólisis, oxidación o reducción. Dentro de éstos se tienen:



-Profármacos bipartitas: se obtienen de la unión de un fármaco y un modificador.

-Profármacos tripartitas: compuestos producto de la unión de un fármaco, un modificador y una entidad que los mantenga unidos (acoplador o "linker").³⁰

-Profármacos dobles: compuesto producto de la unión entre un fármaco, un acarreador y dos acopladores que los mantienen unidos. Generalmente usados para la liberación selectiva o para protección de sitios de biotransformación.¹³

-Profármacos mutuos o Cofármacos: consiste en dos agentes farmacológicamente activos que se acoplan entre sí en una sola molécula de manera que cada fármaco actúa como un modificador para el otro.³⁷⁻³⁸

- b. Bioprecusores, es decir no contienen un modificador, sino que resulta de una modificación molecular del mismo fármaco y son activados por oxidación, reducción o hidrólisis.
- c. Profármacos macromoleculares, donde el portador es una molécula como el polietilenglicol.

Fármacos conjugados con anticuerpos, donde el portador es un anticuerpo generalmente contra células tumorales.^{21,30}

2. De acuerdo al mecanismo de activación del profármaco:

- a) Activación Enzimática: tiene la desventaja de presentar variabilidad biológica y no puede ser optimizado.
- b) Activación Química: no presenta variabilidad biológica, tiene menos dificultades para ser optimizado, aunque presenta dificultades por inestabilidad.³⁰

2.2.3. Grupos funcionales ideales susceptibles para el diseño de profármacos

El diseño de un profármaco con una estructura adecuada debe ser considerado en las primeras etapas del desarrollo preclínico, teniendo en cuenta que los profármacos pueden alterar la distribución en los tejidos, la eficacia y la toxicidad de los fármacos padres. Varios factores importantes deben ser cuidadosamente examinados en el diseño de la estructura de un profármaco, entre ellos:

- Identificación de las barreras a vencer con el diseño de los profármacos: baja solubilidad acuosa, pobre absorción, baja permeabilidad, etc.
- Grupos funcionales presentes en el fármaco padre sean susceptibles a derivación.
- El modificador debe ser seguro y rápidamente eliminable del cuerpo. La elección de modificador se debe considerar con respecto al estado de la enfermedad, la dosis y la duración del tratamiento.



- La unión entre el grupo modificador y el fármaco es de tipo covalente.
- El profármaco debe carecer de actividad biológica y su síntesis no puede ser más costosa que la del mismo fármaco
- La separación del fármaco de su modificador debe llevarse a cabo rápidamente para asegurar niveles adecuados del fármaco en el sitio de acción y así evitar metabolismo del propio profármaco.³³

En la mayoría de los casos, los profármacos son derivados químicos simples que requieren de uno a dos pasos de transformaciones químicas o enzimáticas para obtener el fármaco activo.^{30,37} Se obtienen normalmente a través de la modificación de grupos funcionales como ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas, fosfatos y oximas (**Figura 5**). Sin embargo, otros grupos funcionales poco comunes también han sido investigados como posibles estructuras útiles en el diseño de profármacos. Por ejemplo, los tioles reaccionan de una manera similar a los alcoholes y se pueden derivar a tioéteres y tioésteres. Las aminas pueden ser derivadas a iminas y bases N-Mannich.³³



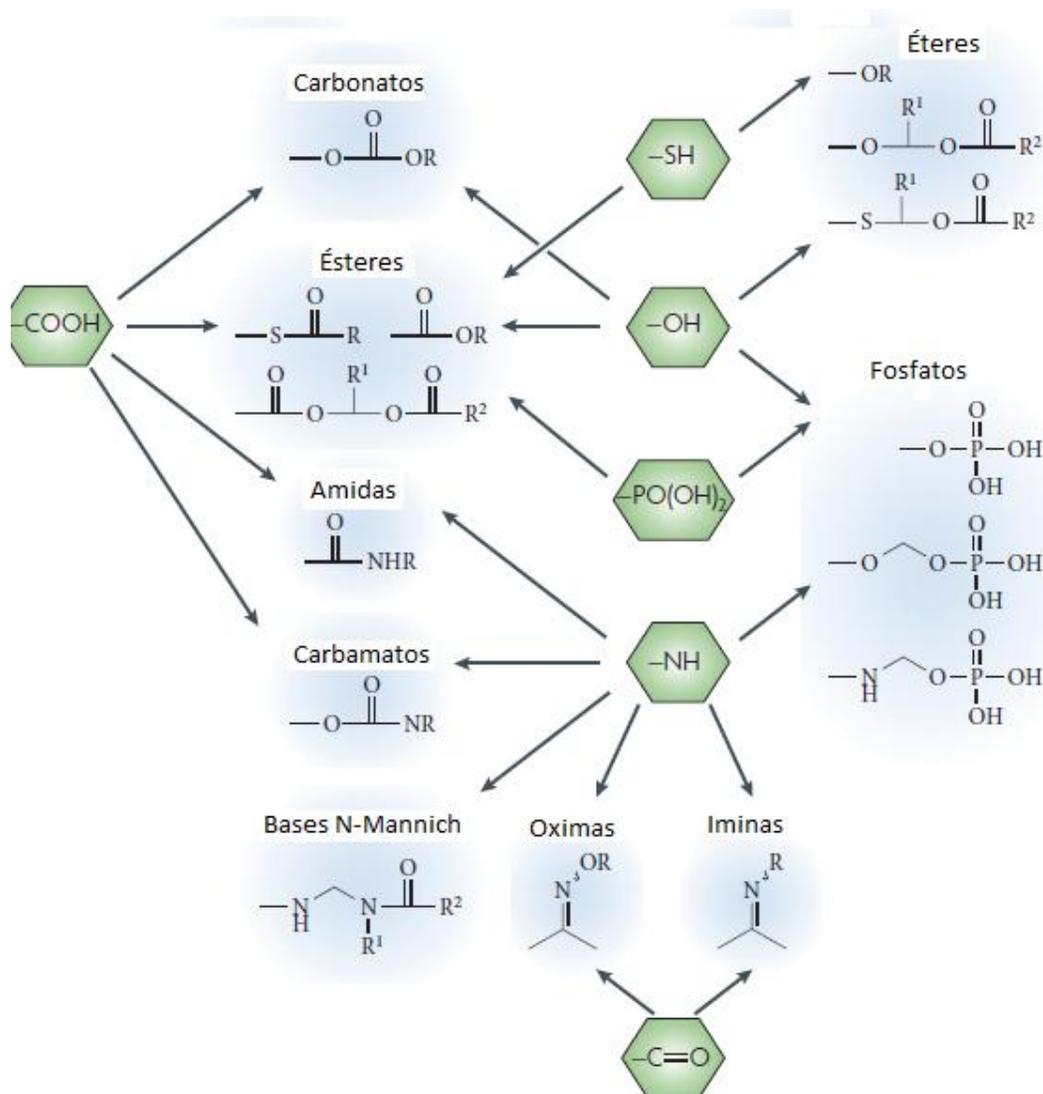


Figura 5. Resumen de los grupos susceptibles a ser derivatizados.³³

Ésteres como profármacos de funciones carboxilo, hidroxilo y tiol. Los ésteres son los profármacos más comunes. Se estima que aproximadamente el 49% del total de profármacos comercializados se activan por hidrólisis enzimática. Los profármacos que contienen un grupo éster son los más utilizados para mejorar la lipofilia, y por lo tanto, la permeabilidad pasiva en la membrana. Una vez en el cuerpo, el enlace éster se hidroliza rápidamente por esterasas que se encuentran principalmente en la sangre, el hígado y carboxilesterasas como las acetilcolinesterasas.³³

Los ésteres de fosfato como profármacos de funciones hidroxilo o amina. Los profármacos que son ésteres de fosfato son típicamente diseñados para los grupos funcionales hidroxilo y amina de fármacos poco solubles en agua con el objetivo de mejorar su solubilidad acuosa para permitir un entorno más favorable para la administración por vía oral o parenteral.³³



Los profármacos fosfato suelen mostrar una excelente estabilidad química y adecuada bioconversión, es decir, un rápido regreso al fármaco original por fosfatasa presentes en el borde en cepillo intestinal, en el hígado o en el torrente sanguíneo.^{18, 39}

A diferencia de los ésteres de ácidos carboxílicos, los ésteres fosfato son hidrolizados por lo general a tasas similares en diferentes especies preclínicas por fosfatasa alcalinas.⁴⁰

Carbonatos y carbamatos como profármacos de carboxilo, hidroxilo o amina. Los carbonatos y carbamatos difieren de los ésteres por la presencia de un oxígeno o nitrógeno en ambos lados del carbono del carbonilo. Éstos a menudo son enzimáticamente más estables que el correspondiente éster, pero son más susceptibles a la hidrólisis que las amidas. Los carbonatos son derivados de ácidos carboxílicos y alcoholes, y los carbamatos son derivados de ácidos carboxílicos y aminas.³³ La bioconversión de muchos profármacos requiere de carbonato y carbamato esterasas para la bioconversión.⁴¹

Amidas como profármacos de ácidos carboxílicos y aminas. En el diseño de profármacos, las amidas se han utilizado sólo en un grado limitado, debido a su relativamente alta estabilidad enzimática *in vivo*.³³ Un enlace amida suele ser hidrolizado por carboxilesterasas, peptidasas o proteasas. Las amidas son, a menudo, diseñadas para mejorar la absorción por vía oral mediante la síntesis de sustratos de absorción intestinal con transportadores específicos,⁴²⁻⁴³

Oximas como los derivados de cetonas, amidinas y guanidinas. Oximas (por ejemplo, cetoximas, amidoximas y guanidoximas) son derivados de cetonas, amidinas y guanidinas, ofreciendo así una oportunidad para modificar moléculas que carecen de funciones hidroxilo, amino o carboxilo. Oximas son hidrolizados por las versátiles enzimas microsomales del citocromo P450 (CYP450), mejor conocidas como enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Las oximas, sobre todo amidinas fuertemente básicas y guanidoximas, se pueden utilizar para mejorar la permeabilidad en la membrana y la absorción de un fármaco.⁴⁴

2.3. La estrategia profármaco como una solución a los problemas de solubilidad de los carbamatos bencimidazólicos

En los casos en que ya se ha completado la fase de descubrimiento de un fármaco, también se puede recurrir al diseño de profármacos como una estrategia para obtener un cambio en las propiedades del fármaco en cuestión.³⁰ Teniendo esta perspectiva se han dedicado esfuerzos para el desarrollo de profármacos de bencimidazoles, con el objetivo de obtener moléculas que tengan una mejor solubilidad acuosa que permita su administración en forma de solución a los animales infectados y que además posean una suficiente estabilidad acuosa durante su aplicación (horas) en un rango de pH de 5 a 9, así como también una rápida bioconversión al fármaco correspondiente en el sitio de acción, generalmente el tracto gastrointestinal. Lo cual, pese a los esfuerzos realizados, aun no se ha logrado, posiblemente porque las estrategias que se han seguido implican una conversión química del fármaco, como la unión al núcleo de bencimidazol de grupos acilo,⁴⁵⁻⁴⁶ portadores como



alcoxicarbonilos⁴⁷⁻⁴⁸ o bases de Mannich⁴⁹⁻⁵⁰ y se ha observado que las condiciones de conversión óptima de los profármacos son, muy a menudo, aquellos en los que el fármaco se mantiene sin grandes modificaciones.

En la década de 1990, Stella y colaboradores desarrollaron una estrategia para el diseño de profármacos a través de la derivación de aminas terciarias con un grupo modificador como fosfonoximetil,⁵¹⁻⁵² que se extendió más tarde a la derivatización de grupos hidroxilo.⁵³ Para liberar al fármaco correspondiente, se tienen que completar dos pasos, el primero de ellos es a través de la catálisis por una fosfatasa, el paso desfosforilación hidrolítica, para obtener el intermediario hidroximetil que se descompone de forma espontánea en el fármaco correspondiente y formaldehído.

Esta estrategia ya se extendió a los carbamatos benzimidazólicos. En 2008 se reportó que se lograron sintetizar los profármacos de fenbendazol, las moléculas obtenidas combinan alta solubilidad y estabilidad en medio acuoso, pero elevada labilidad frente a las fosfatasas alcalinas intestinales. Un estudio *in vivo* de los compuestos obtenidos, realizado en cerdos, demostró que éstos tienen niveles de eficacia comparables con los fármacos de los cuales provenían. Por otra parte, un estudio de farmacocinética comparativo reveló un aumento en la concentración de los fármacos o sus metabolitos activos cuando fueron administrados los profármacos.⁵⁴

2.4. Las ventajas de usar grupos fosfatos en los profármacos

Los profármacos que contienen en su estructura grupos fosfato ofrecen varias ventajas para la formulación y el desarrollo de compuestos con baja solubilidad acuosa, ya que el aumento en la solubilidad por el grupo fosfato dianiónico es, a menudo, de varios órdenes de magnitud,⁵⁵⁻⁵⁶ además de que son químicamente estables,⁵⁸ pero el grupo fosfato puede ser fácilmente escindido por las fosfatasas endógenas.^{40,58-60}

Se tiene preferencia por este tipo de profármacos sobre los ésteres de aminoácidos o amidas, porque éstos carecen de estabilidad acuosa y en ocasiones su bioconversión es incompleta.¹⁸

Los profármacos orales de fosfato son especialmente prometedores cuando se tienen fármacos insolubles en medio acuoso y deben ser administrados en dosis altas, ya que al administrar una dosis baja del profármaco, este se disuelve por completo y puede ser absorbido. Esto se puede explicar mejor en la **Figura 6**.²⁵



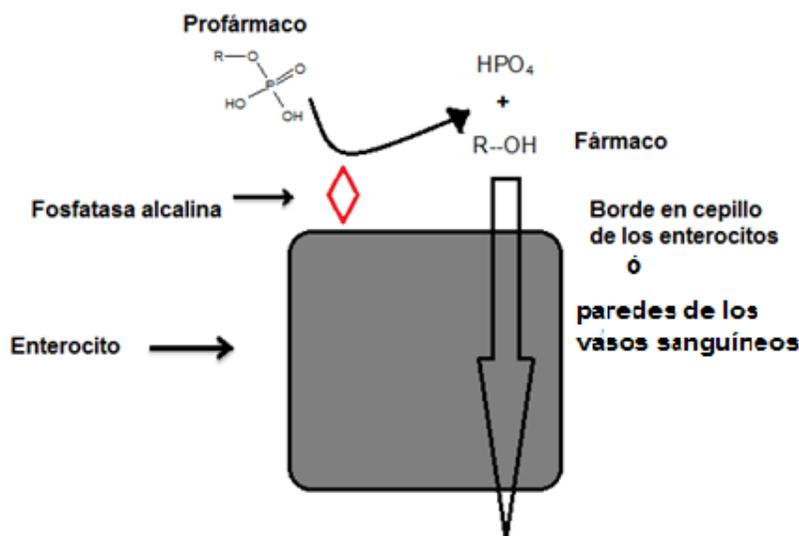


Figura 6. Mecanismo de activación de los profármacos que contienen el grupo fosfato.⁶¹

2.5. Los profármacos en la actualidad

¿Por qué la estrategia del diseño de profármacos ha tomado importancia recientemente cuando el concepto se conoce desde hace años?

Una de las razones es, probablemente, la caída en el número de medicamentos aprobados en todo el mundo debido a las dificultades con las propiedades ADME (Administración, distribución, metabolismo y excreción) de las moléculas, principalmente la solubilidad.²⁵ Se estima que 40% de los compuestos activos, identificados mediante técnicas de química combinatoria presentan problemas de solubilidad en agua.

Sin embargo, la estrategia profármaco está ayudando a resolver estos problemas, lo cual se aprecia con los siguientes datos:

- Hasta antes de 2002, 5-7% de todos los medicamentos aprobados en todo el mundo, podían ser considerados profármacos, y el 15% de los medicamentos aprobados entre 2001 y 2002 son profármacos. Aproximadamente 49% de esos profármacos eran activados por hidrólisis y 23% eran bioprecursores.³⁰
- De 2000 a 2008 fueron aprobadas 236 moléculas, de las cuales 12,6% fueron identificados como profármacos y otro 5,2% pueden considerarse profármacos.³²
- Actualmente 10% de todos los medicamentos comercializados en todo el mundo, se clasifican como profármacos.

Aun con los datos anteriores, se sigue pensando que los profármacos son una medida desesperada a la que sólo debe recurrirse cuando un fármaco es rechazado; y que son sólo de interés académico, como una alternativa para mejorar la biodisponibilidad y problemas de toxicidad.³¹



3.0. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Planteamiento del problema

El triclabendazol, a pesar de los problemas de resistencia que se han presentado, sigue siendo el fármaco de elección en el tratamiento de la fasciolosis, por su eficacia en todos los estadios del parásito y porque no se ha colocado en el mercado otro fármaco que se le compare. Sin embargo, desde que comenzó a emplearse no se han podido resolver los problemas de solubilidad que presenta a pesar de que han pasado muchos años

Lo anterior se sigue viendo reflejado en las altas dosis de fármaco que tienen que administrarse, ya que sólo el 5% del fármaco administrado se absorbe y alcanza el sitio de acción. Además de esto, la administración al ganado sigue siendo un problema, ya que al ser insoluble el triclabendazol, no se han podido desarrollar nuevas formas farmacéuticas que permitan una fácil y mejor forma de hacerlo, por ejemplo una solución inyectable.

Empleando enfoques de la química farmacéutica, es decir, el diseño de profármacos del triclabendazol, agregando a su estructura un grupo que aumente su solubilidad en varios órdenes de magnitud, se lograrán resolver los problemas de pobre absorción y escasas formas de administración.

Para lograr este propósito, se pueden diseñar dos modelos de profármacos que contengan en su estructura el núcleo bencimidazólico y que su síntesis no resulte difícil y costosa, ya que al proponer una ruta de síntesis nueva, se requerirá hacer varios intentos hasta sistematizar los pasos y condiciones de las reacciones involucradas, para posteriormente extrapolar los resultados a la molécula de triclabendazol; sin embargo, aun se tienen dos interrogantes:

-¿Los modelos de profármacos diseñados tendrán la suficiente estabilidad acuosa en un rango de pH de 5-9, por lo menos unas horas, es decir en lo que el fármaco es administrado?

-¿Podrán extrapolarse los modelos de profármacos diseñados al triclabendazol y a otros fármacos antiparasitarios con problemas de solubilidad acuosa?

3.2. Hipótesis

-Si se diseñan modelos de profármacos bencimidazólicos que contengan en su estructura un grupo fosfonoximetil se logrará aumentar la solubilidad de éstos en varios órdenes de magnitud y posteriormente éstos podrán extrapolarse a fármacos bencimidazólicos usados actualmente como el triclabendazol que tiene problemas de solubilidad acuosa y pobre absorción.



-Los modelos de profármacos diseñados presentarán suficiente estabilidad en solución acuosa, que permita su administración, y serán fácilmente activados al fármaco correspondiente por las fosfatasa alcalinas.

3.3. Objetivos

-Objetivo general

Mejorar la solubilidad acuosa de al menos dos modelos de profármacos del bencimidazol.

-Objetivos particulares

Sintetizar los siguientes derivados fosfonoximetilo del bencimidazol como modelos de profármacos (**Figura 7**)

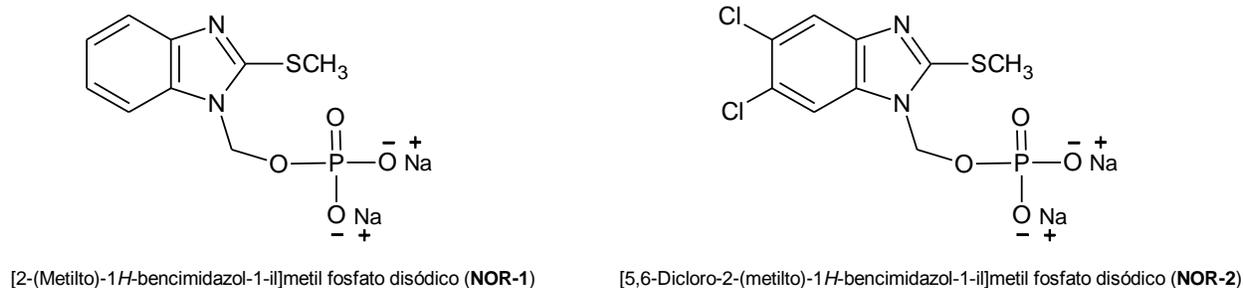


Figura 7. Modelos de profármacos a sintetizar.

Caracterizar a los dos modelos mediante sus propiedades físicas, así como por métodos espectroscópicos (RMN e IR) y por espectrometría de masas.

Determinar la estabilidad de los dos modelos sintetizados en solución acuosa.

Determinar la solubilidad acuosa de los dos modelos de profármacos sintetizados.



4.0. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos planteados, se realizó el trabajo experimental como se describe a continuación.

4.1. Instrumentación y materiales

- Para llevar a cabo las reacciones con temperatura y agitación controladas se empleó una parrilla automática IKA modelo IKA MAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKA TRON ETS-DH fuzzy.
- La cromatografía de capa fina (ccf) empleada en el monitoreo de las reacciones se realizó en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® F₂₅₄ de 1.2 x 6.8 cm. Para visualizar las cromatoplasmas se empleó una lámpara de UV, UVGL-25 Mineralight®
- La evaporación de disolventes se llevó a cabo en un rotaevaporador Büchi modelo RC-114 con baño de calentamiento modelo B-480, acoplado a una bomba de vacío de diafragma marca Vaccubrand modelo PC610 con regulador de vacío integrado CVC2 y un condensador de hielo seco conectado a un enfriador Brinkman CI30 o bien con un rotaevaporador Büchi R-205 con baño de calentamiento R-400 acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un refrigerante en espiral Brinkman modelo IC30 conectado a una bomba de vacío Büchi V-800 y controlador V-500
- Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Büchi modelo B-540 usando capilares abiertos y no están corregidos.
- Los espectros de Infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer de transformada de Fourier modelo Spectrum 400. Los espectros se obtuvieron con el accesorio de reflectancia por ATR. La frecuencia de las señales se reporta en cm^{-1} .
- Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro JEOL modelo SX-102 A. El método de ionización fue bombardeo de átomos rápidos (FAB) usando glicerol o alcohol nitrobenílico como matriz. Se reporta la siguiente simbología: relación m/z (masa/carga), [M+1] (ion cuasimolecular).
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ¹H) se realizaron en un espectrómetro Varian Unity Inova de 300 ó 400 MHz, y los de Carbono 13 (RMN ¹³C) en un espectrómetro Varian Unity Inova de 75 ó 100 MHz. El disolvente empleado fue sulfóxido de dimetilo-d₆, y agua deuterada para el experimento de intercambio de hidrógenos ácidos. El tetrametilsilano (TMS) se usó como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm.



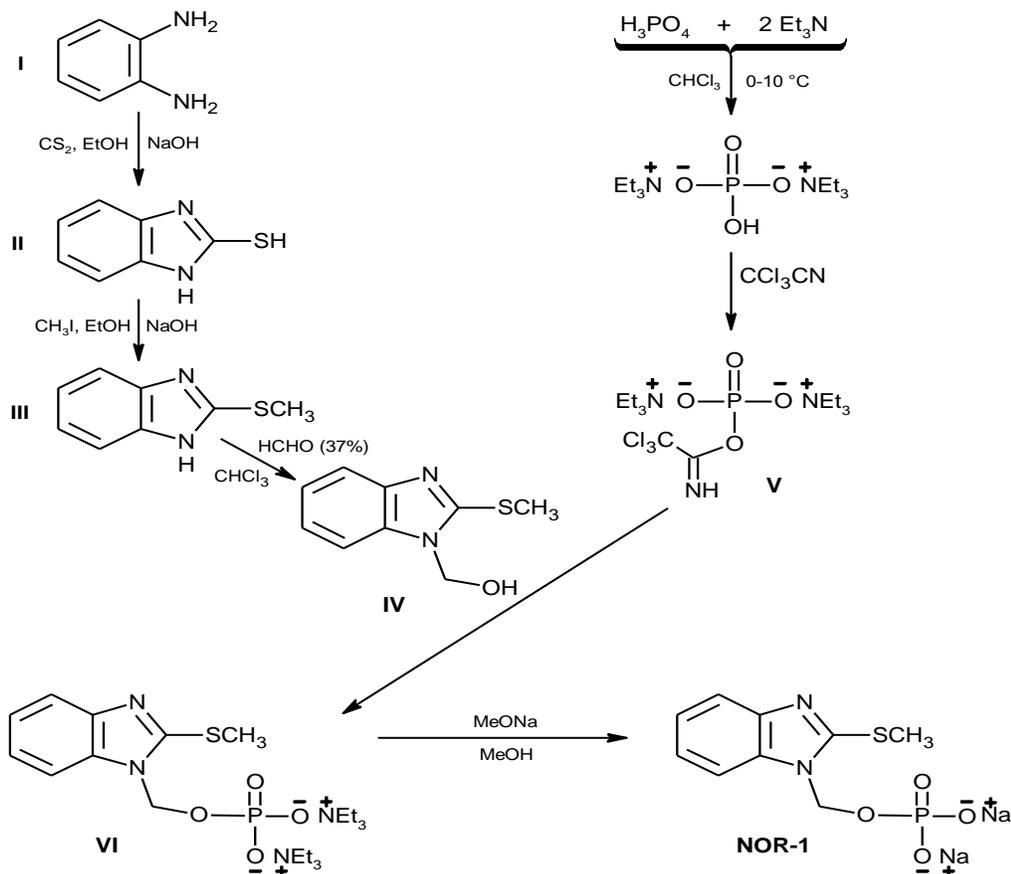
4.2. Preparación del derivado fosfonoximetilbencimidazol **NOR-1**

Para la síntesis del compuesto **NOR-1** se hicieron las reacciones que se muestran en el **Esquema 1**. Se partió de la *o*-fenilendiamina (**I**), que se sometió a una ciclocondensación en presencia de disulfuro de carbono en medio básico para obtener el 2-mercaptobencimidazol(**II**), que posteriormente se trató con yoduro de metilo para dar el 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol(**III**). Una vez purificado **III**, se procedió a la síntesis del intermediario 1-(hidroximetil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**IV**) empleando formaldehído en cloroformo.

Por otro lado se neutralizó el ácido fosfórico con dos equivalentes de trietilamina en cloroformo, se agregó tricloroacetónitrilo para activar el ácido a través del intermediario **V** y se adicionó el compuesto hidroxilado (**IV**) preparado anteriormente.

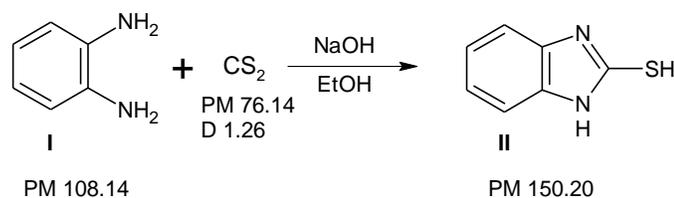
Con esta reacción se logró obtener el derivado fosfonoximetil (**VI**), al que solo restó hacer el intercambio catiónico empleando metóxido de sodio en metanol, para obtener el modelo **NOR-1**.

Esquema 1



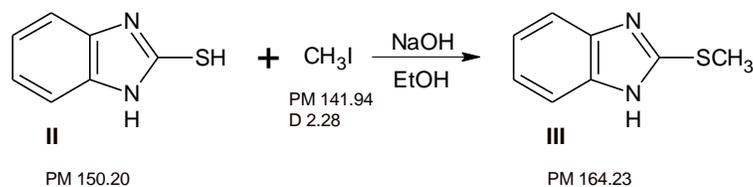
4.2.1. Procedimiento experimental para la síntesis de **NOR-1**

(a) 2-Mercapto-1*H*-bencimidazol (**II**)



En un matraz bola de 500 mL con tres bocas, acondicionado con un refrigerante en posición de reflujo conectado a tres trampas con hipoclorito de sodio, y agitador magnético, se disolvieron 20 g (0.1849 mol) de *o*-fenilendiamina y 11.08 g (0.2770 mol, 1.5 eq) de NaOH en 200 mL de etanol. A la solución anterior se le incorporaron 21.294 g (16.9 mL, 0.2797 mol, 1.5122 eq) de disulfuro de carbono y se elevó la temperatura hasta 55 °C. El consumo de la materia prima I se monitoreo por ccf y se logró en tres horas. La mezcla de reacción se dejó llegar a la temperatura ambiente y se vertió sobre 500 mL de agua fría, el pH se ajustó a 5 con ácido acético al 20% y el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua fría y se dejó secar al aire. El producto obtenido se purificó mediante cristalización simple usando etanol al 95%.

(b) 2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol (**III**)



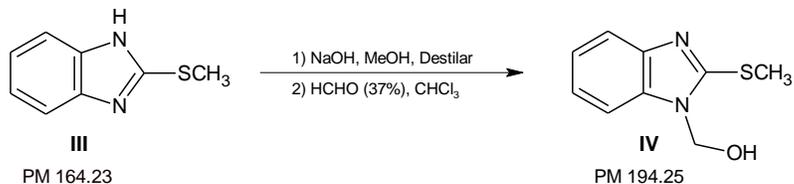
En un matraz bola de 500 mL con tres bocas, provisto de un embudo de adición, agitación magnética, atmosfera de nitrógeno y un termómetro, se disolvieron 25 g (0.1664 mol) de 2-mercapto-1*H*-bencimidazol y 8.02 g (0.2005 mol, 1.2 eq) de NaOH en 250 mL de etanol. La solución formada se enfrió en un baño de hielo y cuando llegó a 5 °C se adicionaron, lentamente y con agitación vigorosa, 32.22 g (14.13 mL, 0.2270 mol, 1.346 eq) de yodometano hasta que una ccf indicó el consumo total de la materia prima. La mezcla reacción fría se trató con ácido acético al 25% hasta llegar a pH 7, el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire.



El sólido obtenido se purificó mediante una recrystalización por par de disolventes (etanol/agua).

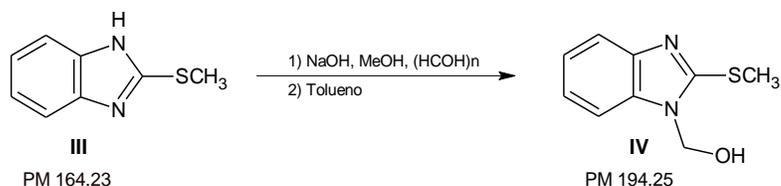
(c) [2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (**IV**)

i Primer método: En medio básico.



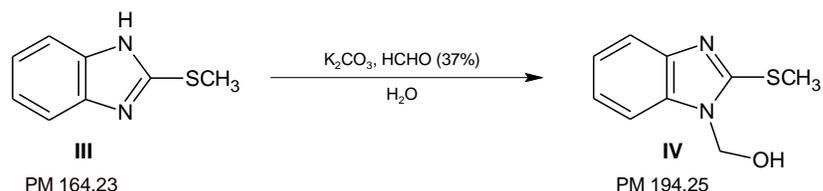
En un matraz bola de 100 mL, adaptado con agitación magnética, se disolvieron perfectamente 1.64 g (10 mmol) de 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol y 0.4 g (10 mmol) de NaOH en 16 mL de metanol. Después de 2 horas de reacción se evaporó el metanol utilizado y se agregaron 16 mL de cloroformo y 0.8 mL (10 mmol) de formaldehído, se dejó concluir la reacción 24 horas.

ii Segundo método: En medio básico con tolueno.



En un matraz bola de 50 ml, adaptado con agitación magnética, se disolvieron 0.75 g (10 mmol) de paraformaldehído y 0.4 g (10 mmol) de NaOH en 16 mL de metanol y la solución se dejó en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 1.64 g (10 mmol) de 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol **III** y se dejó agitar por una hora más. Transcurrido el tiempo indicado se concentró a sequedad, después se agregaron 16 mL de tolueno y se colocó un refrigerante en la posición de reflujo, así se dejó la reacción durante 24 horas. Se monitoreó la reacción usando cloruro de metileno: acetona (95:5).

iii Tercer método: En medio básico acuoso.

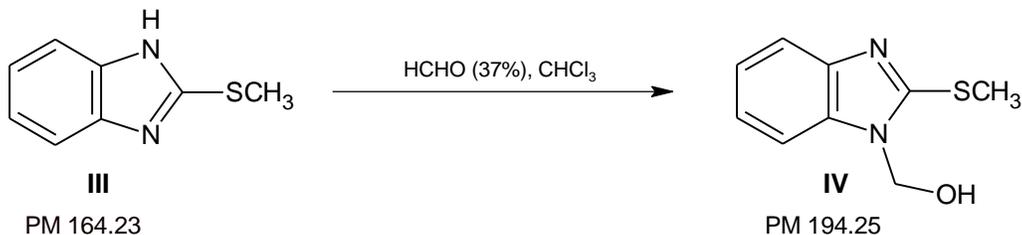


En un matraz bola de 50 ml, adaptado con agitación magnética, se suspendieron 1.64 g (10 mmol) de **III** y 0.67 (10 mmol) de carbonato de potasio en agua; posteriormente se agregaron 8.1 mL de formaldehído (10 mmol) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24



horas. Se observó el fin de la reacción usando ccf y el medio de elución diclorometano: acetona (95:5).

iv Cuarto método: En medio neutro.

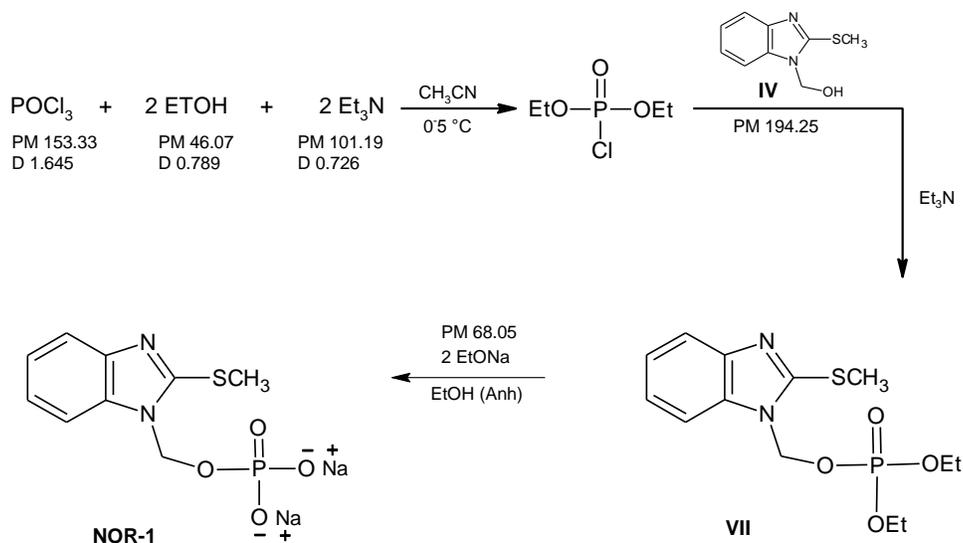


En un matraz de bola de 100 mL, adaptado con agitación magnética, se suspendieron 1.64 g (10 mmol) de 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol en 16 mL de cloroformo; posteriormente se agregaron 8.1 mL (10 mmol) de formaldehído y se agitó durante 24 h, al cabo de las cuales una ccf (CH₂Cl₂-Acetona 95-5) indicó el consumo de III. Posteriormente se separó la fase acuosa de la fase orgánica y esta última se concentró a sequedad en el rotaevaporador. Se obtuvo un líquido viscoso, que después de una hora de encontrarse a temperatura ambiente precipitó.

(d) Obtención del modelo de profármaco [2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metil fosfato disódico, usando dos procedimientos

i Primer procedimiento: Con oxiclورو de fósforo según el **Esquema 2**.

Esquema 2

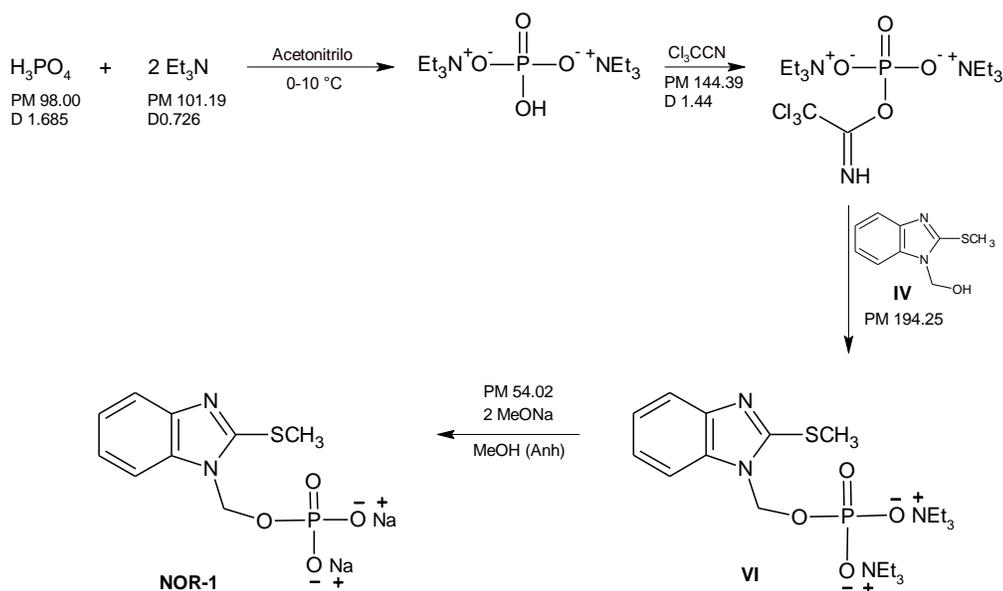


En un matraz bola de 50 mL con bocas, adaptado con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 0.63 mL (1.0364 g, 0.0068 mol) de POCl_3 en 10 mL de acetonitrilo; posteriormente, y con ayuda de dos jeringas de insulina, se agregaron lentamente, y al mismo tiempo, 0.6 mL (0.4734 g, 0.0103 mol) de etanol y 1.4 mL (1.0164 g, 0.0100 mol) de trietilamina. Esta reacción se caracterizó por el desprendimiento de gas. Concluida la reacción se agregó rápidamente al matraz 1 g (0.0051 mol) de [2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol, además de un equivalente de trietilamina (0.7 mL 0.5082 g, 0.0050 mol). El sólido obtenido se separó por filtración al vacío.

Posteriormente se colocó el sólido disuelto en etanol en un matraz de dos bocas, con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, al cual se agregó con ayuda de un embudo de adición 2 equivalentes de etóxido de sodio. La reacción se monitoreó usando el sistema diclorometano: acetona (95:5).

ii Segundo procedimiento: Con ácido fosfórico y tricloroacetitrilo según el **Esquema 3**.

Esquema 3



En un matraz de 50 mL con tres bocas, adaptado con agitación magnética y de una trampa anhidra, se colocaron 0.96 g (9.8 mmol) de ácido fosfórico en acetonitrilo; posteriormente se adicionaron lentamente 2.6 mL de trietilamina (1.8876 g, 18.7 mmol, 1.9 eq) y se dejó en agitación durante una hora. Después se agregaron 0.98 mL (1.4112 g, 9.8 mmol) de Cl_3CCN y se dejó en agitación por 24 horas. Al cabo de este tiempo se



agregaron 1.6 g (8.2 mmol) del alcohol **IV** preparado con anterioridad, esta reacción se dejó agitando para concluir en 24 horas. El fin de la reacción se verificó en ccf usando como sistemas de elución diclorometano: acetona (95:5) y cloroformo: acetona: hidróxido de amonio (4:1:1 gota).

Finalizada la reacción se evaporó el disolvente empleado y se resuspendió en 16 mL de metanol en un matraz de dos bocas, con agitación magnética y provisto de una trampa anhidra. Después se adicionó lentamente el metóxido de sodio, se dejó reaccionar una hora y se filtró al vacío. Se monitoreó el fin de la reacción usando el sistema diclorometano: acetona (95:5).

El producto obtenido se guardó en una campana de vacío para evitar su hidrólisis con la humedad del ambiente.

4.3. Preparación del derivado fosfonoximetilbencimidazol **NOR-2**

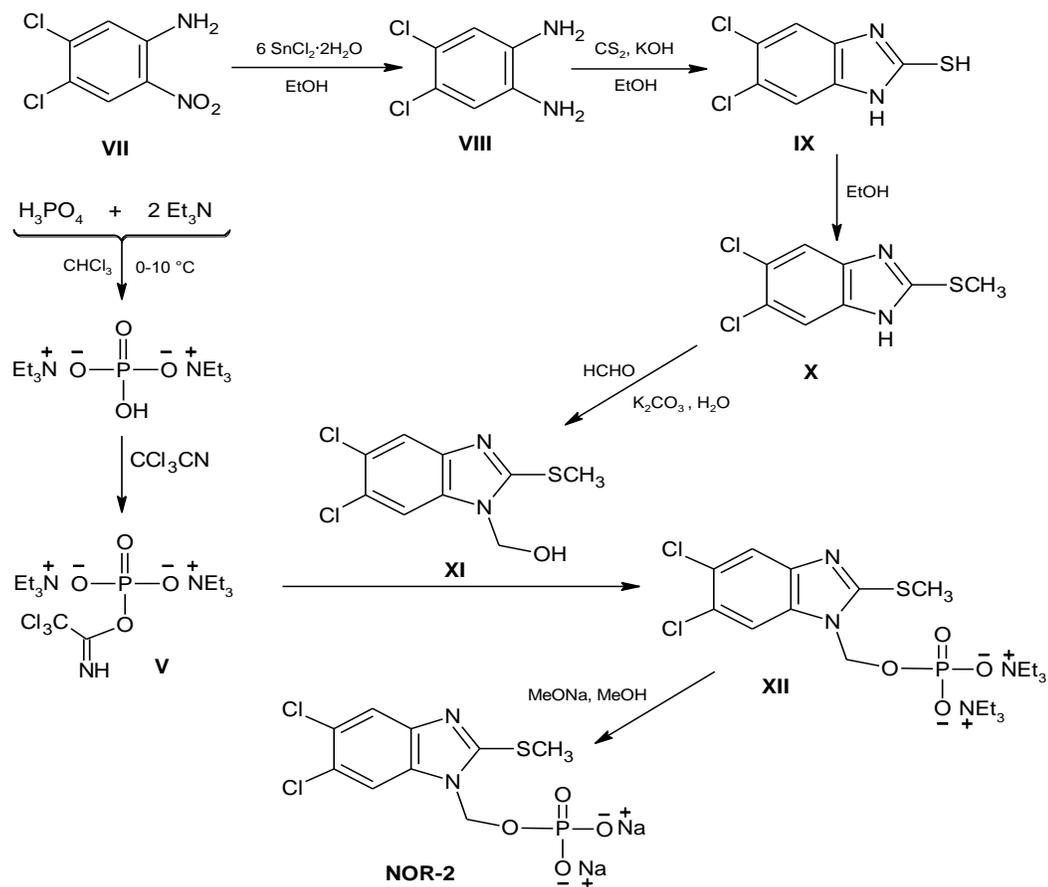
Para la preparación del profármaco **NOR-2** se procedió de manera semejante a la anterior, con algunas modificaciones (**Esquema 4**). Se partió de la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**VII**), que por medio de una reducción química dio la 4,5-diclorobenceno-1,2-diamina (**VIII**). La posterior ciclocondensación de ésta con disulfuro de carbono en medio básico llevó al 5,6-dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol (**IX**), que se sometió a una monometilación con yoduro de metilo para dar el 5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**X**).

Una vez purificado **X** se procedió a la síntesis del intermediario 5,6-dicloro-1-(hidroximetil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**XI**), empleando formaldehído. La reacción se llevó a cabo en medio básico y acuoso.

Por otro lado se preparó el intermediario activado **V**, como se describió anteriormente, y se le adicionó el compuesto **XI**, lo que dio el derivado fosfonoximetil (**XII**). El tratamiento de éste con metóxido de sodio en metanol proporcionó el compuesto **NOR-2** buscado.

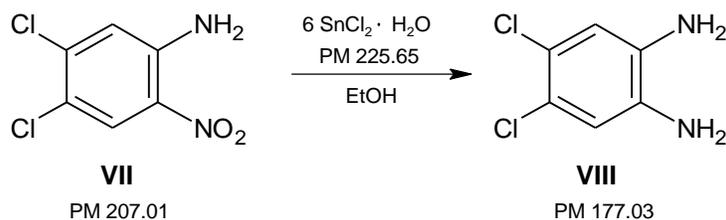


Esquema 4



4.3.1. Procedimiento experimental para la síntesis de NOR-2

(a) 4,5-Diclorobenceno-1,2-diamina (VIII)

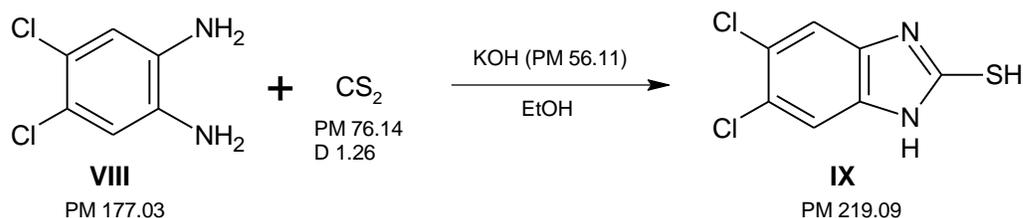


En un matraz bola de 250 mL con dos bocas, adaptado con refrigerante en posición de reflujo, un termómetro, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se mezclaron 5.0 g (24.2 mmol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina sintetizada en el laboratorio con anterioridad y 32.7 g



(144.9 mmol, 6 eq) de cloruro estanoso dihidratado en 50 mL de etanol. Se cerró el sistema y se calentó a reflujo durante 2 horas. Se monitoreó el fin de la reacción por medio de cromatografía de capa fina usando el sistema CHCl_3 : MeOH (98:2). Al término de la reacción se dejó enfriar y se vertió en un vaso de precipitados de 250 mL provisto de un baño de hielo. Enseguida se llevó el pH a 9 por adición de una solución saturada de NaOH. Las sales de estaño que precipitaron se separaron por filtración al vacío y se lavaron varias veces con etanol. El filtrado conteniendo la 4,5-diclorobenceno-1,2-diamina se concentró a sequedad con ayuda del rotaevaporador.

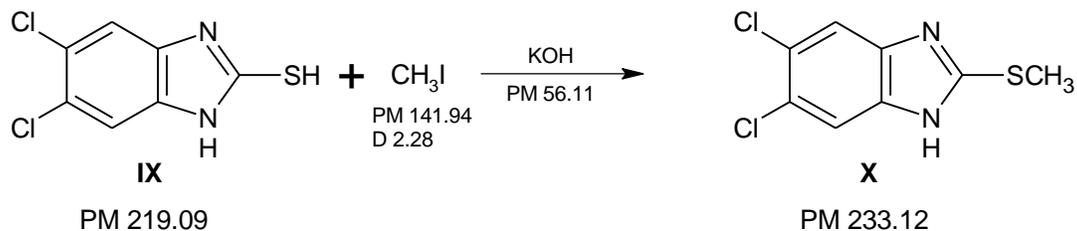
(b) 5,6-Dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol



En un matraz bola de 250 mL con bocas, adaptado con termómetro, refrigerante en posición de reflujo conectado a trampas con hipoclorito de sodio, y agitador magnético, se disolvieron 3.62 g (20.4 mmol) de 4,5-diclorobenceno-1,2-diamina y 1.26 g (22.5 mmol 1.1 equivalente) de KOH en 70 mL de una mezcla EtOH- H_2O (80:20). Ya disueltos los reactivos añadidos se agregaron 1.23 mL (1.5498 g, 20.4 mmol) de disulfuro de carbono, se elevó la temperatura hasta 65-70 °C y se mantuvo así por 2.5 horas. El término de la reacción se detectó por ccf en el sistema cloroformo: metanol (9:1).

La mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados de 250 mL conteniendo 100 mL de agua fría, posteriormente se neutralizó con ácido acético al 20%. El sólido obtenido se separó por filtración con succión, se lavó con agua fría y se dejó secar al aire. El sólido obtenido se purificó por cristalización simple en MeOH.

(c) 5,6-Dicloro-2-(metitio)-1*H*-bencimidazol



En un matraz bola de 500 mL con tres bocas, provisto de un embudo de adición, agitación magnética, atmósfera de nitrógeno y un termómetro, se disolvieron 4.13 g (18.9 mmol) de

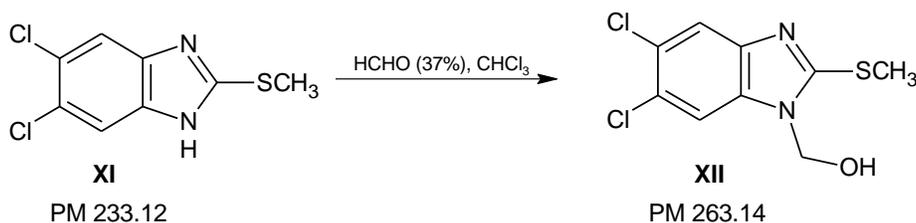


5,6-dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol y 1.16 g (20.7 mmol, 1.1 equivalente) de KOH en 50 mL de etanol y la solución formada se enfrió a 5-10 °C por medio de un baño de agua con hielo. Posteriormente, cuando la temperatura se encontró constante, se añadieron lentamente 1.1 mL (2.508 g, 17.7 mmol) de CH₃I con especial cuidado en mantener la temperatura constante en el intervalo antes mencionado. La reacción se monitoreó por ccf usando el sistema hexano: acetato de etilo (1:1). Terminada la reacción se neutralizó con ácido acético al 20%, el sólido obtenido se separó mediante filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire.

El sólido obtenido se purificó mediante una recristalización simple en MeOH.

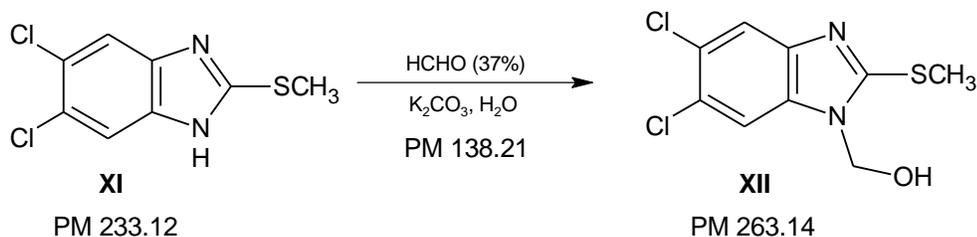
(d) Obtención del [5,6-Dicloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol probando dos diferentes metodologías

i Primer método: Con formaldehído acuoso en cloroformo



En un matraz bola de 100 mL, acondicionado con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se suspendieron 1.16 g (5 mmol) de 5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol en 12 mL de cloroformo, posteriormente se agregaron 4 mL (50 mmol) de formaldehído, se dejó que la reacción concluyera durante 24 horas, se monitoreó el final de la reacción por ccf usando como medio de elusión diclorometano: acetona (95:5). El sólido obtenido se separó del medio de reacción por filtración al vacío.

ii Segundo método: Con formaldehído acuoso en medio básico



En un matraz bola de 50 mL, provisto de agitación magnética, se suspendieron 16 g (0.0686 mol) de 5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**XI**) y 0.34 g (0.0025 mol) de carbonato de potasio en 16 mL de agua; posteriormente se agregaron 4.1 mL (0.05 mol) de formaldehído y

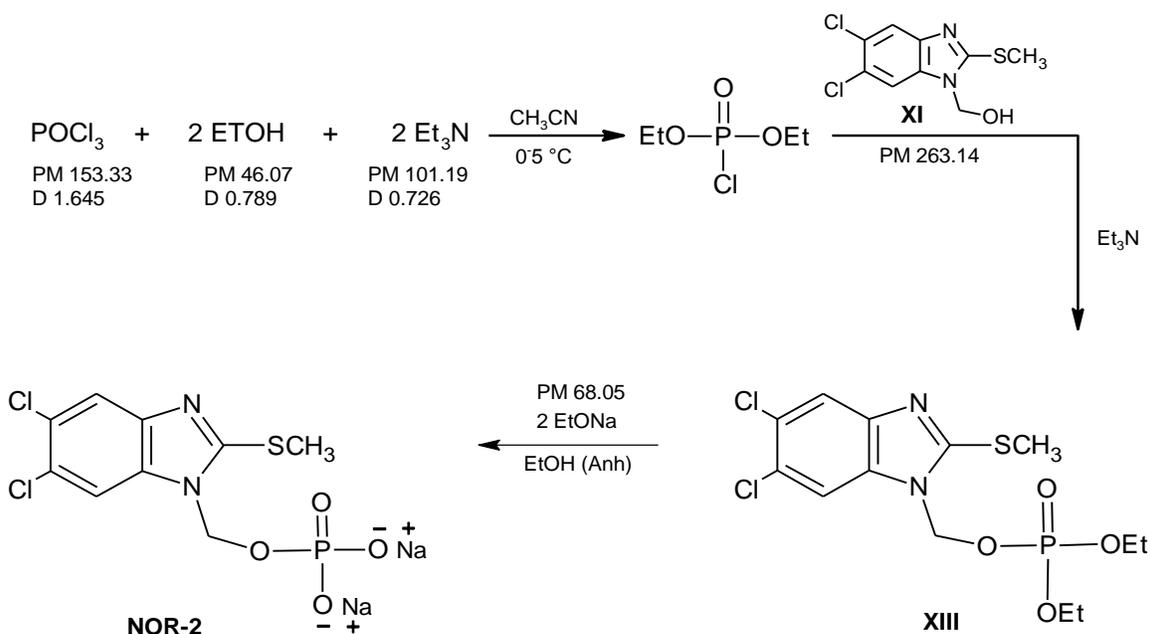


se dejó en agitación durante 24 horas. Se observó el fin de la reacción usando ccf corrida con el medio de elusión diclorometano: acetona (95:5).

(e) Obtención del modelo de profármaco [5,6-Dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il] fosfato disódico, usando dos procedimientos

i Primer procedimiento: Empleando oxiclورو de fósforo según el Esquema 5.

Esquema 5



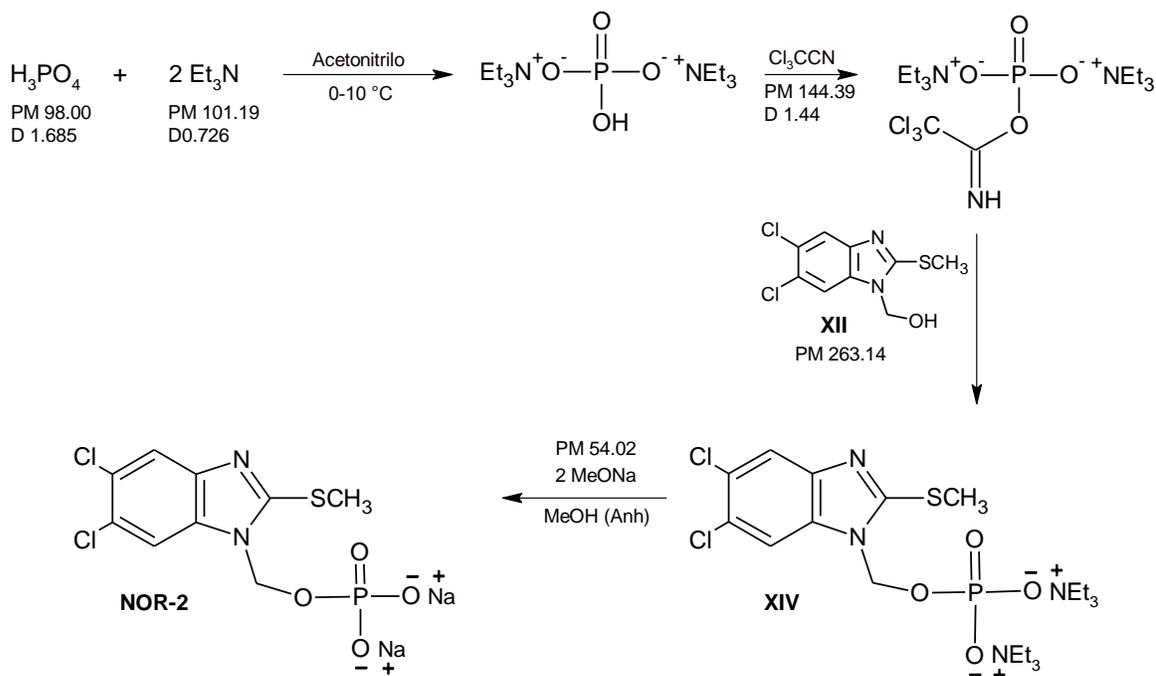
En un matraz bola de 100 mL con dos bocas, acondicionado con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 0.63 mL (1.0364 g, 0.0068 mol) de POCl_3 en 10 mL de acetonitrilo, posteriormente, y con ayuda de dos jeringas de insulina, se agregaron lentamente, y al mismo tiempo, 0.6 mL (0.4734 g, 0.0103 mol) de etanol y 1.4 mL (1.0164 g, 0.0100 mol) de trietilamina. Esta reacción se caracterizó por el desprendimiento de gas. Concluida la reacción se agregó rápidamente al matraz [5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (XII), además de un equivalente de trietilamina (0.7 mL). El sólido obtenido se separó por filtración al vacío.

Posteriormente se colocó el sólido disuelto en etanol en un matraz de dos bocas, con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, al cual se agregó con ayuda de un embudo de adición 2 equivalentes de etóxido de sodio. La reacción se monitoreó usando el sistema diclorometano: acetona (95:5).



ii Segundo procedimiento: Con ácido fosfórico y tricloroacetonitrilo según el Esquema 6.

Esquema 6



En un matraz bola de 50 mL con tres bocas, adaptado con agitación magnética y de una trampa anhidra, se colocaron 0.96 g (9.8 mmol) de ácido fosfórico en acetonitrilo; posteriormente se adicionaron lentamente 2.6 mL de trietilamina (1.8876 g, 18.7 mmol, 1.9 eq) y se dejó en agitación durante una hora. Luego se agregaron 0.98 mL (1.4112 g, 9.8 mmol 10 mmol) de Cl_3CCN y se dejó en agitación por 24 horas. Al cabo de este tiempo se agregaron 2.63 g (10 mmol) del alcohol **XII** preparado con anterioridad, esta reacción se dejó agitando para concluir en 24 horas. El fin de la reacción se verificó por una ccf usando como sistemas de elución diclorometano: acetona (95:5) y cloroformo: acetona: hidróxido de amonio (4:1:1 gota).

Finalizada la reacción se evaporó el disolvente empleado y se resuspendió en 16 mL de metanol en un matraz de dos bocas, con agitación magnética y provisto de una trampa anhidra. Después se adicionó lentamente el metóxido de sodio, se dejó reaccionar una hora y se filtró al vacío. Se monitoreó el fin de la reacción usando el sistema diclorometano: acetona (95:5).

El producto obtenido se guardó en una campana de vacío para evitar su hidrólisis con la humedad del ambiente.



5.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

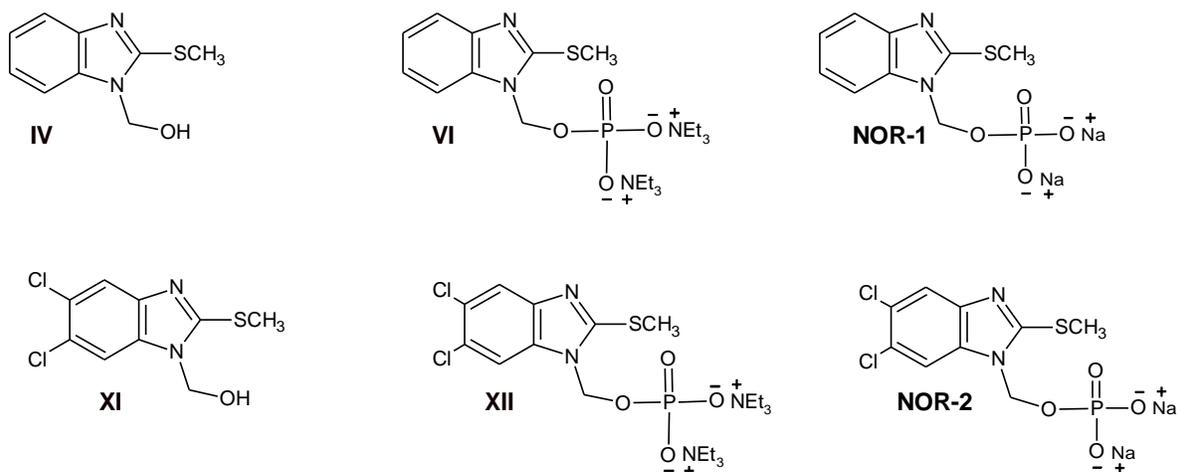


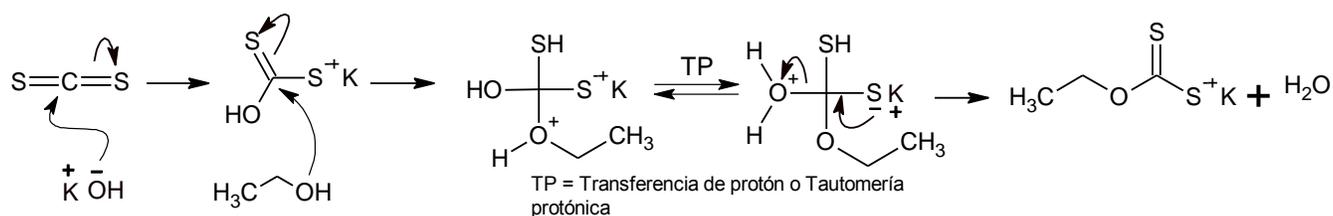
Figura 8. Resumen de los principales compuestos en esta tesis

5.1. Síntesis de materias primas como precursores de los modelos de profármacos.

Antes de iniciar con la síntesis de los modelos de profármacos se sintetizaron previamente las materias primas necesarias: 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**III**) y 5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**X**).

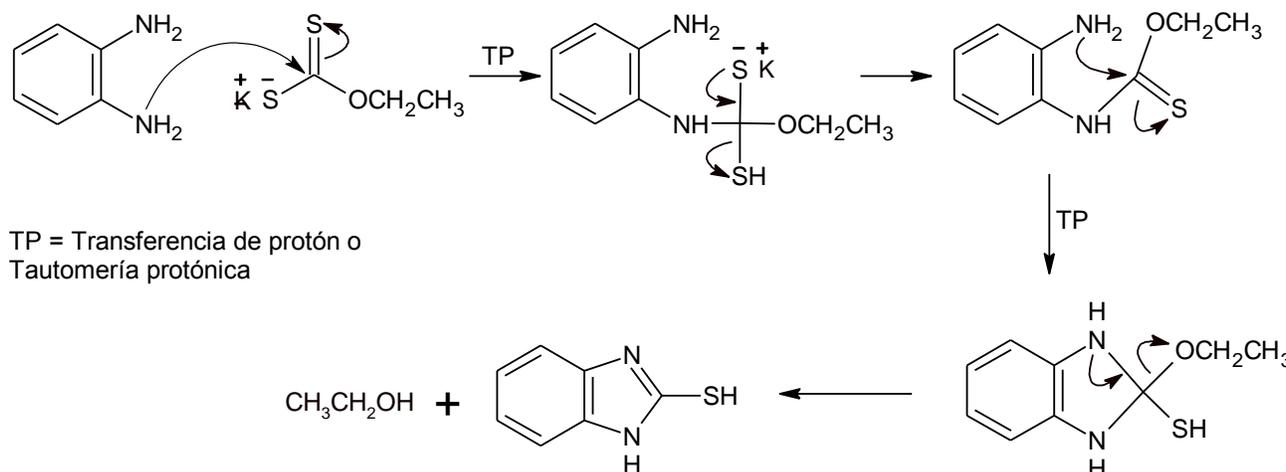
-Para la síntesis de **III** se partió de la *o*-fenilendiamina, que se sometió a una ciclocondensación para obtener el 2-mercapto-1*H*-bencimidazol (**Esquema 8**) por medio de la formación del intermediario xantato de etilo (**Esquema 7**), producto de la reacción entre el hidróxido de potasio, etanol y disulfuro de carbono presentes en el medio de reacción.

Esquema 7. Mecanismo propuesto para la formación del intermediario xantato de etilo



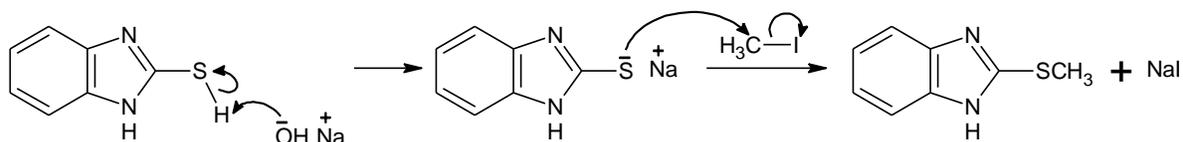
La reacción se llevó a cabo sin mayor problema, sólo se debió de tener cuidado de agregar el disulfuro de carbono al medio de reacción cuando la diamina y la base se encuentran ya disueltas, así como mantener la temperatura de reacción estable.

Esquema 8. Mecanismo propuesto para la ciclocondensación de la *o*-fenilendiamina con el intermediario xantato de etilo



El siguiente paso fue la *S*-metilación (**Esquema 9**), que se realizó mediante la adición de yodometano en medio básico. El éxito de este paso depende del control de la temperatura, ya que si ésta se eleva, se favorece la formación del producto dimetilado.

Esquema 9. Mecanismo propuesto para la *S*-metilación del 2-Mercapto-1*H*-bencimidazol



-Por otro lado, para la formación del 5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol se partió de 4,5-dicloro-2-nitroanilina, que se sometió a una reducción química del grupo nitro con cloruro estannoso, oxidando el ion Sn^{2+} a Sn^{4+} . Esta reacción depende del manejo de las sales de estaño al final de la reacción, debido a la formación de sales que pueden contaminar el producto. Para obtener el producto deseado, se procedió de la misma forma que para el compuesto anterior, la formación del 5,6-dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol mediante una ciclocondensación por medio de la formación del intermediario xantato de etilo y la posterior



metilación mediante la adición de yodometano en medio básico, teniendo los mismos cuidados y tratamientos que en las reacciones anteriores.

5.2. Identificación de las materias primas

Las constantes de R_f y puntos de fusión de los compuestos obtenidos en estas reacciones fueron idénticos a la de los mismos compuestos obtenidos y caracterizados con anterioridad en el laboratorio

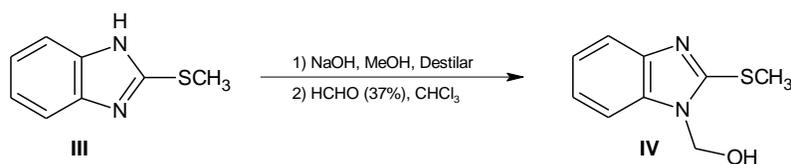
Tabla 2. Caracterización de las materias primas

Compuesto	R_f	Sistema de elusión	Disolvente de recristalización	Punto de fusión (°C)	Rend. (%)
2-Mercaptobencimidazol (II)	0.50	Cloroformo: Metanol (9: 1)	Etanol 95%	303.1-304.9	72.2
2-(Metiltio)bencimidazol (III)	0.40	Cloroformo: Metanol (95: 5)	Etanol/Agua	203.6-204.6	86.8
4,5-Diclorobenceno-1,2-diamina (VIII)	0.61	Cloroformo: Metanol(98: 2)	Metanol	161.1-162.4	85.4
5,6-Dicloro-2-mercaptobencimidazol (IX)	0.40	Cloroformo: Metanol (9:1)	Metanol	333.9-335.1	97.8
5,6-Dicloro-2-metiltiobencimidazol (X)	0.60	Hexano: Acetato de etilo (1: 1)	Metanol	232.5-234.3	72.1

5.3. Síntesis del [2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (IV)

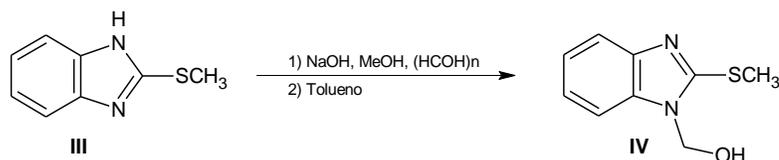
La obtención del [2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol se logró probando cuatro diferentes metodologías que se describen a continuación.

i. Primer método: En medio básico.



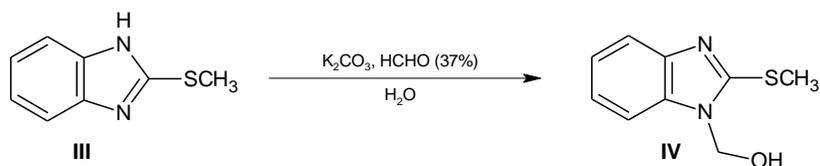
La reacción se dejó 24 horas y durante este tiempo no se observó avance significativo. La reacción permaneció en suspensión, e inclusive los reactivos se pegaron a la pared del matraz sin importar el volumen de cloroformo utilizado en la reacción. Para tratar de disolver las materias primas se agregó DMF, lo que propició la formación de una resina que seguía conteniendo la materia prima, según indicó la cromatoplaca.

ii. Segundo método: En medio básico con tolueno



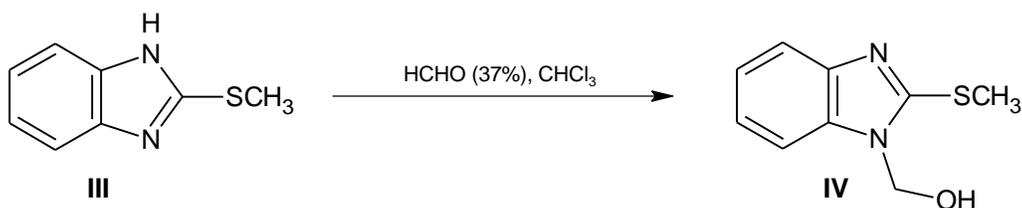
La reacción no concluyó, monitoreando su avance mediante cromatografía de capa fina usando el medio de elución diclorometano: acetona (95:5%). Se intentó extraer la materia prima que no había reaccionado, pero se provocó la hidrólisis del producto formado, lo cual se debió probablemente a la base fuerte presente en el medio de reacción.

iii. Tercer método: En medio básico acuoso



Usando la cromatografía de capa fina se logró observar que la reacción concluyó y se intentó recuperar el producto filtrando al vacío, pero se observó la hidrólisis del producto formado. Posteriormente, en otro procedimiento realizado, se intentó obtener el producto extrayéndolo del medio acuoso con acetato de etilo y concentrando este último a sequedad y temperatura ambiente en el rotaevaporador, pero se volvió a observar la hidrólisis del producto, aunque en menor cantidad.

iv. Cuarto método: En medio neutro



El punto final de la reacción se monitoreó por CCF usando como medio de elución diclorometano: acetona (95:5), y se observó el término de la reacción al encontrar una clara



diferencia entre la materia prima y el producto de reacción, tal y como lo muestra la siguiente placa:

[2-(Metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metanol (IV)	• ● $R_f = 0.13$	
2-(Metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol (III)	• ● $R_f = 0.24$	

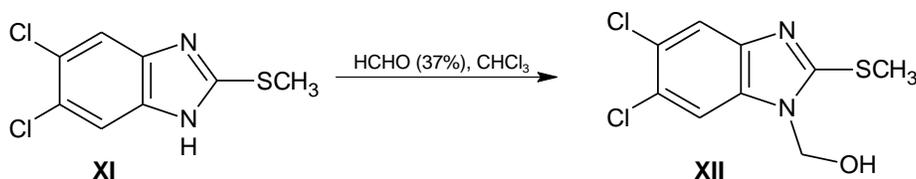
Compuesto	R_f
Producto [2-(Metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il]metanol (IV)	0.13
Materia prima 2-(Metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol (III)	0.24

Separado el producto obtenido, se determinó su punto de fusión, el cual fue de 132.4-134.2 °C. Como era de esperarse, el punto de fusión disminuye cuando se elimina el H en la posición 1, esto debido a que se elimina la atracción intermolecular, lo que hace que se necesite una menor cantidad de energía para lograr el cambio de estado. El rendimiento de la reacción fue de 75% y se obtuvo su espectro de masas (**Espectro 1**), de IR (**Espectro 2**) y de RMN de ^1H (**Espectro 3**), el espectro correspondiente al intercambio con agua deuterada para la identificación de la señal correspondiente al protón del grupo hidroxilo (**Espectro 4**) y ^{13}C (**Espectro 5**).

5.4. Síntesis del [5,6-Dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (XII)

Al encontrar un método para la síntesis de los bencimidazolilmetanoles, se procedió a la síntesis del [5,6-dicloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (XII), empleando solo las dos metodologías que tuvieron resultados positivos para el compuesto anterior, los resultados se presentan a continuación:

i Primer método: Con formaldehído acuoso en cloroformo



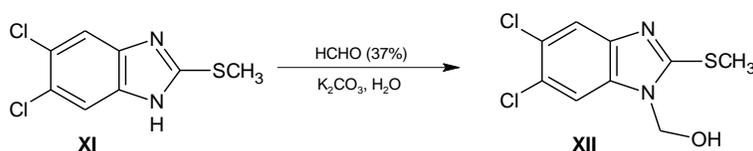
El avance de la reacción se monitoreó por CCF usando como medio de elusión diclorometano: acetona (95:5), y se observó una ligera diferencia entre la materia prima y el



producto; como la diferencia era muy pequeña se verificó el final de la reacción midiendo el punto de fusión del producto y se comprobó que se trataba de la materia prima.

Posteriormente se intentó repetir la reacción sólo cambiando de disolvente, pues se formuló la hipótesis de que la reacción no se llevó a cabo porque la materia prima no logró solubilizarse en el medio de reacción. Los disolventes empleados fueron diclorometano, acetato de etilo, metanol, etanol, acetonitrilo, THF, DMF, en todos los casos se disolvía el bencimidazol, pero en todos se observó que una vez agregado el formaldehído al medio de reacción la materia prima precipitaba como un sólido blanco pastoso e insoluble en todos los disolventes probados. La reacción no se llevó a cabo en ningún disolvente empleado.

ii Segundo método: Con formaldehído acuoso en medio básico



Se logró observar que la reacción concluyó y se recuperó el producto filtrando al vacío, obteniéndose un sólido blanco con un rendimiento de 85.2% que descompone a 200 °C, e insoluble en todos los disolventes orgánicos, excepto DMSO.

A diferencia del alcohol proveniente del 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol, el proveniente del 5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol es estable cuando se obtiene por este método, que resultó ser el único que funciona para la obtención de este intermediario.

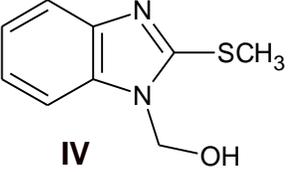
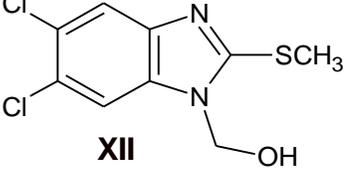
Al igual que el compuesto anterior, se logró obtener la espectrometría de masas, así como el espectro IR, y RMN de ¹H y ¹³C. Los datos espectrométricos y espectroscópicos de ambos compuestos se enlistan en la Tabla 2, y en los espectros 7, 8, y 9.

Se puede observar que la abundancia del compuesto **XI** en el espectro de masas es apenas del 30%, esto debido a que el compuesto es ligeramente soluble en el disolvente empleado, DMSO, porque si se compara el espectro obtenido con el espectro de la matriz, las señales correspondientes a la matriz son de mayor magnitud que las del compuesto **XI**.



5.5. Identificación de los intermediarios hidroxilados

Tabla 3. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los intermediarios 1-(hidrometilo) IV y XII.

Compuesto	Método analítico y señales
<div style="text-align: center;">  <p>IV PM 194.25</p> </div>	<p>Espectro IR Grupo OH: 3143.39 Estiramiento C-N: 1705 Metilo: 2815, 1043, 1379 Vibración C=C: 1590 Vibración C-H: 1136 Vibración C-S: 730</p> <p>Espectro de masas (FAB) M+1= 165 (100%) M+1=195(80%)</p> <p>Espectro de RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) (ppm) 2.75, s (3H, CH₃S) 5.5, d (2H, -CH₂-) 6.77, t (1H, OH, que desaparece al intercambio con D₂O (Fig. 4)) 7.23, m (2H, H4 y H7) 7.57, m (2H, H5 y H6)</p>
<div style="text-align: center;">  <p>XII PM 263.14</p> </div>	<p>Espectro IR Grupo OH: 3143.39 Estiramiento C-N: 1705 Metilo: 2815, 1043, 1379 Vibración C=C: 1590 Vibración C-H: 1136 Vibración C-S: 730</p> <p>Espectro de masas (FAB) M+1= 264 (30%) M+1=233 (20%)</p> <p>Espectro de RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) (ppm)</p>



	2.75, s (3H, CH ₃ S) 5.49, s (2H, -CH ₂ -) 7.83, s (1H, H4) 7.90, s (1H, H7)
--	---

En ambos casos, el producto obtenido alcohol **III** ó **XII** se sometió enseguida a siguiente reacción para evitar la hidrólisis y prevenir que el producto final estuviera contaminado con el nucleó bencimidazólico, así como también para aumentar los rendimientos.

5.6. Síntesis del modelo de profármaco **NOR-1**

(a) Empleando la primera metodología

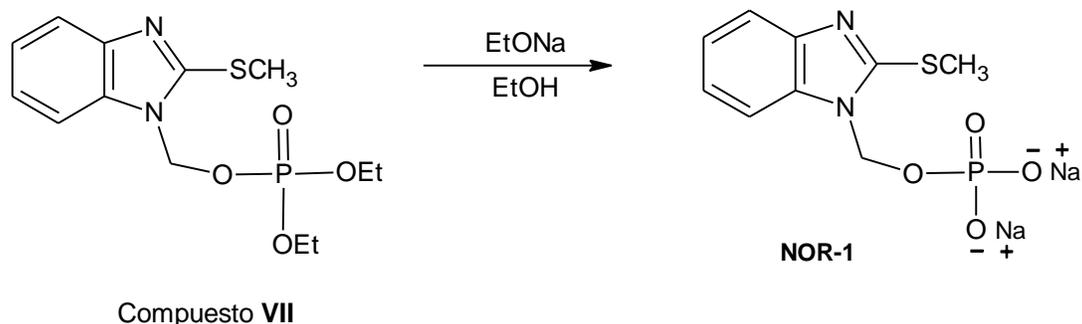
En el primer método empleado para la formación del compuesto **NOR-1**, usando oxiclورو de fosforo, trietilamina y etanol para la formación del intermediario [2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metil fosfato de dietilo (**VII**), se obtuvo un sólido con R_f diferente al del [2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol y al 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol, por lo cual se analizó mediante espectrometría de masas y no se encontró el compuesto esperado, por ello se abandonó esta técnica y ya no se intentó para **NOR-2**, porque además se observó que cuando se intentó romper el éster (**VII**), empleando etóxido de sodio en etanol, para la formación de la sal de sodio (**NOR-1**), no hubo tal ruptura según indicó la cromatoplaaca corrida en el sistema diclorometano-acetona (95:5), es decir no se llevó a cabo la reacción planteada en el **Esquema 10**.

1 ·	●	$R_f = 0.26$
2 ·	●	$R_f = 0.16$
3 ·	●	$R_f = 0.70$
4 ·	●	$R_f = 0.70$

- 1 2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol (**III**)
- 2 [2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (**IV**)
- 3 Compuesto **VII**
- 4 **NOR-1** Esperado



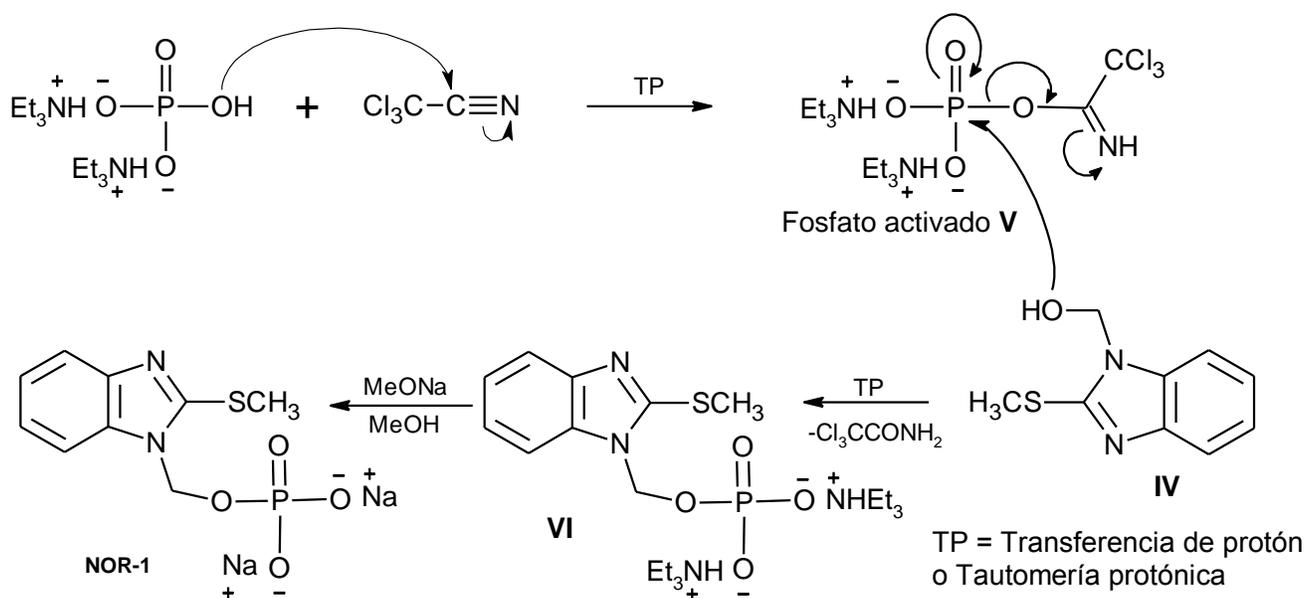
Esquema 10



(b) Empleando la segunda metodología

Por lo tanto, para la formación de los modelos de profármacos modelo **NOR-1** y **NOR-2** se empleó la segunda técnica. Se inició con la reacción ácido-base entre el ácido fosfórico y la trietilamina; esto con el objetivo de hacer un mejor nucleófilo al ácido fosfórico para el posterior ataque de éste al nitrilo del tricloroacetónitrilo en la reacción, formando el intermediario 2,2,2-tricloroetanimidoil fosfato de trietilamonio (intermediario **V**). Una vez formado el intermediario **V**, se añadió el bencimidazolimetanol (**IV**), atacando uno de los pares de electrones libres del oxígeno del alcohol como se muestra en el **Esquema 11**.

Esquema 11. Mecanismo propuesto para la formación de **NOR-1**

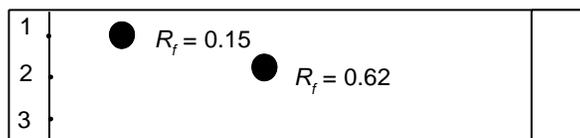


5.6.1. Síntesis e identificación de NOR-1

La trietilamina empleada se destiló previamente en el laboratorio y el ácido fosfórico se guardó en benceno para evitar que se hidratara. La reacción entre ácido fosfórico y trietilamina es rápida; sin embargo, para que se consumara totalmente la materia prima se dejó en agitación durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se añadió el tricloroacetnitrilo, llevándose a cabo la formación del intermediario **V**; esta reacción es lenta, completándose en 24 horas a temperatura ambiente, manteniendo condiciones estrictamente anhidras. Luego se agrega el bencimidazolimetanol (IV) y se deja incorporar en las siguientes 24 horas, monitoreando la conclusión de la reacción mediante ccp, hasta la desaparición de la mancha correspondiente a (IV)

Cuando concluyó la formación del intermediario **VI**, se evaporó el acetonitrilo y se observó la formación de un producto secundario que le brindó a la mezcla de reacción el color amarillo intenso con apariencia viscosa.

La reacción se monitoreó mediante cromatografía de capa fina con diclorometano: acetona (95:5) como medio de elusión para verificar que la reacción se había completado. También se observó la aparición de un producto con un R_f mayor, como se observa en la figura, el cual correspondía al producto secundario, la tricloroacetamida. Los productos de interés no absorben la luz UV, por ello, la reacción se da por terminada cuando se ha consumido toda la materia prima (IV).



- 1 [2-(Metiltio)-1*H*-Bencimidazol-1-il]metanol materia prima (**IV**)
- 2 Mezcla de reacción a las 24 h entre **V** y **IV**
3. Producto obtenido después del intercambio con CH_3ONa , identificado como **NOR-1**

Estos productos no lograron separarse hasta después de hacer el intercambio catiónico entre el ion trietilamonio y el ion sodio, ya que una vez formado el compuesto **NOR-1** precipita y puede separarse filtrando al vacío el sólido formado. En las aguas madres de la reacción, al evaporar el metanol empleado se observó la formación de unos cristales amarillos: tricloroacetamida, identificados mediante ccf.



El residuo de la filtración se hidrataba fácilmente al contacto con la humedad del ambiente, por lo que se guardó en una campana de vacío. Este compuesto es insoluble en todos los disolventes orgánicos y tuvo un punto de fusión mayor a 350 °C. No se pudo corroborar la pureza del producto obtenido mediante ccf debido a que el compuesto no absorbe en el rango UV.

La identificación del producto obtenido se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando la técnica de FAB (Fuentes de bombardeo por átomos rápidos). En el espectro obtenido se observa la presencia tanto del producto de interés como de la sal monobásica (**Espectro 10**). También se obtuvo su espectro de IR (**Espectro 11**), donde se observan las bandas características de los grupos funcionales presentes.

Para la obtención del espectro de RMN de ^1H (**Espectro 12**), la muestra se preparó en D_2O debido a que el compuesto **NOR-1** era soluble sólo en este disolvente. En el espectro se observó la presencia del grupo metileno que une al grupo fosfato con el núcleo bencimidazólico; lo cual indicaba la presencia del producto de interés. También se observó que la proporción en la que se encontraba este respecto a los contaminantes era muy pequeña, porque se observaron señales correspondientes al metóxido y a la trietilamina. También se obtuvo el espectro de ^{31}P (**Espectro 13**) y como se reporta para el caso de los fosfonoximetilbencimidazoles del fenbendazol,⁵⁴ se obtiene una señal singulete en 3, en nuestro caso también se obtiene una señal a ese desplazamiento químico (2.5 ppm) y otra negativa (-7 ppm) en mayor proporción, como se observa en el **Espectro 13** del apéndice.

Para eliminar la trietilamina y el metóxido del producto obtenido se hicieron lavados con metanol anhidro monitoreando la pureza mediante RMN. Aunque se observó la disminución del metóxido, los contaminantes seguían presentes; por lo que, para eliminar también la trietilamina y considerando su pKa de 11.8, se lavó el producto con una solución de metóxido de sodio en metanol, aumentando el pH del medio y provocando la disolución de la trietilamina en estado neutro. El espectro de RMN (**Espectro 14**) mostró la eliminación de la señal perteneciente a la trietilamina, aunque también desapareció la señal correspondiente al metileno, lo que nos hizo concluir que el compuesto **NOR-1** obtenido es inestable a pH básico.

Se repitió el procedimiento de reacción, pero esta vez el metóxido de sodio se agregó al medio de reacción como una solución en metanol empleando exactamente los dos equivalentes necesarios. Se observó el mismo comportamiento, al agregar poco a poco la solución precipitó el compuesto de interés. Para evitar que se hidrolizara el derivado fosfonoximetil se hicieron varios lavados con metanol e inmediatamente se obtuvo su espectro de RMN, donde se observó nuevamente la señal correspondiente al metileno, pero también se observó la presencia de los contaminantes en mayor proporción.



Al obtener el espectro de RMN de ^{31}P se observaron las mismas señales que en el primer espectro obtenido, una positiva, ahora en mayor proporción y una negativa. Por ello se investigó y se concluyó que la señal negativa corresponde al grupo fosfato inorgánico.

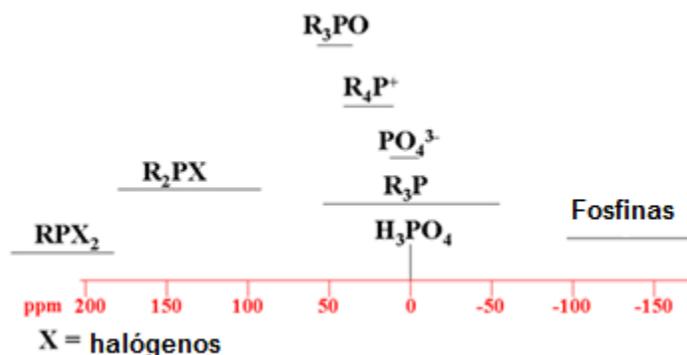


Figura 9. Rangos de desplazamiento químico de ^{31}P de acuerdo a su entorno químico.⁶²

Como se observa en la **Figura 9**, los desplazamientos correspondientes al Fósforo-31 tienen rangos muy amplios, se puede concluir sin embargo que como se reportó para el caso de los profármacos de los carbamatos bencimidazólicos⁵⁴ y por la información presentada en las **Figuras 10** y **11** acerca de la forma de los desplazamientos, de acuerdo al grupo funcional, se concluye que el desplazamiento químico de interés, en nuestro caso, es el que se encuentra entre 2.5-3 ppm.

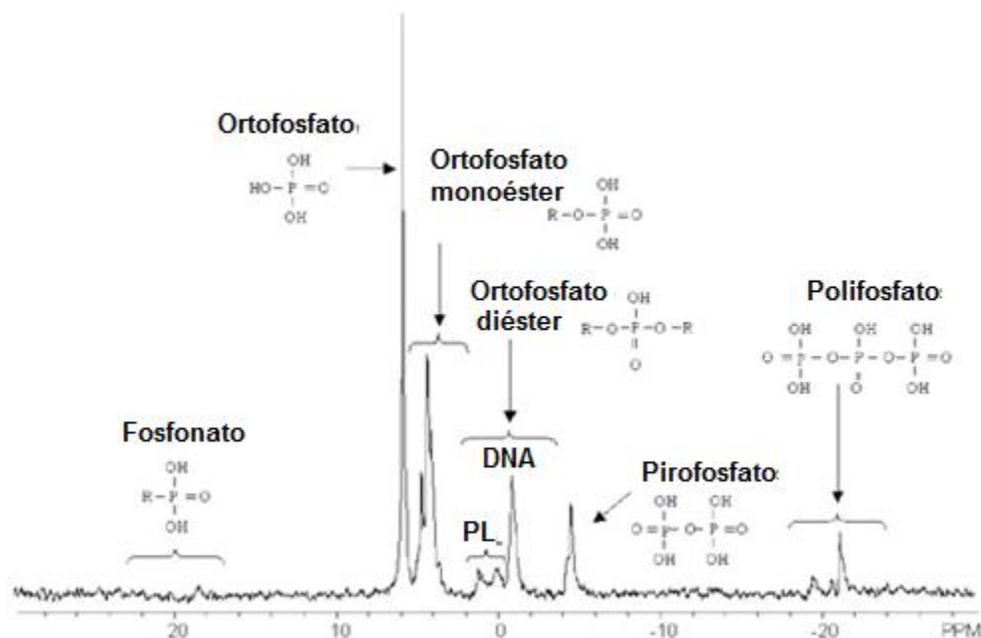


Figura 10. Ejemplos de algunos grupos fosfato y sus desplazamientos.⁶³



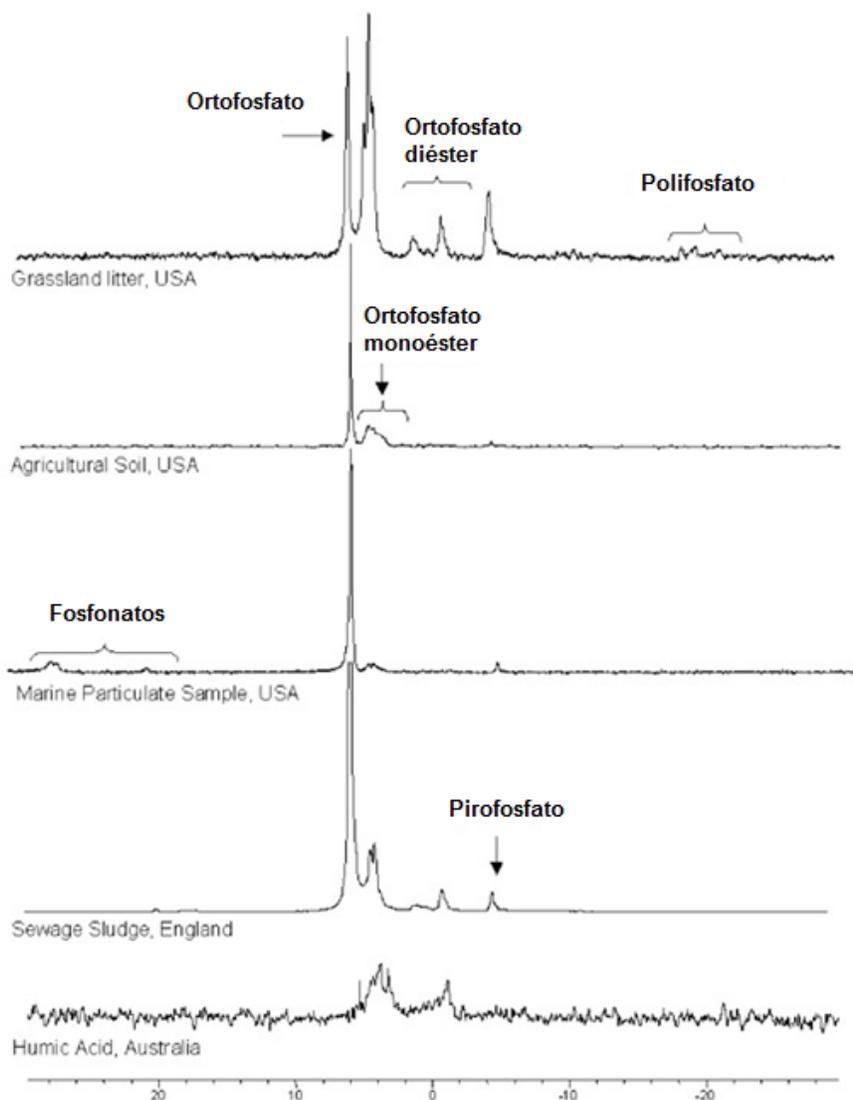


Figura 11. Formas de los desplazamientos de fósforo según el entorno químico en que se encuentran.⁶³

Se repitió la síntesis de **NOR-1** realizando el intercambio catiónico mediante una valoración con una solución de metóxido de sodio en metanol y un potenciómetro. Se consideró el punto final de la valoración cuando el pH se mantuvo estable, con el propósito de emplear sólo la cantidad exacta de metóxido de sodio y evitar un exceso que después contaminara el producto final, como anteriormente se había observado. El pH de inicio de la valoración fue de 2 y se logró estabilizar en 7. El sólido obtenido por filtración al vacío se guardó inmediatamente en la campana de vacío; mediante cromatografía de capa fina se observó que el compuesto NOR-1 estaba limpio de 2-metilbencimidazol, por ello se obtuvo su espectro de RMN de ¹H. Como era de esperarse, el compuesto obtenido tenía una menor



concentración de metóxido de sodio; sin embargo, éste seguía apareciendo junto con la trietilamina, por ello se decidió hacer lavados con metanol y acetona.

Mediante cromatografía de capa fina se verificó que no se hubiera hidrolizado **NOR-1**, lo cual se apreciaría con la presencia de 2-metiltiobencimidazol en la placa. Para evitar cualquier detalle que entorpeciera la identificación del compuesto por RMN, la muestra se preparaba en D₂O minutos antes de ser analizada. El espectro que se obtuvo fue mejor que los anteriores; sin embargo, no se logró eliminar por completo ni el metóxido de sodio ni la trietilamina, lo cual se explica porque a pH 7 la mayor parte de la trietilamina se encuentra protonada y con ello adquiere una carga que le permite ser insoluble en medios no polares, pero muy soluble en disolventes polares, como el agua, que es el único disolvente en el cual es soluble **NOR-1** y que es en el que se preparaba la muestra.

El espectro de ³¹P mostró una vez más dos singuletes, uno en 3 ppm aproximadamente, que corresponde al grupo fosfato unido al bencimidazol y una con desplazamiento químico negativo que corresponde al fosfato inorgánico; de esta manera se propuso que **NOR-1** era inestable en medio acuoso, ya que antes de la preparación de la muestra la placa nos mostraba que la muestra no contenía materia prima, pero después de la preparación de la muestra en el espectro se observa la presencia de fosfato inorgánico, es decir fosfato que se ha separado del núcleo bencimidazólico.

Para comprobar la hipótesis planteada después de los resultados obtenidos de RMN, en un tubo de ensayo se colocaron 100 mg de **NOR-1**, a los cuales se agregó 1 ml de agua destilada y se agitó ligeramente el tubo. Treinta minutos más tarde se observó que el tubo estaba ligeramente turbio, por lo cual se extrajo con acetato de etilo el precipitado y se le realizó una cromatografía de capa fina usando como referencia el 2-metiltiobencimidazol, comprobándose que el precipitado se trataba de la materia prima. Por este sencillo procedimiento se comprobó la inestabilidad del primer modelo de profármaco **NOR-1** en medio acuoso, siendo la estabilidad acuosa uno de los objetivos planteados al inicio del proyecto.

Esta observación fue respaldada por el espectro de IR que se le realizó al compuesto **NOR-1** usando agua como disolvente, ya que al compararlo con un espectro de IR del 2-metiltiobencimidazol se obtienen exactamente los mismos estiramientos, lo cual nos indica la hidrólisis del compuesto. Otros disolventes usados para la obtención del espectro de RMN ¹H del compuesto **NOR-1**, como DMSO y ácido trifluoroacético, no disolvieron la muestra o mostraron las señales de las impurezas anteriormente mencionadas y la desaparición de las señales de interés

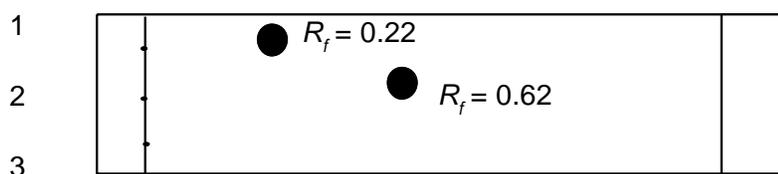
En el **Espectro 15** se presenta únicamente la región del espectro de RMN ¹H del compuesto **NOR-1**, donde se observa la señal correspondiente al metileno y a los grupos aromáticos de la molécula, con los espectros obtenidos y el espectro de masas se prueba la existencia del



compuesto, aunque también se aprecia su inestabilidad en medio acuoso, lo que impidió su purificación.

5.6.2 Síntesis e identificación de **NOR-2**

Para el modelo de profármaco **NOR-2** se siguió el mismo procedimiento que para **NOR-1**: de manera sincronizada se colocó, por un lado, la reacción del intermediario hidroxilado **XI** y por otro, la reacción de formación del intermediario **V**. Cuando ambas reacciones se completaron, el sólido correspondiente al intermediario **XI** se incorporó a la reacción de formación de **V**. Para monitorear el término de esta reacción se empleó la técnica de cromatografía en capa fina, tanto para verificar que se completara la conversión de la materia prima como para corroborar la formación del producto secundario, la tricloroacetamida. La placa se muestra a continuación:



- 1 [5,6- Dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol (**XI**)
- 2 Mezcla de reacción a las 24 h entre el intermediario **V** y **IV**
3. Producto obtenido después del intercambio con CH_3ONa , identificado como **NOR-2**

A diferencia del intermediario **VI**, el intermediario **XII** logró aislarse como un sólido con punto de fusión de 160°C .

El intercambio catiónico para la formación de **NOR-2** se realizó mediante una valoración ácido-base, tomando en cuenta los resultados obtenidos en la formación de **NOR-1**. Se tenía la expectativa de que este compuesto fuera más estable en medio acuoso porque durante toda la ruta de síntesis, la presencia de los dos cloros en el anillo provocó un comportamiento completamente diferente al primer modelo de profármaco. Sin embargo, y pese a las primeras diferencias observadas entre ambos modelos, cuando se obtuvo el sólido correspondiente a **NOR-2**, se observó el mismo comportamiento que para **NOR-1**, ya que el punto de fusión también rebasaba los 350°C , como en el primer caso el hecho de que el punto de fusión se elevara tanto indicaba la presencia de un enlace inorgánico en la



molécula, en nuestro caso el correspondiente a la unión de los dos iones de sodio al grupo fosfato. También se observó el mismo comportamiento respecto a la solubilidad, el sólido obtenido sólo se lograba solubilizar en medio acuoso, este comportamiento hace referencia a que el compuesto sintetizado efectivamente corresponde a una sal inorgánica.

Después de estas observaciones, solo faltaba identificar el compuesto mediante las técnicas espectroscópicas y espectrométricas empleadas para los compuestos anteriores y verificar la estabilidad del compuesto en medio acuoso. El espectro de masas del compuesto **NOR-2** (**Espectro 16**) muestra que éste se encuentra en una proporción relativa de 20%, el espectro de IR (**Espectro 17**) muestra el mismo comportamiento que el compuesto **NOR-1**.

Como se observó en el primer modelo de profármaco, **NOR-2** no absorbía luz UV, por lo que no fue posible determinar su pureza mediante la técnica de cromatografía de capa fina, ya que por este método únicamente se determinó que no existiera materia prima en el producto, por ello se procedió a la obtención de los espectros de RMN. En el espectro de ^1H (**Espectro 18**), se observó, al igual que en el primer compuesto, la presencia en mayor proporción de los contaminantes, trietilamina y metóxido de sodio. También se logró obtener el espectro de ^{31}P (**Espectro 19**), en el cual se observa que la señal correspondiente al fosfato unido al grupo bencimidazólico se encuentra en mayor proporción que el de la señal correspondiente al fosfato inorgánico; sin embargo, esta señal aparece y es un indicio de la inestabilidad acuosa del compuesto, aunque menor que en el compuesto **NOR-1**; por lo anterior, antes de continuar con el proceso de purificación del compuesto, se valoró su estabilidad en medio acuoso, empleando la misma prueba en el tubo de ensayo practicada al compuesto **NOR-1**, por medio de esta prueba se determinó la inestabilidad del compuesto **NOR-2** en medio acuoso, ya que solo bastó dejar el compuesto en agua por media hora, para que se escindiera el grupo fosfato unido al núcleo bencimidazólico, ya que al término de la prueba se observó ligera turbidez en el tubo de ensayo, que se extrajo en acetato de etilo y se comparó mediante cromatografía de capa fina con la materia prima, donde se observó que se trataba del mismo compuesto.

Para cumplir con la identificación de los compuestos mediante RMN, se le hicieron algunos lavados a **NOR-2** empleando únicamente metanol anhidro pero, como se observa en la **Espectro 20**, la señal correspondiente al metileno que une al grupo fosfato con el núcleo bencimidazólico ya no aparece, lo cual nos indica la ruptura del modelo de profármaco **NOR-2**.



6.0. CONCLUSIONES

- Se lograron sintetizar las materia primas necesarias para el estudio de la síntesis de los dos modelos de profármacos planteados: 2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol y 5,6-Dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol con rendimientos de 86.8 y 72.1%, respectivamente.
- Se lograron implementar dos rutas de síntesis, para la formación de los intermediarios hidroxilados, los cuales resultaron ser estables a condiciones ambientales y pudieron aislarse.
- Se lograron sintetizar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas los intermediarios hidroxilados [2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol y [5,6-dicloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-1-il]metanol con rendimientos de 75% y 85.2%, respectivamente.
- Se logró implementar una ruta de síntesis para la formación de los fosfonoximetilbencimidazoles; mediante espectrometría de masas se logró comprobar la presencia de los dos modelos de profármacos que fueron sintetizados mediante esta técnica.
- No se pudieron purificar los modelos de profármacos sintetizados debido a su inestabilidad en medio acuoso, ya que incluso la humedad del ambiente escindía el grupo fosfato unido al núcleo bencimidazólico. Debido a la inestabilidad que caracterizó a ambos modelos sintetizados no fue posible realizar pruebas de solubilidad acuosa. Sin embargo, fue posible caracterizar los compuestos sintetizados empleando agua como disolvente, debido a que eran insolubles en los disolventes orgánicos probados.



7. EXPECTATIVAS

- La inestabilidad en medio acuoso de los dos modelos de profármacos sintetizados se debe a que las moléculas empleadas carecían de sustituyentes en el anillo que aportarían una mayor densidad electrónica que estabilizara el enlace formado, lo cual se comprueba al observar que la molécula más grande que fue sintetizada (**NOR-2**), resultó ser más estable que **NOR-1**
- Por ello se plantea extrapolar esta técnica al triclabendazol, con el fin de aumentar su solubilidad acuosa, se plantea la hipótesis de que al ser una molécula con sustituyentes en el núcleo bencimidazólico que aporten una mayor cantidad de electrones que las empleadas en el estudio de esta ruta de síntesis, tendrá una mayor estabilidad acuosa, lo cual le permitirá ser un profármaco exitoso.
- Así mismo, se plantea extrapolar esta novedosa y sencilla técnica al compuesto desarrollado en el laboratorio 122, comúnmente conocido como compuesto “Alfa”, que también es un derivado del 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol que ha demostrado tener una actividad equiparable al triclabendazol, pero que comparte con éste los problemas de insolubilidad acuosa.



8.0. REFERENCIAS

1. Peter J. Hotez. Control of Neglected Tropical Diseases. *The New England Journal of Medicine*. **2007**; 357: 1018-27.
2. Andrews, S. J. The life cycle of *Fasciola hepatica*. Schering-Plough Animal Health, Division of Schering-Plough Ltd. Breakspear Road South, Harefield, Uxbridge, Middlesex UB9 6LS, UK
3. Mas-Coma, S., Bargues, M. D. Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, **1997**, 57: 144-225.
4. Carrada-Bravo, T.; Fasciola hepática: ciclo biológico y potencial biótico. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, **2007**, 54(1), 21-27.
5. Dalton J., Neill, S., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., et. Al.; Fasciola hepatica cathepsin L-like proteases: biology, function and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal of Parasitology*, **2003**, 33, 1173-1181.
6. Ciclo de vida de Fasciola hepática, tomado de www.virtual.chapingo.mx/biologia/F.%20HEPATICA.pps. Diciembre 2011.
7. Report of the who informal meeting on use of triclabendazole in fasciolosis control, *Bulletin of the World Health Organization*, **1999**, 77(4): 340-346.
8. Esteban, J. G., Bargues, M. D., Mas-Coma, S. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fasciolosis: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, **1988**, 58: 13-48.
9. Bennett R, Christiansen K, Hadley R. Preliminary estimates of the direct cost associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, **1999**, 39: 155-171.
10. Pilar Aparicio, Esperanza Rodríguez, Teresa Gárate, Ricardo Molina, Alicia Soto y Jorge Alvar. Terapéutica antiparasitaria. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, **2003**, 21(10):579-94.
11. Jimenez-Gonzalez, A; De-Armas, S. C.; Criado-Fornelio, A.; Casado-Escribano, N.; Rodríguez-Cabeiro; Díez, J. C. Preliminary characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. *Veterinary Parasitology* **1991**; 39 (1-2): 89-9
12. Katiyar, S. K.; Gordon, V. R.; McLaughlin, G. L.; Edlind, T. D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1994**; 39 (9): 2086-2090.
13. Romo-Mancillas, R. A.; Síntesis de profármacos del fasciolicida experimental 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol y su estudio de solubilidad en medio



- acuoso; Tesis para obtener el grado de licenciatura, Facultad de Química, U.N.A.M.; 2005.
14. Fairweather, I., Boray, J. C.; Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management, *The veterinary Journal*, **1999**, 158: 81-112
 15. Dildo Márquez Lara. Resistencia a los ANTIHELMÍNTICOS en nematodos de rumiantes y estrategias para su control. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica y Colciencias*. Bogotá, octubre de 2007.
 16. Mc Kellar, Q. A.; Scott, E. W. The benzimidazole anthelmintic agents. A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **1990**, 13, 223–247.
 17. Albert, A. Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **1958**, 182, 421-422.
 18. Stella, V. J. Prodrugs: Challenges and Rewards. Part 1 (eds Stella, V. J. et al.) 3–33 (AAPS Press/ Springer, New York, 2007).
 19. Kristiina M. Huttunen, Hannu Raunio, and Jarkko Rautio. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2011**; 63:750–771
 20. Valentino J. Stella, Kwame W. Nti-Addae. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2007**, 59: 677–694
 21. Testa, Prodrug research: futile or fertile, *Biochemical Pharmacology*. **2004**, 68 (11): 2097–2106.
 22. J.C. Escalona, R. Carrasco, J. A. Padrón. Introducción al diseño de Fármacos. *Universidad de Oriente*. Tomado de <http://www.fq.uh.cu/investig/lqct/imagenes2/disenio.pdf>. Diciembre 2011.
 23. Venkatesh, S. & Lipper, R. A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2000**, 89: 145–154.
 24. Christopher A. Lipinski. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **2000**, 44: 235± 249
 25. Fleisher D, Bong R, and Stewart BH. Improved Oral Drug Delivery: Solubility Limitations Overcome by the Use of Prodrugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**; 19:115–130
 26. Stahl PH. Preparation of Water-Soluble Compounds through Salt Formation. *Practice of Medicinal Chemistry* (2nd Edition) **2003**:601–615



27. Müller RH, Jacobs C, and Kayser O. Nanosuspensions as Particulate Drug Formulations in Therapy. Rationale for Development and What We Can Expect for the Future. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**; 47:3–19
28. Rao VM, and Stella VJ. When Can Cyclodextrins Be Considered for Solubilization Purposes? *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**; 92:927–932
29. Beaumont K, Webster R, Gardner I, Dack K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Current Drug Metabolism Journal* **2003**; 4:461–85.
30. Clement, B. & Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2004**, 47: 2393–2404.
31. Rautio J Prodrug strategies in drug design, in *Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties*, **2010**, 1–30.
32. Valentino J. Stella. Prodrugs: Some Thoughts and Current Issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 99: 12.
33. Jarkko Rautio, Hanna Kumpulainen, Tycho Heimbach, Reza Oliyai, Dooman Oh, Tomi Järvinen and Jouko Savolainen. Prodrugs: design and clinical Applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2008**, 7: 255-270.
34. Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Bolikal, D.; Gilbert, C. W. Highly water soluble taxol derivatives: 2-polyethyleneglycol esters as potential prodrugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **1994**, 4, 2465- 2470.
35. Mizuno, N.; Niwa, T.; Yotsumoto, Y.; Sugiyama, Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacological Reviews.* **2003**, 55, 425-461
36. Tunek, A.; Levin, E.; Svensson, L. A. Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro. *Biochemical Pharmacology.* **1988**, 37, 3867-3876.
37. Kiptoo, P. K., Hamad, M. O., Crooks, P. A. & Stinchcomb, A. L. Enhancement of transdermal delivery of 6-b-naltrexol via a codrug linked to hydroxybupropion. *Journal of Control Release*, **2006**, 113: 137–145.
38. Leppanen, J. *et al.* Design and synthesis of a novel l-DOPA-entacapone codrug. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2002**, 45: 1379–1382.
39. Heimbach, T. *et al.* Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *International Journal Pharmaceutics.* **2003**, 261: 81–92.
40. McComb, R., Bowers, G. & Posen, S. Alkaline Phosphatase (*Plenum Press, New York and London, 1979*).



41. Potter, P. M. & Wadkins, R. M. Carboxylesterases —detoxifying enzymes and targets for drug therapy. *Current Medicinal Chemistry.* **2006**, 13: 1045–1054.
42. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. & Pidgeon, C. Intestinalpeptide transport systems and oral drug availability. *Pharmaceutical Research.* **1999**, 16: 1331–1343.
43. Steffansen, B. *et al.* Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *European Journal Pharmaceutical Sciences.* **2004**, 21: 3–16.
44. Clement, B. Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metabolism Reviews.* **2002**, 34: 565–579.
45. Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Cedillo, R.; Castilho, R. Synthesis and hydrolytic stability studies of albendazole carrier prodrugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2001**, 11, 1359–1362
46. Dransch, G.; Mildenerger, H.; Düwel, D.; Kirsch, R. Substituted 2-Alkoxy-carbonylamine-5-(6)-phenylmercapto-benzimidazoles. *Patent Application* US3980796, 1976
47. Nielsen, L. S.; Sløk, F.; Bundgaard, H. N-Alkoxy-carbonyl prodrugs of mebendazole with increased water solubility. *International Journal of Pharmaceutics.* **1994**, 102, 231–239.
48. Nielsen, L. S.; Bundgaard, H.; Falch, E. Prodrugs of thiabendazole with increased water-solubility. *Acta Pharmaceutica Nordica.* **1992**, 4, 43–49.
49. Dhaneshwar, S. R.; Khadikar, P. V.; Chaturvedi, S. C. Synthesis and antimicrobial activity of some Mannich bases of fenbendazole. *Indian Drugs* **1990**, 28, 625–627.
50. Röchling, H.; Härtel, K.; Kirsch, R.; Düwel, D. Bis-triazinobenzimidazoles and Their Preparation. *Patent Application* US3928345, 1975.
51. Krise, J. P.; Zygmunt, J.; Georg, G. I.; Stella, V. J. Novel prodrug approach for tertiary amines: synthesis and preliminary evaluation of N-phosphonoxymethyl prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry.* **1999**, 42, 3094–3100.
52. Krise, J. P.; Narisawa, S.; Stella, V. J. A novel prodrug approach for tertiary amines. 2. Physicochemical and in vitro enzymatic evaluation of selected N-phosphonoxymethyl prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **1999**, 88, 922–927.
53. Mäntylä, A.; Garnier, T.; Rautio, F.; Nevalainen, T.; Vepsäläinen, J.; Koskinen, A.; Croft, S. L.; Järvinen, T. Synthesis, in vitro evaluation, and antileishmanial activity of



- water-soluble prodrugs of buparvaquone. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, *47*, 188–195.
54. Chassaing,* M. Berger, A. Heckerroth, T. Ilg, M. Jaeger, C. Kern, K. Schmid, and M. Uphoff. Highly Water-Soluble Prodrugs of Anthelmintic Benzimidazole Carbamates: Synthesis, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, Vol. 51, No. 5
55. Stella VJ. A Case for Prodrugs: Fosphenytoin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1996**; 19:311-330.
56. S.A. Varia, V.J. Stella, Phenytoin prodrugs. V: in vivo evaluation of some water-soluble phenytoin prodrugs in dogs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1984**, 73 (8): 1080–1087.
57. Kearney AS, and Stella VJ. Hydrolysis of Pharmaceutically Relevant Phosphate Monoester Monoanions: Correlation to an Established Structure-Reactivity Relationship. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1993**; 82:69–72
58. T. Heimbach, D. Fleisher, A. Kaddoumi, Overcoming poor aqueous solubility of drugs for oral delivery, *Prodrugs: Challenges and Rewards*, AAPS/ Springer, **2007**.
59. B.A. Hanson, R.L. Schowen, V.J. Stella, A mechanistic and kinetic study of the e-ring hydrolysis and lactonization of a novel phosphoryloxymethyl prodrug of camptothecin; *Pharmaceutical Research*. **2003**, 20 (7): 1031–1038.
60. A.S. Kearney, V.J. Stella, The in vitro enzymic labilities of chemically distinct phosphomonoester prodrugs, *Pharmaceutical Research*. **1992**, 9 (4): 497–503.
61. Imagen T. Heimbach, D.M. Oh, L.Y. Li, M. Forsberg, J. Savolainen, J. Leppanen, Y. Matsunaga, G. Flynn, D. Fleisher, Absorption rate limit considerations for oral phosphate prodrugs, *Pharmaceutical Research*. **2003**, 20 (6): 848–856.
62. ³¹P Phosphorus NMR, tomado en abril de 2012, de <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/1d/row3/p.html>
63. ³¹P NMR at the SMRL, tomado en abril de 2012 de la pagina Stanford Magnetic Resonance Laboratory. <http://smrl.stanford.edu/pnmr/>



9.0. ESPECTROS

ÍNDICE DE ESPECTROS

ESPECTRO 1. MASAS DE IV.

ESPECTRO 2. IR DE IV.

ESPECTRO 3. RMN ^1H DE IV.

ESPECTRO 4. RMN ^1H DE IV DESPUÉS DE INTERCAMBIO CON D_2O .

ESPECTRO 5. RMN ^{13}C DE IV.

ESPECTRO 6. MASAS DE XI.

ESPECTRO 7. IR DE XI.

ESPECTRO 8. RMN ^1H DE XI.

ESPECTRO 9. RMN ^{13}C DE XI.

ESPECTRO 10. MASAS DE NOR-1.

ESPECTRO 11. IR DE NOR-1.

ESPECTRO 12. RMN ^1H DE NOR-1.

ESPECTRO 13. RMN ^{31}P DE NOR-1.

ESPECTRO 14. RMN ^1H DE NOR-1 HIDROLIZADO.

ESPECTRO 15. REGIÓN AMPLIADA DEL ESPECTRO DE RMN ^1H DE NOR-1 DONDE SE APRECIA LA SEÑAL DEL METILENO.

ESPECTRO 16. MASAS DE NOR-2.

ESPECTRO 17. IR DE NOR-2.

ESPECTRO 18. RMN ^1H DE NOR-2.

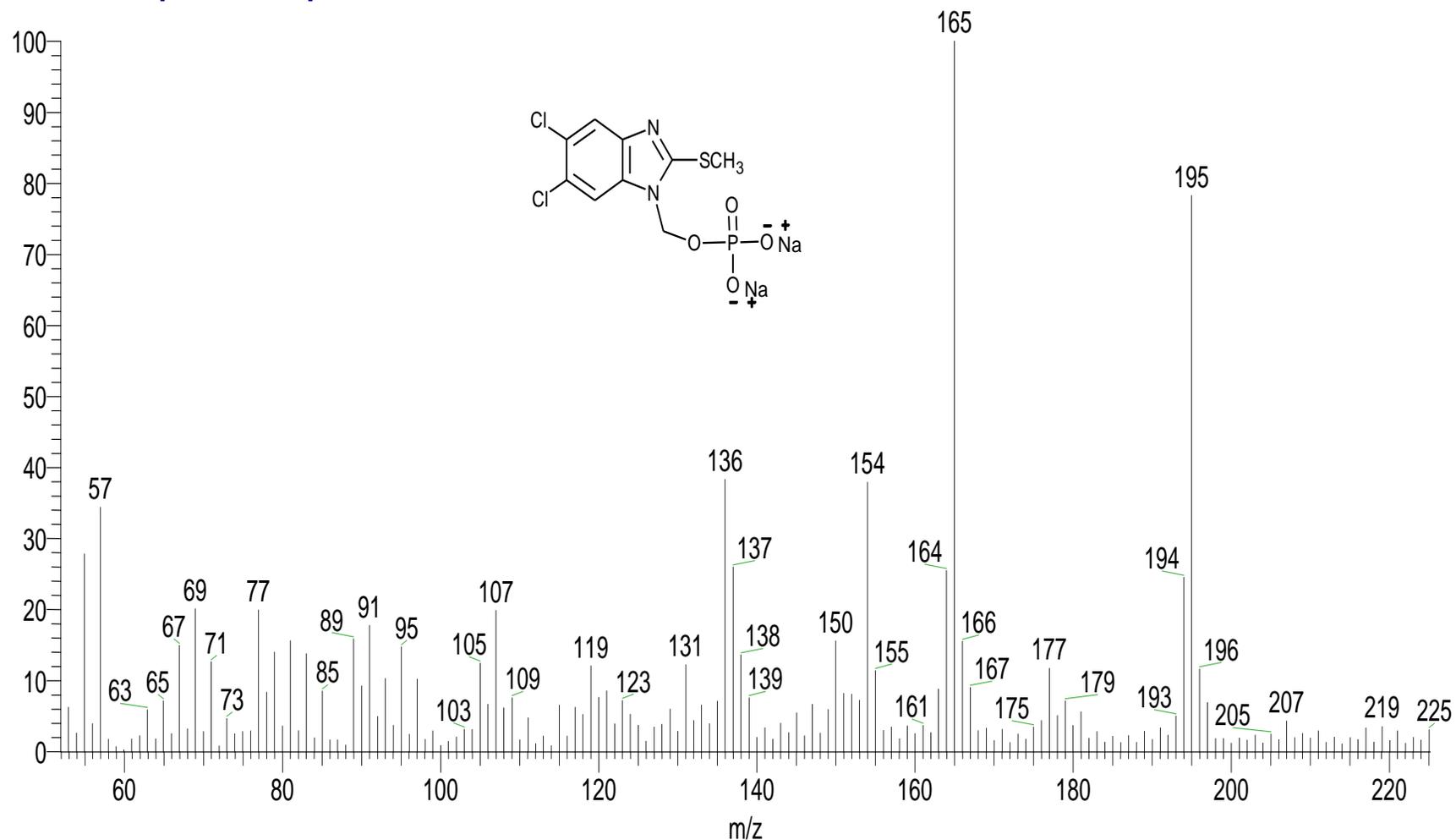
ESPECTRO 19. RMN ^{31}P DE NOR-2.

ESPECTRO 20. RMN ^1H DE NOR-2 HIDROLIZADO.



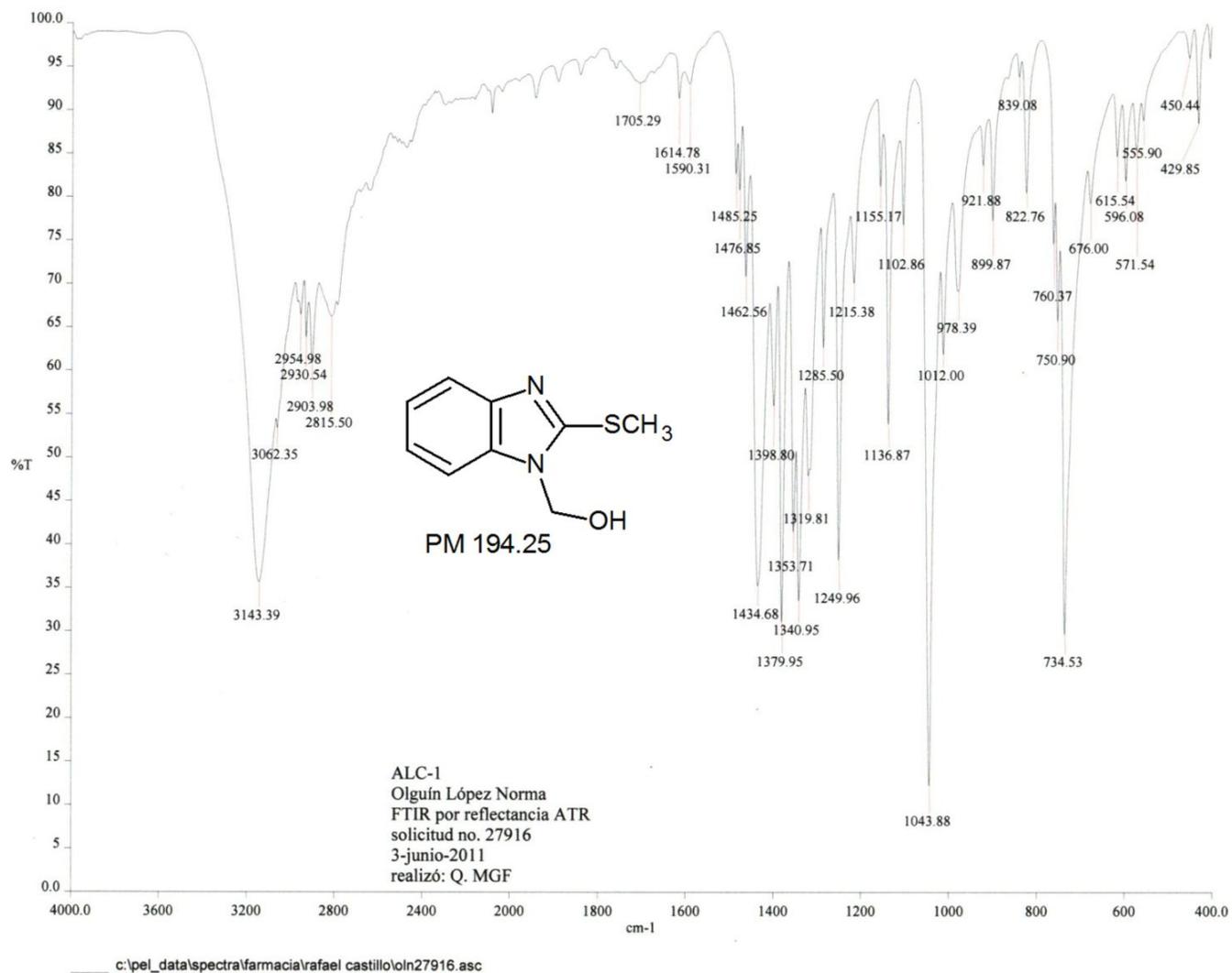
OT5512_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 1.56E7

T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



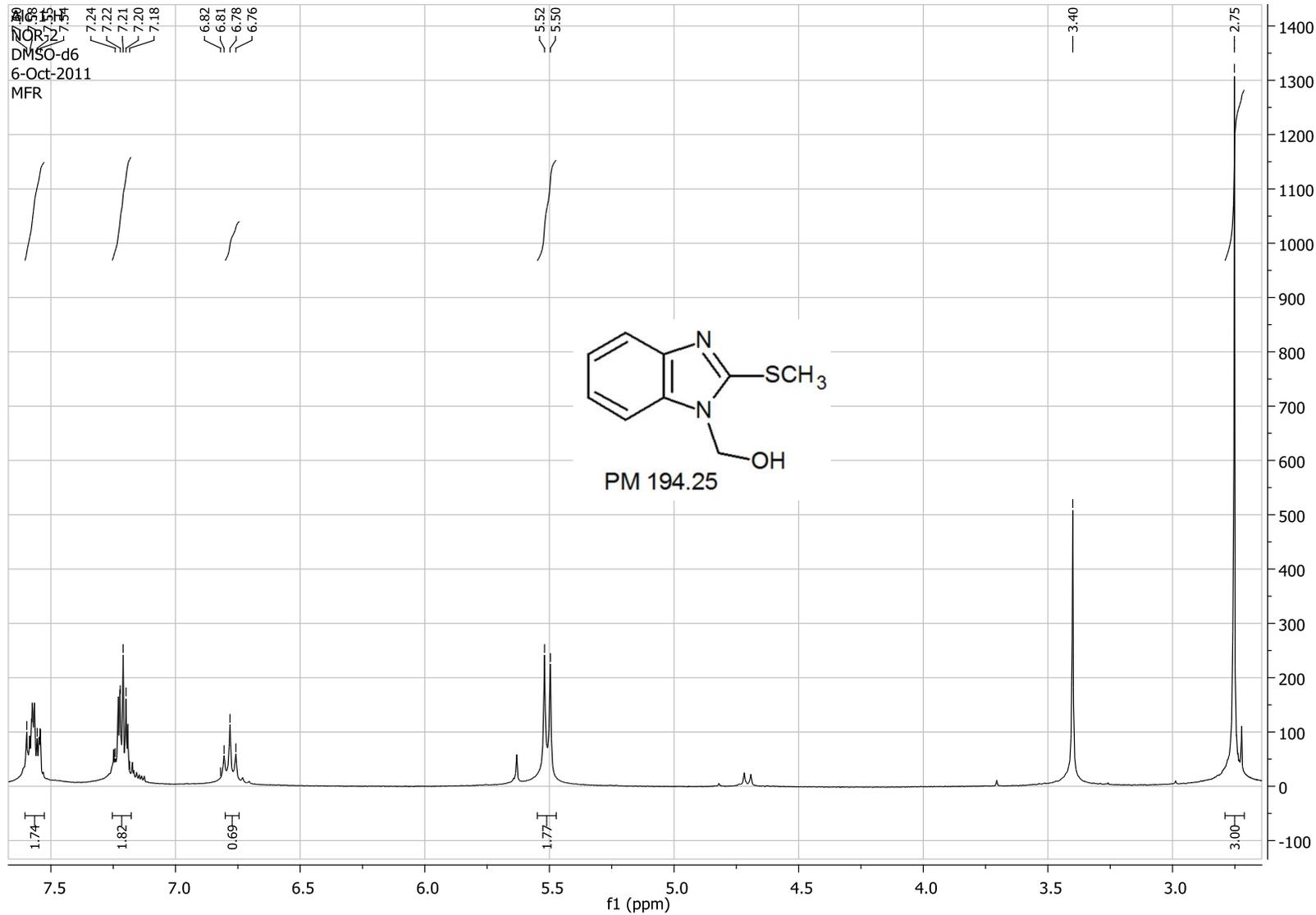
ESPECTRO 1. MASAS DE IV.





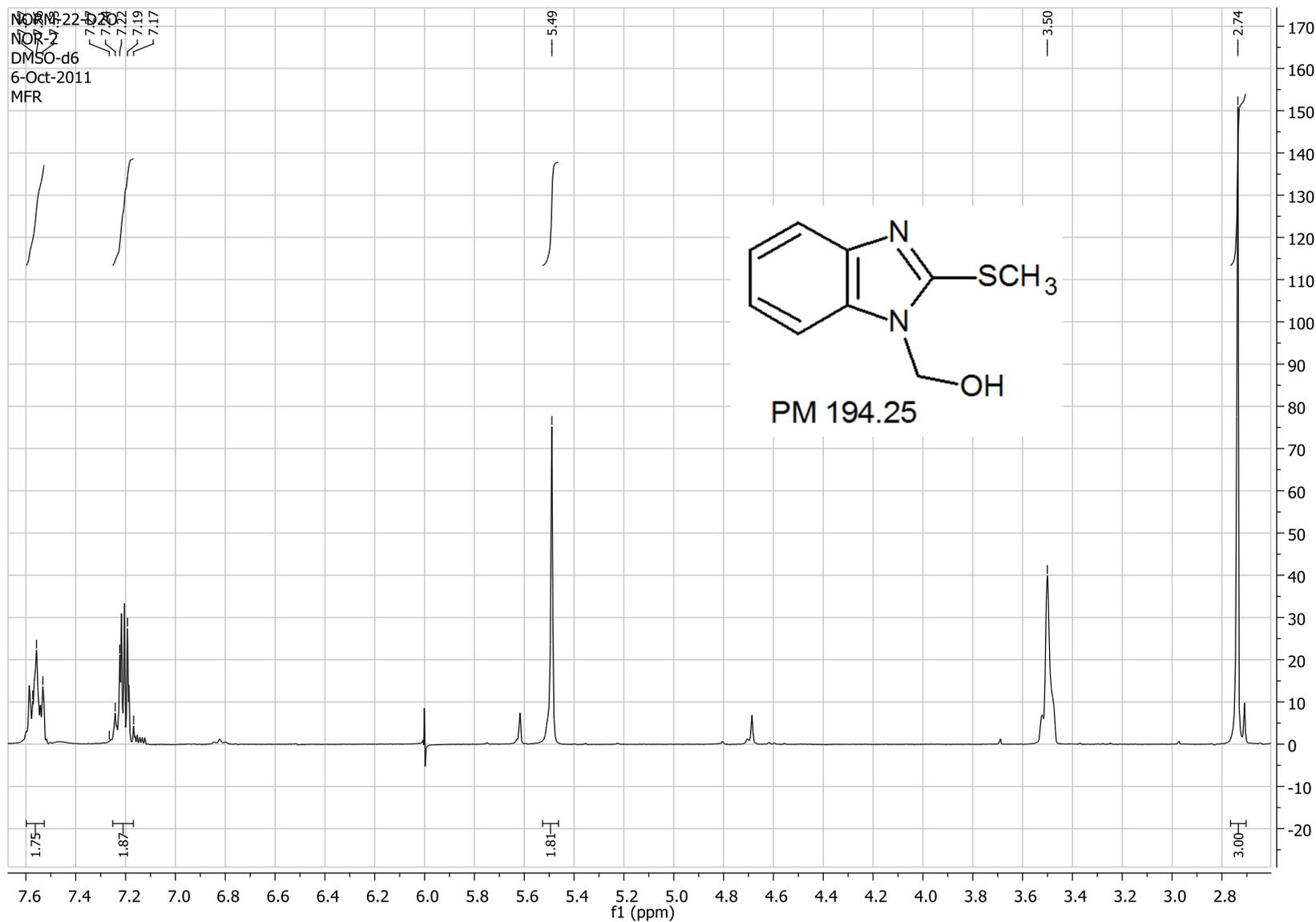
ESPECTRO 2. IR IV.





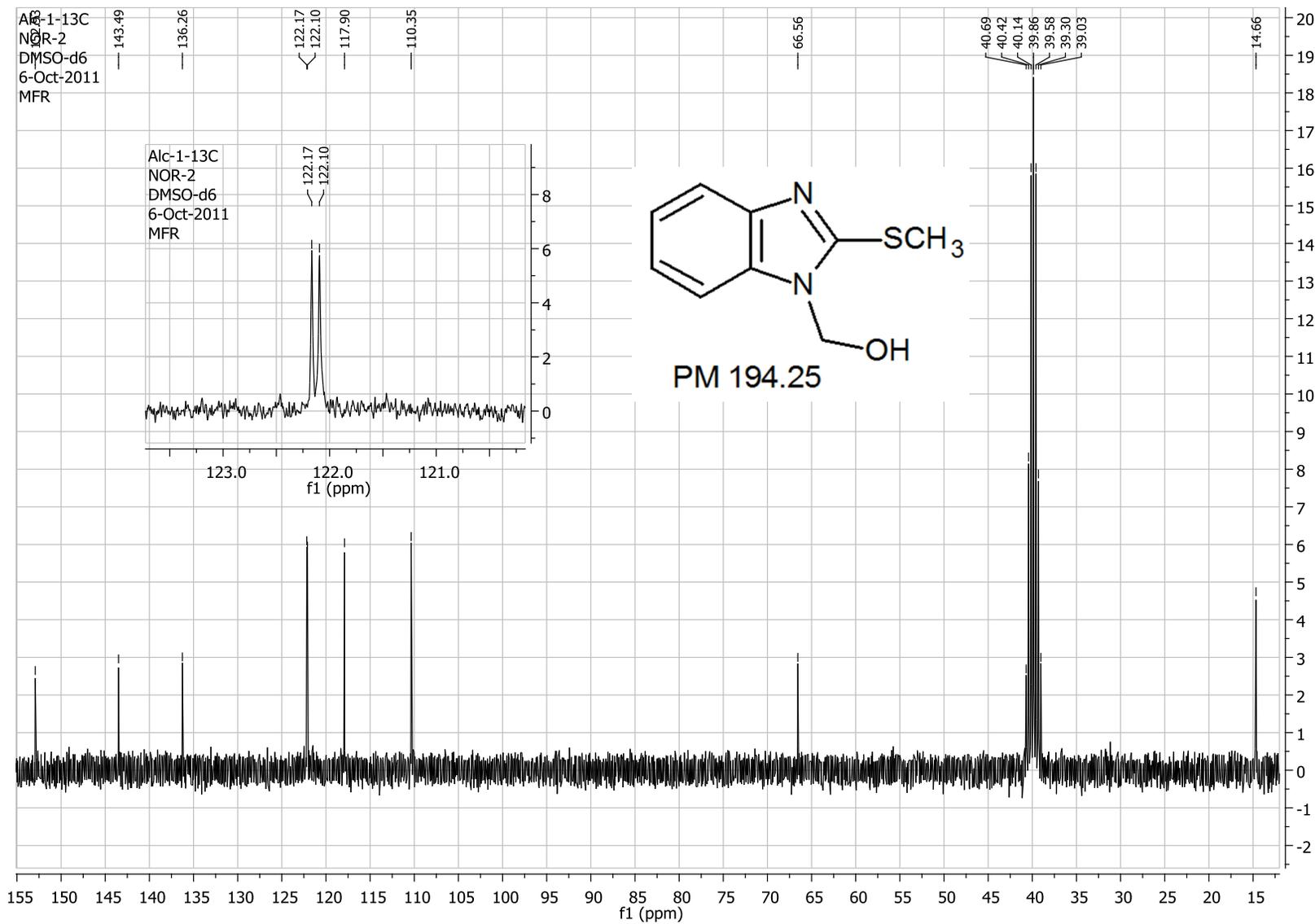
ESPECTRO 3. RMN ¹H DE IV.





ESPECTRO 4. RMN ¹H DE IV DESPUÉS DE INTERCAMBIO CON D₂O.

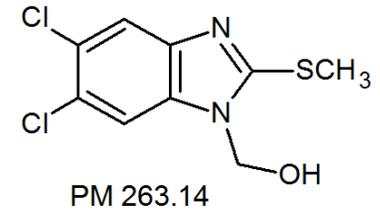
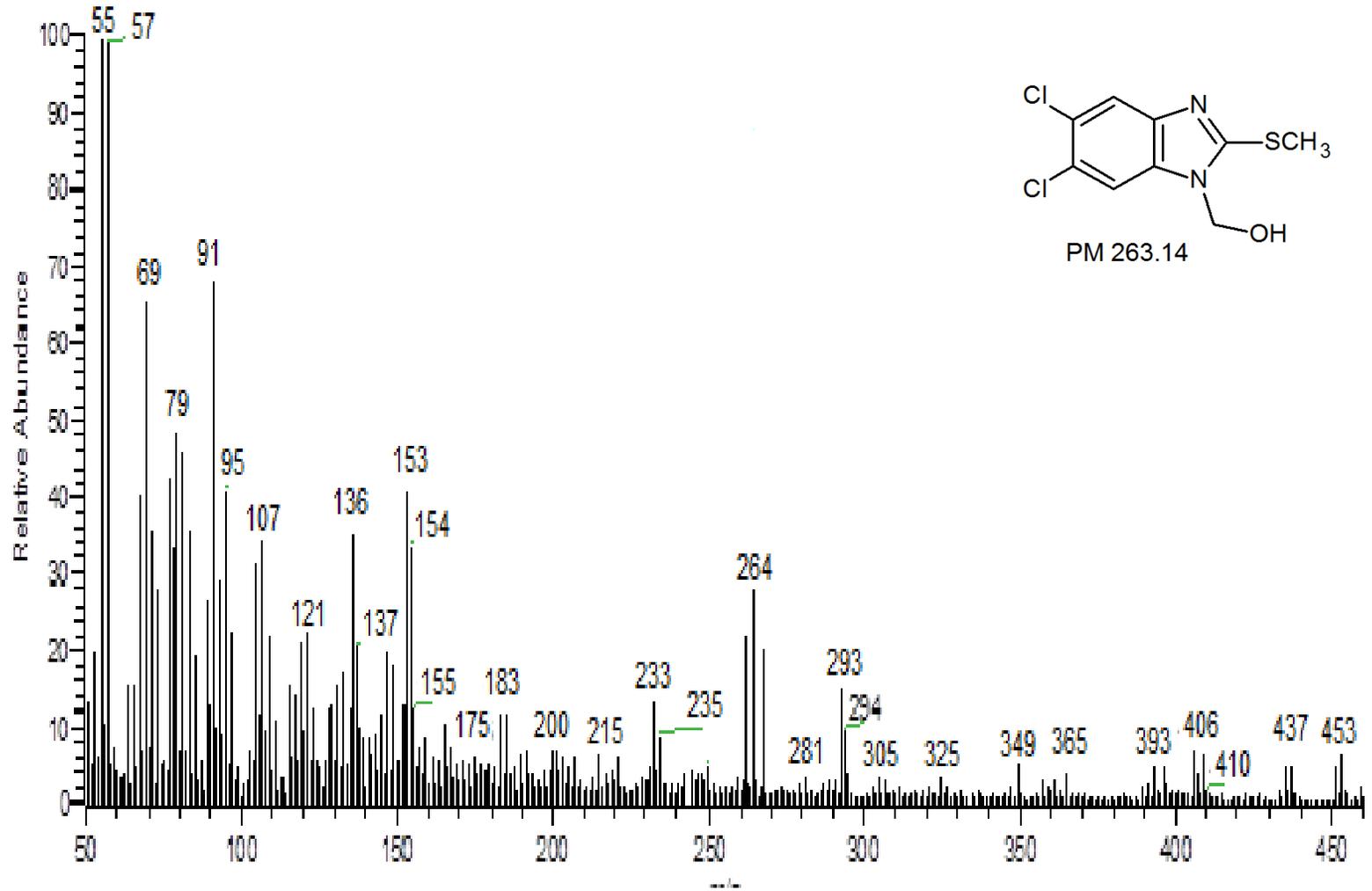




ESPECTRO 5. RMN ^{13}C IV.

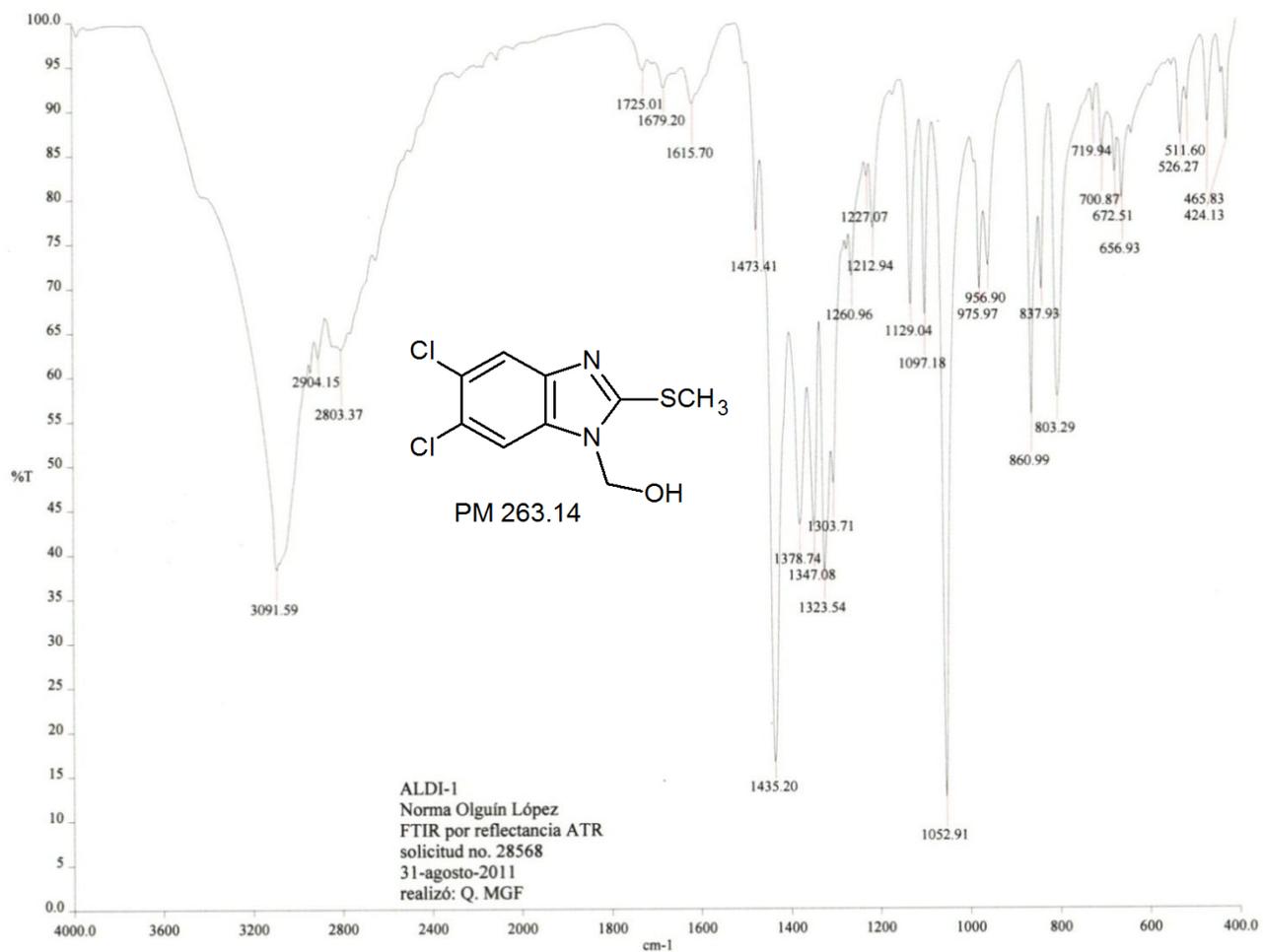


OT7436_1#1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 6.69E8
T: +c FAB Full ms [49.50-1000.50]



ESPECTRO 6. MASAS DE XI.

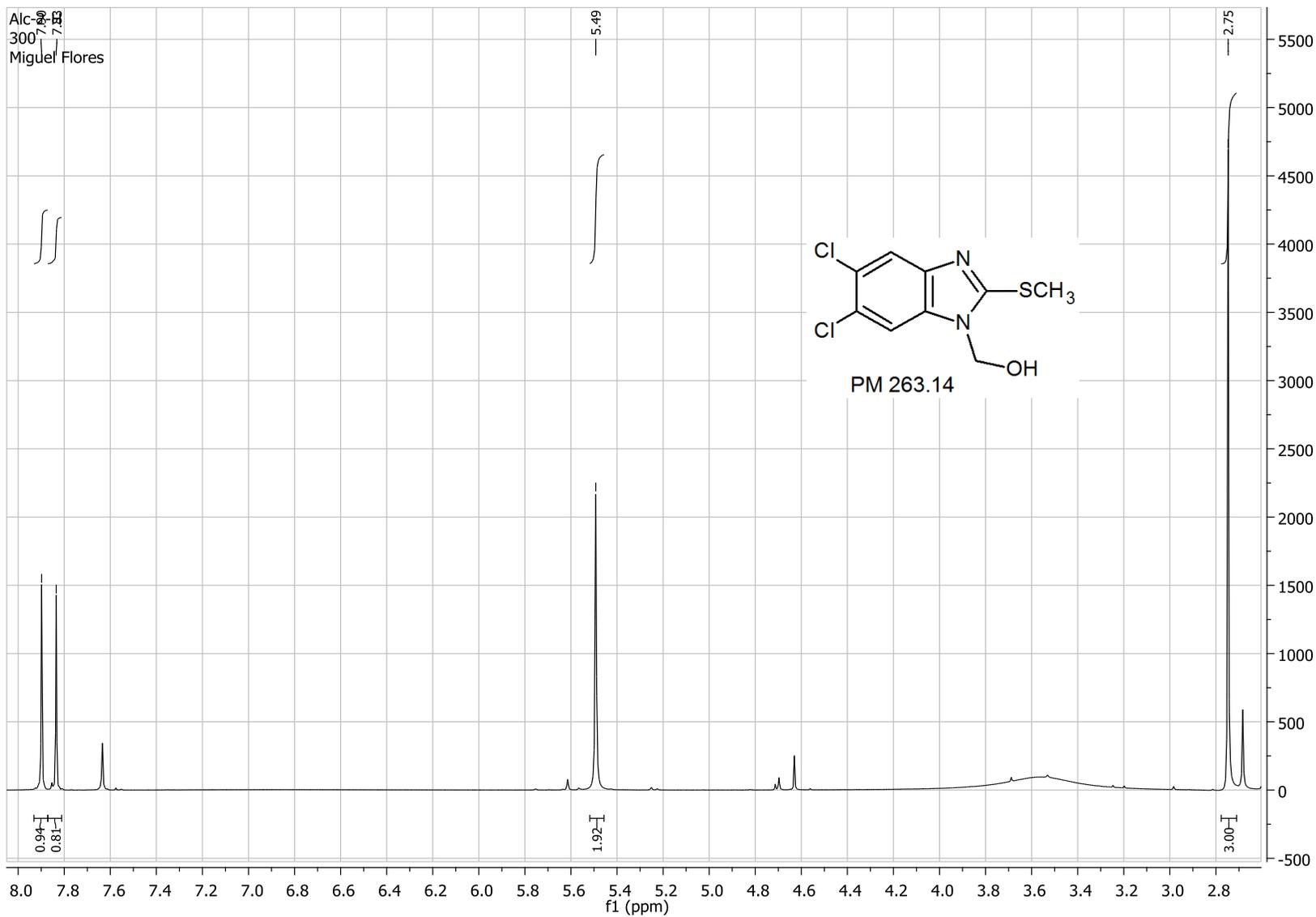




c:\pel_data\spectra\farmacia\rafael castillo\noi28568.asc

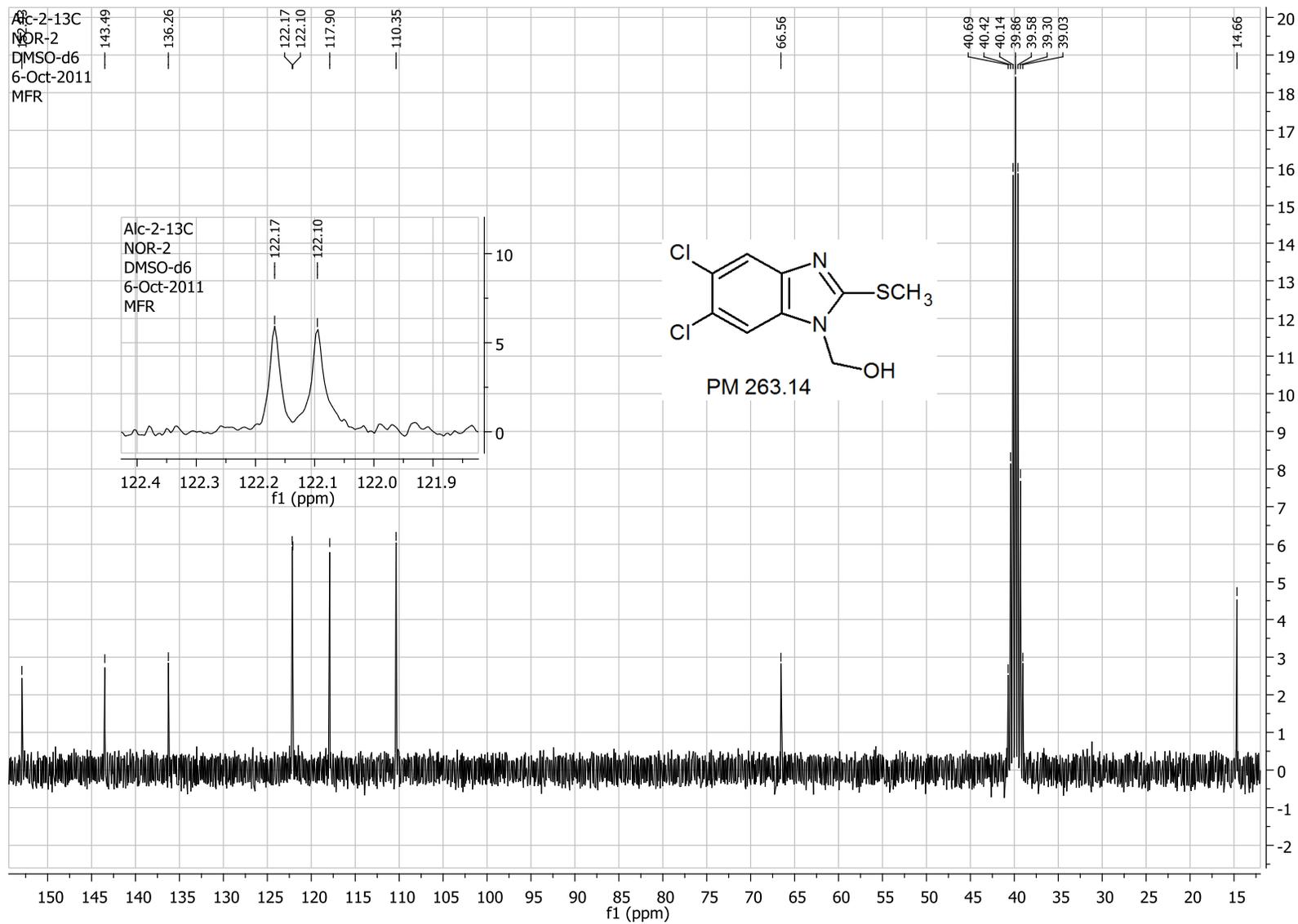
ESPECTRO 7. IR DE XI.





ESPECTRO 8. RMN ^1H DE XI.



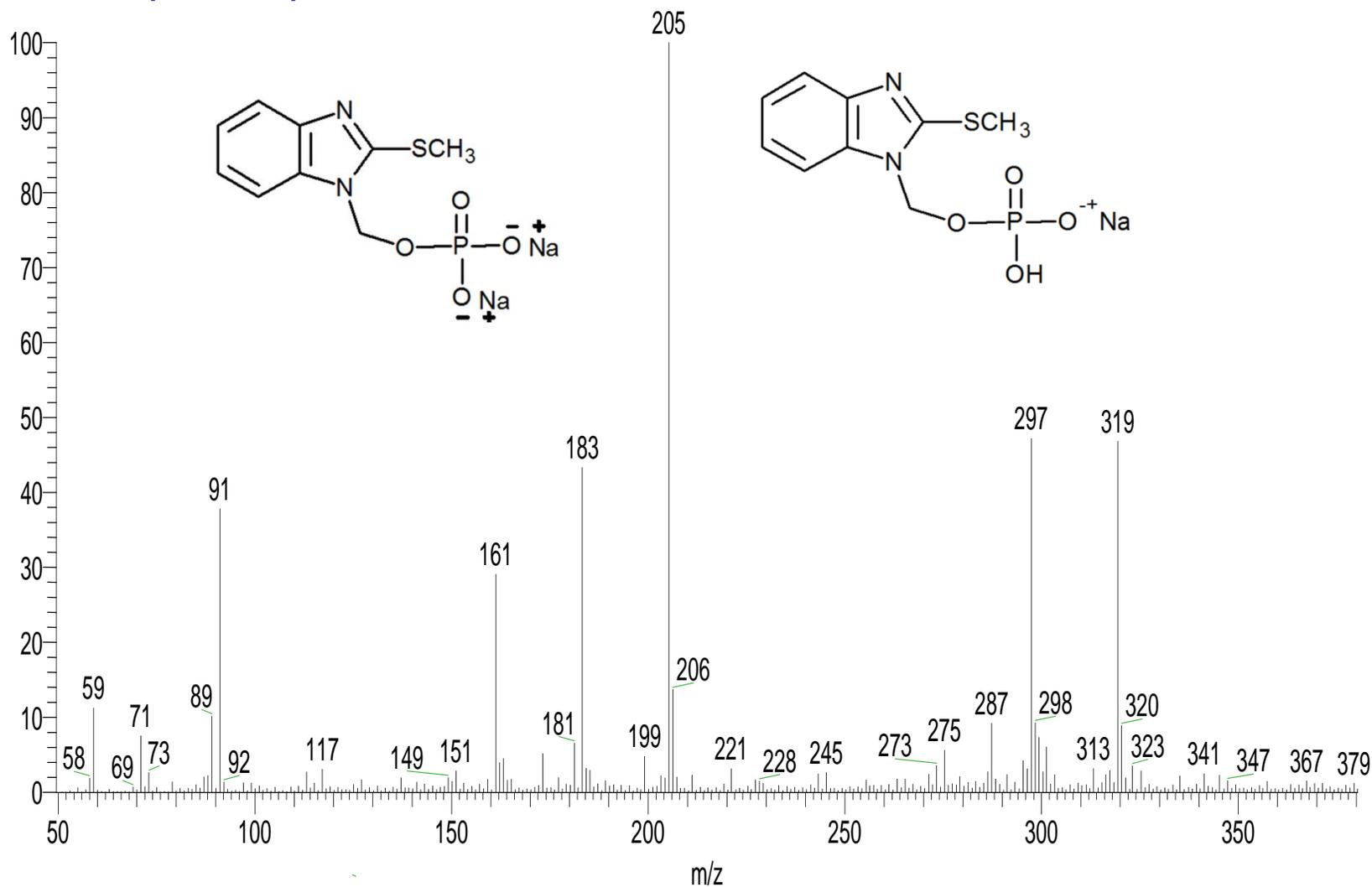


ESPECTRO 9. RMN ¹³C DE XI.



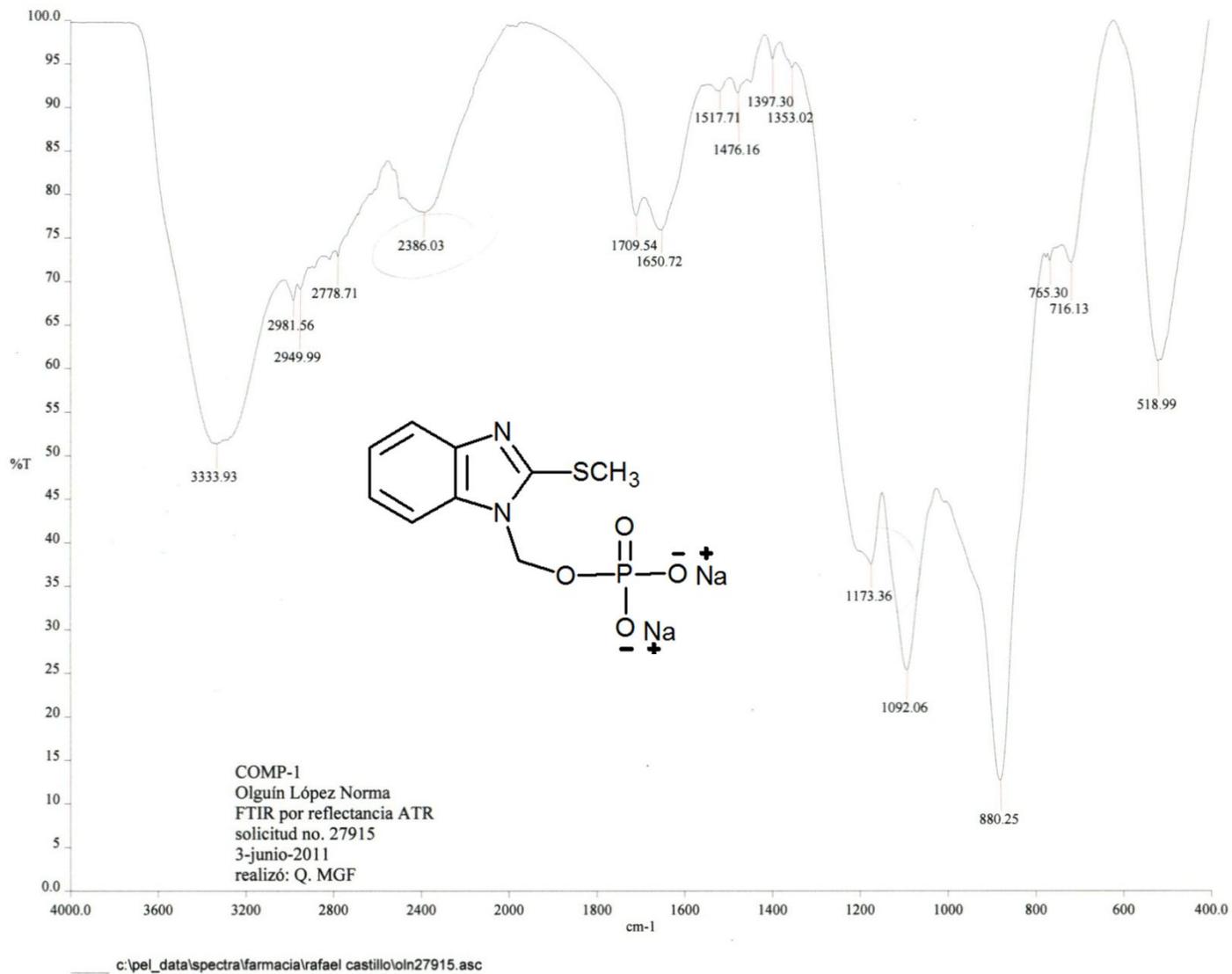
OT5657_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 4.50E7

T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

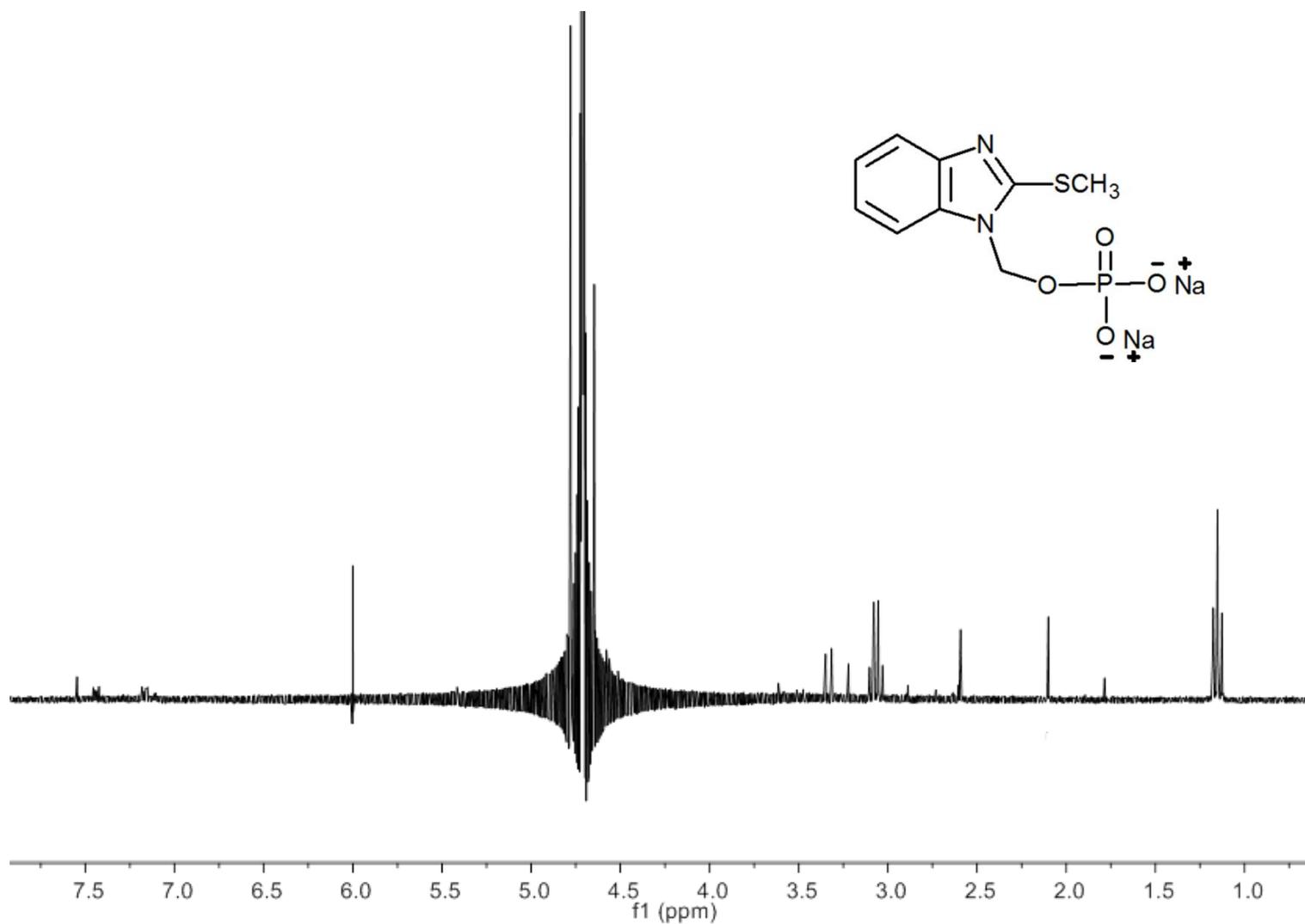


ESPECTRO 10. MASAS DE NOR-1



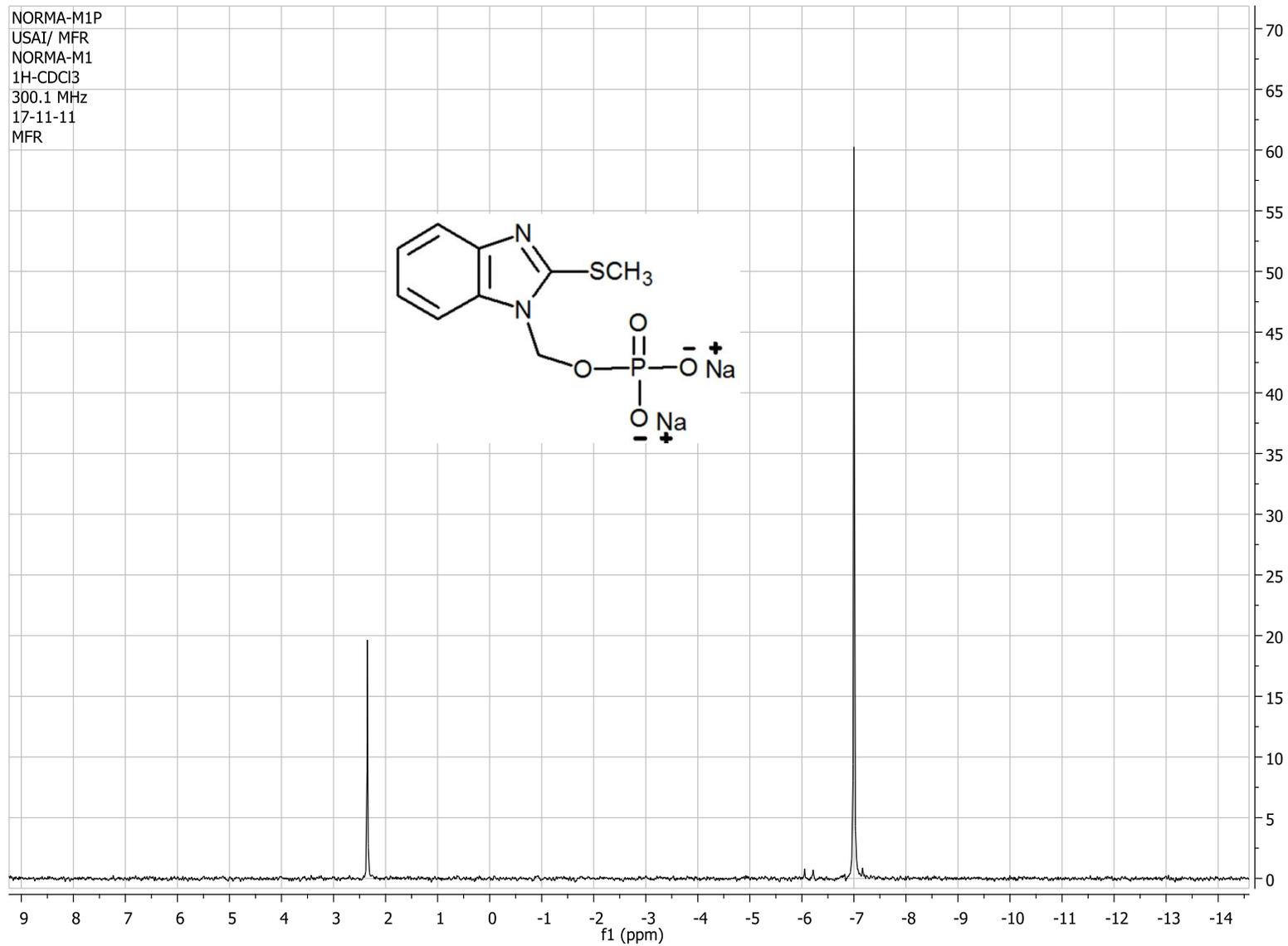


ESPECTRO 11. IR DE NOR-1

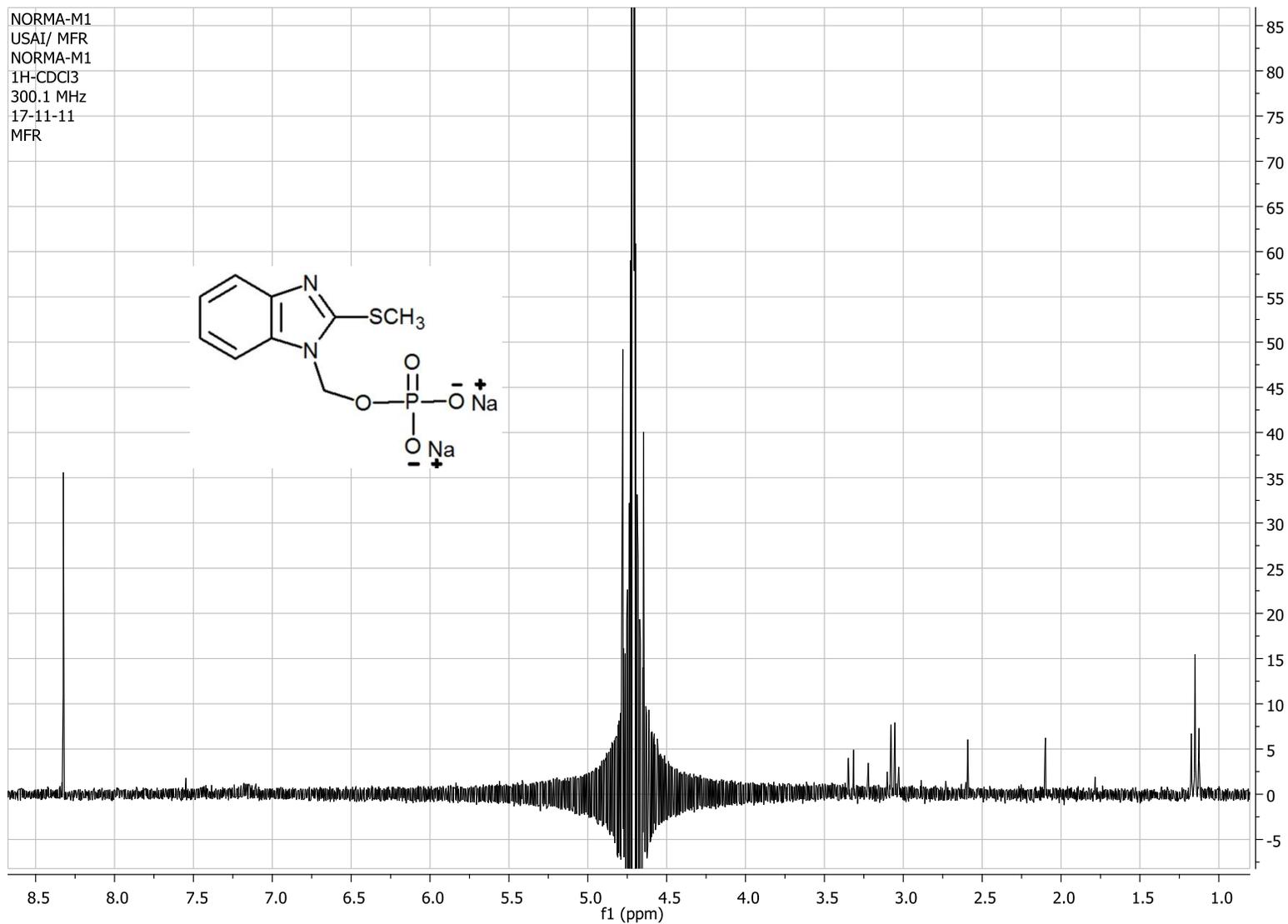


ESPECTRO 12. RMN ^1H DE NOR-1



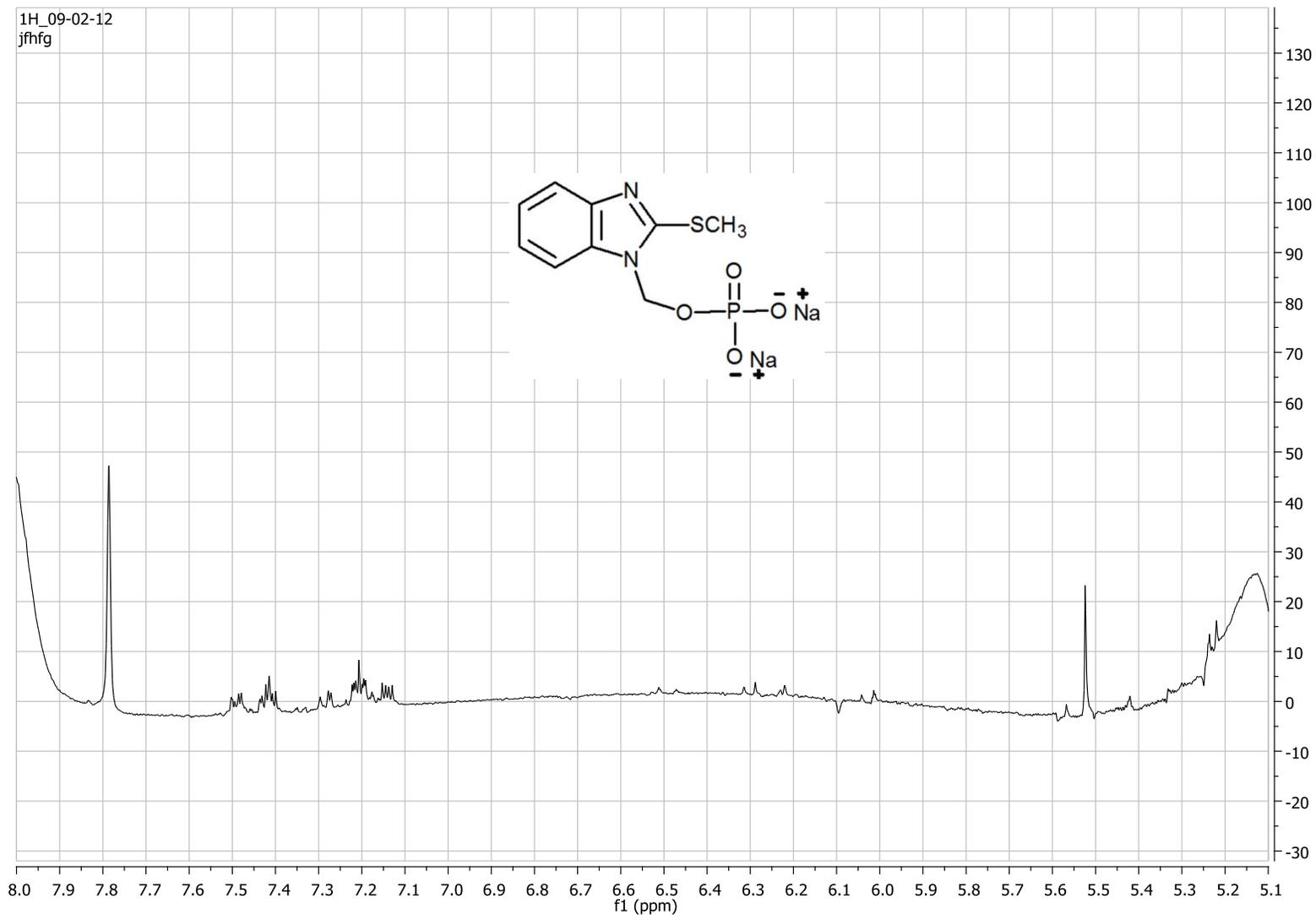


ESPECTRO 13. RMN ^{31}P DE NOR-1



ESPECTRO 14. RMN ¹H DE NOR-1 HIDROLIZADO

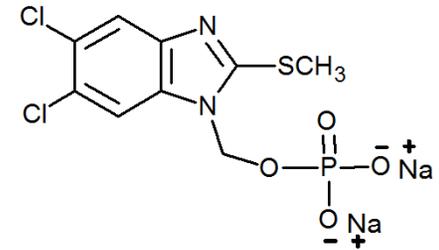
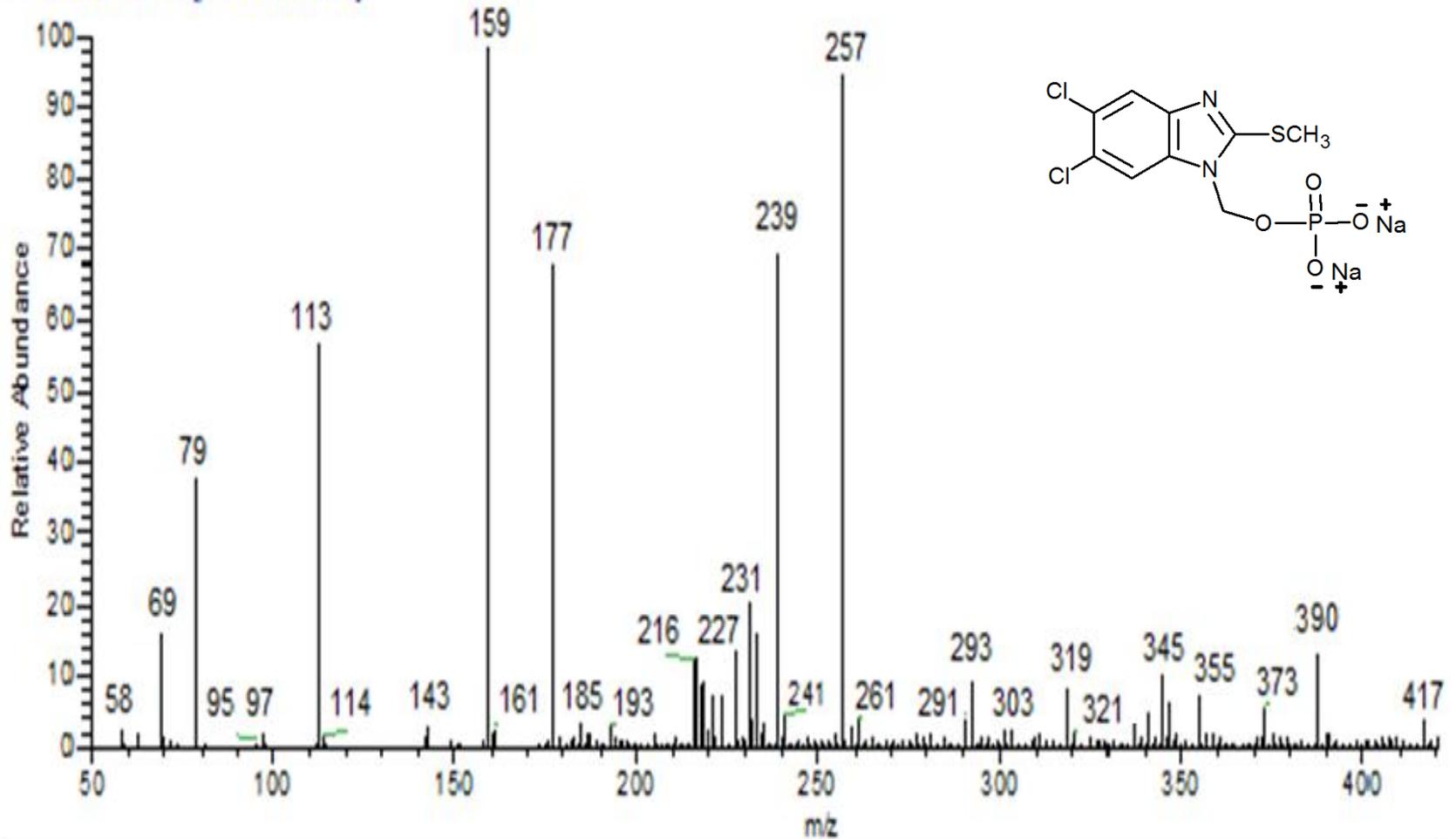




ESPECTRO 15. REGIÓN AMPLIADA DEL ESPECTRO DE RMN 1H DE NOR-1 DONDE SE APRECIA LA SEÑAL DEL METILENO.



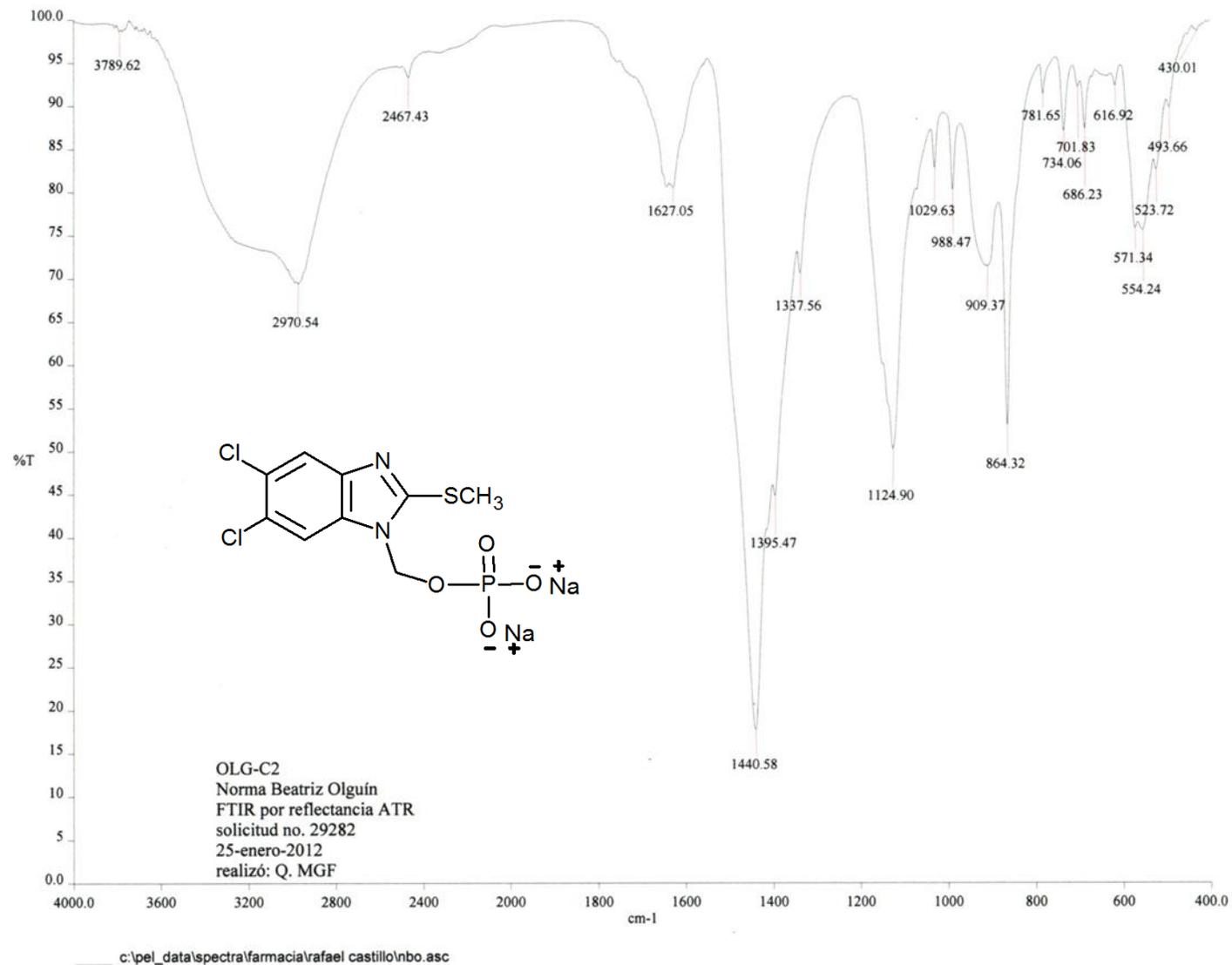
OT7434 1#1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 3.08E6
T: + c F⁻AB Full ms [49.50-1200.50]



OT7434 1#1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 3.08E6

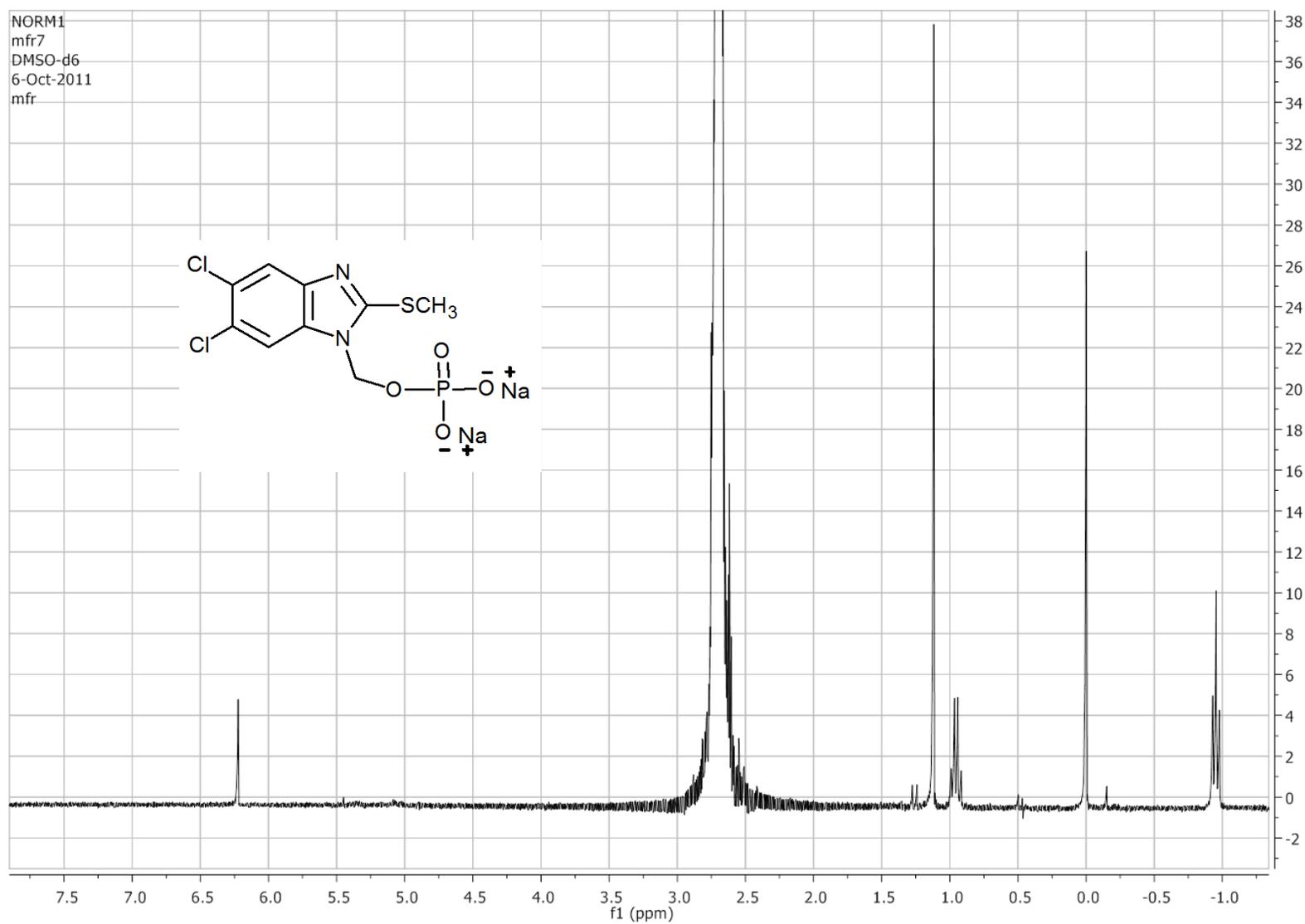


ESPECTRO 16. MASAS DE NOR-2



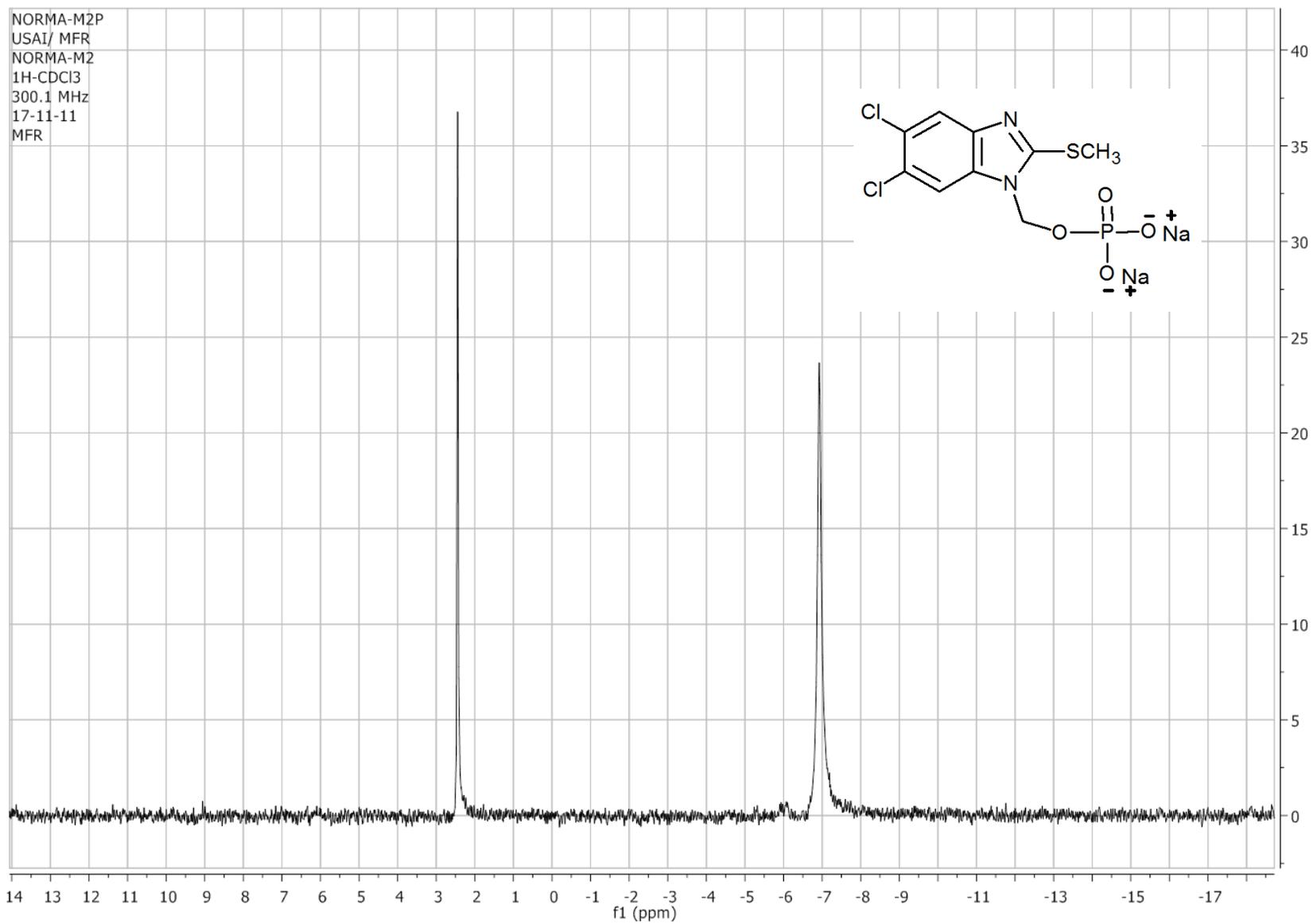
ESPECTRO 17. IR DE NOR-2



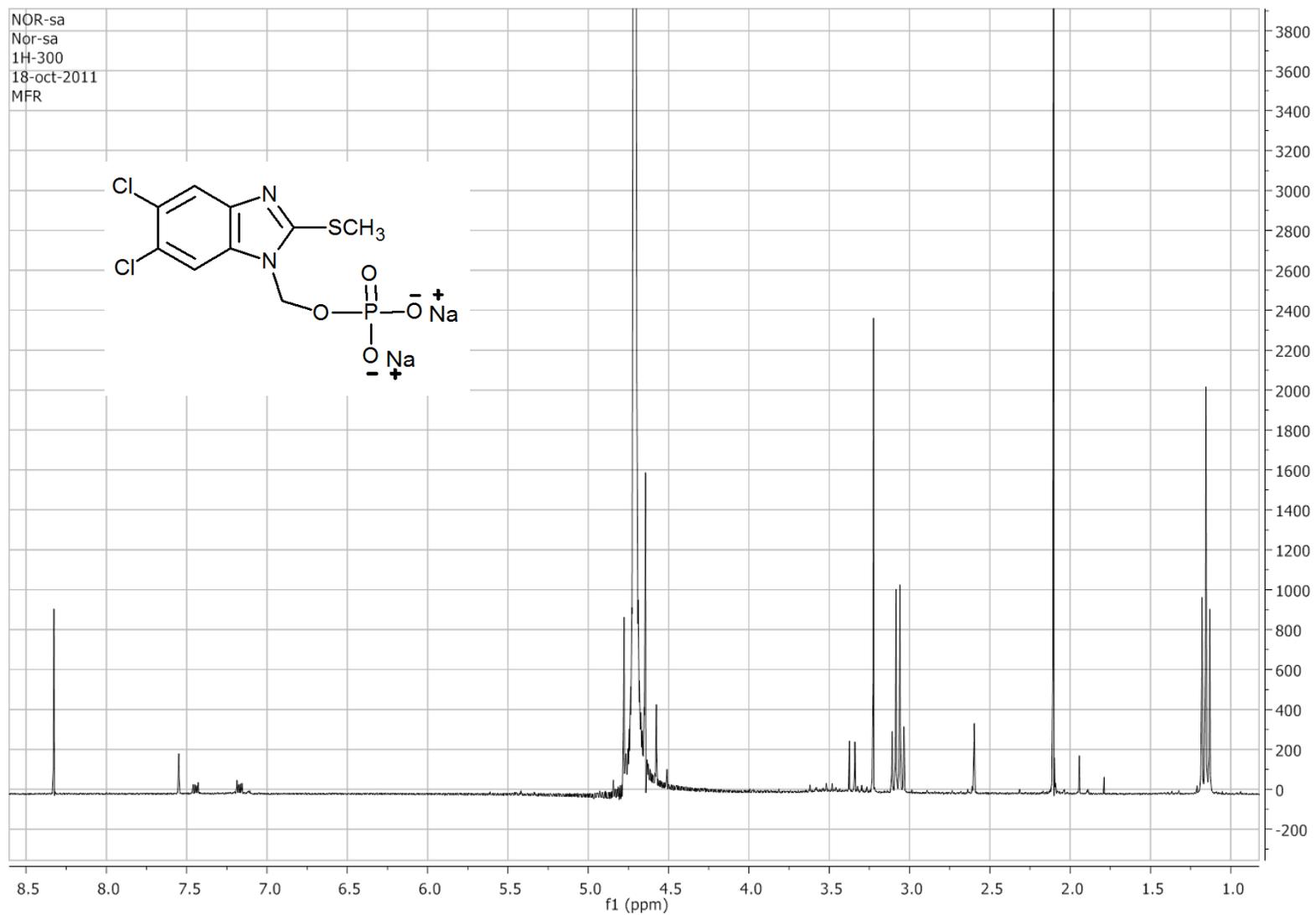


ESPECTRO 18. RMN ^1H DE NOR-2





ESPECTRO 19. RMN ³¹P DE NOR-2



ESPECTRO 20. RMN ¹H DE NOR-2 HIDROLIZADO.