UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M.F. CARLOS MARTINEZ CONDE

DIRECTOR DE TESIS: Dr. J. GABRIEL NAVARRETE VÁZQUEZ

CUERNAVACA, MORELOS 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

A CONACyT por el apoyo otorgado para el proyecto de investigación para la educación en ciencia básica 2015, número 778190 y por la beca otorgada para estudios de maestría (CVU/ Becario): 741523

Al financiamiento interno otorgado por la **Facultad de Farmacia** de la **Universidad Autónoma del Estado de Morelos** (**UAEM**) para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Emanuel Hernández Nuñez** del Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico Superior de Calkiní y al Dr. **David Morales-Morales** de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la colaboración en la obtención de los espectros de los análisis espectroscópicos y espectrométricos.

A la **Dra. Lilián Yépez-Mulia,** de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Unidad Médica de Alta Especialidad-Hospital de Pediatría, por su colaboración en los estudios *in vitro*.

Al **Dr. Rodrigo Aguayo-Ortiz,** de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su colaboración en los estudios de dinámica molecular.

A la **Dra. Jessica Nayelli Sánchez-Carranza,** de la Facultad de Farmacia, UAEM, por su colaboración en los estudios de citotoxicidad.

A la **Dra. Elizabeth Barbosa-Cabrera,** de la sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, IPN, por su colaboración en los estudios *In vivo*.

Al comité tutoral: **Dra. Blanca Colín-Lozano** y **Dr. Jaime Escalante**, por sus observaciones y tiempo invertido en la revisión de ésta investigación.

Finalmente, un agradecimiento especial al **Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez** por permitirme una vez más formar parte de su grupo de trabajo, por enseñarme responsabilidad y constancia.

RESUMEN ***1***

1. INTRODUCCIÓN ***3***

2. ANTECEDENTES ***5***

2.1 Parásitos **5**

2.1.1 *Giardia lamblia* **6**

2.1.1.1 Morfología 7

2.1.1.1.1 Estructura del trofozoíto 7

2.1.1.1.2 Estructura del quiste 8

2.1.1.2 Ciclo de vida 8

2.1.1.3 Características clínicas 10

2.1.1.4 Patogenia 11

2.1.1.5 Epidemiología 11

2.1.1.6 Diagnóstico 12

2.1.2 Tratamiento farmacológico 12

2.1.2.1 Nitroimidazoles 13

2.1.2.1.1 Inhibición de PFOR 14

2.1.2.2 Bencimidazoles carbamato de metilo 16

2.1.2.2.1 Inhibición de la polimerización de la tubulina 17

2.1.3 Bencimidazoles como estructuras privilegiadas 18

2.1.4 Química del bencimidazol 20

2.1.5 Relación estructura-actividad de los bencimidazoles 21

2.1.5.1 Modificaciones en la posición 1 22

2.1.5.2 Modificaciones en la posición 2 22

2.1.5.3 Modificaciones en las posiciones 5 o 6 22

3. JUSTIFICACIÓN ***22***

4. HIPÓTESIS ***23***

5. OBJETIVOS ***23***

5.1 Objetivo general: **23**

6. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR 25

6.1 Serie A, compuestos 5-nitrobencimidazoles (CON 1-7) 25

6.2 Serie B, compuestos carbamatos de bencimidazol 27

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL 30

7.1 Parte computacional (*in silico*) 30

7.1.1.1 Perfil biofarmacéutico 31

7.1.1.2 Perfil farmacocinético 31

7.1.1.3 Perfil toxicológico 31

7.1.1.4 Perfil farmacodinámico 31

7.1.1.5 Fundamento del análisis de consenso farmacológico 31

7.1.2.1 Molelecular operating environment (MOE) 33

7.1.2.2 Acoplamiento molecular en MOE 34

7.1.2.2.1 Metodología para Acoplamiento Molecular en MOE 35

7.1.2.2.2 PyMOL 35

7.2 Parte química 36

7.2.1.1 Retrosíntesis de la serie de compuestos nitrobencimidazoles y carbamatos de bencimidazol 37

7.3 Parte farmacológica 40

7.4 Determinación de la solubilidad termodinámica 43

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42

8.1 Parte *in silico* 42

8.1.2 Perfil farmacocinético 46

8.1.3 Predicciones del perfil toxicológico 50

8.1.3.1 Predicción de la inhibición de las isoformas del CYP450 50

8.1.3.2 Bloqueo de los canales hERG 53

8.1.3.3 Daño hepático inducido por medicamentos (DILI) 55

Tabla 11. Daño hepático de los compuestos 5-nitroimidazoles. 56

Tabla 12. Daño hepático de los compuestos carbamatos de bencimidazol... 57

8.1.3.4 Probabilidad de mutagenicidad y carcinogenicidad 57

8.1.4 Predicciones del perfil farmacodinámico 59
8.1.5 Análisis de consenso farmacológico 62

8.2 Parte química 65

Se priorizaron los compuestos con las mejores características, según el análisis de consenso farmacológico. A continuación, se detalla la síntesis de cada uno de ellos. 65

8.2.1.1 Síntesis del 5-nitro-1*H*-bencimidazol-2-tiol (CON 1) 65
8.2.1.2 Síntesis de los compuestos finales CON-2, 4-7 de tipo 4-Nitro-2-tioalquilbencimidazol (2, 4-7) 68
8.2.1.3 Síntesis del compuesto CON-3 71
8.2.1.4 Síntesis de los compuestos precursores CON 2, 4-7red 73
8.2.1.5 Síntesis de los compuestos finales de tipo carbamato de bencimidazol 75

8.3 Parte farmacológica 88

8.3.3.1 Preparación de la disolución de referencia (0.01 mg/mL) 92
8.3.3.2 Preparación de la curva de calibración 92
8.3.3.3 Preparación de las muestras de prueba 93
8.3.3.4 Linealidad del método analítico 94
8.3.3.5 Precisión 96
8.3.3.6 Determinación de la solubilidad termodinámica del compuesto RetroABZ (CON-8) 98
8.3.3.7 Actividad giardicida *in vivo* en un modelo murino de giardiasis 100

8.4 Acoplamiento molecular refinado sobre la □/β-tubulina de *Giardia lamblia* 101

8.4.1 Modelado por homología de la □/β-tubulina de *Giardia lamblia* 101

8.5 RetroABZ vs ABZ 109

9. CONCLUSIONES 108

10. PERSPECTIVAS 109

11. PARTE EXPERIMENTAL 110

11.1 Instrumentos 110

11.2 Cromatografía en capa fina 110

11.3 Síntesis de los compuestos finales 111

12. ANEXO 120

13. REFERENCIAS 121

14. ESPECTROS 137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura morfológica de *Giardia lamblia* 7

Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia* 9

Figura 3. Fármacos nitroimidazoles y nitrotiazoles 14

Figura 4. Mecanismo de acción de los compuestos nitroimidazoles. 15

Figura 5. Fármacos de tipo carbamato de bencimidazol 17

Figura 6. Inhibición de la polimerización de la tubulina 18

Figura 7. Dianas biológicas de los bencimidazoles 19

Figura 8. Tautomerismo del bencimidazol 21

Figura 9. Sitios de modificacion molecular de los bencimidazoles. 22

Figura 10. Diseño molecular de los compuestos nitroimidazoles **CON 1-7**. 26

Figura 11. Diseño de la serie de compuestos 5-carbamatos de bencimidazol (**CON 8-22**) 27

Figura 12. Diseño del regioisomero **ABZ**, denominado **RetroABZ**. 28

Figura 13. Estructura dimérica de los desmotropos del albendazol 28

Figura 14. Analisis de consenso farmacológico 32

Figura 15. Retrosíntesis de los compuestos finales 38

Figura 16. Ruta de síntesis general para la obtención de los compuestos finales **CON 1-7** 39

Figura 17. Ruta de síntesis general para la obtención de los compuestos finales 40

Figura 18. A) potencial de acción cardiaco, b) electrocardiograma correspondiente 53

Figura 19. Sintesis del compuesto final **CON-1** 65

Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **CON-1**. 66

Figura 21. Espectro de ^{13}C del precursor **CON-1**. 67

Figura 22. Espectro de EM-EI del compuesto **CON-1**. 67

Figura 23. Síntesis de compuestos **CON-2**, **4-7** 68

Figura 24. Espectro de ^{1}H del precursor **CON-2** 68

Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **CON-2** 69
Figura 26. Espectro de NOE diferencial del compuesto **CON-2**. 70
Figura 27. Correlación de prones C-1´ y el protón de C-7 70
Figura 28. Espectro de EM-EI del compuesto **CON-2** 71
Figura 29. Espectro de ^{1}H del compuesto **CON-3** 72
Figura 30. Espectro de ^{13}C del compuesto **CON-3**. 72
Figura 31. Síntesis del compuesto **CON-2red** con Sn^{0} 73
Figura 32. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **CON-2red** 73
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **CON-2Red** 74
Figura 34. Espectro de EM-EI del compuesto final **CON-1** 75
Figura 35.- Síntesis general de los compuestos finales de la serie de carbamatos de bencimidazol 75
Figura 36. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto final **CON-8**. 76
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto final **RetroABZ**. 77
Figura 38. Espectro de EM-EI del compuesto final **RetroABZ**. 77
Figura 39. Potencia relativa de los ocmpuestos evaluados vs **ABZ** 90
Figura 40. Curva de calibración de **RetroABZ**, día 1, primero repetición 95
Figura 41. Curva de calibración del compuesto **RetroABZ** para el primer día. 96
Figura 42. Curva de calibración de la solubilidad del **RetroABZ** 99
Figura 43. Superposición de las estructuras tridimensionales de los modelos obtenidos mediante modelado por homología: α-tubulina 102
Figura 44. Mapa de Ramachandran generado por MOE 103
Figura 45. Puntuación QMEN para el modelo por homología de la α/β-tubulina de *G. lamblia* 104
Figura 46.- Visualización 3D en el programa MOE del **ABZ** 106
Figura 47.- Overlay del compuesto **CON-8** (**RetroABZ**) y el fármaco de referencia **Albendazol** (**ABZ**) en el sitio de unión de la β-tubulina de *G. lamblia*. 107
Figura 48. Análisis de las dos simulaciones 108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Perfil biofarmacéutico de los compuestos 5-nitrobencimidazoles. 43

Tabla 2. Perfil biofarmacéutico de los compuestos carbamatos de bencimidazol 44

Tabla 3. Absorción intestinal humana para los compuestos de tipo 5-nitrobencimidazoles 47

Tabla 4. Absorción intestinal humana para los compuestos de tipo carbamato de bencimidazol. 47

Tabla 5. Probabilidad de ser sustrato de la glicoproteína P de la serie de compuestos de tipo 5-nitrobencimidazoles. 48

Tabla 6. Probabilidad de sustrato de glicoproteína P de los compuestos carbamatos de bencimidazol. 49

Tabla 7. Probabilidad de inhibición del CYP 450 de los compuestos 5-Nitrobencimidazoles. 51

Tabla 8. Inhibición de CYP 450 de los compuestos de tipo carbamato de bencimidazol. 52

Tabla 9. Probabilidad de bloqueo de los canales hERG de la serie de compuestos 5-nitrobencimidazoles. 54

Tabla 10. Probabilidad de bloqueo de los canales hERG de la serie de compuestos 5-nitrobencimidazoles. 55

Tabla 11. Daño hepático de los compuestos 5-nitroimidazoles. 56

Tabla 12. Daño hepático de los compuestos carbamatos de bencimidazol. 57

Tabla 15. Probabilidad de mutagenicidad y carcinogenicidad de los compuestos **CON-1** a **CON-7** y **MTZ** 58

Tabla 16. Mutagenicidad y carcinogenicidad de los compuestos **CON 8-22** 59

Tabla 17. Perfil farmacodinámico para los compuestos 5-nitrobencimidazoles 60

Tabla 18. Perfil farmacodinámico para los compuestos carbamatos de bencimidazol. 60

Tabla 19. Análisis de consenso farmacológico para la serie de compuestos 5-nitrobencimidazoles. 62

Tabla 20. Análisis de consenso farmacológico de los compuestos de tipo carbamato de bencimidazol 64

Tabla 21. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados. 78

Tabla 22. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-1** 79

Tabla 23. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-2**. 79

Tabla 24. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-3** 80

Tabla 25. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-4** 80

Tabla 26. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-5** 81

Tabla 27. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-6** 81

Tabla 28. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-7** 82

Tabla 29. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-8 (RetroABZ)**. 83

Tabla 30. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-9**. 84

Tabla 31. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-11**. 85

Tabla 32. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-12**. 86

Tabla 35. Susceptibilidad *in vitro* contra *G. lamblia* de los compuestos sintetizados. 89

Tabla 36. Citotoxicidad de los compuestos **CON-7**, **CON-8** y **CON-9** 91

Tabla 37. Preparación de la curva de calibración de **RetroABZ** 93

Tabla 38. Preparación de las muestras problema de **RetroABZ** 93

Tabla 39. Curva de calibración de **RetroABZ**: Primera repetición, Día 1 94

Tabla 40. Coeficientes de determinación (r^2) de las curvas de calibración del compuesto **RetroABZ** 95

Tabla 41. Resultados de precisión intradía del compuesto **CON-8** para el primer día. 97

Tabla 42. Coeficiente de variación de la curva de repetibilidad. 98

Tabla 43. Curvas de calibración para la determinación de la solubilidad del compuesto **RetroABZ**. 98

Tabla 44. Solubilidad promedio determinada para el compuesto **RetroABZ**. 99

Tabla 45. Valores DE_{50} de **CON-7**, **RetroABZ** y **CON-9** compuestos de referencia en modelo murino de giardiasis. 101

Tabla 46. Scores de los compuestos sintetizados sobre la a/b-tubulina de *G. lamblia* 105

Tabla 47. Análisis de consenso de **RetroABZ** versus **ABZ**. 110

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ^{1}H de **CON-1** 160

Espectro 2. RMN ^{13}C de **CON-1** 160

Espectro 3. RMN ^{1}H de **CON-2** 161

Espectro 4. RMN ^{13}C de **CON-2** 161

Espectro 5. RMN ^{1}H de **CON-3** 162

Espectro 6. RMN ^{13}C de **CON-3** 162

Espectro 7. RMN ^{1}H de **CON-4** 163

Espectro 8. RMN ^{13}C de **CON-4** 163

Espectro 9. RMN ^{1}H de **CON-5.** 164

Espectro 10. RMN ^{13}C de **CON-5** 164

Espectro 11. RMN ^{1}H de **CON-6.** 165

Espectro 12. RMN ^{13}C de **CON-6** 165

Espectro 13. RMN ^{1}H de **CON-7.** 166

Espectro 14. RMN ^{13}C de **CON-7** 166

Espectro 15. RMN ^{1}H de **CON-8.** 167

Espectro 16. RMN ^{13}C de **CON-8.** 167

Espectro 17. RMN ^{1}H de **CON-9.** 168

Espectro 18. RMN ^{13}C de **CON-9** 168

ABREVIATURAS

ETD – Enfermedades Tropicales Desatendidas

OMS – Organización Mundial de la Salud

G. lamblia – Giardia lamblia

PFOR – Piruvato Ferredoxina Oxidorreductasa

SN_2 – Sustitución Nucleofílica Bimolecular

CS_2 – Disulfuro de Carbono

ABZ – Albendazol

RetroABZ – Regioisómero del albendazol (Retroalbendazol)

CI_{50} – Concentración Inhibitoria media

DMSO – Dimetilsulfóxido

ATCC – American Type Culture Collection

FF-UAEM – Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

MOE – Molecular Operating Environment

pKa – Constante de disociación ácida

SAR – Relación Estructura-Actividad

CB – Carbamatos de Bencimidazol

ADME – Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

Caco-2/TC7 – Línea celular derivada del colon (utilizada en estudios *in vitro*)

Huh-7 – Línea celular de carcinoma hepatocelular humano

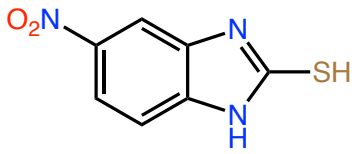
HaCaT – Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados

HFF -- "Human Foreskin Fibroblasts" (fibroblastos de prepucio humano)

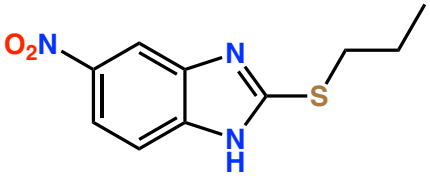
CD-1 – Cepa de ratón (utilizada en estudios *in vivo*)

IPN – Instituto Politécnico Nacional (mencionado en el contexto de colaboraciones)

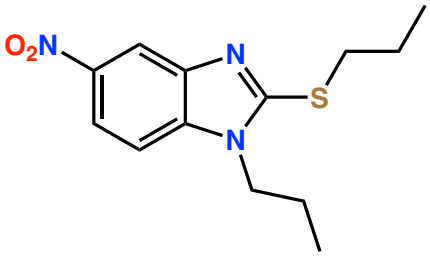
COMPUESTOS NITROBENCIMIDAZOLES



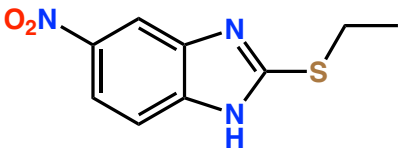
CON-1
5-nitro-1*H*-bencimidazol-2-tiol



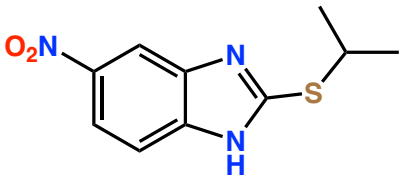
CON-2
5-nitro-2-(propiltio)-1*H*-bencimidazol



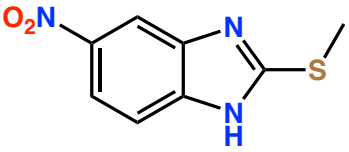
CON-3
5-nitro-1-propil-2-(propitio)-1*H*-bencimidazol



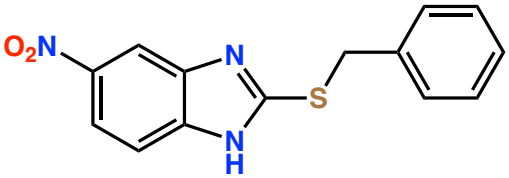
CON-4
2-(etiltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol



CON-5
2-(isopropiltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol

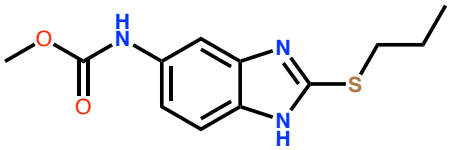


CON-6
2-(metiltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol

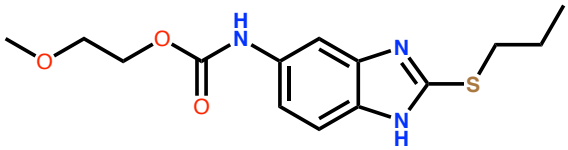


CON-7
2-(benciltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol

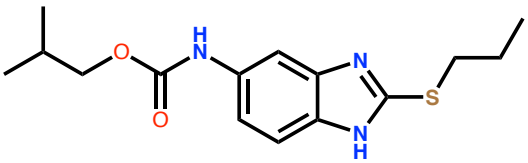
COMPUESTOS CARBAMATOS DE BENCIMIDAZOL



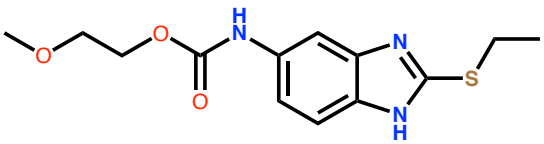
CON-8 (RetroABZ)
(2-(Propiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de metilo



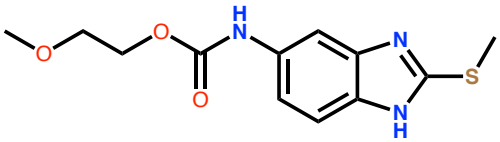
CON-9
(2-(Propiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de 2-metoxietilo



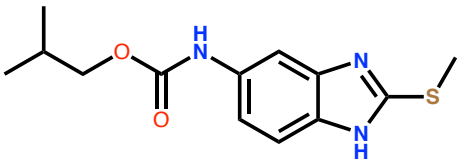
CON-10
(2-(Propiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de isobutilo



CON-11
(2-(Etiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de 2 metoxietilo



CON-12
(2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de 2-metoxietilo



CON-18
(2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de isobutilo

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias, incluida la giardiasis causada por *Giardia lamblia* (*G. lamblia*), representan una carga significativa para la salud pública a nivel mundial. La eficacia limitada y los efectos adversos asociados con las terapias actuales subrayan la necesidad urgente de desarrollar nuevos compuestos terapéuticos. En este estudio, se implementó una estrategia de diseño racional para sintetizar una serie de compuestos de tipo bencimidazol azufrados, con el objetivo de superar las limitaciones del albendazol, uno de los medicamentos más utilizados para tratar la giardiasis. Los compuestos sintetizados mostraron una mayor actividad *in vitro* contra los trofozoitos de *G. lamblia*, con una potencia nanomolar de hasta 4.7 veces mayor a la presentada por albendazol (0.196 ± 0.011 μM). Asimismo, en un modelo murino *in vivo* de giardiasis, **CON-7**, **CON-8** (**RetroABZ**) y **CON-9** evidenciaron una eficacia superior.

El **RetroABZ** (**CON-8**) fue uno de los mejores candidatos, que ademas mostró una mejora en la solubilidad acuosa lo que representa un incremento de 23 veces en comparación con el albendazol. Esta característica mejora significativamente su perfil biofarmacéutico y abre nuevas oportunidades para desarrollar derivados dirigidos eficazmente contra parásitos invasivos. El análisis de acoplamiento molecular reveló que los compuestos de tipo bencimidazol azufrados interactúan con la tubulina de manera similar al albendazol, formando enlaces de hidrógeno con los residuos Glu198 y Cys236 de la α/β-tubulina de *G. lamblia*. Asimismo, el estudio de dinámica molecular apoyó la conclusión de que el **RetroABZ**, a pesar de ser menos estable que el **ABZ** en el complejo ligando-receptor, presenta ventajas en términos de interacciones favorables y mayor afinidad en el sitio de unión de la α/β-tubulina de *G. lamblia.* En conjunto, estos hallazgos destacan el potencial de los compuestos bencimidazoles azufrados como candidatos terapéuticos prometedores para la giardiasis y posiblemente otras enfermedades parasitarias, ofreciendo una alternativa más efectiva y con mejores propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas que el **ABZ**.

ABSTRACT

Parasitic diseases, including giardiasis caused by *Giardia lamblia* (*G. lamblia*), represent a significant global public-health burden. The limited efficacy and adverse effects associated with current therapies underscore the urgent need to develop new therapeutic compounds. In this study, a rational-design strategy was implemented to synthesize a series of sulfur-containing benzimidazole derivatives aimed at overcoming the limitations of albendazole, one of the most widely used drugs for treating giardiasis. The synthesized compounds exhibited enhanced *in vitro* activity against *G. lamblia* trophozoites, with nanomolar potency up to 4.7-fold greater than that of albendazole (0.196 ± 0.011 μM). Moreover, in an *in vivo* murine model of giardiasis, **CON-7**, **CON-8** (**RetroABZ**), and **CON-9** demonstrated superior efficacy.

RetroABZ (**CON-8**) emerged as one of the most promising candidates, additionally showing a 23-fold improvement in aqueous solubility compared to albendazole. This feature significantly enhances its biopharmaceutical profile and opens new opportunities for developing derivatives that effectively target invasive parasites. Molecular-docking analysis revealed that these sulfur-containing benzimidazoles interact with tubulin in a manner analogous to albendazole, forming hydrogen bonds with Glu198 and Cys236 residues of *G. lamblia* α/β-tubulin. Furthermore, molecular-dynamics studies supported the conclusion that, although **RetroABZ** is less stable than albendazole (**ABZ**) within the ligand–receptor complex, it offers advantages in terms of favorable interactions and higher affinity at the *G. lamblia* α/β-tubulin binding site. Together, these findings highlight the potential of sulfur-containing benzimidazole derivatives as promising therapeutic candidates for giardiasis and potentially other parasitic diseases, offering a more effective alternative with improved physicochemical and biopharmaceutical properties compared to **ABZ**.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) representan un grupo de patologías que, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), afectan a más de mil millones de personas en todo el mundo. Estas enfermedades son particularmente prevalentes en países en vías de desarrollo, donde su impacto genera una significativa carga sobre los sistemas de salud y el desarrollo económico.[1,2] Dentro de las ETD se encuentran las parasitosis, que representan un desafío considerable para la salud pública a nivel global, especialmente en regiones con condiciones socioeconómicas desfavorables. Estas enfermedades afectan predominantemente a las poblaciones más vulnerables, como niños, ancianos y comunidades con acceso limitado a servicios de salud y saneamiento básico. Entre ellas, los protozoos y las helmintiasis se destacan por su alta morbilidad, siendo responsables de diarreas severas e infecciones invasivas.[3-5]

El tratamiento actual de las parasitosis se basa en dos grupos principales de compuestos. Uno de ellos incluye a los nitroderivados, que abarcan fármacos como metronidazol, tinidazol, nitazoxanida y furazolidona. Aunque estos agentes han demostrado eficacia en la eliminación de diversos parásitos, su uso está asociado con efectos tóxicos significativos, que incluyen hepatotoxicidad y mutagenicidad. En cuanto a las helmintiasis, los fármacos de primera elección son el albendazol y el mebendazol. Estos fármacos, además de su actividad antihelmíntica, también presentan efecto antiprotozoario debido a su capacidad para inhibir la polimerización de la tubulina. Los compuestos carbamatos de bencimidazol, como el albendazol y el mebendazol, se caracterizan por su alto índice terapéutico y baja toxicidad, lo que los convierte en opciones preferidas para el tratamiento de las parasitosis. Sin embargo, en los últimos años, se ha documentado un aumento en la resistencia de los parásitos a estos tratamientos,[6-8] lo que plantea un desafío significativo para el manejo efectivo de las helmintiasis y resalta la urgencia de

desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y alternativas de tratamiento, considerando la alta prevalencia de las enfermedades parasitarias y las desventajas de los fármacos de elección, es necesario la creación de nuevas moléculas que posean mejor solubilidad acuosa, incrementando su biodisponibilidad y la reducción de los efectos adversos para poder usarlas en la terapia experimental de las parasitosis humanas y veterinarias.

2. ANTECEDENTES

Los parásitos son los causantes de enfermedades infecciosas que han afectado a los seres humanos y animales a lo largo de su historia. Algunos de estos parásitos han sido comunes en diferentes sociedades antiguas a nivel mundial, mientras que otros se han desarrollado únicamente en zonas particulares, donde las condiciones ambientales favorecen sus ciclos de vida.[3]

2.1 Parásitos

Los parásitos son organismos que viven sobre o dentro de otro (el hospedero), del cual dependen para sobrevivir, alimentándose de él durante todo o parte de su ciclo vital. Dependiendo de su ciclo de vida, los parásitos pueden estar en el huésped de manera temporal o permanente, y algunos tienen complejos ciclos vitales que involucran múltiples huéspedes.[2]

Dentro de la clasificación de parásitos hay tres grandes grupos:

1) Helmintos o gusanos: Es un organismo multicelular y con sistemas de órganos complejos. A su vez puede dividirse en:

Nematodos o gusanos redondos: Estos organismos tienen cuerpos cilíndricos y alargados.

Platelmintos o gusanos planos: Estos gusanos tienen cuerpos planos y a menudo segmentados. Algunos de estos platelmintos, como las Taenias se encuentran colonizando típicamente el intestino delgado de sus huéspedes.

Los helmintos son una causa importante de enfermedades parasitarias en humanos y animales en todo el mundo. Pueden infectar diferentes partes del cuerpo y causar una amplia gama de síntomas, desde molestias gastrointestinales hasta problemas más graves como daño en órganos internos.

2) **Artrópodos**: Es un grupo de organismos complejos, conocidos por tener cuerpos segmentados y exoesqueletos de quitina. Este filo incluye una amplia variedad de criaturas, desde insectos, arácnidos y crustáceos. Los especímenes de este grupo dañan a sus huéspedes, ya sea directamente o por ejemplo, por su actividad de succión o por la transmisión de agentes de enfermedades (virus, bacterias, hongos y/u otros parásitos).

3) **Protista o protozoos**: Son organismos unicelulares de tipo eucariota, están clasificados a su vez por su conformación y reproducción. Algunos de los grupos de protozoarios más comunes incluyen:

Flagelados: Protozoarios que tienen uno o más flagelos para su movimiento.

Ciliados: Se caracterizan por presentar cilios en su superficie que utilizan para moverse y alimentarse.

Amebas: Los cuales son protozoarios cuyo movimiento es mediante la formación de pseudópodos.

Los protozoarios desempeñan diversos roles en la salud y las enfermedades humanas. Muchos protozoos son responsables de enfermedades gastrointestinales en humanos, por ejemplo, las producidas por *Giardia lamblia*.[9-10]

2.1.1 *Giardia lamblia*

Giardia lamblia, también conocida como *G. intestinales* o *G. duodenalis*, es un tipo de protozoo flagelado que reside en el intestino delgado tanto de seres humanos como de diversos vertebrados. Debido a su naturaleza zoonótica, puede transmitirse entre diferentes especies animales. *G lamblia* es una de las causas más frecuentes de infecciones gastrointestinales producidas por un protozoario a nivel mundial. Es especialmente relevante en la transmisión de diarrea a través del agua, los alimentos contaminados y en el caso de la diarrea del viajero.[11]

2.1.1.1 Morfología

2.1.1.1.1 Estructura del trofozoíto

Giardia lamblia presenta dos formas morfológicas: el trofozoíto que es la forma móvil y es responsable de la acción patógena, y el quiste que es una forma más pequeña capaz de resistir las condiciones del medio ambiente adversas.

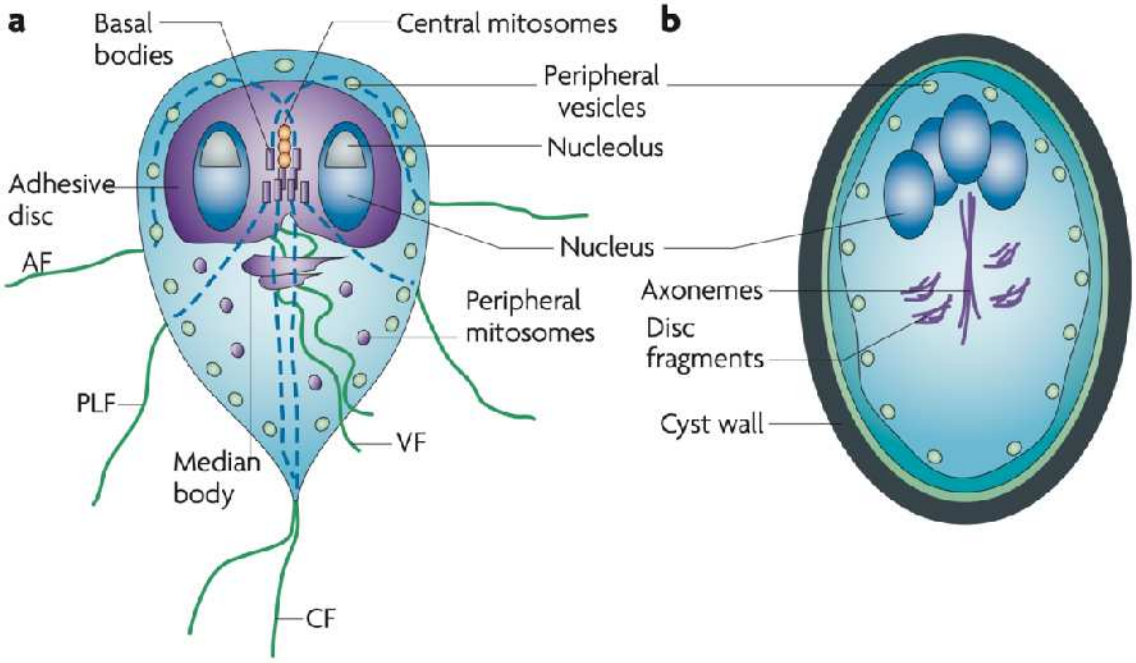


Figura 1. Estructura morfológica de *Giardia lamblia*: **a**. Trofozoíto y **b**. Quiste. El trofozoíto presenta cuatro pares de flagelos: flagelos anteriores (FA), flagelos postersiores laterales (FPL), flagelos caudales (FC) y flagelos ventrales (FV).[14]

El trofozoíto presenta una morfología característica mostrada en la **Figura 1a**, con dos núcleos simétricos situados anteriormente, un cuerpo medio y cuatro pares de flagelos. Su superficie dorsal es convexa, mientras que la ventral es plana y contiene un orgánulo en espiral o un disco de succión. Presenta una forma morfológica similar a una pera, midiendo aproximadamente de 12 a 20 µm de largo y de 5 a 10 µm de ancho. *Giardia lamblia* exhibe una diversidad genética, identificándose ocho

genotipos o conjuntos (A a H) con distintas especificidades de huésped. Los conjuntos A y B se encuentran en humanos y animales, como perros, gatos, ganado y animales salvajes.[12,13]

2.1.1.1.2 Estructura del quiste

Los quistes de *Giardia lamblia* (**Figura 1b**) son estructuras resistentes y no móviles, con una morfología ovoide y paredes lisas. Sus dimensiones varían entre 8 y 12 µm de largo y 7 a 10 µm de ancho. Estas estructuras son moderadamente resistentes a la acción de desinfectantes y ambientalmente estables, lo que las hace altamente efectivas para la transmisión del parásito.

El quiste está compuesto por una pared externa y una capa interna formada por dos membranas que brindan protección al parásito en condiciones adversas. La pared externa tiene un espesor de 0,3 a 0,5 µm y está constituida principalmente por una red de filamentos de 7 a 20 nm de diámetro. Esta red está formada, en su mayoría, por *N*-acetilgalactosamina, un componente esencial para la estabilidad estructural.

En su interior, el quiste contiene cuatro núcleos tetraploides, lo que refleja su capacidad para excistarse (transformarse en trofozoítos) una vez en un ambiente favorable, como el tracto intestinal del huésped. Este diseño estructural permite que los quistes de *G. lamblia* sean efectivos en la transmisión y supervivencia del parásito.[12]

2.1.1.2 Ciclo de vida

El ciclo biológico de *Giardia lamblia* se caracteriza por dos formas principales: el quiste y el trofozoíto (**Figura 2**). La transmisión del parásito ocurre principalmente por la ingestión de agua o alimentos contaminados con quistes, aunque también puede producirse por vía fecal-oral a través del contacto con superficies contaminadas o manos sucias.[15] A continuación, se describen las etapas del ciclo:

1. Ingestión de quistes: El ciclo comienza cuando el huésped ingiere quistes de *Giardia lamblia*, presentes en agua, alimentos o superficies contaminadas. Los quistes son resistentes a las condiciones ambientales y pueden sobrevivir durante largos períodos fuera del cuerpo.

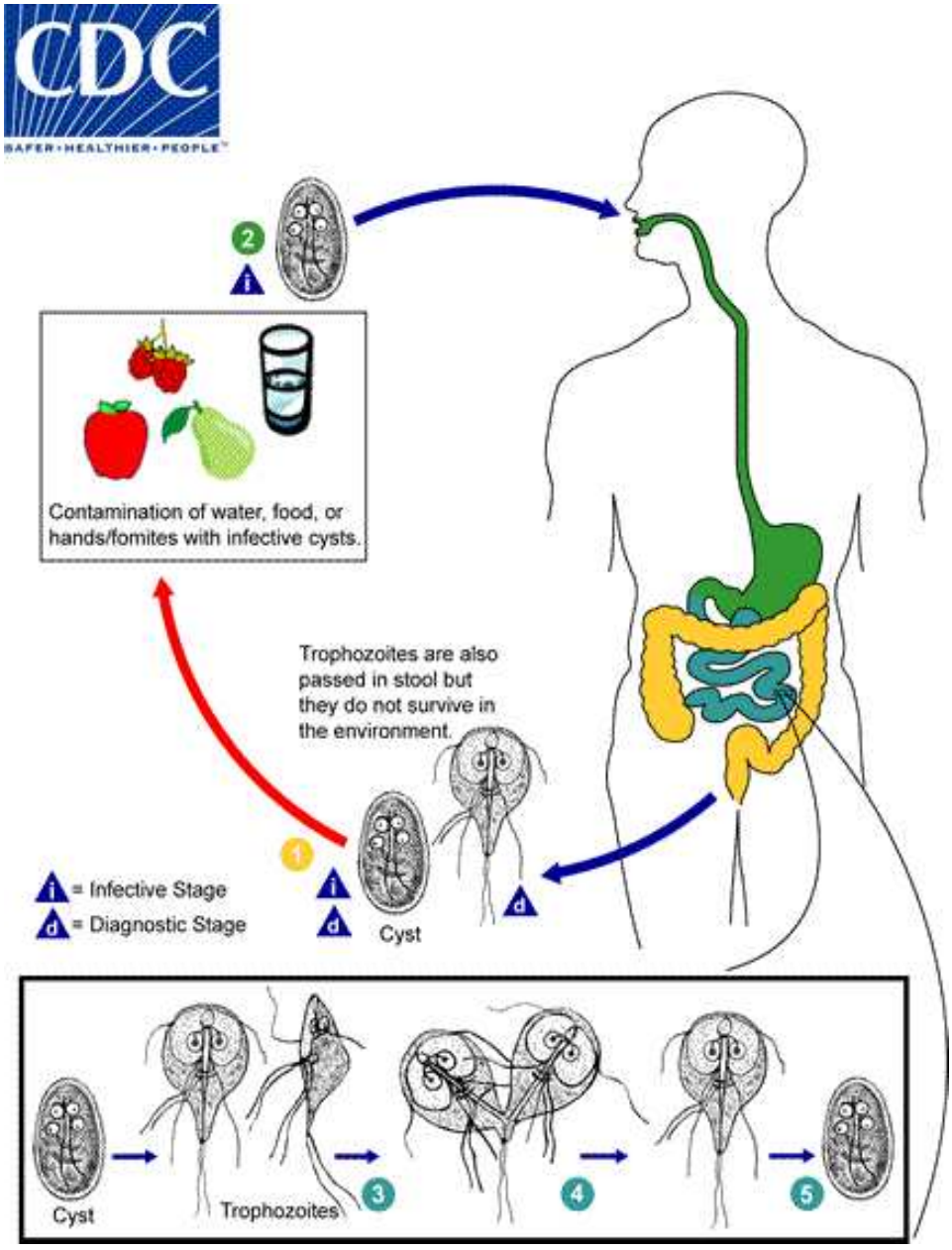


Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. El ciclo incluye las etapas de quiste infectante, trofozoíto activo, y la transformación entre ambas formas. [16]

2. Desenquistación: Una vez ingeridos, los quistes atraviesan el tracto gastrointestinal. Al llegar al estómago, la exposición al ácido gástrico y a las enzimas gástricas activa el proceso de liberación del quiste, en el cual los quistes se transforman en trofozoítos en el intestino delgado.

3. Trofozoítos: Los trofozoítos son la forma activa y móvil de *G. lamblia*. Se adhieren a la mucosa del intestino delgado, principalmente en el duodeno y el yeyuno, utilizando su disco de succión. Durante esta fase, los trofozoítos se reproducen asexualmente por fisión binaria y causan los síntomas de la giardiasis al interferir con la absorción de nutrientes.

4. Enquistación: A medida que los trofozoítos avanzan hacia el colon, las condiciones del ambiente cambian y el proceso de enquistación se inicia. Durante esta fase, los trofozoítos se transforman en quistes, que son la forma resistente que permite que el parásito sobreviva en el ambiente externo hasta encontrar un nuevo hospedero.

5. Excreción de quistes: Los quistes son excretados en las heces del huésped. Pueden sobrevivir en ambientes húmedos y fríos durante semanas o meses, esperando ser ingeridos por un nuevo huésped para reiniciar el ciclo.

2.1.1.3 Características clínicas

El período de incubación de *Giardia lamblia* varía entre 1 y 3 semanas. Es importante destacar que no todas las personas infectadas desarrollarán síntomas. Se estima que entre el 50 % y el 75 % de los individuos infectados permanecen asintomáticos. Las infecciones sintomáticas son más comunes en poblaciones vulnerables, siendo los niños los más afectados en comparación con los adultos.[12]

Cuando la enfermedad es sintomática, se presenta típicamente con diarrea crónica, esteatorrea, cólicos abdominales, distensión abdominal y expulsión de heces líquidas, grasosas y malolientes. Otros síntomas incluyen fatiga y pérdida de peso.[12]

2.1.1.4 Patogenia

El trofozoíto, que es la forma patogénica, y el quiste, que es la forma infectiva. La ingestión de tan solo 10 quistes puede ser suficiente para generar una infección sintomática.

Tras la infección por vía oral, la desenquistación se produce en el duodeno, probablemente debido a la exposición del quiste al pH ácido del estómago y las proteasas pancreáticas en el duodeno. Es durante la fase de trofozoíto cuando se manifiestan los síntomas clínicos. Se han descrito diversos mecanismos patogénicos asociados con la infección, que incluyen el deterioro de las uniones intercelulares, daño a los enterocitos, pérdida del borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado y acortamiento de las microvellosidades.

La población pediátrica es la más afectada por la infección por *G. lamblia*, ya que puede generar una infección crónica que conduce a desnutrición, mala absorción de nutrientes, y deficiencia de vitamina B_{12}, lo cual puede ocasionar anemia, retraso en el crecimiento y deterioro cognitivo.[13]

Estudios han demostrado deterioro estructural y funcional del borde en cepillo después de 24 horas de cultivo de *G. lamblia* sobre células Caco-2/TC7. Estos resultados sugieren que el parásito secreta diversas sustancias, como enterotoxinas, proteinasas y lectinas, durante la adhesión a las células. Además, algunos estudios indican que las lectinas en la superficie de *G. lamblia* podrían estar implicadas en la unión del parásito a las células huésped.[17]

2.1.1.5 Epidemiología

La giardiasis afecta a personas de todas las edades, pero la población pediátrica y aquellos con sistemas inmunitarios comprometidos son particularmente más vulnerables. Se estima que anualmente la giardiasis afecta a más de 280 millones

de personas a nivel mundial, convirtiéndola en una de las infecciones intestinales más comunes, especialmente en áreas con saneamiento deficiente.

En regiones como México, las estadísticas son menos precisas; sin embargo, la incidencia se reporta frecuentemente en comunidades rurales y zonas con deficientes condiciones de saneamiento. En 2023, se registraron 5,409 casos de giardiasis en México, siendo Chiapas, Oaxaca y Veracruz los estados con mayor prevalencia. Para 2024, se reportaron 5,418 casos. Es importante señalar que en 2024 también se registraron 81,263 casos de otras helmintiasis en el país, lo que subraya la persistente problemática de las enfermedades parasitarias como un desafío de salud pública en México.[22]

2.1.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de una infección por *G. lamblia* generalmente se realiza en casos de infección crónica, especialmente cuando el cuadro clínico presenta diarrea subaguda o crónica, acompañada de síntomas característicos de la infección. El diagnóstico clínico se basa en la microscopía de una muestra fecal para la identificación de quistes o trofozoítos de *G. lamblia*. Otra prueba específica es la detección inmunológica de antígenos en las heces, la cual tiene una sensibilidad comparable a la microscopía. Además, existen pruebas de detección de ácidos nucleicos, que son altamente específicas y más sensibles que la microscopía, permitiendo un diagnóstico más preciso, incluso en personas asintomáticas.[23]

2.1.2 Tratamiento farmacológico

Aunque la giardiasis es una enfermedad parasitaria de gran importancia epidemiológica y clínica debido a su alta prevalencia y patogenicidad, especialmente en niños, no hay consenso claro sobre el tratamiento más adecuado para esta infección.

Sin embargo, se requiere un tratamiento activo para la giardiasis sintomática, con el fin de reducir la sintomatología, la transmisión y las complicaciones asociadas a la enfermedad. Existen dos grupos principales de fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis,[17] los cuales se describirán a continuación.

2.1.2.1 Nitroimidazoles

El tratamiento de la giardiasis se basa principalmente en el uso de los derivados de los nitroimidazoles, que incluyen metronidazol, tinidazol *y* secnidazol, así como la nitazoxanida, un fármaco que pertenece a los nitrotiazoles (**Figura 3**). El primer nitroimidazol reportado fue el 2-nitroimidazol, surgido a partir de la exploración de compuestos de origen natural con actividad antimicrobiana. Este hallazgo motivó la búsqueda de rutas sintéticas para obtener análogos y regioisómeros, con el objetivo de ampliar sus aplicaciones terapéuticas. El desarrollo de estos compuestos se vio impulsado por el descubrimiento de que la funcionalidad **nitro** presente en la estructura del imidazol es fundamental para su mecanismo de acción. En este contexto, el **metronidazol** se convirtió en el primer fármaco con actividad comprobada contra *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*. Posteriormente, se desarrollaron otros fármacos de la misma clase, como tinidazol, ornidazol, satranidazol, nimorazol, secnidazol y dimetridazol**.**

A pesar de la eficacia general de estos medicamentos, alrededor del 90% de los pacientes ha experimentado fallas terapéuticas, debido en parte a la aparición de resistencias en aproximadamente el 20% de los casos.[18, 21]

Estos fármacos se administran por vía oral y actúan como profármacos. El grupo nitro se reduce intracelularmente, generando nuevas moléculas con actividad biológica. Los nitroimidazoles atacan de manera más eficaz a los trofozoítos, mientras que los quistes son menos afectados debido a la baja penetración de los fármacos a través de la pared del quiste.[17,24]

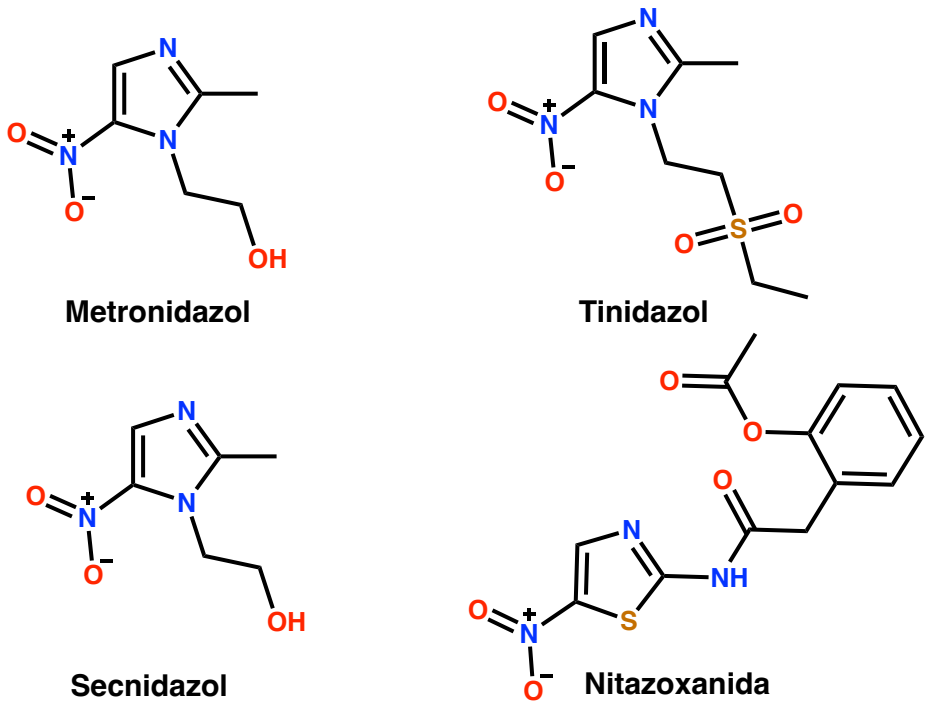


Figura 3. Fármacos nitroimidazoles y nitrotiazoles.

2.1.2.1.1 Inhibición de PFOR

El mecanismo de acción de fármacos de tipo nitroimidazoles comienza cuando entra al trofozoíto por difusión pasiva. Una vez dentro de la célula, el grupo nitro del compuesto es reducido a través del metabolismo anaerobio mediado por la piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFOR). Esta enzima cataliza la descarboxilación del piruvato a acetil-CoA y CO_2, reduciendo simultáneamente la ferredoxina.[17, 19, 20]

Otro mecanismo implicado en la reducción del grupo nitro es la acción de la tiorredoxina reductasa de *Giardia lamblia*, que actúa directamente sobre el metronidazol como nitroreductasa. El metronidazol reducido funciona como un aceptor terminal de electrones, uniéndose a las macromoléculas de ADN. Esto provoca la pérdida de su estructura, la rotura de las cadenas helicoidales y, en consecuencia, la muerte del trofozoíto.[16] Es posible que otros compuestos, como los nitroimidazoles y nitrotiazoles, compartan este mecanismo de acción debido a su similitud estructural.

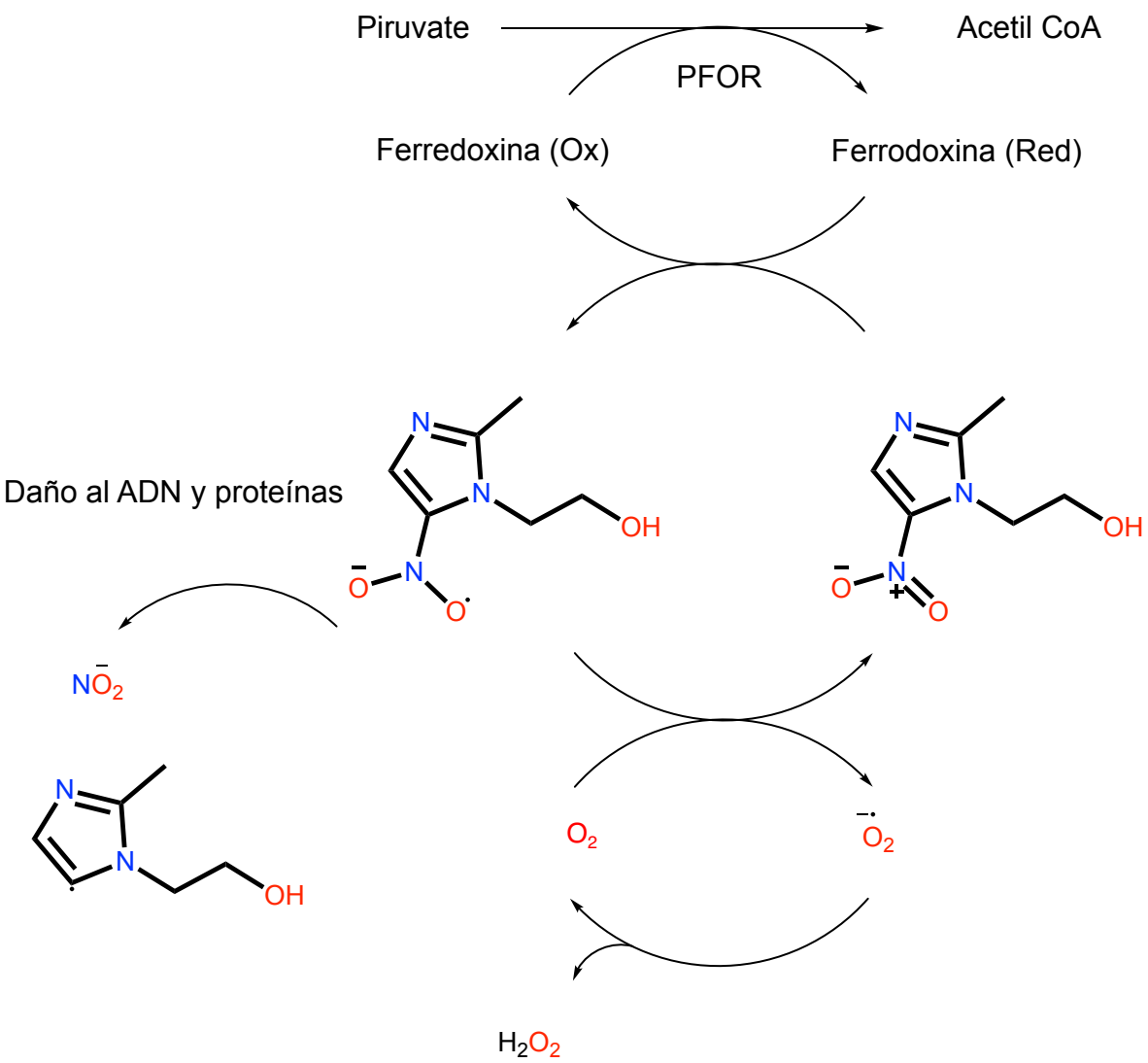


Figura 4. Mecanismo de los compuesto nitroaromaticos, que implica la biorreducción del grupo nitro por ferrodoxina

Otras enzimas relevantes en *Giardia lamblia* son las nitrorreductasas (NR1, NR2 y NR3). Las enzimas NR1 y NR2 contienen dominios de ferredoxina, lo que les permite reducir compuestos nitroaromáticos, aunque desempeñan funciones distintas. La NR1 actúa como una nitrorreductasa que puede reducir parcialmente fármacos como metronidazol y nitazoxanida, generando intermediarios tóxicos que contribuyen a la destrucción del parásito. En contraste, la NR2 participa principalmente en la inactivación de fármacos nitroaromáticos, al reducirlos

completamente a formas menos tóxicas. La sobreexpresión de NR2 en *G. lamblia* se ha asociado con una disminución en la sensibilidad a este tipo de compuestos, lo que sugiere su implicación en mecanismos de resistencia farmacológica.

A diferencia de NR1 y NR2, la NR3 carece de un dominio de ferredoxina; sin embargo, se ha reportado que presenta actividad significativa en la reducción de quinonas y en la modulación de la susceptibilidad a fármacos como la nitazoxanida, lo que indica que también podría estar involucrada en mecanismos de resistencia a nitrocompuestos.[17, 18]

2.1.2.2 Bencimidazoles carbamato de metilo

El bencimidazol es un compuesto orgánico aromático heterocíclico que constituye un importante farmacóforo presente en numerosos medicamentos. Este núcleo químico es responsable de una amplia variedad de actividades biológicas, incluyendo propiedades antihelmínticas, antifúngicas, antialérgicas, antibióticas, antivirales y antineoplásicas, entre otras, lo que lo convierte en una estructura privilegiada. Entre los fármacos utilizados para el tratamiento de parasitosis destacan los derivados carbamatos de bencimidazol, como el albendazol y el mebendazol, ampliamente empleados para infecciones por helmintos intestinales. Estos fármacos son reconocidos por su amplio espectro de acción, baja absorción intestinal y baja toxicidad. Sin embargo, este tipo de compuestos se caracteriza por presentar pobre solubilidad y baja biodisponibilidad oral. En particular, el **ABZ** muestra una biodisponibilidad inferior al 5 %, lo que limita su eficacia en el tratamiento de infecciones sistémicas. Debido a esta baja absorción, el ABZ requiere la administración de una dosis única y elevada de 400 mg para alcanzar concentraciones terapéuticas adecuadas.[24]

Aunque los bencimidazoles se utilizan principalmente contra helmintos, se ha observado que también inducen cambios morfológicos en trofozoítos de *Giardia*

lamblia. Estudios han demostrado que el albendazol es más efectivo que el mebendazol y el metronidazol para tratar infecciones por este protozoario. El mecanismo de acción de los fármacos de tipo carbamato de bencimidazol radica en la inhibición de la polimerización de la β-tubulina, lo que interfiere con la formación de microtúbulos esenciales para la función y estructura celular del parásito. Sin embargo, en años recientes, se ha reportado la aparición de resistencia al albendazol en algunos parásitos, lo que plantea desafíos en su uso clínico.[28]

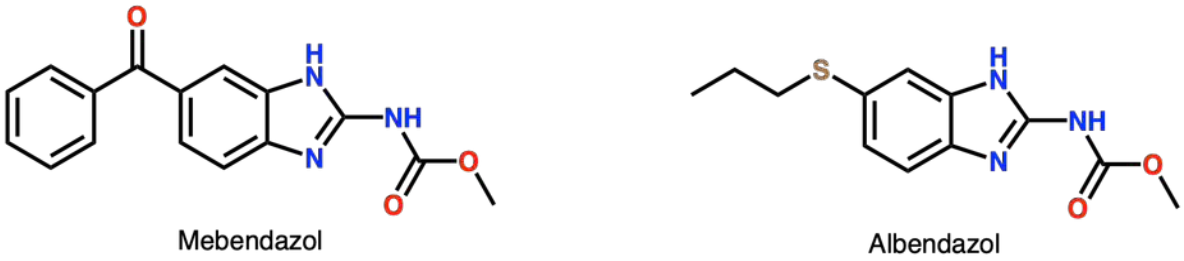


Figura 5. Fármacos de tipo carbamato de bencimidazol.

2.1.2.2.1 Inhibición de la polimerización de la tubulina

La dinámica de los microtúbulos que conforman el citoesqueleto es esencial para mantener la homeostasis celular y el desarrollo de los protozoarios. En estos organismos, los microtúbulos citoplasmáticos desempeñan un papel crucial en la estabilización de la integridad celular, mientras que los filamentos de actina generan fuerza dinámica. Sin embargo, en *Giardia lamblia*, los filamentos de actina son raramente detectados, se caracterizan por ser altamente dinámicos e inestables, mientras que los microtúbulos presentan una notable estabilidad.

En *Giardia*, existen matrices microtubulares únicas y especializadas, como el disco ventral y los cuatro pares de flagelos. El disco ventral es una estructura de microtúbulos en espiral única que resulta esencial para la fijación del parásito al epitelio del huésped y está implicada en su patogenicidad. Por su parte, los microtúbulos de los flagelos son altamente dinámicos y mantienen una longitud de equilibrio característica. Estudios han demostrado que esta longitud es regulada por

un mecanismo de despolimerización mediado por la **cinesina-13**, una proteína dependiente de la longitud de los microtúbulos. Se ha observado que los flagelos crecen a una velocidad constante hasta alcanzar una longitud estable, lo que permite la extensión de un nuevo flagelo hijo sin comprometer la longitud del flagelo materno. Este proceso es fundamental para la división celular y la diferenciación del parásito.[15, 28]

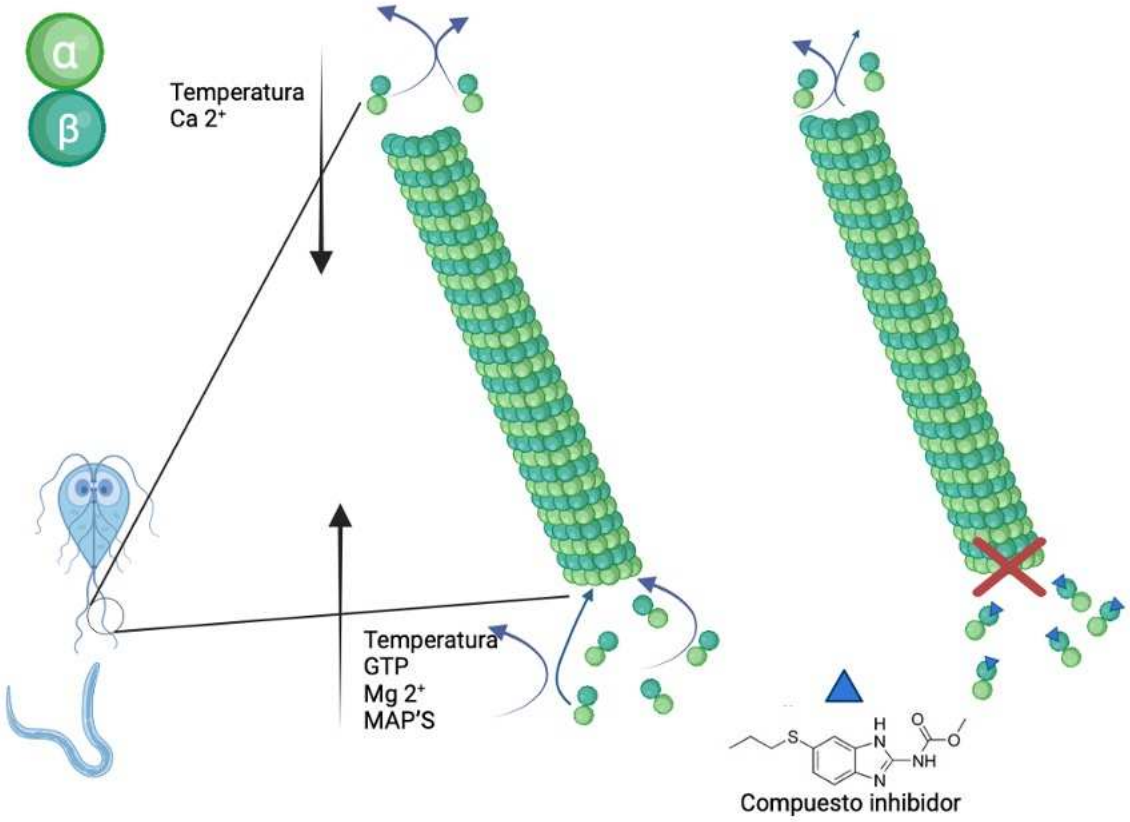


Figura 6. Inhibición de la polimerización de la α/β tubulina.

2.1.3 Bencimidazoles como estructuras privilegiadas

Los compuestos heterocíclicos han sido ampliamente utilizados en el descubrimiento de moléculas bioactivas, representando la estructura central de aproximadamente el 80 % de los fármacos disponibles en el mercado. Entre ellos,

destaca el anillo de bencimidazol, un compuesto heterocíclico que contiene nitrógeno en su estructura. El bencimidazol es una molécula bicíclica formada por la fusión de un anillo de benceno con un anillo de imidazol.[29]

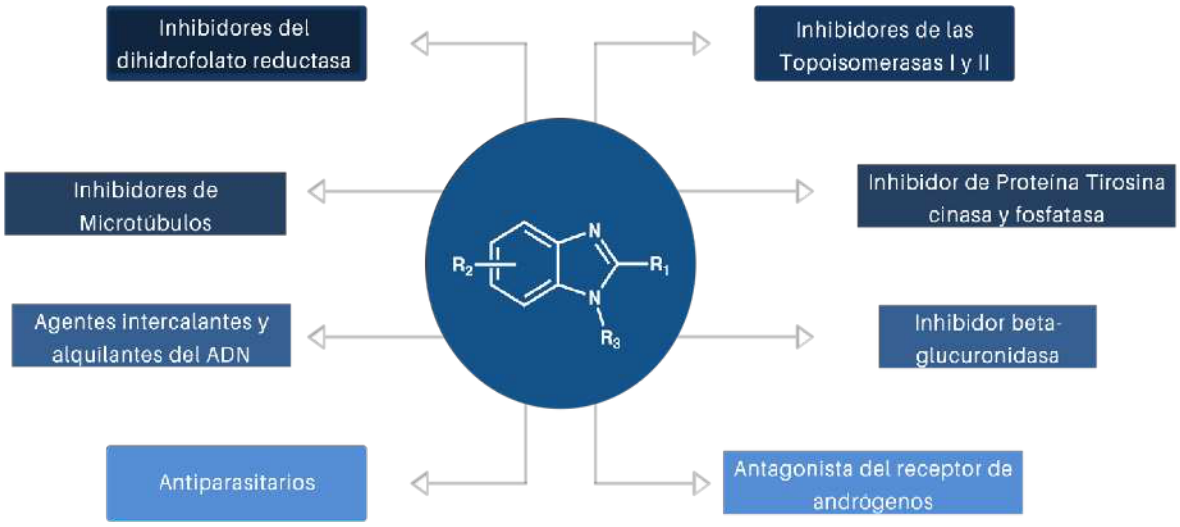


Figura 7.- Dianas biológicas de los bencimidazoles.

Numerosos estudios han señalado que el bencimidazol es una estructura privilegiada, presente en diversas moléculas bioactivas, como se ilustra en la **Figura 7**. Este concepto de "estructura privilegiada" se refiere a su capacidad para interactuar con múltiples dianas biológicas, lo que lo convierte en una herramienta valiosa en el diseño de nuevos fármacos. Sin embargo, es fundamental tener especial cuidado con las estructuras promiscuas, las cuales corresponden a compuestos que interactúan con múltiples blancos biológicos de manera inespecífica. Esta promiscuidad suele estar asociada a su alta reactividad química y a ciertas propiedades fisicoquímicas que les permiten interferir en diversos ensayos biológicos, generando falsos positivos. Un subconjunto relevante de este tipo de compuestos son los denominados **PAINS** (*Pan-Assay Interference Compounds*), conocidos por su capacidad de alterar múltiples ensayos independientemente del blanco terapéutico evaluado.[30, 34]

Debido a lo anterior, es crucial distinguir entre estructuras privilegiadas y promiscuas, es por eso que la incorporación de scaffolds privilegiados basados en bencimidazol ha demostrado ser una estrategia eficaz en el diseño de moléculas bioactivas. Este enfoque permite la obtención de compuestos con alta afinidad por diversas dianas biológicas en tiempos relativamente cortos. La afinidad y actividad de estos compuestos pueden optimizarse mediante modificaciones en los sustituyentes del anillo de bencimidazol, lo que amplía su potencial terapéutico en diferentes áreas de la quimica farmacéutica.[29, 35]

2.1.4 Química del bencimidazol

El bencimidazol es un scaffold heteroaromático bicíclico formado por la fusión de un anillo de benceno con un anillo de imidazol. Los bencimidazoles son moléculas anfóteras, con una naturaleza débilmente básica, siendo ligeramente menos básicas que los imidazoles. Además, presentan características ácidas, lo que les permite ser solubles en soluciones alcalinas. Los bencimidazoles tienen dos valores de pKa: pKa_1 = 5.30 y pKa_2 = 12.3, lo que refleja su capacidad para actuar tanto como ácidos débiles como bases débiles. La presencia de un hidrógeno en la posición 1 del anillo contribuye a su solubilidad en disolventes polares. Por otro lado, la incorporación de sustituyentes no polares en el anillo mejora su solubilidad en disolventes no polares.[36]

Además, se ha identificado la capacidad de los bencimidazoles no sustituidos para formar asociaciones moleculares a través de enlaces N-H···N. Estos enlaces de hidrógeno son un factor clave en la interacción entre moléculas de bencimidazol.[30]

El anillo de bencimidazol también puede existir en dos formas tautoméricas equivalentes, dependiendo de la ubicación del átomo de hidrógeno en uno u otro nitrógeno del anillo imidazólico (**Figura 8**).[36] Este fenómeno de tautomerismo puede ocurrir mediante dos mecanismos:

- **Interacción intermolecular**, que involucra dos o más moléculas de bencimidazol.
- **Interacciones con disolventes próticos**, como el agua, que facilitan el intercambio de protones entre los átomos de nitrógeno.

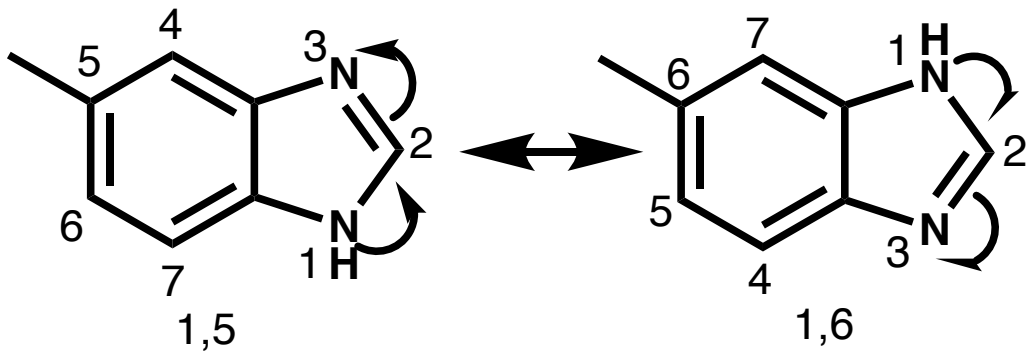


Figura 8.- Tautomerismo del bencimidazol

Estas propiedades químicas hacen del bencimidazol un núcleo versátil para su uso en el diseño y desarrollo de moléculas bioactivas.

2.1.5 Relación estructura-actividad de los bencimidazoles

La relación estructura-actividad (SAR) de los bencimidazoles destaca su amplia utilidad en química farmacéutica, siendo una base para el diseño de moléculas con diversas actividades biológicas, como agentes antimicrobianos, antiprotozoarios, anticancerígenos y antiinflamatorios. La bioactividad de los derivados del bencimidazol se atribuye a su núcleo estructural, que interactúa con diversas dianas biológicas mediante enlaces de hidrógeno**,** interacciones hidrofóbicas e interacciones π-π, confiriendo alta afinidad y especificidad hacia sus objetivos. [35, 36]

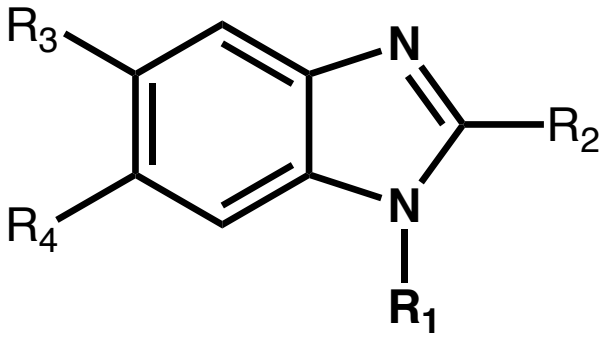


Figura 9. Sitios de modificacion molecular de los bencimidazoles.

2.1.5.1 Modificaciones en la posición 1

La incorporación de grupos alquilo pequeños en la posición 1 del anillo mejora significativamente la lipofilicidad y la permeabilidad a la membrana, favoreciendo el acceso a la diana objetivo.[31]

2.1.5.2 Modificaciones en la posición 2

La adición de grupos alquilo o arilo en la posición 2 incrementa la lipofilicidad y potencia la afinidad de unión al receptor. En particular, los agentes antihelmínticos aprovechan sustituciones como 2-carbamatos o 2-tioéteres, las cuales son esenciales para la interacción con la β-tubulina, inhibiendo la polimerización de los microtúbulos del parásito.

2.1.5.3 Modificaciones en las posiciones 5 o 6

La incorporación de grupos halógeno o nitro incrementan la densidad electrónica del anillo, mejorando la bioactividad.

Los grupos hidroxilo o amino mejoran la solubilidad en agua y favorecen la formación de enlaces de hidrógeno, lo que aumenta la afinidad por ciertos receptores.

Estas modificaciones estructurales hacen del bencimidazol un núcleo versátil y adaptable, permitiendo optimizar propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas en función del objetivo terapéutico.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades causadas por helmintos y protozoarios representan un problema significativo de salud pública, con una prevalencia mundial, aunque afectan de manera desproporcionada a los países en vías de desarrollo. Estas enfermedades, además de su impacto sanitario, presentan desafíos adicionales debido a la toxicidad de los tratamientos actuales y al desarrollo de resistencia por parte de los parásitos hacia compuestos como los nitroimidazoles y los carbamatos bencimidazólicos (CB).

La búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria ha llevado al descubrimiento de una amplia variedad de compuestos bioactivos, siendo los derivados del bencimidazol especialmente relevantes. Dentro de este grupo, los bencimidazol-2-carbamatos (CB) destacan por su eficacia en el tratamiento de parasitosis. Entre ellos, los fármacos de primera elección en México, como el albendazol y el mebendazol, han demostrado alta eficacia y bajos efectos adversos. No obstante, en los últimos años se ha documentado la aparición de resistencia a estos tratamientos, lo que pone en riesgo su efectividad a largo plazo.[35]

Por lo tanto, resulta crucial el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria capaces de superar los mecanismos de resistencia existentes. En este contexto, este proyecto de investigación química-farmacéutica propone el diseño de nuevos compuestos cuyos cambios estructurales puedan generar otras interaciones aumentando la afinidad de las moleculas sobre el sitio de union de la β-tubulina,[36] la síntesis y evaluación biológica de una serie de compuestos derivados del bencimidazol, con el objetivo de identificar su posible efecto antiparasitario.

Contar con nuevas alternativas terapéuticas no solo contribuirá a combatir las parasitosis de manera más eficaz, sino que también permitirá el desarrollo de

moléculas con mayor actividad farmacologica y menores efectos adversos, ofreciendo así soluciones más seguras y sostenibles para enfrentar estas enfermedades.

4. HIPÓTESIS

Los derivados azufrados del bencimidazol actuarán como ligandos virtuales de la β-tubulina de *Giardia lamblia*, manteniendo o incluso incrementando su actividad antiprotozoaria tanto *in vitro* como *in vivo*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Diseñar, sintetizar y evaluar una serie de derivados azufrados del bencimidazol para determinar su efecto antiprotozoario *in vitro* e *in vivo* y su posible interacción *in silico* con la β-tubulina de *Giardia lamblia*.

5.1.1 Objetivos específicos:

- Diseñar un grupo de derivados azufrados del bencimidazol con sustituyentes nitro y carbamato.
- Analizar *in silico* las propiedades biofarmacéuticas, farmacocinéticas, toxicológicas y farmacodinámicas de los compuestos.
- Realizar un análisis de consenso farmacológico para identificar *hits* computacionales seguros y priorizar su síntesis.
- Sintetizar y caracterizar los compuestos con las mejores características en el análisis de consenso farmacológico.

- Evaluar el efecto antiprotozoario de los compuestos sintetizados mediante ensayos fenotípicos *in vitro* frente a *Giardia lamblia*.

- Determinar la solubilidad acuosa del compuesto más activos en los ensayos *in vitro*.

- Realizar estudios *in vivo* en un modelo murino parasitado con trofozoítos de *Giardia lamblia*, para validar la eficacia terapéutica de los mejores candidatos.

- Llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular refinado para dilucidar su posible modo de unión a la β-tubulina de *Giardia lamblia*. Además de estudios de dinámica molecular para evaluar la estabilidad del complejo ligando–receptor.

6. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR

6.1 Serie A, compuestos 5-nitrobencimidazoles (CON 1-7)

El grupo nitro es un sustituyente versátil en el diseño de compuestos con actividad biológica dentro de la química farmacéutica. Sus propiedades electroatractoras permiten interacciones con nucleófilos biológicos como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y enzimas, modulando diversas funciones biológicas. Por esta razón, la incorporación de este grupo funcional ha sido ampliamente utilizada en el diseño de moléculas con aplicaciones biológicas diversas, como agentes anticancerígenos, antibióticos, fungicidas y antiparasitarios.[39]

En el desarrollo de nuevas moléculas con potencial efecto biológico, una estrategia común es el diseño racional de compuestos análogos de moléculas activas existentes. Estas modificaciones estructurales tienen como objetivo incrementar la potencia biológica, reducir la toxicidad y mejorar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos diseñados.

Tomando en cuenta esta estrategia, el diseño de los compuestos **CON 1-7** se basó en la estructura de fármacos nitroimidazólicos como el metronidazol y secnidazol**.** Para ello, se utilizó el principio de benzología, que establece que dos sustituyentes X-Y vinculados por un anillo aromático o separados por dobles enlaces mantienen conectividad electrónica a través de efectos resonantes. Esto sugiere que, al

preservar esta conectividad, la actividad biológica podría mantenerse,[37, 38] tal como se ilustra en la **Figura 10.**

Este enfoque no solo permite explorar nuevas variantes estructurales con potencial actividad antiparasitaria, sino que también aprovecha el conocimiento existente sobre compuestos con propiedades bien documentadas, maximizando así las posibilidades de éxito en la identificación de nuevos agentes bioactivos.

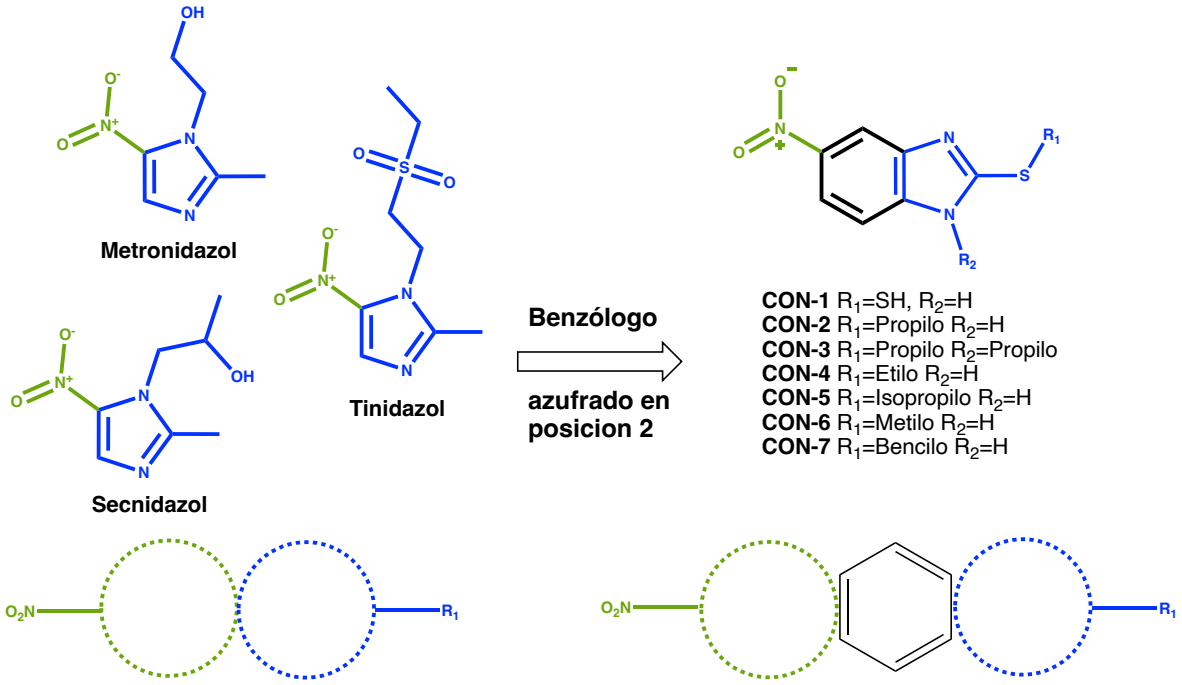


Figura 10. Diseño molecular de los compuestos nitroimidazoles **CON 1-7**.

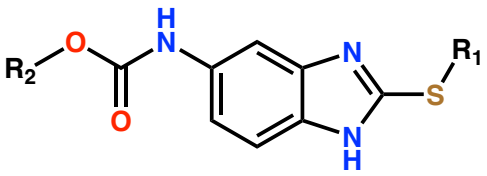
Como se muestra en la **Figura 10**, todos los compuestos fueron diseñados siguiendo el principio de benzología, que consiste en incorporar un anillo de benceno entre los dos sustituyentes laterales, manteniendo así la comunicación electrónica**.**

La adición del anillo de benceno no solo preserva esta conectividad electrónica, sino que también implica un incremento en el volumen molecular y el LogP. Este aumento favorece, por un lado, una mayor interacción molecular con las dianas

biológicas y, por otro, una mejora en la permeabilidad por difusión pasiva, lo que potencialmente podría aumentar la biodisponibilidad de los compuestos diseñados.

6.2 Serie B, compuestos carbamatos de bencimidazol

Los compuestos diseñados en este proyecto presentan diferencias en el patrón de sustitución de las cadenas laterales R_1 y R_2, representadas en la **Figura 11**.



CON 8-22

CON-8 $R_1 = -CH_3$ $R_2 = -CH_2-CH_2-CH_3$
CON-9 $R_1 = -CH_2-CH_2-O-CH_3$
CON-10 $R_1 = -iBu$
CON-11 $R_1 = -CH_3$ $R_2 = -CH_2-CH_3$
CON-12 $R_1 = -CH_2-CH_2-O-CH_3$
CON-13 $R_1 = -iBu$
CON-14 $R_1 = -CH_3$ $R_2 = -iPr$
CON-15 $R_1 = -CH_2-CH_2-O-CH_3$
CON-16 $R_1 = -iBu$
CON-17 $R_1 = -CH_3$ $R_2 = -CH_3$
CON-18 $R_1 = -CH_2-CH_2-O-CH_3$
CON-19 $R_1 = -iBu$
CON-20 $R_1 = -CH_3$ $R_2 = -Bn$
CON-21 $R_1 = -CH_2-CH_2-O-CH_3$
CON-22 $R_1 = -iBu$

Figura 11. Diseño de la serie de compuestos 5-carbamatos de bencimidazol (**CON 8-22**)

Esta serie de compuestos fue diseñada tomando como base la estructura del **albendazol (ABZ)**, un fármaco de primera elección en el tratamiento de helmintiasis y protozoarios ricos en tubulina, como *Giardia lamblia*, el cual contiene un sustituyente azufrado en posición 5(6) al ánillo bencimidazólico y un grupo carbamato en posición 2.[40]

La primera consideración estructural fue intercambiar los sustituyentes de las cadenas laterales del **ABZ**: el intercambio del grupo carbamato de la posición 2 a la posición 5 y el grupo tiopropiltio de la posición 5 a la posición 2, dando lugar al

diseño de un regioisómero **CON-1** y renombrado **RetroABZ**, como se muestra en la **Figura 12**.

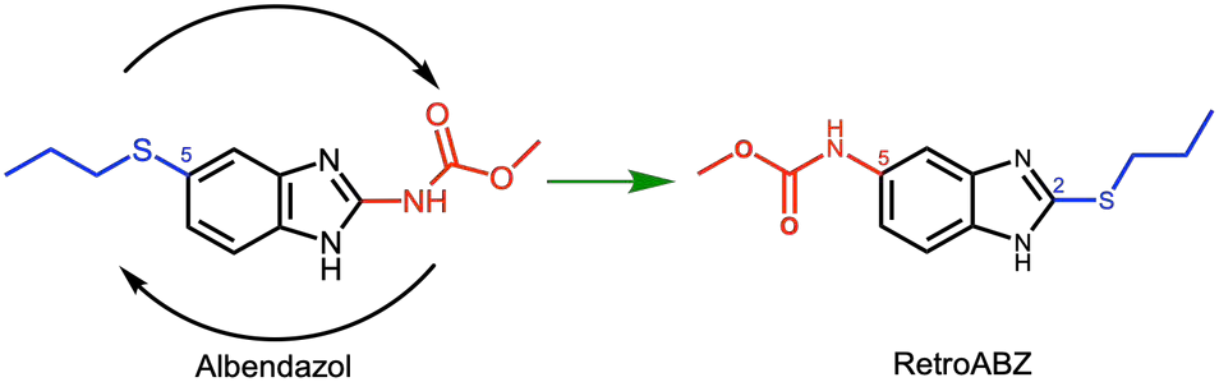


Figura 12. Diseño del regioisomero **ABZ**, denominado **RetroABZ**.

El **RetroABZ** surgió a partir de un enfoque de diseño racional para abordar las limitaciones de los compuestos empleados en la terapéutica actual. Si bien el **ABZ** es un fármaco eficaz de amplio espectro utilizado tanto en humanos como en animales, sus características desfavorables limitan su uso a infecciones localizadas en el tracto gastrointestinal debido a su baja solubilidad acuosa y, por ende, pobre biodisponibilidad.[40, 41]

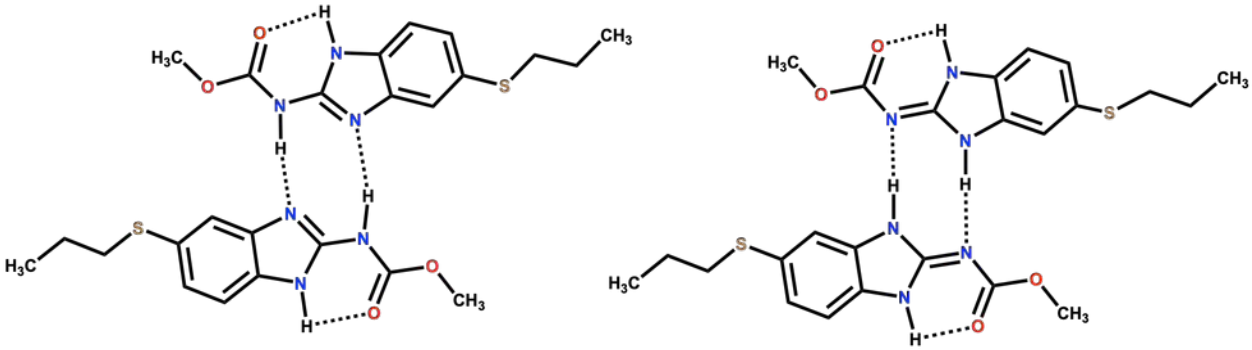


Figura 13. Estructura dimérica de los desmotropos del albendazol: **A.** Forma I y **B.** Forma II, adaptada de.[33]

La limitada solubilidad en agua de los carbamatos de bencimidazol, como el albendazo de 0.0228 mg/mL se debe principalmente a sus características estructurales,[42] particularmente a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, como se observa en las dos conformaciones diméricas polimorfas del albendazol (formas I y II), representadas en la **Figura 13**.[40]

Estos enlaces de hidrógeno juegan un papel clave en la baja solubilidad del albendazol. Por ello, el diseño de **RetroABZ** busca interrumpir la formación de estas conformaciones diméricas, lo que podría mejorar la solubilidad acuosa del compuesto.

La segunda consideración fue realizar modificaciones adicionales a las cadenas laterales de **RetroABZ** (**Figura 11**), con el objetivo de aumentar el número de compuestos disponibles y realizar un estudio de relación estructura-actividad (SAR)**.** Este análisis busca determinar la relación entre las características moleculares y la actividad biológica de los compuestos.

Se prevé que los sustituyentes en las posiciones $-R_1$ y $-R_2$ contribuyan mediante interacciones hidrofóbicas dentro del sitio de unión de la β-tubulina de *G. lamblia*. Esto podría favorecer la actividad inhibidora de la polimerización de la tubulina, mejorando la eficacia de los compuestos diseñados.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental se divide en tres partes principales, detalladas a continuación:

7.1 Parte computacional (*in silico*)

7.1.1 Análisis de consenso farmacológico (a priori)

Se han reportado casos de éxito en la literatura, donde se evaluaron las propiedades ADME de manera *in silico* en una serie de nuevos derivados de pirimidinas, inspirados en las dihidropiridinas y diseñados como bloqueadores de canales de calcio, con potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, en donde la combinación de los estudios *in silico* permitio identificar estructuras clave que mostraron actividad biologica.[43]

Por lo que, la integración de datos biofarmacéuticos, farmacocinéticos, toxicológicos y farmacodinámicos en las etapas iniciales del diseño de moléculas bioactivas permite mejorar sistemáticamente sus propiedades, incrementando así la probabilidad de éxito. [46, 47]

Aunque los métodos *in vitro* de alto rendimiento han ganado popularidad, su elevado costo ha impulsado la adopción de herramientas computacionales *in silico* como parte de enfoques multidisciplinarios. Estas herramientas facilitan la selección de candidatos para su síntesis química y evaluación experimental, reduciendo tiempo y costos.[46]

En este proyecto, se emplearon diversas herramientas quimio-informáticas, cuyos resultados se clasificaron en cuatro perfiles fundamentales:

7.1.1.1 Perfil biofarmacéutico

Cerca del 39 % de los proyectos de descubrimiento de nuevos fármacos fracasan debido a propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas deficientes, lo que genera pérdidas económicas significativas.[46, 48] Por ello, es crucial considerar estos aspectos desde el diseño molecular.

7.1.1.2 Perfil farmacocinético

El análisis de las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) en etapas tempranas permite predecir cómo una molécula podría comportarse en el organismo, influyendo directamente en su eficacia. Las moléculas con perfiles ADME óptimos tienen una mayor probabilidad de éxito.[50]

7.1.1.3 Perfil toxicológico

La identificación temprana de propiedades toxicológicas es esencial para minimizar riesgos asociados con la seguridad de las moléculas, lo que resulta crítico en el diseño de fármacos seguros.[50]

7.1.1.4 Perfil farmacodinámico

Este perfil evalúa cómo una molécula interactúa con su diana biológica, proporcionando información clave sobre la actividad esperada en su sitio de acción.

7.1.1.5 Fundamento del análisis de consenso farmacológico

Este análisis se basa en la idea de que cuanta más concordancia haya entre los datos sobre el perfil biofarmacéutico, farmacocinético, toxicológico y

farmacodinámico, mayor será la probabilidad de éxito de un compuesto. Esta metodología permite priorizar las moléculas con mayor potencial para estudios *in vitro* e *in vivo*, como se muestra en la **Figura 14.**[49, 52]

Los resultados se clasifican según un sistema de colores tipo semáforo:

- **Verde (+1):** Resultados altamente favorables.
- **Amarillo (0):** Resultados satisfactorios.
- **Rojo (-1):** Resultados desfavorables.

Con base en esta clasificación, se asigna un puntaje global (*score*) a los compuestos, priorizando aquellos con las mejores características para su síntesis y evaluación biológica.

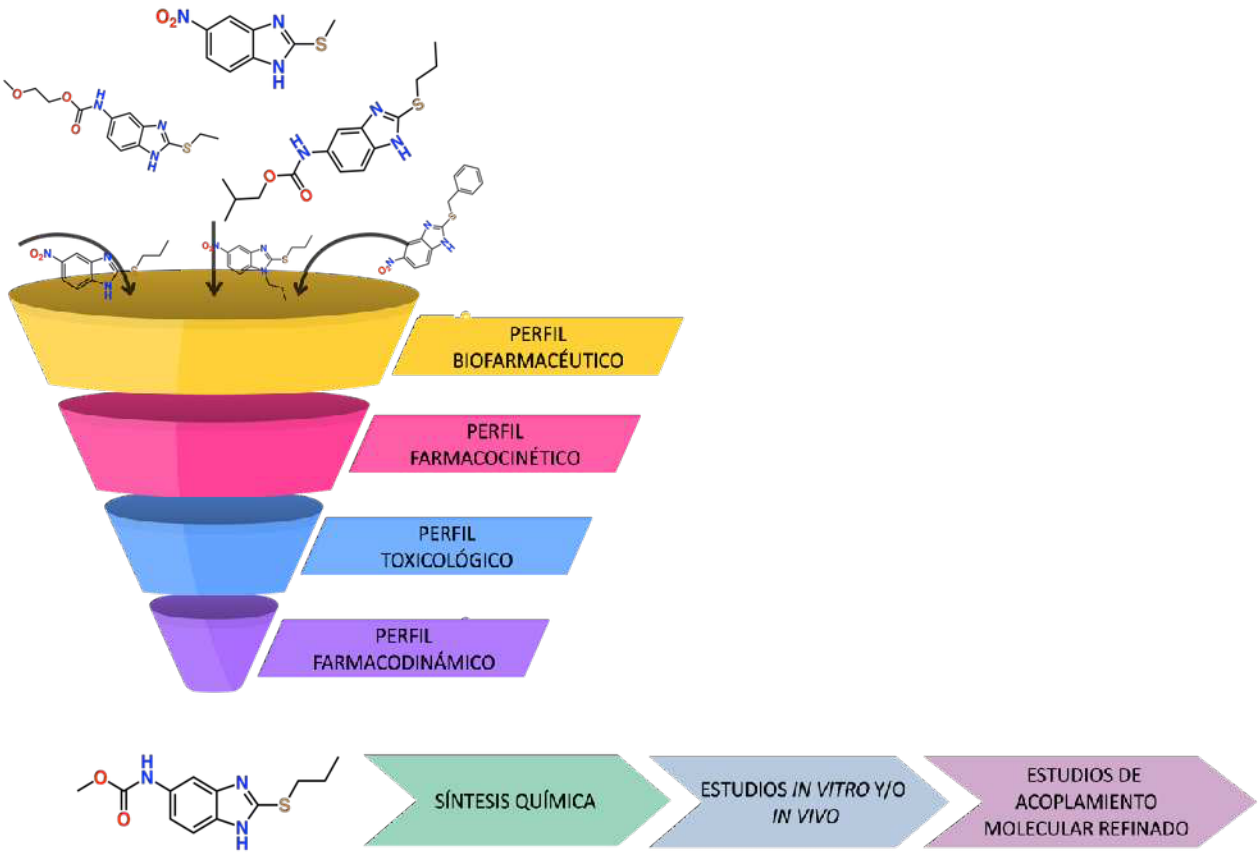


Figura 14. Análisis de consenso farmacológico.

7.1.2 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una técnica computacional empleada para predecir la interacción entre un ligando (molécula química) y una macromolécula diana, como una proteína. Esta técnica simula cómo un ligando se une al sitio activo de la diana, proporcionando información clave sobre la afinidad y el modo de unión del complejo.[53, 54]

El proceso consta de cuatro etapas principales:

- **Preparación de estructuras:** Incluye la optimización de la macromolécula y el ligando.
- **Posicionamiento del ligando:** Simulación de cómo el ligando se acomoda en el sitio activo de la diana.
- **Evaluación de la afinidad:** Cálculo de la energía de unión utilizando funciones de puntuación para estimar la estabilidad del complejo.
- **Análisis de resultados:** Identificación de interacciones clave que contribuyen a la afinidad del ligando hacia el sitio diana.

Esta técnica es fundamental para comprender los mecanismos moleculares y orientar el diseño de compuestos con alta afinidad y especificidad por su diana biológica.[49]

7.1.2.1 Molelecular operating environment (MOE)

MOE es un software desarrollado por Chemical Computing Group, el cual requiere una licencia comercial para su uso. Está disponible en el sitio oficial: https://www.chemcomp.com/en/Products.htm.[55]

Este software es ampliamente utilizado en la química farmacéutica para:

- Estudios de modelado y acoplamiento molecular.

- Cálculo de propiedades físico-químicas.
- Análisis de propiedades e interacciones moleculares.
- Visualización de estructuras en 3D.

7.1.2.2 Acoplamiento molecular en MOE

Dado que la estructura co-cristalizada de la α/β-tubulina de *G. lamblia* no se encuentra disponible en las bases de datos estructurales, fue necesario construirla mediante modelado por homología**.** Esta técnica se emplea para predecir la estructura terciaria de una proteína cuya conformación tridimensional es desconocida, basándose en la estructura de una proteína molde ya determinada experimentalmente y cuya secuencia presenta alta homología con la proteína objetivo. [56, 57]

El proceso incluye varias etapas principales.

1. Identificación de la proteína molde: Se realizó una búsqueda en la base de datos del Protein Data Bank (PDB), en la cual se identificó la α/β-tubulina de *Gallus gallus* formando un complejo ligando–receptor **con** mebendazol**,** un fármaco del tipo **carbamato de** bencimidazol. Esta estructura se utilizó posteriormente como referencia para la realización de los estudios de acoplamiento molecular.
2. Alineamiento de secuencias:Se alinearon las secuencias de la α/β-tubulina de *G. lamblia* con el molde de α/β-tubulina de *Gallus gallus* para identificar regiones conservadas.
3. Construcción del modelo:Se generó la estructura tridimensional (3D) de la proteína diana copiando las coordenadas de la estructura del molde en las regiones conservadas y modelando las regiones variables, utilizando la herramienta de modelado de MOE (Molecular Operating Environment**)**.
4. Optimización y refinamiento**:** A la estructura obtenida se le aplicó una **minimización de energía** para corregir errores geométricos presentes en el modelo.

5. Evaluación del modelo: La calidad estereoquímica del modelo fue evaluada mediante el gráfico de Ramachandran en MOE, y la estructura secundaria fue analizada a través de la puntuación QMEAN, disponible en https://swissmodel.expasy.org/qmean/. [58]

7.1.2.2.1 Metodología para Acoplamiento Molecular en MOE

El acoplamiento molecular se realizó utilizando el programa MOE 2019, el cual comprendió la preparación de las estructuras, incluyendo la optimización de la macromolécula y del ligando. Se corrigieron los enlaces del ligando y se llevó a cabo una protonación a pH fisiológico (~7.4), seguida de una minimización de energía mediante la herramienta QuickPrep.

Se realizó un acoplamiento molecular dirigido, empleando como referencia el ligando co-cristalizado en el complejo ligando–receptor.

Se analizaron las diez poses más representativas. Las interacciones 2D fueron visualizadas con la herramienta de análisis de MOE, y los mapas 3D se visualizaron con PyMOL 3.0.

7.1.2.2.2 PyMOL

PyMOL es un software especializado en la visualización molecular en tres dimensiones. Aunque requiere una licencia comercial, se ofrece una licencia educativa gratuita, disponible en: https://www.pymol.org/.[59]

Este software es ampliamente utilizado en la química farmacéutica y permite:

- Explorar y modelar estructuras moleculares en 3D.
- Analizar interacciones ligando-receptor.
- Visualizar complejos obtenidos en estudios de acoplamiento molecular.

PyMOL ofrece una representación tridimensional detallada de las interacciones entre los ligandos y las macromoléculas diana, lo que lo convierte en una herramienta esencial en el análisis estructural.

7.2 Parte química

El diseño y la síntesis de las series de compuestos se llevó a cabo en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos **(FF-UAEM)**, bajo la dirección del Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez. En este laboratorio se realizaron las siguientes actividades:

- Diseño molecular.
- Análisis retrosintético.
- Síntesis química.
- Caracterización de los compuestos mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

7.2.1 Retrosíntesis

La retrosíntesis química es un enfoque estratégico que tiene como finalidad proponer rutas de síntesis más sencillas y lógicas, minimizando la complejidad del proceso. Este método plantea una serie de desconexiones en la molécula objetivo para identificar equivalentes sintéticos más simples y comercialmente disponibles.[46] Este enfoque resulta esencial en la química farmacéutica, ya que permite la síntesis de nuevas entidades químicas de manera eficiente, optimizando tanto recursos como costos.

7.2.1.1 Retrosíntesis de la serie de compuestos nitrobencimidazoles y carbamatos de bencimidazol

Para la síntesis de los compuestos tipo 5-nitrobencimidazoles, se plantearon las siguientes desconexiones con sus correspondientes equivalentes sintéticos.

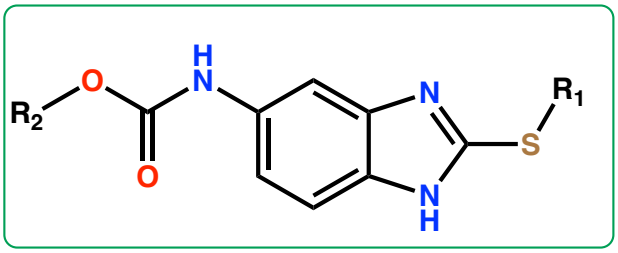
- Se realizó la desconexión en el enlace nitrógeno-oxígeno, obteniendo los respectivos cloroformiatos sustituidos y los 5-amino-2-tioalquilbencimidazoles.

- El compuesto 5-amino-2-tioalquilbencimidazol se obtendrá mediante la interconversión del grupo nitro del precursor 5-nitro-2-tioalquilbencimidazol.

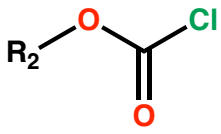
- En el compuesto 5-nitro-2-tioalquilbencimidazol, se realizó una desconexión en el enlace azufre-carbono del grupo alquilo, obteniendo los halogenuros de alquilo debidamente sustituidos y el 5-nitro-2-mercaptobencimidazol como precursor común.

- Al 5-nitro-2-mercaptobencimidazol se le realizó una desconexión en los enlaces nitrógeno-carbono del anillo de bencimidazol, obteniendo como equivalentes sintéticos al disulfuro de carbono y la 4-nitro-*o*-fenilendiamina.

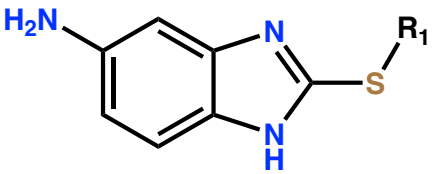
En la **Figura 15**, se puede observar un resumen de las retrosíntesis para los compuestos finales de ambas series.

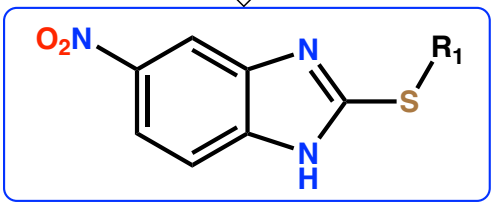


Serie 2. Carbamatos de bencimidazol

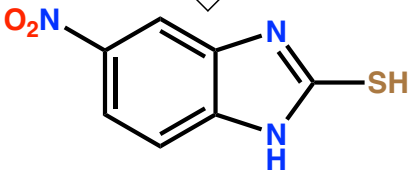


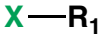
R_2=-CH_3, -$CH_2CH_2OCH_3$, -IPropil



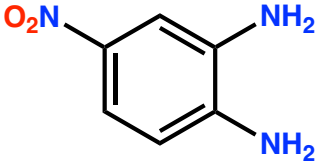


Serie 1. Nitrobencimidazoles





R_1= -Propilo, Etilo, iPropilo Metilo, Bencilo



CS_2

Figura 15. Retrosíntesis de los compuestos finales

7.2.2 Metodología general para la síntesis de la serie A de compuestos tipo 5-nitrobencimidazoles (CON 1-7)

La síntesis de los compuestos **CON 1-7** (**Figura 16**) se llevó a cabo mediante la reacción entre la 4-nitro-*o*-fenilendiamina (**14**) y disulfuro de carbono (**CS_2**) en presencia de KOH como base y etanol como disolvente,[61] obteniendo el precursor 5-nitro-2-mercaptobencimidazol (**CON-1**).

Posteriormente, para obtener los compuestos finales tipo 5-nitro-2-tioalquilbencimidazoles, se realizó una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (SN2) entre el compuesto **CON-1** y los respectivos halogenuros de alquilo.[62]

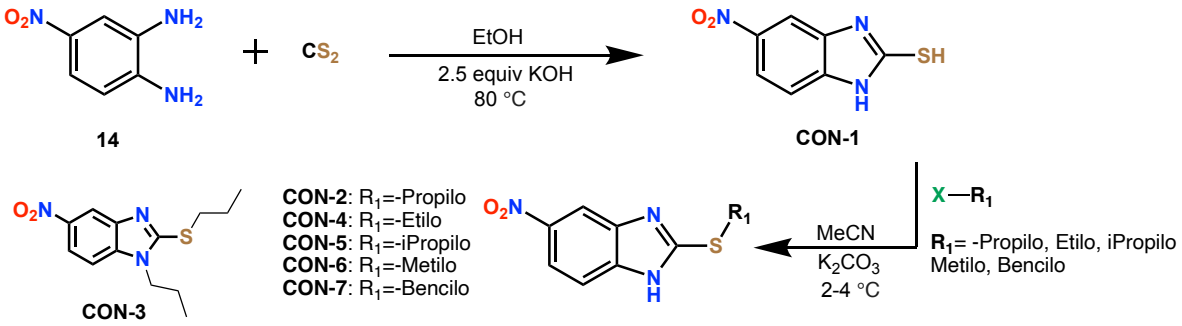


Figura 16. Ruta de síntesis general para la obtención de los compuestos finales **CON 1-7**.

7.2.3 Metodología general para la síntesis de la serie B de compuestos tipo carbamatos de bencimidazol (CON 8-13)

Los compuestos 2-alquiltio-5-nitrobencimidazoles fueron sometidos a una reducción química para obtener los correspondientes 5-amino-2-tioalquinbencimidazoles**.** Posteriormente, estos últimos se hicieron reaccionar con

los cloroformiatos de alquilo respectivos para sintetizar los compuestos finales (**Figura 17**).

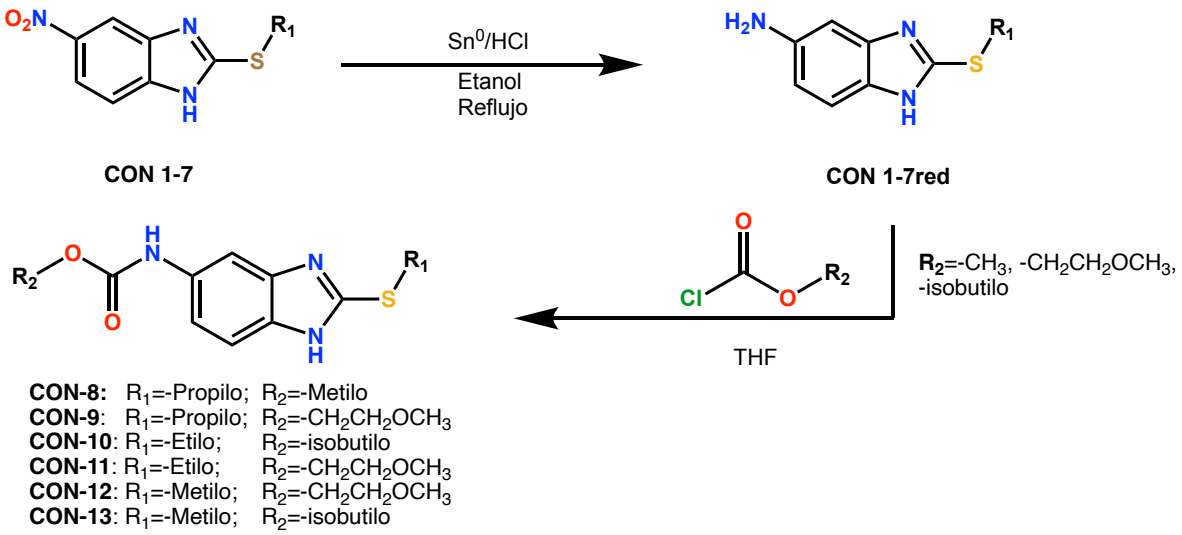


Figura 17. Ruta de síntesis general para la obtención de los compuestos finales **CON 8-13**.

7.3 Parte farmacológica

7.3.1 Evaluación *in vitro* sobre *Giardia lamblia*

Se evaluó el efecto antiprotozoario de los compuestos sintetizados mediante estudios biológicos *in vitro* usando métodos estandarizados, esto se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, en una colaboración con la Dra. Yepez Milia L. Se incubaron 4 x 10^6 trofozoítos de *G. lamblia* durante 48 horas a 37 °C en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos y **ABZ** como referencia (0.05, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 µM). Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio sin fármacos. Posterior a la incubación, los trofozoítos tratados se transfirieron a medio fresco y se incubaron otras 48 horas.

El número final de trofozoítos se determinó en un hematocitómetro, y el porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó comparándolo con los controles. Mediante

análisis Probit, se determinó la CI_{50}, que corresponde a la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de los trofozoítos. Los experimentos se realizaron por triplicado.[63, 64]

7.3.2 Ensayo citotóxico *in vitro*

El ensayo citotóxico de **RetroABZ**, se realizó en la Facultad de Farmacia, UAEM, en una colaboración con la Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza. Los ensayos citotóxicos se realizaron en células Huh-7 (carcinoma hepatocelular humano) y en HaCaT (queratinocitos epidérmicos humanos inmortalizados) adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU).[65] Las células se cultivaron en medio DMEM, complementado con 10% de suero bovino fetal y 2 mM de glutamina, manteniéndolas en condiciones estándar de cultivo (37 °C y 5% de CO_2). Se cultivaron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos. Se probó una curva de concentración/respuesta (100, 10, 1, 0.1, 0.01 µg/mL para Huh-7 y 200, 20, 2, 0.2, 0.02 µg/mL para HaCaT). El control negativo consistió en una solución con 0.05% de DMSO en medio. Tras 48 horas de incubación, se evaluó la viabilidad celular utilizando el kit CellTiter 96® AQueous One Solution. Los experimentos se realizaron por triplicado, y el análisis estadístico se llevó a cabo con Prism 8.0, obteniendo el CI_{50} mediante regresión.[66]

7.3.3 Evaluación *in vivo* en un modelo de ratón CD-1 parasitado con trofozoítos de *G. lamblia*

La actividad giardicida *in vivo* se realizó en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, IPN, en una colaboración con la Dra. Elizabeth Barbosa-Cabrera. Los compuestos se evaluaron en ratones CD-1. Las hembras de ratón CD-1 (16-24 g) fueron obtenidas de las instalaciones del bioterio

de la Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, y mantenidas en condiciones estándar de laboratorio. Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales, cumpliendo con las directrices para el cuidado y uso ético de animales de laboratorio.

El efecto giardicida de **CON-7**, **CON-8** (**RetroABZ**) y **CON-9** se evaluó en ratones infectados experimentalmente con trofozoítos de *Giardia lamblia*. Antes de la infección experimental, los ratones fueron tratados por vía oral con una solución de mebendazol (10 µg/ratón/día) durante tres días consecutivos para asegurar la eliminación de posibles infecciones por protozoos preexistentes. Una semana después del tratamiento, se realizaron tres exámenes fecales consecutivos para confirmar la ausencia de infecciones antes de proceder con la experimentación.

Los ratones (n = 6 por grupo) fueron infectados por vía intragástrica con 1×10^6 trofozoítos suspendidos en 300 µL de medio TYI-S-33. Seis días después de la infección, los ratones fueron tratados por vía intragástrica con 300 µL de **RetroABZ** disuelto en 1 mL de una solución de DMSO al 2 % en agua. Como controles, se incluyó un grupo tratado con **ABZ** y otro grupo tratado únicamente con el vehículo (solución de DMSO al 2 %). Se evaluaron cinco dosis únicas de **CON-7**, **RetroABZ** y **ABZ** (0,018, 0,037, 0,075, 0,15 y 0,3 µg/kg). A las 48 horas posteriores al tratamiento (ocho días después de la infección), los ratones fueron sacrificados, y se extirpó el intestino delgado. El tejido se abrió longitudinalmente y se sumergió en 10 mL de fijador de PAF al 10 % durante un mínimo de 2 horas. Posteriormente, se agitaron los tubos para garantizar el desprendimiento completo de los trofozoítos adheridos al epitelio intestinal. Se calculó el número de trofozoítos en cada grupo experimental, comparando los grupos tratados con los grupos de control.[67, 68]

7.4 Determinación de la solubilidad termodinámica

La solubilidad acuosa de **RetroABZ** y **ABZ**, se realizó en la Facultad de Farmacia, UAEM, en una estancia bajo la supervición del Dr. Julio C. Rivera-Leyva. se evaluó mediante el método de saturación en matraz, como se describe en estudios previos.[70] Para preparar las soluciones saturadas de **RetroABZ** y **ABZ**, se suspendió una muestra de 6 mg de los compuestos en 6 mL de agua bidestilada, para tener una concentracion de 1 mg/ml, agitándola durante 48 horas a una temperatura constante de 37 ± 2 °C. Posteriormente, la solución se filtró a través de un filtro de 0,2 µm (Phenex-NY, 4 µm). La solubilidad acuosa de **RetroABZ** y **ABZ** se cuantificó utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).[40] El análisis por HPLC se realizó con un sistema PerkinElmer 200, equipado con un detector ultravioleta (UV/VIS 200). La detección del analito se efectuó a una longitud de onda de 254 nm. La separación cromatográfica se llevó a cabo empleando una columna Phenomenex Luna C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm). La fase móvil para **RetroABZ** consistió en una mezcla de metanol y agua (60:40, v/v) y para **ABZ** se utilizó una mezcla de metanol y tampón de fosfato 0.05 M (pH 5,7) en una proporción 70:30 (v/v). La elución se realizó en modo isocrático a un flujo constante de 1 mL/min. Se inyectaron alícuotas de 20 µL en el sistema, estableciendo un tiempo de corrida de 10 minutos por inyección. Todos los análisis se efectuaron por triplicado.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Parte *in silico*

La integración de datos farmacodinámicos, farmacocinéticos y toxicológicos permite optimizar sistemáticamente las propiedades de las moléculas en etapas tempranas del descubrimiento de compuestos bioactivos, aumentando así su probabilidad de éxito en fases posteriores. Aunque en los últimos años se han desarrollado métodos *in vitro* de alto rendimiento, estos siguen siendo procesos costosos y demandantes de recursos.[50]

Por esta razón, el uso de métodos *in silico* se ha convertido en una herramienta implementada con un enfoque multidisciplinario para acelerar el descubrimiento de moléculas bioactivas y reducir costos. Sin embargo, es importante aclarar que los métodos computacionales no reemplazan las pruebas experimentales, ya que sus resultados están limitados por los modelos y las metodologías empleadas. Por ello, estos requieren una interpretación cuidadosa y validación experimental para confirmar su validez. [69, 70]

En el presente proyecto, estas herramientas permitieron la selección preliminar de candidatos prometedores para su síntesis y posterior evaluación experimental, empleando diversas herramientas quimioinformáticas para calcular sus propiedades biofarmacéuticas**,** farmacocinéticas y farmacodinámicas. Es importante mencionar que este análisis difiere del diseño de fármacos asistido **por** computadora (CADD, por sus siglas en inglés)**,** el cual es un enfoque que combina técnicas de química computacional**,** modelado molecular y diseño racional, con el objetivo de predecir cómo interactúan las moléculas con sus blancos biológicos.[71]

8.1.1 Perfil biofarmacéutico

En las etapas tempranas del descubrimiento de moléculas bioactivas, es crucial evaluar parámetros como la lipofilia, el peso molecular, la solubilidad y la permeabilidad.[74] Estos factores son determinantes en el diseño de compuestos con propiedades biofarmacéuticas óptimas, y su consideración temprana puede aumentar significativamente las probabilidades de éxito en el desarrollo de moléculas bioactivas. Es importante destacar que aproximadamente el 39 % de los proyectos de desarrollo de fármacos fracasan debido a deficiencias en estas propiedades, lo que implica costos elevados asociados a la necesidad de desarrollar formulaciones más complejas. Por ello, evaluar estos parámetros en las primeras etapas del diseño de moléculas bioactivas es fundamental.[50]

Entre los parámetros biofarmacéuticos, la solubilidad ocupa un lugar destacado, ya que influye directamente en la biodisponibilidad de los compuestos. Una mayor solubilidad permite una concentración más elevada de moléculas libres en la membrana intestinal, facilitando su absorción. Sin embargo, la solubilidad es una propiedad que varía según la estructura química del compuesto, su forma y las condiciones de la solución en la que se evalúe.

Tabla 1. Perfil biofarmacéutico de los compuestos 5-nitrobencimidazoles.[89]

CON	Solubilidad µg/mL	Lipinski (Violaciones)	Log D (pH 7.4)	Permeabilidad (Caco-2, cm/s)	TPSA	Score
1	390.0	0	2.15	1.988E-06	113.30	
2	82.2	0	3.43	1.847E-07	99.80	
3	32.10	0	3.66	1.367E-06	88.94	
4	196.0	0	3.2	1.068E-07	99.80	
5	81.6	0	3.33	1.299E-07	99.80	
6	257.0	0	2.43	1.786E-06	99.80	
7	18.0	0	3.37	1.198E-07	99.80	
MTZ	669	0	2.16	1.988E-06	83.9	

Solubilidad: Poco soluble <10 µg/mL, moderadamente soluble 10-60 µg/mL, Muy soluble >60 µg/mL; Log $D_{7.4}$:< 1 Desfavorable absorción oral, 1-3 Favorable absorción oral, > 3 Absorción errática; Permeabilidad Caco-2: permeable $3x10^{-6}$ cm/s, no permeable < $3x10^{-6}$ cm/s; TPSA: ≤ 140 $Å^2$ buena absorción oral.

De acuerdo con los resultados obtenidos (presentados en las **Tablas 1** y **2**) mediante programas quimioinformáticos, la mayoría de las moléculas analizadas mostraron una alta solubilidad. No obstante, se identificaron excepciones en las moléculas **CON-7**, **CON-10**, **CON-16**, y **CON-20** a **CON-22**, las cuales presentaron solubilidad baja. Es importante mencionar que, para que una molécula sea considerada altamente soluble en esta etapa de descubrimiento, su solubilidad debe ser superior a 60 µg/mL.[50]

Tabla 2. Perfil biofarmacéutico de los compuestos carbamatos de bencimidazol.[89]

CON	Solubilidad µg/mL	Lipinski (Violaciones)	Log D (pH 7.4)	Permeabilidad (Caco-2, cm/s)	TPSA	Score
8	60.43	0	3.04	1.98E-05	92.31	
9	76.72	0	3.01	1.77E-05	101.54	
10	8.22	0	3.55	1.89E-05	92.31	
11	127.46	0	2.65	2.11E-05	91.31	
12	165.47	0	2.74	1.60E-05	101.54	
13	17.54	0	3.38	1.81E-05	92.31	
14	65.43	0	2.97	2.28E-05	92.31	
15	79.23	0	3.05	1.75E-05	101.54	
16	9.13	0	3.53	1.55E-05	92.31	
17	219.63	0	2.11	1.51E-05	92.31	
18	278.36	0	2.24	1.90E-05	101.54	
19	30.44	0	3.27	1.41E-05	92.31	
20	9.6	0	3.21	1.41E-05	92.31	
21	10.12	0	3.12	1.69E-05	101.54	
22	10.05	0	3.73	1.53E-05	92.31	
ABZ	59.43	0	2.94	1.01E-05	92.31	

Solubilidad: Poco soluble <10 µg/mL, moderadamente soluble 10-60 µg/mL, Muy soluble >60 µg/mL; Log $D_{7.4}$:< 1 Desfavorable absorción oral, 1-3 Favorable absorción oral, > 3 Absorción errática; Permeabilidad Caco-2: permeable $3x10^{-6}$ cm/s, no permeable < $3x10^{-6}$ cm/s; TPSA: ≤ 140 $Å^2$ buena absorción oral.

Se determinaron las Reglas de los Cinco, también conocidas como las reglas de Lipinski, las cuales predicen problemas de permeabilidad de compuestos mediante difusión pasiva. Estas reglas establecen que un compuesto puede presentar mala absorción o permeabilidad si incumple alguna de las siguientes condiciones:[68]

- Más de 5 donadores de puentes de hidrógeno (-NH y -OH).
- Peso molecular superior a 500
- Coeficiente de partición calculado (*cLogP*) mayor a 5.
- Más de 10 aceptores de puentes de hidrógeno (átomos de oxígeno y nitrógeno).

De acuerdo con los resultados presentados en las **Tablas 1** y **2**, ninguno de los compuestos analizados, incluyendo **MTZ** y **ABZ**, muestra violaciones a las reglas de Lipinski. Por lo tanto, se prevé que estos compuestos no presenten problemas de permeabilidad asociados a la difusión pasiva.

El LogD a pH 7.4 se determinó como un parámetro clave en el diseño temprano de moléculas bioactivas, ya que la lipofilicidad de una molécula influye significativamente en sus propiedades fisicoquímicas, metabólicas y toxicológicas. Se ha establecido que un valor deseable de LogD a pH 7.4 debe situarse entre 1 y 3, lo que asegura una buena absorción intestinal, penetración en el sistema nervioso central (SNC) y un bajo metabolismo.[50, 76] De acuerdo con los resultados mostrados en las **Tablas 1** y **2**, más de la mitad de los compuestos analizados presentaron valores de LogD muy favorables. No obstante, los compuestos **CON-10**, **CON-13**, **CON-16**, **CON 19-22** y **ABZ** mostraron valores no satisfactorios, lo que sugiere que podrían enfrentar problemas relacionados con la absorción intestinal.

Además, se evaluó *in silico* la permeabilidad, otro parámetro crucial en el diseño de moléculas. Una baja permeabilidad puede limitar la absorción intestinal, y se sabe que las moléculas en su forma neutra tienen una permeabilidad mucho mayor que en su forma ionizada. La permeación celular ocurre por diversos mecanismos, siendo la difusión pasiva la predominante en la mayoría de los fármacos. Se ha establecido que una molécula debe tener un valor de permeabilidad superior a $3x10^{-}$

^{6} cm/s en un modelo de células Caco-2 para ser considerada adecuada.[37, 58] Según los resultados (**Tabla 1**), la mayoría de los compuestos nitrobencimidazoles presentan valores insatisfactorios, lo que indica posibles problemas de permeabilidad. En contraste, los compuestos del tipo carbamato de bencimidazol, incluyendo el **ABZ**, mostraron permeabilidades calculadas adecuadas.

En conjunto, la mayoría de las moléculas de ambas series presentan valores satisfactorios a muy satisfactorios en los parámetros evaluados, lo que sugiere propiedades biofarmacéuticas favorables y, por ende, una biodisponibilidad adecuada. Esto implica una mayor probabilidad de alcanzar el sitio diana y ejercer su efecto biológico. Sin embargo, los compuestos **CON-10**, **CON-16** y **CON-20** a **CON-22** presentan valores desfavorables en ambos parámetros, lo que indica una posible biodisponibilidad oral errática.

8.1.2 Perfil farmacocinético

Las propiedades farmacocinéticas de las nuevas entidades químicas son un componente esencial para el éxito en el descubrimiento de moléculas. El éxito de una molécula no depende únicamente de su capacidad para interactuar con su diana biológica, sino también de su perfil farmacocinético ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción). Las moléculas que poseen propiedades farmacocinéticas adecuadas tienen una mayor probabilidad de demostrar actividad biológica. [50, 78]

En este proyecto químico-farmacéutico, se dio prioridad a las predicciones *in silico* de las propiedades farmacocinéticas desde las etapas iniciales, como parte de una metodología racional para el diseño de moléculas bioactivas. Este enfoque permite identificar compuestos con alta probabilidad de éxito en ensayos biológicos posteriores.

Tabla 3. Absorción intestinal humana para los compuestos de tipo 5-nitrobencimidazoles

Compuesto	ADMET AI[90]	SwissADME[91]	PreADMET[92]	Score
CON-1	++	++	++	
CON-2	++	++	++	
CON-3	++	++	++	
CON-4	++	++	++	
CON-5	++	++	++	
CON-6	++	++	++	
CON-7	++	+	+	
CON-8	++	++	++	
MTZ	++	++	++	

Probabilidad de absorción intestinal: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)

Las **Tablas 3-5** presentan los resultados de la evaluación de parámetros clave para un perfil farmacocinético adecuado en las series de compuestos nitrobencimidazoles y carbamato de bencimidazol.

Tabla 4. Absorción intestinal humana para los compuestos de tipo carbamato de bencimidazol.

Compuesto	ADMET AI[90]	SwissADME[91]	PreADMET[92]	Score
CON-8	++	++	+	
CON-9	++	++	+	
CON-10	++	++	+	
CON-11	++	++	+	
CON-12	++	++	+	
CON-13	++	++	+	
CON-14	++	++	+	
CON-15	+	++	+	
CON-16	++	++	+	
CON-17	+	++	+	
CON-18	+	++	+	
CON-19	+	++	+	
CON-20	+	++	+	
CON-21	+	++	+	
CON-22	++	++	++	
ABZ	+	++	+	

Probabilidad de absorción intestinal: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)

Según los resultados mostrados en las **Tablas 3** y **4**, los compuestos **CON-1** a **CON-22** obtuvieron calificaciones de satisfactorias a muy satisfactorias en cuanto a su capacidad para una absorción intestinal humana, comparable al fármaco de referencia. Esto sugiere que estos compuestos tendrían una buena biodisponibilidad en el organismo, factor crucial para su desempeño farmacológico.

Por otro lado, el eflujo mediado por la glicoproteína P (P-gp) es un parámetro de gran relevancia a considerar durante las etapas tempranas del descubrimiento de moléculas bioactivas. Este mecanismo no solo tiene implicaciones en el diseño de moléculas dirigidas a la actividad anticancerígena, sino que también afecta significativamente el perfil farmacocinético de los compuestos, influyendo en su absorción, distribución y eliminación.

Tabla 5. Probabilidad de ser sustrato de la glicoproteína P de la serie de compuestos de tipo 5-nitrobencimidazoles.

Compuesto	admetSAR 3.0[93]	SwissADME[91]	PreADMET[92] Inhibición	Score
CON-1	-	-	++	
CON-2	-	-	++	
CON-3	+	-	++	
CON-4	-	-	++	
CON-5	-	-	++	
CON-6	-	-	++	
CON-7	-	-	++	
CON-8	-	-	+	

Probabilidad de sustrato o inhibidor: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)

La P-gp actúa como una bomba de eflujo dependiente de ATP, capaz de transportar una amplia gama de sustancias desde el interior de las células hacia el exterior. Se encuentra especialmente activa y sobreexpresada en células con funciones protectoras, como las del epitelio intestinal, el hígado, los riñones y la barrera hematoencefálica, desempeñando un papel crucial en el eflujo de compuestos

tóxicos y xenobióticos. Diseñar moléculas que evadan la P-gp o utilizar inhibidores de este transportador es una estrategia para superar la resistencia a fármacos.[50, 79]

Como se muestra en las **Tablas 5** y **6**, todos los compuestos evaluados, incluyendo el **MTZ** y el **ABZ**, obtuvieron resultados altamente satisfactorios al no ser sustratos de la P-gp. Esto indica que estos compuestos no estarían relacionados con problemas de resistencia a fármacos mediados por eflujo de esta proteína, lo cual es una característica favorable para su desarrollo como posibles agentes terapéuticos.

Tabla 6. Probabilidad de sustrato de glicoproteína P de los compuestos carbamatos de bencimidazol.

Compuesto	admetSAR 3.0[93]	SwissADME[91]	PreADMET[92] Inhibición	Score
CON-1	-	-	-	
CON-2	-	-	-	
CON-3	-	-	++	
CON-4	-	-	-	
CON-5	-	++	-	
CON-6	-	-	++	
CON-7	-	-	-	
CON-8	-	-	-	
CON-9	-	-	++	
CON-10	-	-	-	
CON-11	-	-	-	
CON-12	-	-	-	
CON-13	-	-	++	
CON-14	-	-	-	
CON-15	-	-	++	
ABZ	-	-	-	

Probabilidad de sustrato o inhibidor: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)

8.1.3 Predicciones del perfil toxicológico

La toxicidad es una de las principales razones de abandono de moléculas durante las etapas iniciales del descubrimiento de fármacos. Los efectos adversos asociados a los fármacos pueden variar desde reacciones secundarias leves hasta eventos que comprometan gravemente la salud del paciente. Muchos compuestos han sido retirados del mercado tras identificar toxicidades significativas durante su uso clínico en poblaciones extensas.[50, 80] Por ello, la evaluación de toxicidad es un parámetro crítico en el descubrimiento temprano de moléculas bioactivas. Identificar de manera temprana las posibles alertas toxicológicas permite priorizar aquellos compuestos con un perfil de seguridad más favorable, seleccionando así al mejor candidato para avanzar en el desarrollo. En las **Tablas 7** y **8** se presentan los análisis de consenso realizados sobre los compuestos **CON-1** a **CON-22**, enfocándose en algunos de los parámetros toxicológicos más relevantes.

8.1.3.1 Predicción de la inhibición de las isoformas del CYP450

Se evaluó la inhibición de las principales isoformas del citocromo P450 (CYP450), ya que estas enzimas metabólicas son clave en el metabolismo de fármacos y frecuentemente están implicadas en reacciones adversas causadas por interacciones fármaco-fármaco.[81]

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) se definen como respuestas nocivas e involuntarias que ocurren tras la administración de un fármaco a dosis terapéuticas habituales. Una proporción considerable de estas reacciones adversas se debe a interacciones fármaco-fármaco, las cuales alteran la farmacocinética de uno o más medicamentos administrados simultáneamente. Entre las principales causas de RAM derivadas de interacciones está la inhibición reversible de enzimas metabólicas, particularmente las del sistema CYP450.[50, 81]

Tabla 7. Probabilidad de inhibición del CYP 450 de los compuestos 5-Nitrobencimidazoles.

Compuesto	Isoforma del CYP450	admetSAR 3.0[93]	SwissADME[91]	PreADME[92]	Score
CON-1	3A4 2D6	- -	+ -	- -	
CON-2	3A4 2D6	- -	+ -	++ -	
CON-3	3A4 2D6	- -	- -	- -	
CON-4	3A4 2D6	- -	+ -	++ -	
CON-5	3A4 2D6	- -	+ -	+ -	
CON-6	3A4 2D6	- -	- -	- ++	
CON-7	3A4 2D6	+ +	- +	++ -	
MTZ	3A4 2D6	- -	- -	- -	
Clotrimazol	3A4 2D6	++ ++	++ ++	++ -	

Probabilidad de inhibición de CYP 450: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)

Por este motivo, la inhibición del CYP450 es un parámetro crucial para el diseño de nuevas moléculas bioactivas, ya que su identificación temprana puede predecir posibles reacciones adversas y reducir el riesgo de interacciones farmacológicas en etapas posteriores del desarrollo.

En las **Tablas 7** y **8** se muestran los resultados correspondientes a la evaluación de las principales isoformas del citocromo P450 (CYP450) en microsomas de hígado humano. De manera general, se observó que los compuestos **CON-1** a **CON-22**, así como los fármacos de referencia **MTZ** y **ABZ**, obtuvieron una calificación de satisfactoria a muy satisfactoria. Esto sugiere que estos compuestos tienen un bajo potencial para causar interacciones medicamentosas adversas relacionadas con la inhibición de las isoformas del CYP450.

Tabla 8. Inhibición de CYP 450 de los compuestos de tipo carbamato de bencimidazol.

Compuesto	Isoformas del CYP 450	admetSAR 3.0[93]	SwissADME[91]	PreADME[92]	Score
CON-8	3A4 2D6	- -	- -	- -	
CON-9	3A4 2D6	- -	- -	++ -	
CON-10	3A4 2D6	- -	- -	++ -	
CON-11	3A4 2D6	- -	- -	++ -	
CON-12	3A4 2D6	- -	- -	- -	
CON-13	3A4 2D6	- -	- -	- ++	
CON-14	3A4 2D6	- -	- -	- ++	
CON-15	3A4 2D6	- -	- -	- ++	
CON-16	3A4 2D6	- -	- -	- ++	
CON-17	3A4 2D6	- -	- -	- ++	
CON-18	3A4 2D6	+ -	- -	- ++	
CON-19	3A4 2D6	+ -	- -	- ++	
CON-20	3A4 2D6	+ -	++ ++	- ++	
CON-21	3A4 2D6	+ -	++ ++	- ++	
CON-22	3A4 2D6	+ -	++ ++	- ++	
Albendazol	3A4 2D6	- -	- -	- -	
Clotrimazol	3A4 2D6	++ ++	++ ++	++ -	

Probabilidad de inhibición de CYP 450: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)

En contraste, el clotrimazol, un fármaco antimicótico de amplio espectro conocido por su capacidad para inhibir varias isoformas del CYP450,[82] presentó una calificación de consenso poco satisfactoria. Estos resultados destacan el perfil favorable de los compuestos analizados frente a la inhibición enzimática, lo que podría traducirse en una menor probabilidad de interacciones fármaco-fármaco.

8.1.3.2 Bloqueo de los canales hERG

Los canales hERG son canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje presentes en las células del músculo cardíaco y son responsables de la generación del potencial de acción a nivel celular. Como se ilustra en la **Figura 18**, el potencial de acción cardíaco comienza con la apertura de los canales de sodio (Na^+), permitiendo la entrada de estos iones a la célula y causando la despolarización de la membrana celular, que pasa de un potencial en reposo de -90 mV a +20 mV. La despolarización se mantiene gracias a la apertura de los canales de calcio (Ca^{2+}), lo que permite la entrada de Ca^{2+} a la célula. Este flujo se compensa con la apertura de los canales de potasio (K^+), que facilitan la salida de iones K^+ y la disminución de la entrada de Ca^{2+}. Este ciclo es esencial para la correcta actividad eléctrica del corazón.[50, 83]

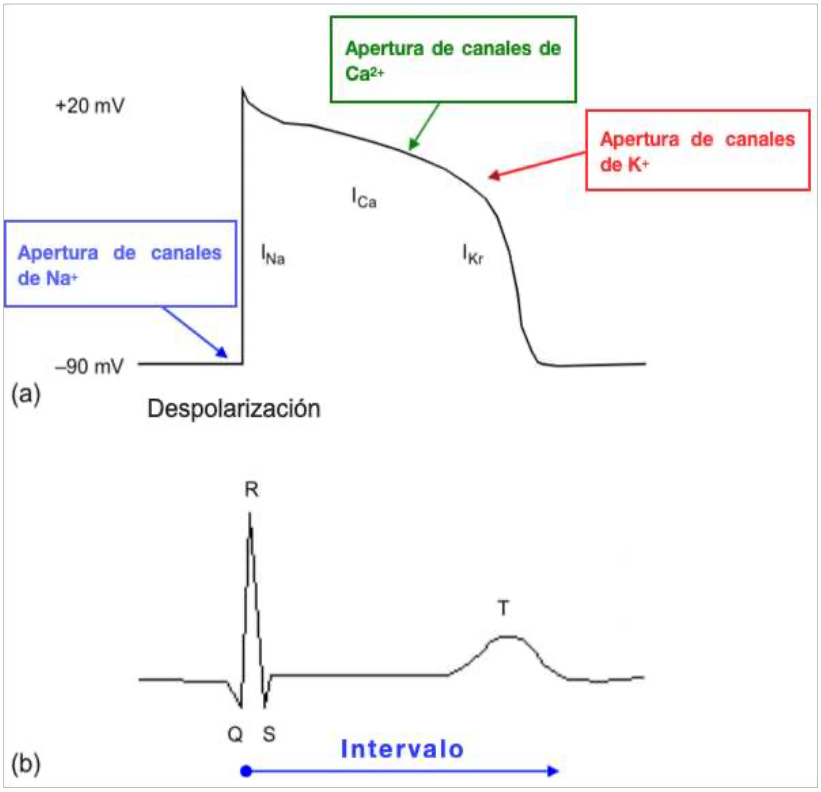


Figura 18. A) potencial de acción cardiaco, b) electrocardiograma, intervalo QT.

El bloqueo de los canales hERG por moléculas puede interrumpir este equilibrio, resultando en el síndrome de QT largo, lo que lleva a arritmias ventriculares graves,

como torsión de puntos en el ECG que pueden causar muerte súbita. Por esta razón, es fundamental seleccionar moléculas que no presenten afinidad hacia estos canales, minimizando el riesgo de efectos cardiotóxicos.[83]

Tabla 9. Probabilidad de bloqueo de los canales hERG de la serie de compuestos 5-nitrobencimidazoles.

Compuesto	admetSAR 3.0[93] (10 μM)	ACD/Tox Suite[95] (10 μM)	PreADMET[84]	ADMETLab 3.0[94] (10 μM)	Score
CON-1	-	-	-	+	
CON-2	-	++	+	+	
CON-3	-	++	+	++	
CON-4	-	+	+	+	
CON-5	-	+	+	-	
CON-6	+	+	+	+	
CON-7	-	++	+	+	
MTZ	-	-	+	-	
CFN	++	++	++	+	

Probabilidad de bloqueo de canales hERG: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)
Metronidazol (**MTZ**); Clorfenamina (**CFN**)

Como se muestra en las **Tablas 9** y **10**, los compuestos de la serie **CON-1 a CON-22** obtuvieron una calificación de satisfactoria a muy satisfactoria, indicando una baja probabilidad de bloquear los canales hERG a concentraciones clínicamente relevantes. Este resultado resalta el bajo riesgo de cardiotoxicidad asociado a estos compuestos. Con la excepción de los compuestos **CON 20-22** que presentaron una calificación poco satisfactoria.

En contraste, la clorfenamina un fármaco antihistamínico H_1 de primera generación, ha sido identificado como un inhibidor experimental de los canales hERG y el cual presentó una alta probabilidad de bloqueo de los canales hERG,[84] reafirmando su perfil de riesgo en cuanto a posibles efectos cardiotóxicos. No obstante, su amplia eficacia clínica en el tratameinto de reacciones alérgicas y su favorable relación riesgo/ beneficio han respaldado su uso en la terapéutica.

Tabla 10. Probabilidad de bloqueo de los canales hERG de la serie de compuestos 5-nitrobencimidazoles.

Compuesto	admetSAR 3.0[93](10 μM)	ACD/Tox Suite[95] (10 μM)	PreADMET[84]	ADMETlab 3.0[94] (10 μM)	Score
CON-8	+	-	+	+	
CON-9	++	-	+	+	
CON-10	++	-	+	+	
CON-11	+	-	+	+	
CON-12	++	-	+	-	
CON-13	++	-	+	+	
CON-14	+	-	+	+	
CON-15	++	-	+	-	
CON-16	++	-	+	+	
CON-17	++	-	+	-	
CON-18	++	-	+	-	
CON-19	++	-	+	+	
CON-20	++	-	++	+	
CON-21	++	++	++	+	
CON-22	++	+	++	++	
ABZ	++	--	+	+	
CFN	++	++	++	++	

Probabilidad de bloqueo de canales hERG: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)
Albendazol (**ABZ**); Clorfenamina (**CFN**)

8.1.3.3 Daño hepático inducido por medicamentos (DILI)

El daño hepático inducido por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés) es una de las principales causas de fracaso en el desarrollo de nuevos fármacos y de retiros del mercado de medicamentos previamente aprobados. Considerar el potencial hepatotóxico de una molécula en las etapas tempranas del diseño de fármacos es esencial para garantizar la seguridad de las moléculas en futuros ensayos.[82, 83]

Tabla 11. Daño hepático de los compuestos 5-nitroimidazoles.

Compuesto	ADMET-AI[86]	ADMETLAB 3.0[90]	SCORE
CON-1	++	++	
CON-2	++	++	
CON-3	++	++	
CON-4	++	++	
CON-5	++	++	
CON-6	++	++	
CON-7	++	++	
MTZ	++	++	

Probabilidad de daño hepático: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)
Metronidazol (**MTZ**)

Como se puede observar en la **Tabla 11**, todas las moléculas de esta serie presentaron una calificación desfavorable, este efecto está asociado al grupo nitro en posición 5 de las moléculas, ya que los grupos nitro en los fármacos han sido asociados con toxicidad hepática, principalmente debido a su metabolismo a especies reactivas que pueden inducir estrés oxidativo y daño celular. Estas especies reactivas derivadas del metabolismo del grupo nitro pueden interactuar con macromoléculas celulares, causado peroxidación lipídica y daño al ADN. Sin embargo, MTZ presentó una calificación desfavorable y es fármaco que actualmente se ocupa en la terapéutica.[87]

De manera similar, la serie de compuestos tipo carbamato de bencimidazol obtuvieron una calificación poco satisfactoria, al igual que el fármaco de referencia, el **ABZ**. Cabe destacar que los efectos adversos de la terapia con **ABZ** a dosis bajas son mínimos; sin embargo, se han reportado casos raros en los que puede causar hepatotoxicidad, especialmente durante tratamientos prolongados o en pacientes con enfermedades hepáticas preexistentes.[88] Estos efectos podrían estar asociados a un mecanismo idiosincrático, donde el daño hepático no guarda una relación directa con la dosis administrada.

Tabla 12. Daño hepático de los compuestos carbamatos de bencimidazol.

Compuesto	ADMET-AI[90]	ADMETLAB 3.0[94]	SCORE
CON-8	++	++	
CON-9	++	++	
CON-10	++	++	
CON-11	++	++	
CON-12	++	++	
CON-13	++	++	
CON-14	++	++	
CON-15	++	++	
CON-16	++	++	
CON-17	++	++	
CON-18	++	++	
CON-19	++	++	
CON-19	++	++	
CON-20	++	++	
CON-21	++	++	
CON-22	++	++	
ABZ	++	++	

Probabilidad de daño hepático: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)
Albendazol (**ABZ**)

8.1.3.4 Probabilidad de mutagenicidad y carcinogenicidad

La toxicidad al material genético es un parámetro crucial en el descubrimiento de moléculas bioactivas. Esta toxicidad puede derivar en carcinogenicidad mediante la acción de moléculas que actúan como mutágenos, provocando cambios en la secuencia de ADN mediante sustituciones, inserciones o eliminaciones de pares de bases. Por lo tanto, evaluar la toxicidad al material genético permite estimar la probabilidad de riesgo de carcinogenicidad de una molécula desde las primeras etapas del descubrimiento.

Tabla 15. Probabilidad de mutagenicidad y carcinogenicidad de los compuestos **CON-1** a **CON-7** y **MTZ**

Compuesto	admetSAR 2.0		PreADME		OSIRIS		Score
	Mut	Car	Mut	Car	Mut	Car	
CON-1	++	-	++	+	++	-	
CON-2	++	-	++	++	++	-	
CON-3	++	-	++	++	++	-	
CON-4	++	-	++	++	++	-	
CON-5	++	-	++	++	++	-	
CON-6	++	-	++	++	++	-	
CON-7	++	-	++	++	++	-	
MTZ	++	-	++	++	++	-	

Probabilidad: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)
Mutagenicidad (Mut); Carcinogenicidad (Car); Metronidazol (**MTZ**)

En la **Tabla 15**, se presentan las probabilidades de que los compuestos de la serie de nitrobencimidazoles actúen como mutagénicos y carcinogénicos. El análisis de consenso muestra que todos los compuestos, al igual que el **MTZ**, presentan una alta probabilidad de actuar como mutágenos y carcinógenos. Este efecto parece estar relacionado con el grupo nitro (-NO_2) en posición 5 de las moléculas.[87]

Se ha descrito que ciertos fármacos con estructuras nitroaromáticas están asociados con toxicidad en órganos, incluido el hígado, debido al potencial de bioactivación nitrorreductora. Este proceso implica la transferencia de seis electrones y genera intermediarios reactivos como nitroso y derivados de *N*-hidroxilamina, los cuales son potencialmente peligrosos. Estos intermediarios pueden causar estrés oxidativo y reaccionar con residuos nucleofílicos de proteínas y ácidos nucleicos.[87] Sin embargo, estos datos no son concluyentes y es necesario realizar pruebas de citotoxicidad en células hepáticas para confirmar los resultados *in silico*.

Por otro lado, los resultados de las moléculas de la serie de carbamatos de bencimidazol, presentados en la **Tabla 16**, muestran que, en general, los compuestos propuestos tienen un perfil muy satisfactorio. El análisis de consenso indica que estos compuestos no presentan una probabilidad significativa de actuar como agentes con actividad mutagénica o carcinogénica.

Tabla 16. Mutagenicidad y carcinogenicidad de los compuestos **CON 8-22**

Compuesto	admetSAR 2.0		PreADME		OSIRIS		Score
	Mut	Car	Mut	Car	Mut	Car	
CON-8	-	-	+	-	-	-	
CON-9	-	-	+	-	-	-	
CON-10	-	-	+	-	-	-	
CON-11	-	-	+	-	-	-	
CON-12	-	-	-	-	+	-	
CON-13	-	-	-	-	-	-	
CON-14	-	-	-	-	-	-	
CON-15	-	-	-	-	-	-	
CON-16	-	-	-	-	-	-	
CON-17	-	-	-	-	-	-	
CON-18	-	-	-	-	-	-	
CON-19	-	-	-	-	-	-	
CON-20	-	-	-	-	-	-	
CON-21	-	-	-	-	-	-	
CON-22	-	-	-	-	-	-	
ABZ	-	-	+	-	-	-	

Probabilidad: - (1-33 %); + (34-66 %); ++ (67-100 %)
Mutagenicidad (Mut); Carcinogenicidad (Car)

8.1.4 Predicciones del perfil farmacodinámico

El perfil farmacodinámico de la serie de compuestos finales **CON 1-22** se evaluó utilizando la herramienta PASS Online (Prediction of Activity Spectra for Substances),[96] que permite predecir la probabilidad de actividad biológica basada en estructuras químicas. Este análisis se complementó con estudios de acoplamiento molecular, enfocados en evaluar la interacción de los compuestos con dianas biológicas relevantes.

Tabla 17. Perfil farmacodinámico para los compuestos 5-nitrobencimidazoles.

	PASS Online		Acoplamiento molecular
Compuesto	Antiparasitario (%)	Antiprotozoario (%)	β-tubulina de *G. lamblia* (kcal/mol)
CON-1	45.4	40.6	-7.39
CON-2	68.7	27.1	-7.70
CON-3	36.2	27.0	-8.18
CON-4	50.4	24.7	-6.95
CON-5	54.1	24.7	-7.82
CON-6	66.3	31.5	-7.44
CON-7	46.1	25.6	-6.96
MTZ	51.6	96.8	-7.66

Los compuestos fueron analizados específicamente para actividades relacionadas con la acción antiparasitaria y antiprotozoaria, así como la inhibición de microtúbulos. Estas actividades son cruciales para el desarrollo de agentes terapéuticos contra infecciones parasitarias, como las provocadas por *Giardia lamblia*.

Tabla 18. Perfil farmacodinámico para los compuestos carbamatos de bencimidazol.

	PASS Online			Acoplamiento molecular
	Antihelmínticos (%)	Antiparasitario (%)	Inhibidor de microtúbulos (%)	β-tubulina de *G. lamblia* (kcal/mol)
CON-8	76.5	72.1	30.9	-7.39
CON-9	74.6	70.2	28.6	-7.70
CON-10	62.3	56.5	28.4	-8.18
CON-11	73.3	56.2	25.0	-6.95
CON-12	66.6	52.5	23.0	-7.82
CON-13	60.5	43.8	22.9	-7.44
CON-14	69.8	57.3	22.5	-6.96
CON-15	61.5	55.5	20.9	-7.66
CON-16	55.3	42.5	20.8	-7.78
CON-17	74.7	69.6	35.6	-6.63
CON-18	72.0	67.8	33.1	-7.01
CON-19	64.4	55.7	33.4	-7.25
CON-20	68.2	50.1	30.1	-8.09
CON-21	59.4	47.9	27.8	-8.09
CON-22	54.7	35.8	28.1	-8.02
ABZ	84.7	81.8	36.2	-7.02

Las **Tablas 16** y **18** presentan los valores obtenidos, destacando las probabilidades de actividad según PASS Online y los resultados de afinidad energética (scores) del acoplamiento molecular.

- **Predicciones por PASS Online:** PASS Online realiza las estimaciones de actividad mediante el análisis de relaciones estructura–actividad (SAR)**,** basándose en un conjunto de datos de entrenamiento que contiene información sobre la estructura química y la actividad biológica de más de 300,000 compuestos**.** Sin embargo, es importante considerar las limitaciones de estas estimaciones, ya que una alta probabilidad de actividad no garantiza que una molécula sea activa en experimentos reales. Además, las predicciones pueden variar dependiendo del grado de similitud estructural con los compuestos presentes en el conjunto de entrenamiento. Los compuestos diseñados mostraron una probabilidad discreta de actividad antiparasitaria según las predicciones de PASS Online. Aunque las probabilidades no fueron excepcionalmente altas, sugieren que los compuestos tienen potencial de actividad biológica.
- **Resultados de Acoplamiento Molecular:** A pesar de las probabilidades discretas en PASS Online, los compuestos presentaron buenas afinidades de unión en los estudios de acoplamiento molecular, comparables o superiores a los fármacos de referencia MTZ y ABZ. Estos resultados respaldan la capacidad de los compuestos para interactuar eficazmente con dianas críticas, como la β-tubulina de *G. lamblia*, lo que es esencial para inhibir la formación de microtúbulos en parásitos.

A partir de los análisis realizados, se puede establecer que los compuestos **CON 1-22** tienen potencial farmacológico antiparasitario. Aunque la probabilidad de actividad predicha por PASS Online fue discreta, los datos de acoplamiento molecular sugieren una alta afinidad a la β-tubulina de *Giardia lamblia*, lo que refuerza su viabilidad como candidatos para estudios experimentales posteriores.

8.1.5 Análisis de consenso farmacológico

Tabla 19. Análisis de consenso farmacológico para la serie de compuestos 5-Nitrobencimidazoles.

Serie A, Nitrobencimidazoles								
Compuesto	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**MTZ**
Perfil Biofarmacéutico								
Solubilidad								
Lipinski								
Log D (pH 7.4)								
TPSA								
Permeabilidad								
Perfil Farmacodinamico								
Docking Score								
PASS Online								
Perfil Farmacocinetico								
Biodisponibilidad								
Absorción GI								
BHE								
Sustrato P-gp								
Union a proteinas								
Inhibidor CYP450 3A4								
Sustrato CYP450 3A4								
Excrecion (t ½)								
Perfil Toxicológico								
Bloqueador hERG								
Alertas PAIN								
DILI								
Mutagenicidad								
Carcinogenicidad								
Consenso								
Scoring	XII	X	XII	XI	XII	XII	X	XIII
Consenso								

El análisis de consenso farmacológico tiene como objetivo integrar los resultados obtenidos de diferentes herramientas quimio-informáticas, permitiendo una evaluación global y sistemática de los compuestos diseñados. Este enfoque es esencial para identificar los compuestos con las propiedades más prometedoras en términos de su perfil biofarmacéutico, farmacocinético, o toxicológico y farmacodinámico, jerarquizando aquellos con las mejores características en estos perfiles, para priorizarlos para su síntesis y evaluación biológica.

En la **Tabla 19** se presenta el análisis de consenso farmacológico para la serie de compuestos 5-Nitrobencimidazoles, los compuestos fueron evaluados y clasificados de acuerdo con sus puntuaciones en los diferentes parámetros estudiados. En donde se observa que todos estos compuestos al igual que el fármaco presentaron un scoring similar, por lo que todos fueron candidatos para su síntesis y sus estudios biológicos.

Para la serie de compuestos carbamatos de bencimidazol **Tabla 20**, se establece un corte en un scoring de VIII, por lo que los compuestos que presenten una calificación ≥ a VIII fueron los compuestos que se priorizaron para su síntesis y su evaluación biológica.

Este análisis permitió enfocar los recursos experimentales en los compuestos de ambas series, para tener una mayor probabilidad de éxito, optimizando tiempo y costos en la etapa de descubrimiento de moléculas bioactivas.

Tabla 20. Análisis de consenso farmacológico de los compuestos de tipo carbamato de bencimidazol.

Serie B, Carbamatos de bencimidazol																
Compuesto	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	16	17	18	19	20	21	22	ABZ
Perfil Biofarmacéutico																
Solubilidad																
Lipinski																
Log D (pH 7.4)																
TPSA																
Permeabilidad																
Perfil Farmacodinamico																
Docking Score																
PASS Online																
Perfil Farmacocinetico																
Biodisponibilidad																
Absorción GI																
BHE																
Sustrato P-gp																
Union a proteinas																
Inhibidor CYP450 3A4																
Sustrato CYP450 3A4																
Excrecion (t ½)																
Perfil Toxicológico																
Bloqueador hERG																
Alertas PAIN																
DILI																
Mutagenicidad																
Carcinogenicidad																
Consenso																
Scoring	XVI	XV	XIV	XII	XVI	XII	XIII	XIII	X	XIII	XVI	XIII	VII	VII	VII	XIV
Consenso																

8.2 Parte química

Se priorizaron los compuestos con las mejores características, según el análisis de consenso farmacológico. A continuación, se detalla la síntesis de cada uno de ellos.

8.2.1 Síntesis de los compuestos de tipo 5-nitrobencimidazoles

8.2.1.1 Síntesis del 5-nitro-1*H*-bencimidazol-2-tiol (CON 1)

En un matraz de bola de 100 mL, equipado con agitación magnética, un baño de aceite y un refrigerante en posición de reflujo, se mezcló KOH en etanol como disolvente. Posteriormente, se añadió CS_2 y se agitó hasta obtener una solución homogénea. Una vez disuelta la base, se agregó 4-nitro-*o*-fenilendiamina (**23**), manteniendo la mezcla bajo condiciones de reflujo durante 12 horas (**Figura 19**).

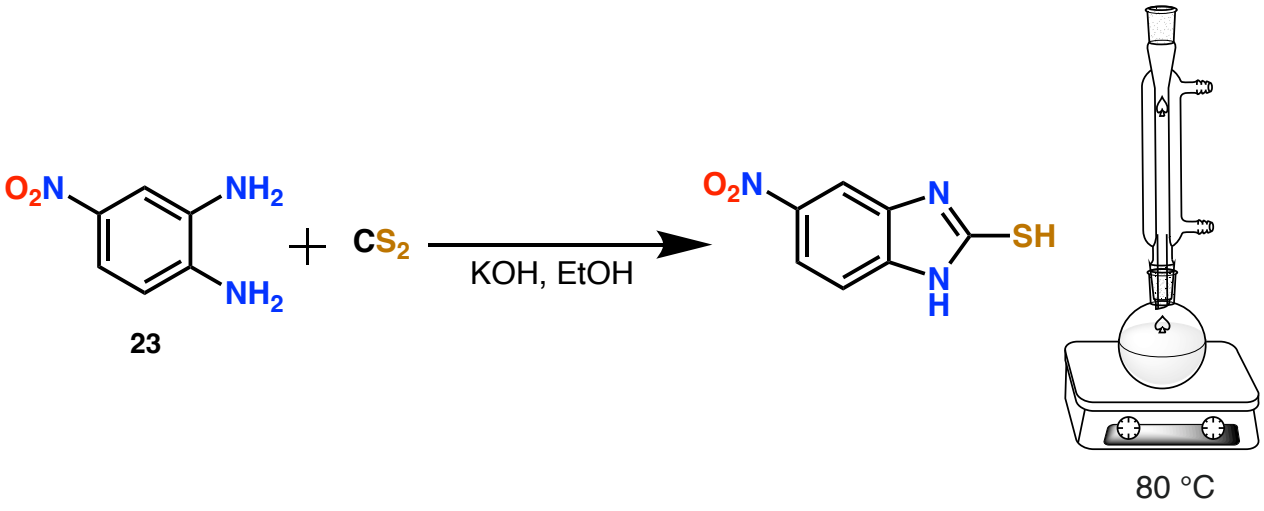


Figura 19. Síntesis del compuesto final **CON-1**

Al finalizar la reacción, la mezcla se neutralizó con una solución de HCl al 10 % hasta un pH de 8, lo que provocó la precipitación de un sólido amarillo. El producto se aisló mediante filtración al vacío y se secó. Se obtuvo un rendimiento del 93 % con un punto de fusión de 264.5-266.1 °C.

En la **Figura 20** se observa el espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-1**, en donde se puede observar la señal que corresponde al protón del grupo tiol (-SH) en 2.47 ppm, en 7.26 ppm se observa un doblete que corresponde al protón del C-7, con una constante de acoplamiento J_o=8.8 Hz. En 7.84 ppm se observa la señal que corresponde al protón del C-4, con una constante J_m=2.2 Hz y en 8.03 se observa un *dd* que corresponde para el protón del C-6, una con constante J_o=8.8 Hz y J_m=2.2 Hz.

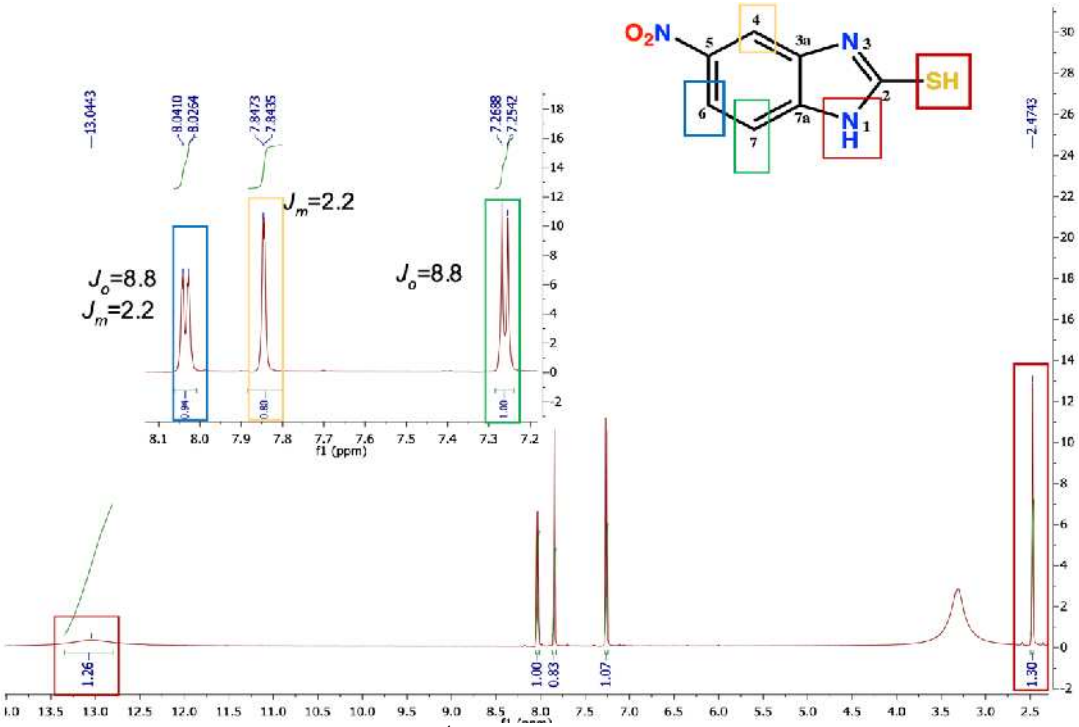


Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-1**.

En la **Figura 21**, se muestra el espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) de **CON-1**, en donde se identificaron todas las señales esperadas para la molécula. En 105.1 ppm se observa la señal que corresponde para el C-7, en 109.7 ppm se observa la señal del C-4, en 119.4 ppm se observa la señal que corresponde el C-6, en 132.8 ppm se observa la señal del C-7a, en 138 ppm se observa la señal del

C-3a, en 143 ppm se observa la señal del C-5. Por último, en 172.29 ppm se observa la señal del C-2.

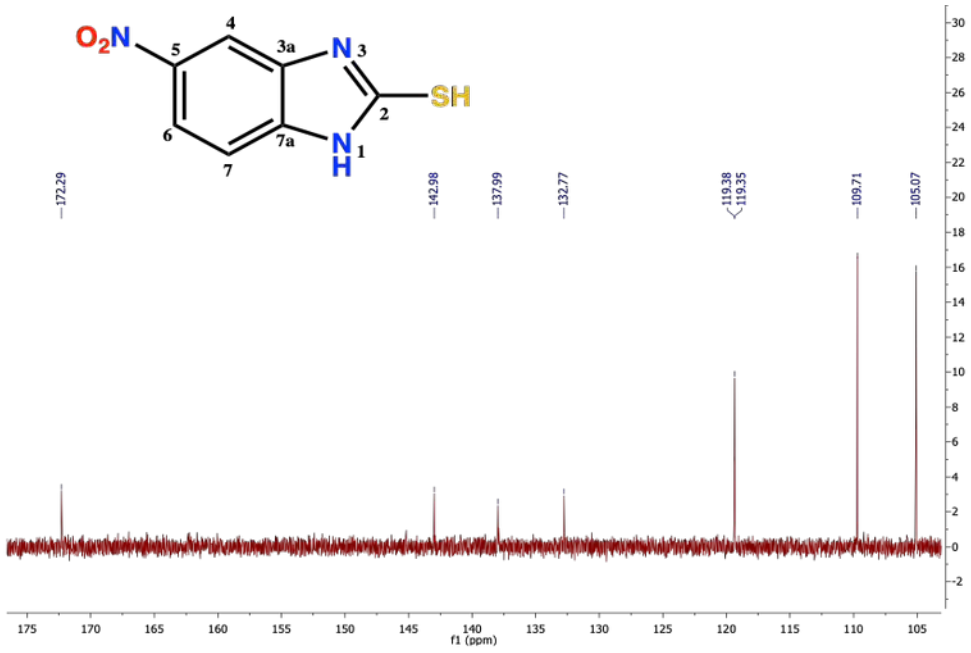


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-1**.

En la **Figura 22**, se muestra el espectro de EM-EI del mismo compuesto, en donde se puede observar la señal que corresponde al ion molecular en 195 m/z.

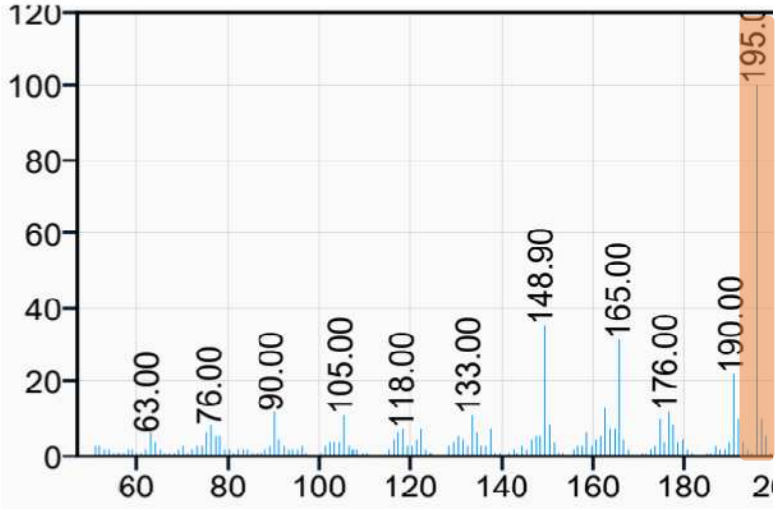


Figura 22. Espectro de EM-EI del compuesto **CON-1**.

8.2.1.2 Síntesis de los compuestos finales CON-2, 4-7 de tipo 4-Nitro-2-tioalquilbencimidazol (2, 4-7)

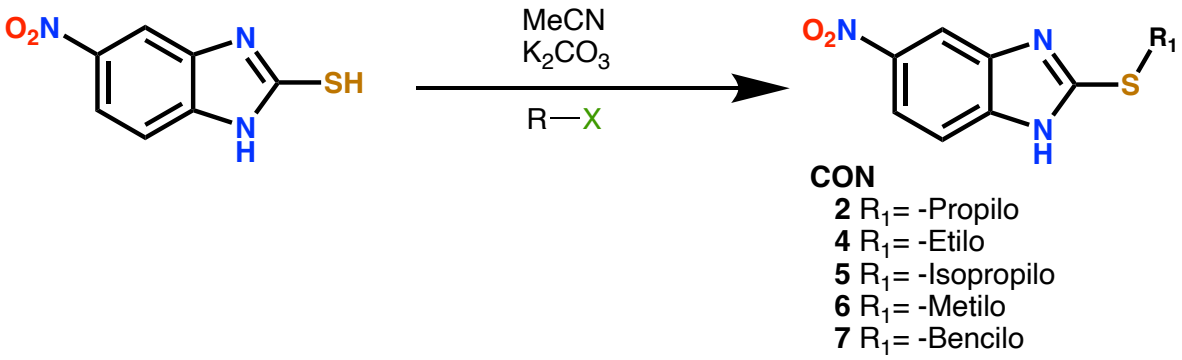


Figura 23. Síntesis de los compuestos **CON-2**, **4-7**.

En un matraz bola de 100 mL acondicionado con agitación magnética y baño de hielo, se disolvió al compuesto **CON-1** en acetonitrilo como disolvente, se adicionó K_2CO_3 disuelto en agua. Posteriormente, se adiciona por goteo el respectivo halogenuro de alquilo. Esta mezcla se mantuvo en condiciones de baño de hielo por un periodo de 7-12 horas. A manera de ejemplo, en las **Figuras 24-26** se presentan los análisis espectroscópicos y espectrométricos del compuesto **CON-2**.

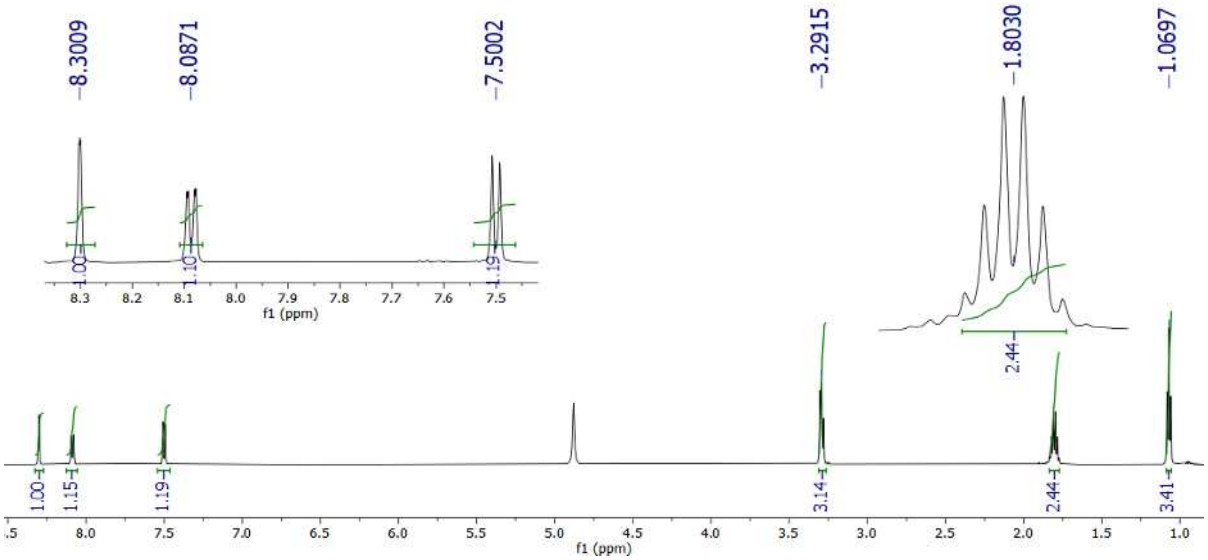


Figura 24. Espectro de ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) del compuersto **CON-2**.

En la **Figura 24**, se observa el espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-2**, en donde se puede observar un triplete que corresponde a los protones del C-3´ en 1.07 ppm, en 1.80 ppm se observa un sextuplete que corresponde a los protones del C-2´. En 3.29 ppm se observa un triplete que corresponde a los protones del C-1´, en 7.50 se observa un doblete que corresponde a la señal de protón del C-7, con una constante J_o=8.9 Hz. En 8.09 ppm se observa un *dd* que corresponde al protón del C-6, con una constante de acoplamiento J_o=8.9 Hz y una J_m=2.2 Hz. Por último, en 8.30 ppm se observa la señal que corresponde al protón del C-4 con una constante J_m=2.2 Hz.

En la **Figura 25**, se observa el espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) para el mismo compuesto en donde se observan todas las señales esperadas para la molécula. En 12 ppm se observa la señal que corresponde para el C-3´, en 22.72 ppm al C-2´, en 33.20 ppm se observa la señal que corresponde al C-1´, en 109.78 ppm se observa la señal del C-7a, en 112.64 ppm se observa la señal del C-3a, en 117.48 ppm se observa la señal de los C-4, C-6 y C-7. Por último, en 143 ppm se observa la señal del C-5 y en 157 ppm se observa la señal del C-2.

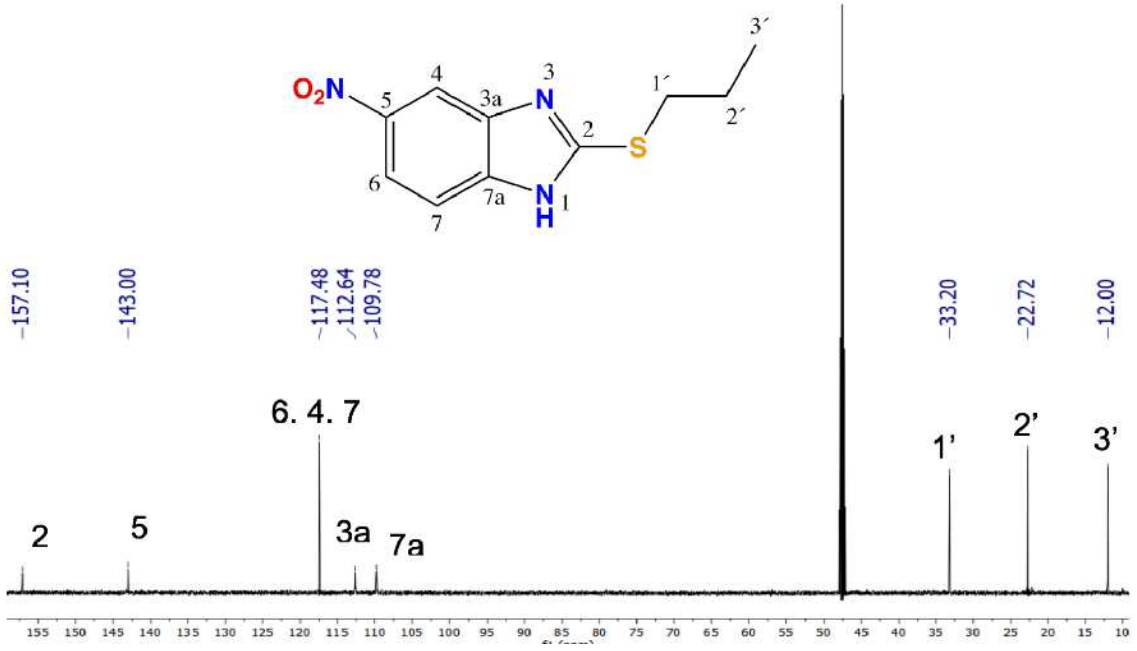


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-2**.

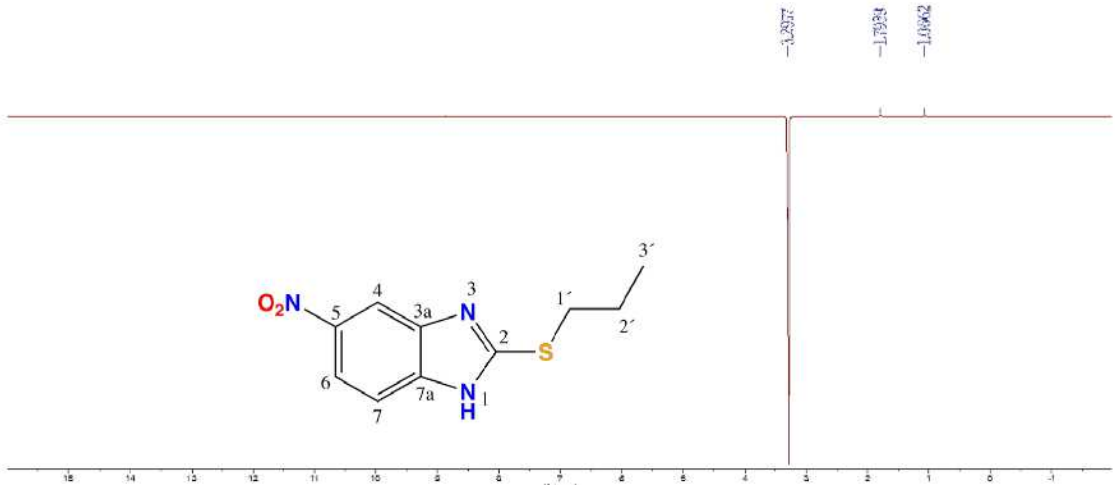


Figura 26. Espectro de NOE diferencial del compuesto **CON-2**.

Para el caso del compuesto **CON-2**, se realizó un experimento NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY) para poder determinar el acoplamiento dipolar, que es el acoplamiento entre dos núcleos activos a través del espacio y esto con el objetivo de asegurar la *S*-alquilación del compuesto **CON-2**. En la **Figura 26**, se muestra el espectro de NOE diferencial para el precursor **CON-2**.

Como se puede observar en la **Figura 26**, no existe correlación con los protones de C-1´ y el protón del C-7, que en el caso contrario de tener la *N*-alquilación se observaría la correlación del protón del C-7 y los protones del C-1´ como se muestra en la **Figura 27**.

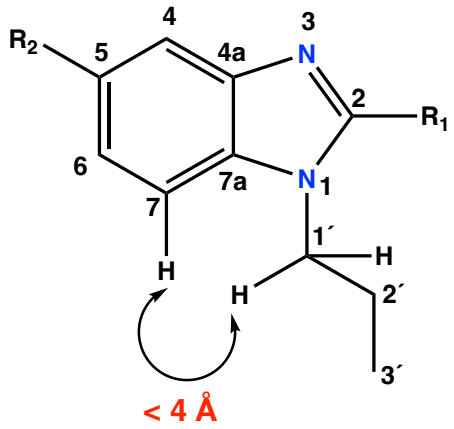


Figura 27. Correlación de protones C-1´ y el protón de C-7

En la **Figura 28**, se observa el espectro de EM-EI del compuesto **CON-2**, en donde se puede observar la señal que corresponde al ion molecular en 237 m/z.

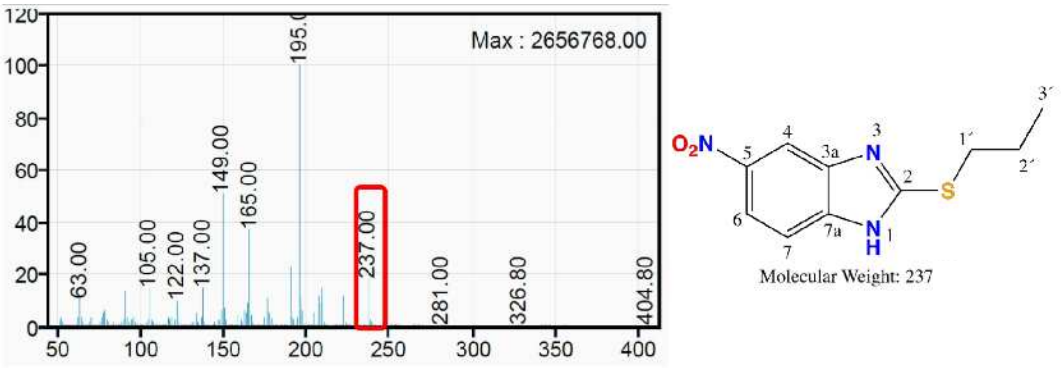


Figura 28. Espectro de EM-EI del compuesto **CON-2**.

8.2.1.3 Síntesis del compuesto CON-3

En un matraz bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética y baño de hielo, se disolvió al compuesto **CON-1** en acetonitrilo como disolvente, se adiciona 3 equivalentes (equiv) de KOH disuelto en agua. Posteriormente, se adiciona por goteo el respectivo halogenuro de alquilo. Esta mezcla se mantuvo con condiciones de baño de hielo por un periodo de 10 horas. En las **Figuras 29-30** se presentan los análisis espectroscópicos y espectrométricos del compuesto **CON-3**.

En la **Figura 29**, se observa el espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) para el compuesto **CON-3**, en donde se pueden observar las señales en 0.85 y 0.97 ppm que corresponden a los protones del C-3´ y C-6´, en 1.72 ppm se observa una señal que corresponde a los protones del C-2´ y 5´. En 2.47 ppm se observa una señal que corresponde a los protones del C-4´ y una señal en 4.18 ppm que corresponde a los protones del C-1´. En la región aromática se observan las señales que corresponden a los protones del anillo de bencimidazol.

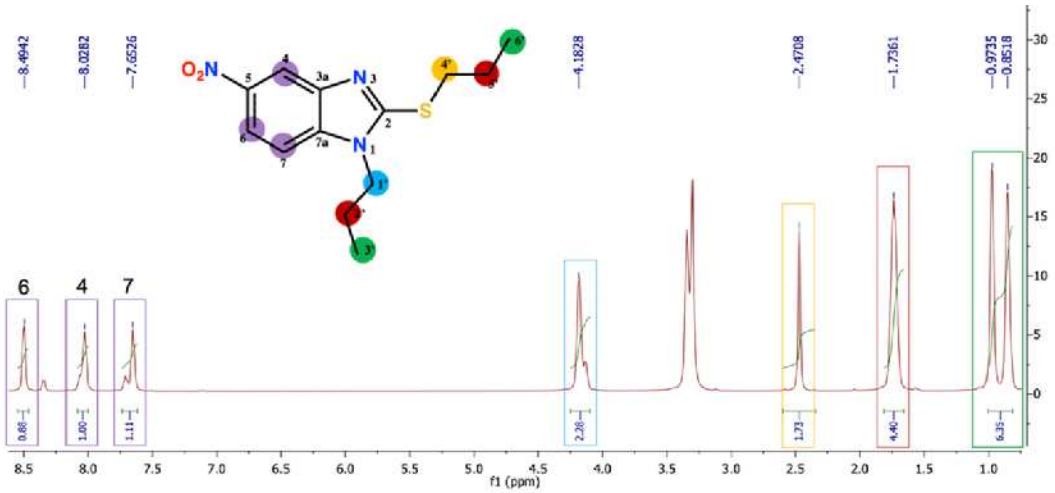


Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-3**.

En la **Figura 30**, se observa el espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) para el compuesto **CON-3** en donde se observan las 13 señales esperadas para la molécula. En 11.3 ppm se observa la señal que corresponde para el C-3´, en, 13.5 ppm se observa la señal del C-6´, en 22.6 ppm al C-5´, en 22.9 ppm se observa la señal del C-2´, en 34.0 ppm se observa el C-4´ y en 45.7 ppm se observa la señal del C-7 en 117.8 y 118.0 ppm se observan las señales de los carbonos C-4 y C-6 respectivamente, en 136.08 ppm se observa la señal que corresponde al C-7a, en 142.4 ppm se observa la señal del C-3a, en 147.93 ppm se observa la señal del C-5 y en 158.8 ppm se observa la señal del C-2.

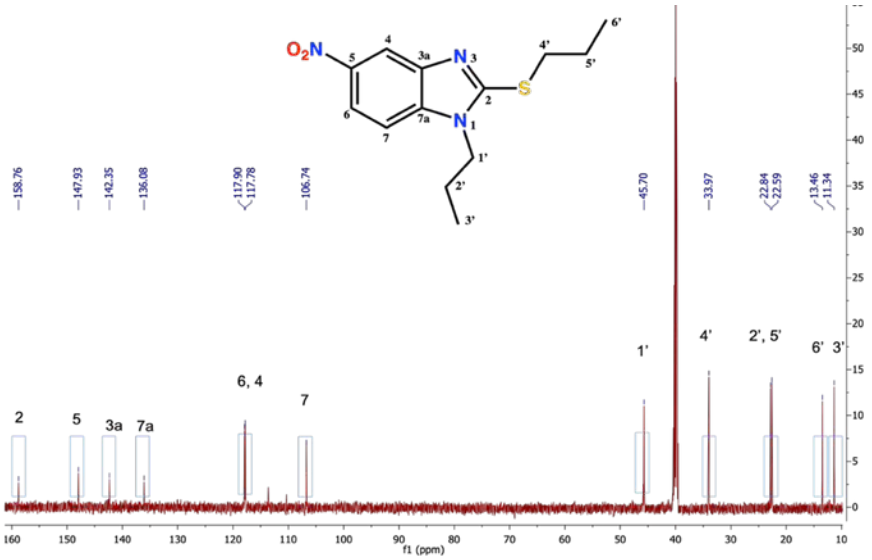


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) para el compuesto **CON-3**.

8.2.1.4 Síntesis de los compuestos precursores CON 2, 4-7red

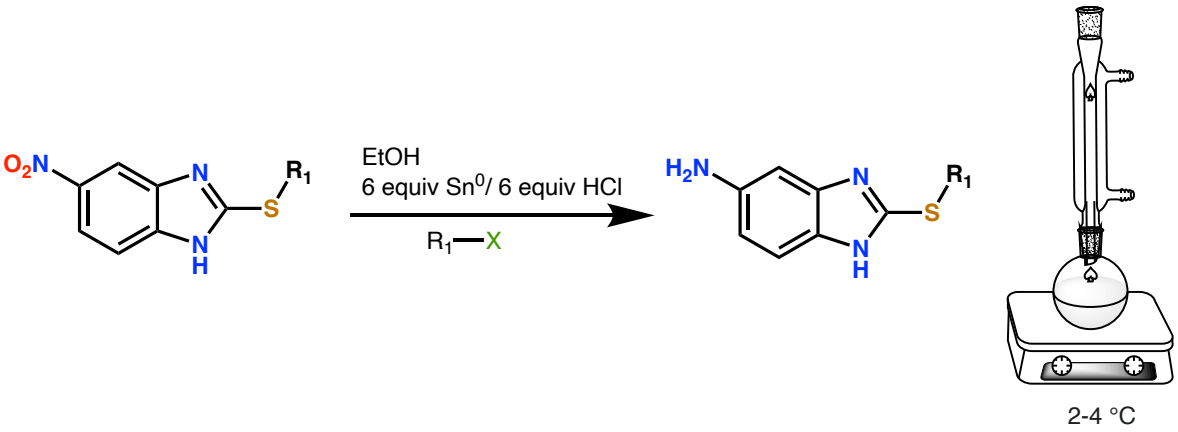


Figura 31. Síntesis del compuesto **CON-2red** con Sn^0HCl.

En un matraz bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, se disolvieron los compuestos **CON 2, 4-7**, en etanol como disolvente, posteriormente se adicionó 6 equiv Sn^0 y HCl lentamente. Esta mezcla se hizo reaccionar en un intervalo de 10-12 horas.

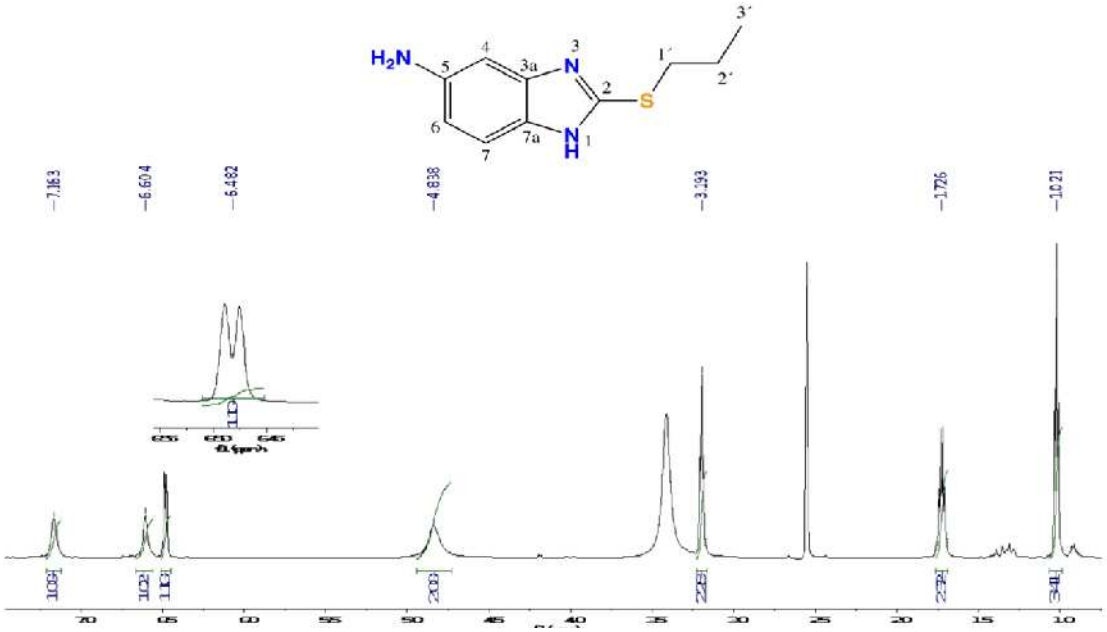


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-2red**.

En la **Figura 32**, y a manera de ejemplo se observa el espectro de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) para el compuesto precursor **CON-2red**. En donde se pueden observar los protones de la región alifática en 1.02, 1.73 y 3.19 ppm que corresponden para los protones localizados en C-3´, C-2´y C-1´ respectivamente. En 4.84 ppm se puede observar la señal que corresponde a los protones de la amina de posición 5 del anillo de bencimidazol. En la región aromática se puede observar un doblete que corresponde al protón del C-7 con una constante J_o=8.4 Hz, en 6.60 ppm la señal que corresponde al protón para el C-6 y en 7.16 ppm se observa la señal que corresponde al protón del C-4.

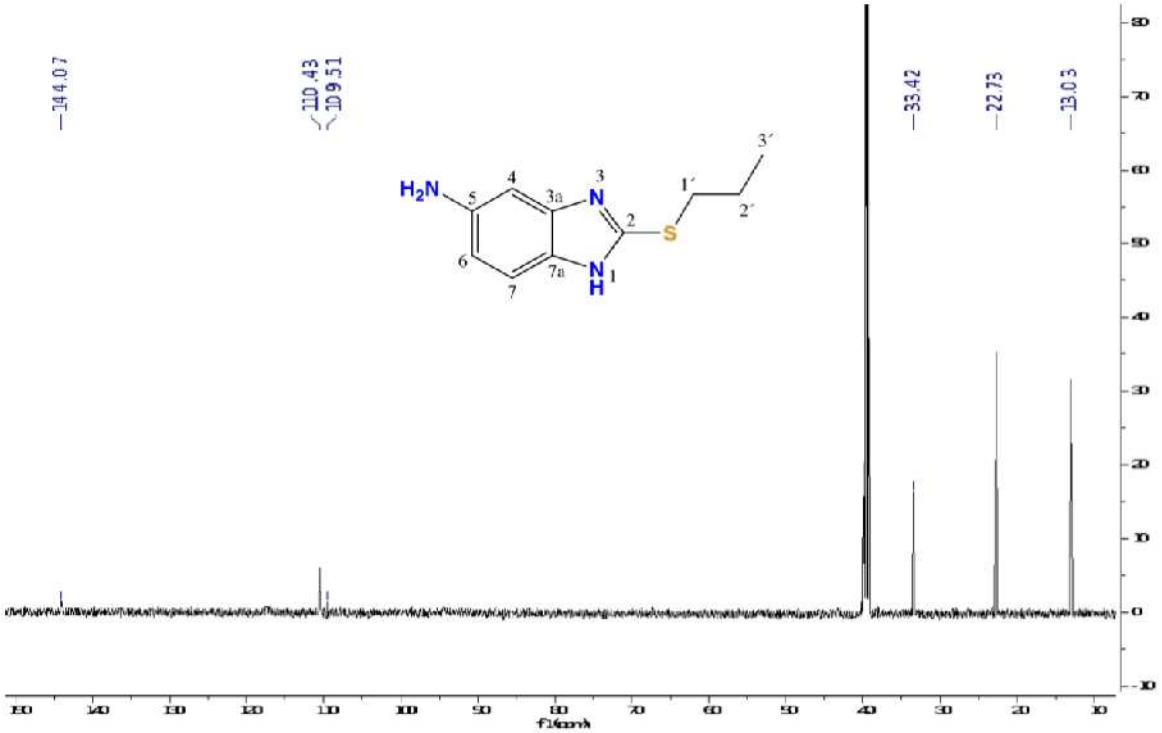


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-2red.**

En la **Figura 33**, se observa el espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **CON-2red**. En donde se pueden observar a los carbonos de la región alifática en 13.03, 22.73 y 33.42 ppm que corresponden para los C-3´, C-2´y C-1´ respectivamente. En la región aromática no se lograron identificar las 7 señales esperadas para el anillo de bencimidazol. Sin embargo, se puede corroborar la

estructura del compuesto CON-2red con el espectro de ^{1}H y la espectrometría de masas discutida más adelante.

En la **Figura 34**, se observa el espectro de EM-EI del compuesto precursor **CON-2red**, en donde se puede observar la señal que corresponde al ion molecular en 207.10 m/z. Así como también se identificó al fragmento $[M-43]^{+}$que corresponde la fragmentación del grupo propilo y el enlace con el 2-mercaptobencimidazol. El fragmento $[M-16]^{+}$ corresponde a la fragmentación del grupo amino y el enlace con el anillo de bencimidazol.

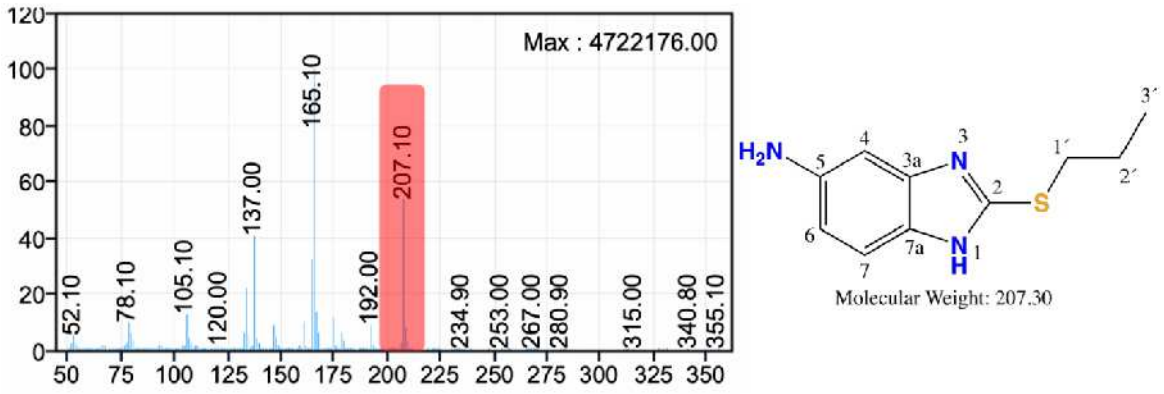


Figura 34. Espectro de EM-EI del compuesto final **CON-1**.

8.2.1.5 Síntesis de los compuestos finales de tipo carbamato de bencimidazol

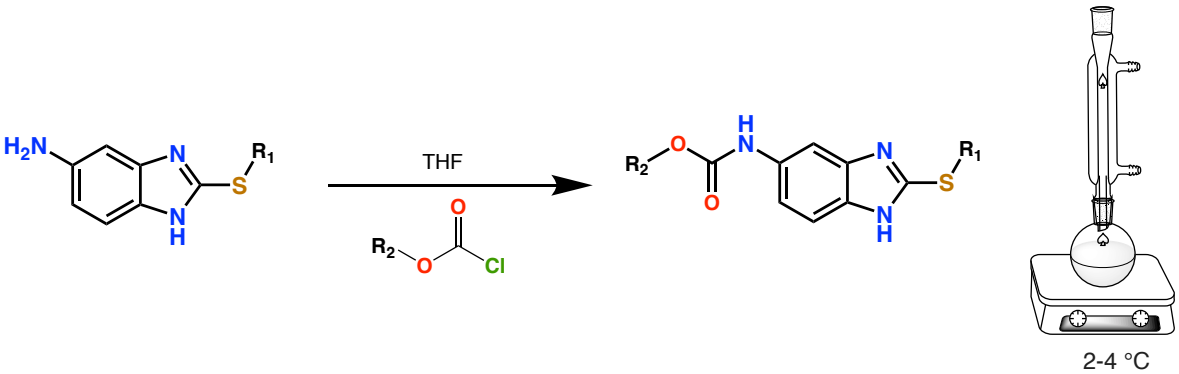


Figura 35.- Síntesis general de los compuestos finales de la serie de carbamatos de bencimidazol.

En un matraz bola de 25 mL acondicionado con agitación magnética y baño de hielo, se disolvió a los respectivos precursores **CON 2-7red** en THF como disolvente, posteriormente se adicionó el respectivo cloroformiato de alquilo, esta mezcla se mantuvo a 3-4 °C.

En las **Figuras 36-38**, se presenta el análisis espectroscópico y espectrométrico para el compuesto final **CON-8.** En la **Figura 36** se muestra el espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) para el compuesto final **CON-8** (**RetroABZ**)**.** En la región alifática en 1.10 ppm se pueden observar un triplete que corresponde a los protones del carbono C-3´. En 1.83 ppm se puede observar un sextuplete que corresponde a los protones del C-2´, en 3.59 ppm se observa un triplete que corresponde a los protones del C-1´ y finalmente en 3.75 ppm se observa la señal que corresponde a los protones del C-5´. En la región aromática se observan en *dd* en 7.48 ppm con esta constante de J_o= 8.9 y J_m=2.1 que corresponde al protón del C-6, en 7.61 ppm se observa un doblete con una J_o= 8.9 que corresponde al protón del C-7, en 8.06 ppm se observa un singulete que corresponde al protón del C-4, y en 9.98 ppm se observa una señal que corresponde al protón del grupo carbamato.

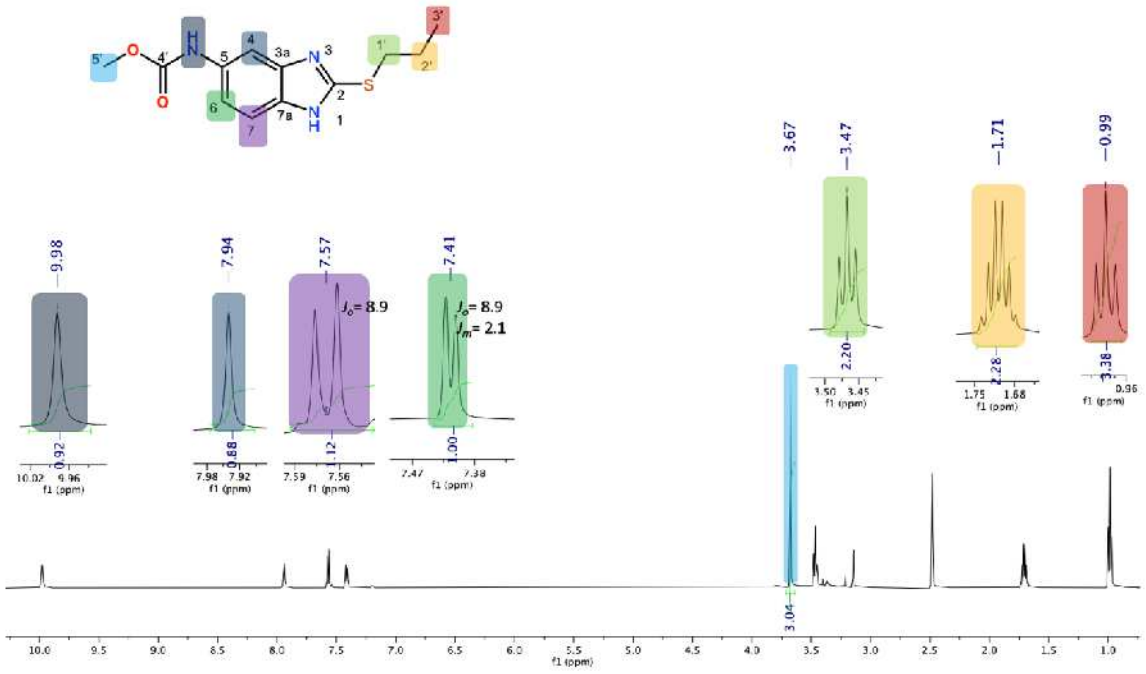


Figura 36. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) del compuesto final **CON-8**.

En la **Figura 37**, se observa el espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) para el compuesto final **RetroABZ**, en donde en la región alifática se observa la señal que corresponde al C-3´ en 12.3 ppm, en 22. 2 ppm se observa la señal que corresponde al metileno C-2´, en 34.4 ppm se observa la señal que corresponde al metileno C-1´ y en 51.4 ppm se observa la señal que corresponde al C-5´. En la región aromática se observan las señales del C-4, C-7, C-6, (C-7a, C-5, C-3a), C-2 en 112.7, 127.16, 132.0, 136.9 y 148.9 ppm respectivamente. Por último, se observa una señal en 153.8 ppm que corresponde al carbono del carbonilo

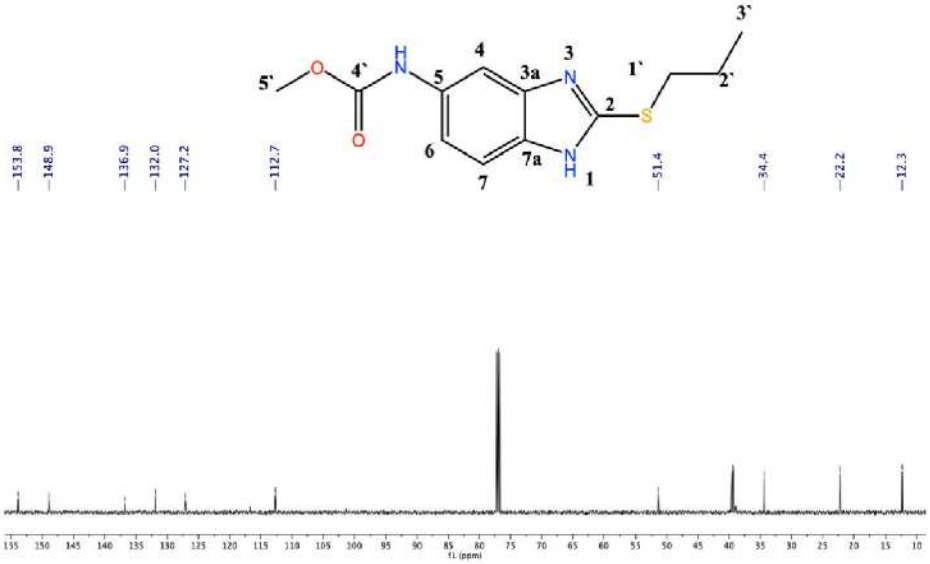


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) del compuesto final **RetroABZ**.

En la **Figura 38**, se observa el espectro de EM-EI del compuesto final **CON-8**, en donde se puede observar la señal que corresponde al ion molecular en 265 m/z.

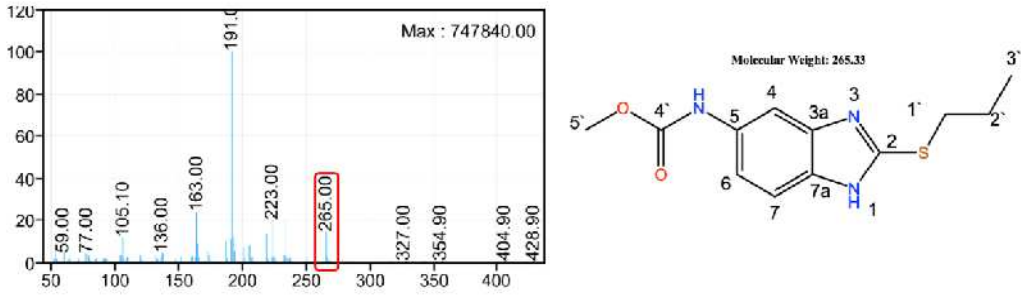
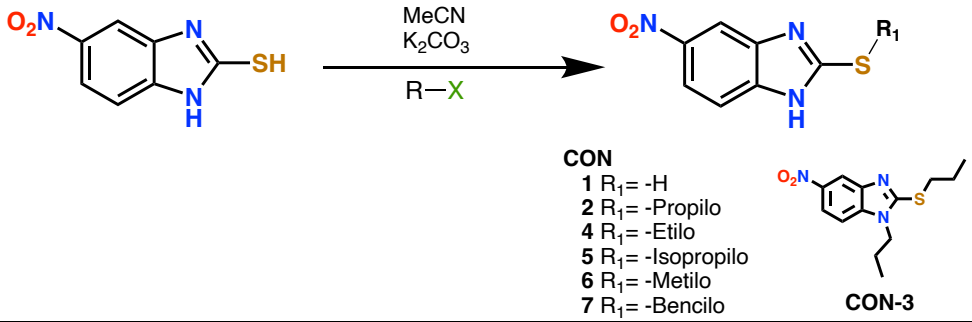
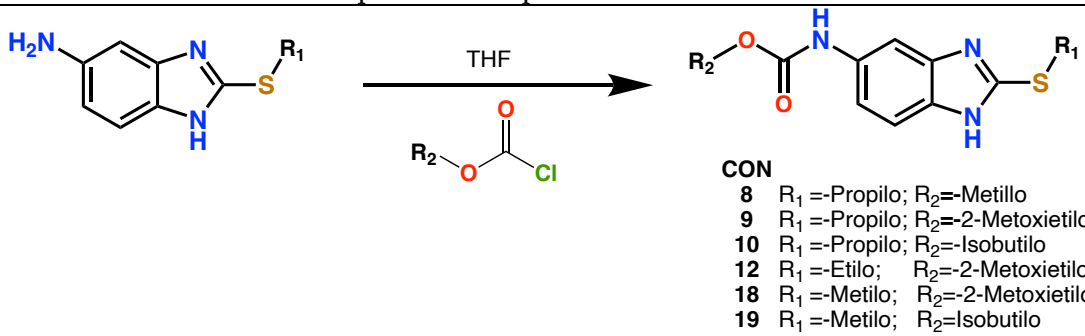


Figura 38. Espectro de EM-EI del compuesto final **RetroABZ**.

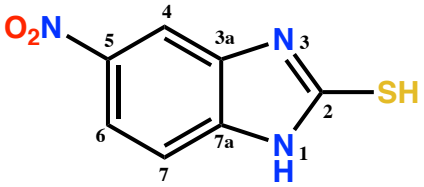
En la **Tabla 21**, se muestran las propiedades fisicoquímicas, así como condiciones de reacción, para los compuestos sintetizados.

Tabla 21. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados.

Cp	PM (g/mol)	T rxn (h)	Condiciones	% Rxn	Estado físico	Pf (°C)
Serie A de compuestos de tipo Nitrobencimidazoles						
						
CON-1	195	12	Reflujo	93	Polvo amarillo	264.5-266.1
CON-2	237	8	3-4	90	Polvo amarillo	91.9-93.7
CON-3	279	6	Reflujo	78	Polvo amarillo	>280
CON-4	223	8	3-4	88	Polvo amarillo	191.1-193.3
CON-5	227	10	3-4	89	Polvo amarillo	187.4-189.1
CON-6	209	8	3-4	83	Polvo amarillo	179.9-182.6
CON-7	285	8	3-4	88	Polvo amarillo	273.9-275.1
Serie B de compuestos de tipo Carbamato de Bencimidazol.						
						
CON-8	265	8	3-4	72	Polvo marrón	179.5-183.5
CON-9	309	9	3-4	68	Polvo marrón	144.4-147.4
CON-10	307	8	3-4	70	Polvo café	140.8-143.1
CON-12	251	7	3-4	70	Polvo amarillo	187.4-189.1
CON-18	295	8	3-4	76	Polvo amarillo	179.9-182.6
CON-19	293	8	3-4	73	Polvo amarillo	273.9-275.1

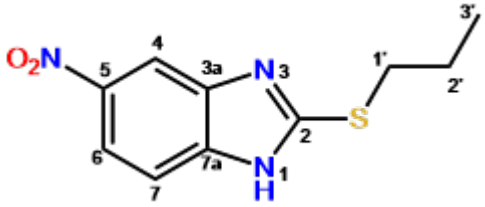
En las **Tablas 22-34**, se muestran los resultados obtenidos de la espectroscopia de ^{1}H y ^{13}C de los compuestos finales.

Tabla 22. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-1**.



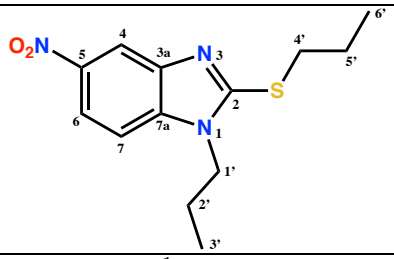
Posición	^{1}H	^{13}C
1	13.04 (*s*, 1H)	---
2	---	172.3
3	---	---
3a	---	138.0
4	7.85 (*d*,1H, J_m=2.3 Hz)	109.7
5	---	143.0
6	8.04 (*dd*, 1H, J_m=2.4, J_o=8.6 Hz)	119.4
7	7.26 (*d*, 1H, J_o=8.8 Hz)	105.1
7a	---	132.8
SH	2.47 (*s*, 1H)	---

Tabla 23. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-2**.



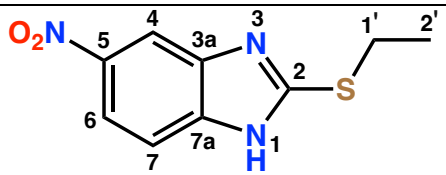
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	157.1
3	---	---
3a	---	112.6
4	8.30 (*s*, 1H, J_m=2.2 Hz)	117.5
5	---	143.0
6	8.09 (*dd*, 1H, J_m=2.1, J_o=8.8 Hz)	117.5
7	7.50 (*d*, 1H, J_o=8.8 Hz)	117.5
7a	---	109.8
1´	3.29 (*t*, 2H)	33.2
2´	1.80 (*sext*, 2H)	22.7
3´	1.07 (*t*, 3H)	12.0

Tabla 24. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-3**



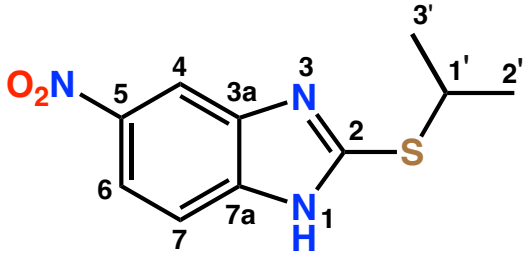
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	158.8
3	---	---
3a	---	142.3
4	8.50 (*s*, 1H, J_m=2.4 Hz)	117.8
5	---	147.9
6	8.02 (*s*, 1H, J_m=2.2, J_o=8.8 Hz)	117.9
7	7.65 (s, 1H, J_o=8.8 Hz)	106.7
7a	---	136.1
1´	4.18 (*t*, 2H)	45.7
2´	1.70-1.77 (*m*, 4H)	22.6
3´	0.85 (*t*, 3H)	11.3
4´	3.34 (*t*, 2H)	33.9
5´	1.70-1.77 (*m*, 4H)	22.8
6´	0.98 (*t*, 3H)	13.4

Tabla 25. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-4**



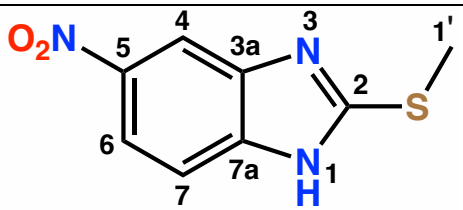
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	157.0
3	---	---
3a	---	141.8
4	8.27 (*s*, 1H, J_m=2.3 Hz)	113.3
5	---	144.4
6	7.55 (*dd*, 1H, J_m=2.2, J_o=8.8 Hz)	117.2
7	8.02 (*d*, 1H, J_o=8.8 Hz)	110.1
7a	---	139.9
1´	3.31 (*q*, 2H)	25.5
2´	1.38 (*t*, 3H)	15.0

Tabla 26. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-5**



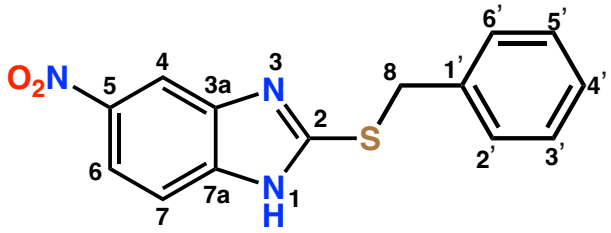
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	143.4
3	---	---
3a	---	132.4
4	8.50 (*s*, 1H, J_m=2.3 Hz)	118.7
5	---	134.0
6	8.15 (*dd*, 1H, J_o=8.8 Hz, J_m=2.1)	118.7
7	7.49 (*s*, 1H)	118.7
7a	---	130.1
1´	4.13 (*sept*, 1H)	39.1
2´	1.49 (*d*, 6H)	23.8
3´	1.49 (*d*, 6H)	23.8

Tabla 27. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-6**



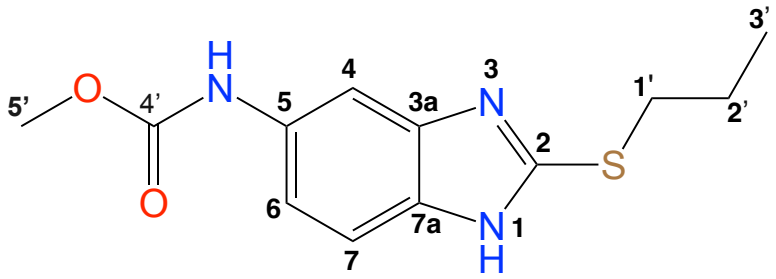
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	157.6
3	---	---
3a	---	142.0
4	8.29 (*s*, 1H, J_m=2.4 Hz)	113.28
5	---	142.0
6	8.05 (*dd*, 1H, J_o=8.8, J_m=2.2, H-6),	117.35
7	7.58 (*d*, 1H, J_o=8.8),	110.0
7a	---	142.0
1´	2.73 (*s*, 3H)	13.7

Tabla 28. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-7**.



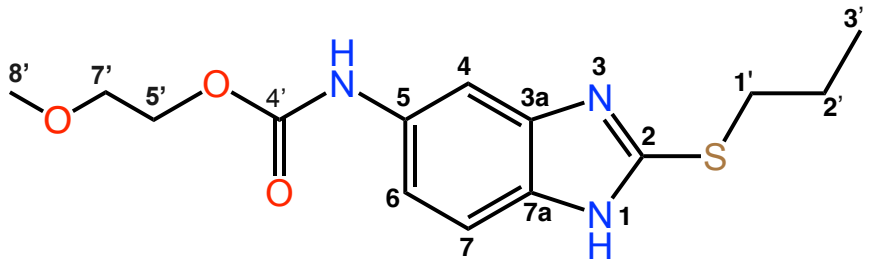
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	156.3
3	---	---
3a	---	137.2
4	8.31 (*s*, 1H, J_m=2.2 Hz)	113.4
5	---	142.1
6	8.04 (*dd*, 1H, J_o=8.8, J_m=2.0)	117.4
7	7.59 (*d*, 1H, J_o=8.2)	110.3
7a	---	137.2
1´	2.73 (*s*, 3H)	129.4
2´	7.47 (*d*, 2H, J_o=7.1)	128.9
3´	7.24-7.32 (*m*, 3H),	127.5
4´	7.24-7.32 (*m*, 3H)	---
5´	7.24-7.32 (*m*, 3H)	127.5
6´	7.47 (d, 2H, J_o=7.1')	128.9
8	4.62 (*s*, 2H)	35.0

Tabla 29. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-8 (RetroABZ)**.



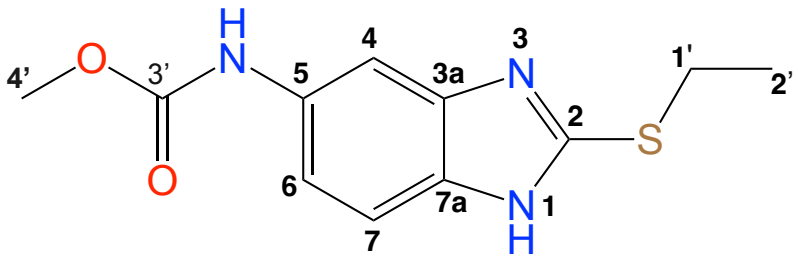
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	150.2
3	---	---
3a	---	137.3
4	7.94 (*s*, 1H, J_m=2.3)	101.8
5	---	128.8
6	7.41 (*dd*, 1H, J_o=8.8, J_m=2.0)	116.9
7	7.56 (*d*, 1H, J_o=8.8)	113.8
7a	---	133.6
1´	3.47 (*t*, 2H)	34.5
2´	1.71 (*sext*, 2H)	23.0
3´	0.99 (*t*, 3H)	13.2
4´		---
5´		52.3
-NH Carbamato	9.98 (*s*, 1H)	---
-(C=O) Carbamato	---	154.5

Tabla 30. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-9**.



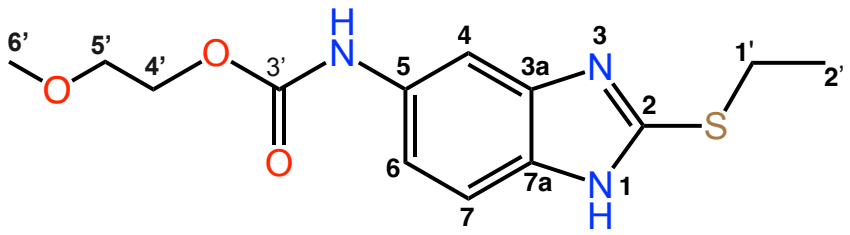
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	147.8
3	---	---
3a	---	136.0
4	8.07 (*s*, 1H, J_m=2.3)	99.9
5	---	126.1
6	7.48 (*dd*, 1H, J_o=8.6, J_m=2.3)	115.5
7	7.55 (d, 1H, H-7, J_o=8.6)	111.4
7a	---	131.1
1´	33.52 (*t*, 2H)	33.0
2´	1.81 (*sext*, 2H)	21.2
3´	1.09 (*t*, 3H, H-3')	11.3
4´	---	---
5´	4.28 (t, 2H)	62.0
6'	3.63 (*t*, 2H)	68.8
7´	3.36 (*s*, 3H)	56.7
-NH Carbamato	9.95 (*s*, 1H)	---
-(C=O) Carbamato	---	152.0

Tabla 31. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-11**.



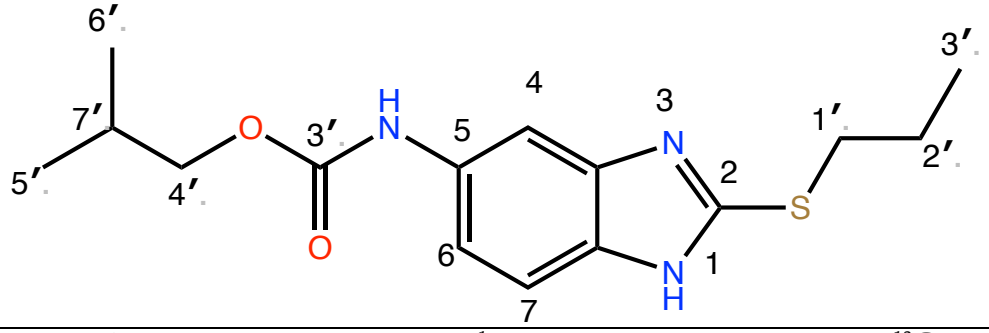
Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	154.2
3	---	---
3a	---	149.6
4	7.65 (*s*, 1H, J_m=2.3)	109.0
5	---	133.5
6	7.11 (*dd*, 1H, J_o=8.8, J_m=2.0)	117.8
7	7.31 (*d*, 1H, J_o=8.8)	113.3
7a	---	133.5
1´	3.23 (*q*, 2H)	25.6
2´	1.33 (*t*, 3H)	15.2
3´		
4´	3.65 (*s*, 3H)	51.5
-NH Carbamato	9.56 (*s*, 1H)	---
-(C=O) Carbamato	---	162.3

Tabla 32. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-12**.



Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	154.3
3	---	---
3a	---	144.8
4	11.85 (s, 1H, J_m=2.3)	114.6
5	---	138.7
6	11.74 (dd, 1H, J_o=8.6, J_m=2.0)	122.0
7	12.04 (d, 2H, J=8.6)	118.4
7a	---	140.5
1´	6.06 (q, 2H)	31.1
2´	4.65 (t, 3H)	20.0
3´		
4´	8.92 (t, 2H)	68.1
5´	8.28 (t, 2H)	75.5
6´	7.23 (s, 3H)	63.3
-NH Carbamato	12.45 (s, 1H)	---
-(C=O) Carbamato	---	158.7

Tabla 32. Desplazamientos de ^{1}H y de ^{13}C del compuesto **CON-12**.



Posición	^{1}H	^{13}C
1	---	---
2	---	152.6
3	---	---
3a	---	134.5
4	8.03 (d, 1H J_m=2.0)	105.9
5	---	135.3
6	7.58 (dd, 1H, J_o=8.6, J_m=2.0)	118.1
7	7.51 (*d*, 1H, J_o=8.6)	110.9
7a	---	134.5
1´	3.12 (*t*, 2H)	33.5
2´	1.08 (*sext*, 2H)	23.4
3´	1.05 (*t*, 2H)	12.9
4´	3.93 (*d*, 2H)	70.8
5´	0.98 (*s*, 6H)	19.2
6´	0.98 (*s*, 6H)	19.2
7´	1.93-2.01 (*m*, H1)	27.9
-NH Carbamato	12.45 (*s*, 1H)	---
-(C=O) Carbamato	---	158.7

8.3 Parte farmacológica

En este estudio se diseñaron, sintetizaron y evaluaron *in vitro* un total de 13 nuevos compuestos contra *Giardia lamblia*. De estos, siete corresponden a análogos de tipo 5-nitrobencimidazol, seleccionados debido a la evidencia previa que muestra la actividad antiprotozoaria de compuestos con núcleo 5-nitrobencimidazol contra *G. lamblia*, *T. vaginalis* y *E. histolytica* en estudios *in vitro*.

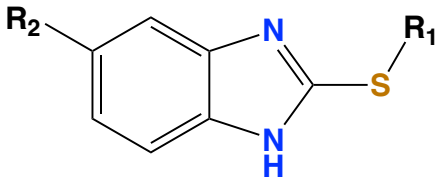
Además, se evaluó una serie de seis compuestos de tipo carbamato de bencimidazol, análogos del **ABZ**. Estos compuestos se diseñaron modificando los grupos laterales del **ABZ** con el objetivo de mejorar sus propiedades biofarmacéuticas, como la solubilidad y potencialmente, mantener o incrementar su actividad antiparasitaria.

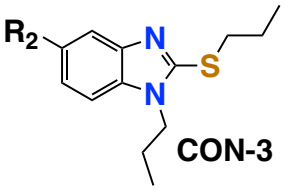
8.3.1 Susceptibilidad *in vitro* contra *Giardia lamblia*

En la **Tabla 35** se presentan los resultados del bioensayo fenotípico de los compuestos evaluados, mostrando que, en términos generales, la mayoría de los compuestos de ambas series fueron más activos que el fármaco de referencia **ABZ**. Cabe destacar que todos los compuestos mostraron actividades en el rango nanomolar, lo que los clasifica como compuestos líderes.

En la serie de tipo 5-nitro-2-tioalquilbencimidazol (**CON 1-7**), todos los compuestos demostraron ser más activos que el **ABZ**, como se detalla en la **Tabla 35**. Además, se calculó la potencia relativa de los compuestos en comparación con el **ABZ**, lo que se muestra en la **Figura 39**. Es importante resaltar al compuesto **CON-7**, que resultó ser 4.7 veces más activo que el fármaco de referencia.

Tabla 35. Susceptibilidad *in vitro* contra *G. lamblia* de los compuestos sintetizados.

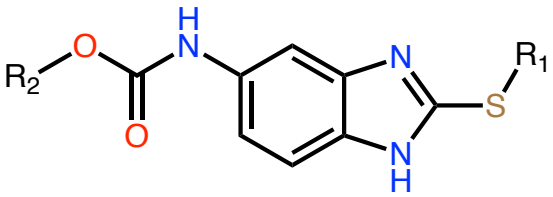




CON-3

CI_{50} (μM)

Comp	R_1	R_2	*G. lamblia*
		Serie A, Nitrobencimidazoles	
CON-1	-H	$-NO_2$	0.080 ± 0.011
CON-2	-Propilo	$-NO_2$	0.078 ± 0.003
CON-3	---	$-NO_2$	0.054
CON-4	-Etilo	$-NO_2$	0.058 ± 0.010
CON-5	-Isopropilo	$-NO_2$	0.072 ± 0.006
CON-6	-Metilo	$-NO_2$	0.084 ± 0.010
CON-7	-Bencilo	-NO2	0.042 ± 0.005
MTZ	--	--	5.36 ± 0.93



CI_{50} (μM)

		Serie B (carbamatos de bencimidazol)	
CON-8	-Propilo	-Metilo	0.083 ± 0.013
CON-9	-Propilo	-2-Metoxietilo	0.058 ± 0.005
CON-10	-Propilo	-Ibutilo	0.101 ± 0.009
CON-12	-Etilo	-2-Metoxietilo	0.247 ± 0.019
CON-18	-Metilo	-2-Metoxietilo	0.178 ± 0.043
CON-19	-Metilo	-Isobutilo	0.079 ± 0.005
ABZ	--	--	0.196 ± 0.011

Este notable efecto podría atribuirse a la presencia del grupo nitro en posición 5, ya que existe evidencia de que los compuestos nitroheterocíclicos requieren someterse a procesos de biorreducción para ejercer su efecto antiparasitario. Durante este proceso, la reducción del grupo nitro genera radicales libres (como el nitro aniónico,

nitroso e intermediarios hidroxilamina), los cuales tienen un marcado efecto citotóxico, clave en su actividad antiparasitaria.

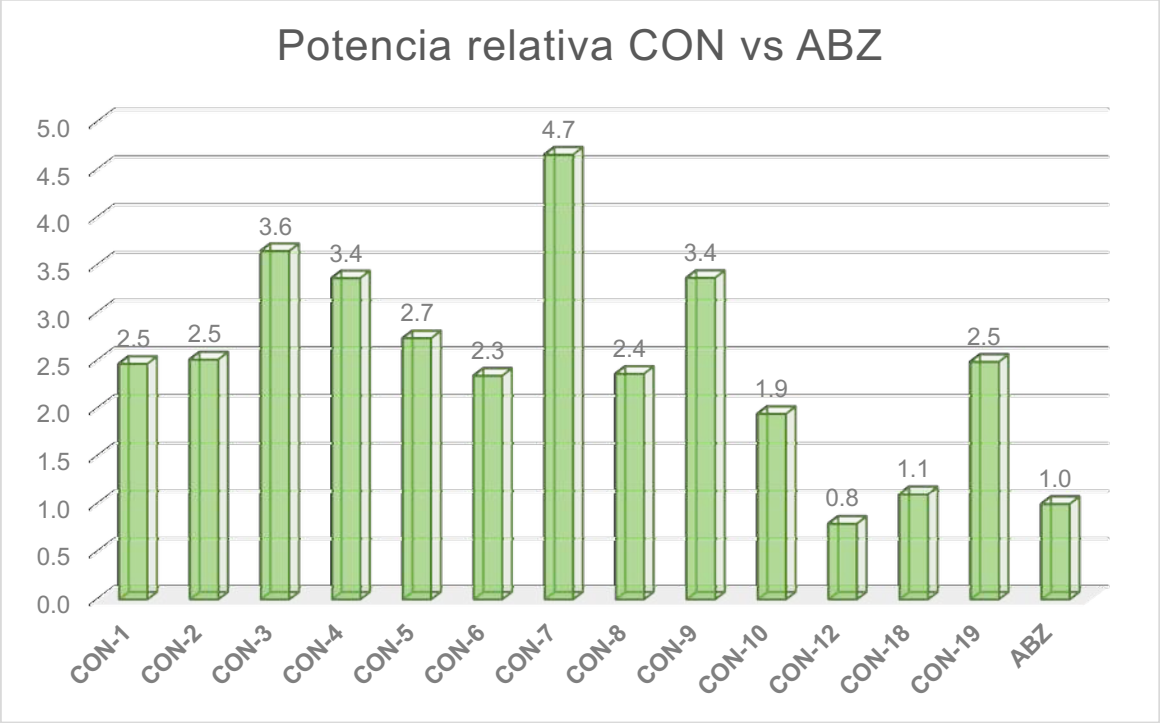


Figura 39. Potencia relativa de los compuestos evaluados vs **ABZ.**

En la serie de compuestos de tipo carbamato de bencimidazol, todos los compuestos, excepto **CON-12** y **CON-18**, demostraron ser más activos contra *G. lamblia* en comparación con el fármaco de referencia **ABZ**. Entre ellos, destacan los compuestos **CON-8** y **CON-9**, que fueron 3.4 y 2.4 veces más activos que el **ABZ**, respectivamente como se muestra en la **Figura 39**.

Un aspecto interesante es el efecto del grupo 2-tiopropilo presente en los compuestos **CON-8** a **CON-9**, los cuales exhibieron la mayor actividad dentro de la serie. Sin embargo, se observó que al reducir la longitud de la cadena alifática del grupo 2-tioalquilo, la actividad disminuyó, lo que sugiere la importancia de este grupo funcional para la interacción molecular y la eficacia antiparasitaria.

8.3.2 Citotoxicidad

Como se mencionó anteriormente, el compuesto **CON-7** de la serie A de nitrobencimidazoles y los compuestos **CON-8** y **CON-9** de la serie B de carbamatos de bencimidazol mostraron las mejores actividades en el estudio de susceptibilidad frente a *G. lamblia*, siendo **4.7**, **2.5 Y 3.4** veces más activos, respectivamente, en comparación con el fármaco de referencia el **ABZ**.

Debido a estos resultados prometedores, se evaluó la citotoxicidad de estos compuestos en células de fibroblastos humanos normales (HFF). En la **Tabla 36** se presentan los valores de las concentraciones citotóxicas medias (CC_{50}) frente a las células HFF, así como los índices de selectividad (IS) calculados frente a *G. lamblia*.

Un compuesto biológicamente activo se considera citotóxico cuando su índice de selectividad es menor o igual a 10 (IS≤10). Como se observa en la **Tabla 36**, todos los compuestos evaluados mostraron índices de selectividad altos, lo que indica una marcada toxicidad selectiva contra el protozoario en comparación con las células HFF.

Tabla 36. Citotoxicidad de los compuestos **CON-7**, **CON-8** y **CON-9**

	Compuesto					
	7	8	9	7	8	9
Célula	CC_{50} (μM)			IS= CC_{50} HFF/ CI_{50} *G. lamblia* (≥ 10)		
HFF	131.16 ± 23.5	598.4 ± 12.4	801.6 ± 7.1	3123	7210	14079

8.3.3 Estudios de solubilidad del compuesto CON-8 (RetroABZ)

Como se describió en el apartado del diseño molecular de la serie de compuestos tipo carbamato de bencimidazol, este tipo de compuestos se caracteriza por su baja

solubilidad acuosa, atribuida a sus características estructurales, particularmente a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares, como ocurre con el **ABZ**.

En esta serie, se sintetizó un regioisómero del **ABZ**, denominado **RetroABZ** (**CON-8**), que implicó un intercambio de los grupos funcionales en sus cadenas laterales con el objetivo de interrumpir la formación de conformaciones diméricas estabilizadas por enlaces de hidrógeno. Para evaluar si estos cambios estructurales contribuyen a mejorar la solubilidad acuosa, se llevó a cabo un estudio para determinar la solubilidad acuosa termodinámica del compuesto **RetroABZ.**

8.3.3.1 Preparación de la disolución de referencia (0.01 mg/mL)

Se pesaron 10 mg del compuesto **CON-8** y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL. Posteriormente, se añadieron 6 mL de metanol y se agitó la mezcla hasta lograr la completa disolución. Una vez disuelto, se aforó el matraz con el mismo disolvente, obteniendo una concentración de 1000 µg/mL.

A partir de esta solución, se realizó una dilución 1:10 para preparar una solución stock final con una concentración de 100 µg/mL.

8.3.3.2 Preparación de la curva de calibración

De la solución stock de 100 µg/mL, se preparó una solución con una concentración de 12.5 µg/mL, utilizada como base para construir una curva de calibración. Esta curva se realizó con siete concentraciones específicas, marcadas en gris en la **Tabla 37**.

Tabla 37. Preparación de la curva de calibración de **RetroABZ**

Muestra	C_1 (µg/mL)	V_1 (mL)	V_2 (mL)	C_2 (µg/mL)	Vol de MeOH Aforar
		$V_1 = \frac{V_2 C_2}{C_1}$			
Solución stock	100	1.25	10	12.5	8.75
1	12.5	0.3	1	3.75	0.7
2	12.5	0.25	1	3.125	0.75
3	12.5	0.2	1	2.5	0.8
4	12.5	0.15	1	1.875	0.85
5	12.5	0.2	2	1.25	1.8
6	1.25	0.5	1	0.625	0.5
7	1.25	0.25	1	0.3125	0.75

8.3.3.3 Preparación de las muestras de prueba

Para evaluar la precisión y exactitud del método analítico, se seleccionaron tres concentraciones problema: 3.5, 1.5625 y 0.5 µg/mL, indicadas en gris en la **Tabla 38**. Estas concentraciones fueron preparadas a partir de una solución stock general de 6.25 µg/mL, siguiendo el procedimiento detallado en la tabla mencionada.

Tabla 38. Preparación de las muestras problema de **RetroABZ**

Muestra	C_1 (µg/mL)	V_1 (mL)	V_2 (mL)	C_2 (µg/mL)	Vol de MeOH Aforar
		$V_1 = \frac{V_2 C_2}{V_1}$			
1	12.5	5	10	6.25	5
2	6.25	0.56	1	3.5	0.44
3	6.25	0.25	1	1.5625	0.75
4	6.25	0.04	1	0.5	0.96

8.3.3.4 Linealidad del método analítico

Para evaluar la linealidad del método analítico, se prepararon dos curvas de calibración en tres días diferentes, utilizando siete concentraciones, como se muestra en la **Tabla 39**.

Tabla 39. Curva de calibración de **RetroABZ**: Primera repetición, Día 1

Inyección	Muestra	Concentración µg/mL	Área	Height	Área promedio
1	Blanco	0	0	0	0
2	2	3.75	91451.492	4197.134	
3	2	3.75	92249.461	4074.347	91850.4765
4	3	3.125	70851.5	3095.844	
5	3	3.125	72390.594	3135.856	71621.047
6	4	2.5	56642.008	2560.343	
7	4	2.5	58540.504	2610.431	57591.256
8	5	1.875	41646.402	1848.91	
9	5	1.875	41689.758	1867.506	41668.08
10	6	1.25	25670.096	1147.712	
11	6	1.25	26105.898	1186.365	25887.997
12	7	0.625	13053.346	620.817	
13	7	0.625	13275.106	622.348	13164.226
14	8	0.3125	5860.102	267.744	
15	8	0.3125	5770.11	271.737	5815.106

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un modelo de regresión lineal, donde se consideró un coeficiente de determinación (r^2) de al menos ≥ 0.98 como criterio aceptable para establecer la linealidad.

A manera de ejemplo, se presentan en la **Tabla 39** y la **Figura 40** los datos correspondientes a la primera repetición del día 1 de la curva de calibración del compuesto **RetroABZ**.

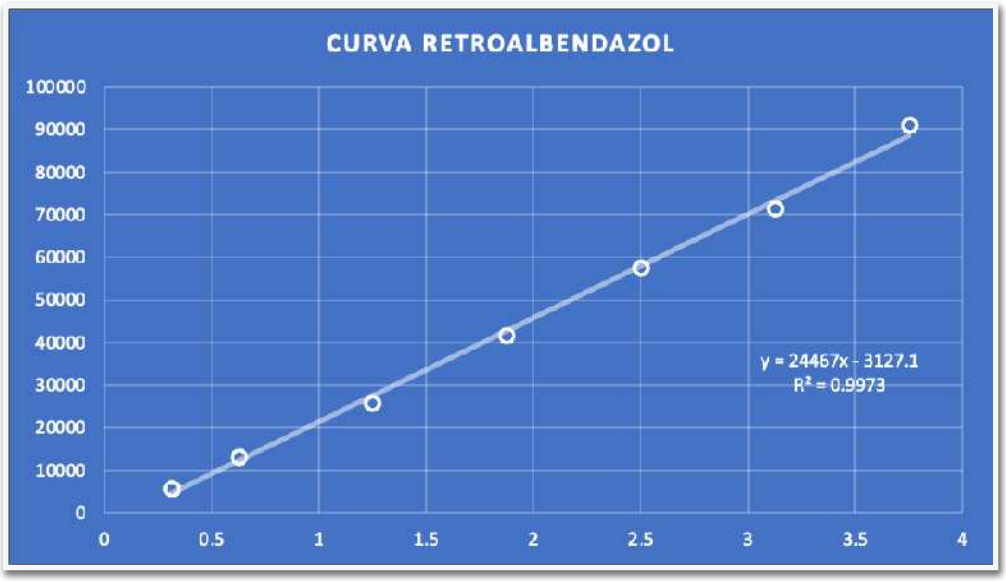


Figura 40. Curva de calibración de **RetroABZ**, día 1, primero repetición.

Como se observa en la **Tabla 40**, los resultados obtenidos permiten confirmar que el método es lineal en el intervalo de concentraciones evaluado. Esto se fundamenta en los valores de los coeficientes de determinación (r^2), que en todos los casos fueron ≥ 0.98, cumpliendo con los criterios establecidos para la validación del método analítico.

Tabla 40. Coeficientes de determinación (r^2) de las curvas de calibración del compuesto **RetroABZ**

Día	Repetición	R^2
1	1	0.9973
1	2	0.9989
2	1	0.9985
2	2	0.9969
3	1	0.9994
3	2	0.9987

8.3.3.5 Precisión

Se realizó una curva de calibración utilizando las concentraciones de 3.75**,** 3.125, 2.5, 1.875, 1.25, 0.625 y 0.3125 µg/mL. Este procedimiento fue repetido en dos días diferentes para evaluar la precisión interdiaria del método. Como ejemplo representativo, en la **Figura 41** se presenta la ecuación de la recta correspondiente al primer día de análisis.



Figura 41. Curva de calibración del compuesto **RetroABZ** para el primer día.

Además, se prepararon cinco réplicas para cada una de las concentraciones seleccionadas: 3.5, 1.5625 y 0.5 µg/mL, con el objetivo de evaluar la precisión intradía. Los resultados obtenidos para el primer día se resumen en la **Tabla 41**.

Tabla 41. Resultados de precisión intradía del compuesto **CON-8** para el primer día.

Inyección	Concentración	Área	Altura	Concentración
1	3.5	114667.805	4096.394	3.38344528
2	3.5	114632.195	4014.512	3.38243306
3	3.5	113741.195	4016.216	3.35710617
4	3.5	112409.297	3993.067	3.31924665
5	3.5	112582.602	3958.364	3.32417288
			Promedio	3.35328081
			st	0.01437618
			cv	0.91673692
1	1.5625	49502.199	1747.651	1.53109719
2	1.5625	48462.297	1714.337	1.50153772
3	1.5625	48557.148	1715.016	1.50423388
4	1.5625	48448.047	1688.548	1.50113266
5	1.5625	48187.406	1700.235	1.49372388
			Promedio	1.50634507
			st	0.01437618
			cv	0.95437523
1	0.5	16387.4	586.407	0.58980102
2	0.5	16044.603	577.819	0.58005694
3	0.5	16121.795	578.098	0.58225114
4	0.5	15937.096	591.105	0.57700102
5	0.5	15765.195	580.477	0.5721147
			Promedio	0.58024496
			st	0.00655749
			cv	1.13012463

Como se puede observar en la **Tabla 42**, el método analítico cumple con los criterios de aceptación establecidos para la repetibilidad y precisión, ya que los coeficientes de variación (CV) obtenidos para los tres niveles de concentración evaluados fueron ≤ 1.5 %.

Tabla 42. Coeficiente de variación de la curva de repetibilidad.

Concentración teórica µg/mL	Día 1		Día 2	
	st	CV	st	CV
3.5	0.018	0.551	0.030	0.916
1.5625	0.016	1.177	0.014	0.954
0.5	0.005	1.250	0.006	1.130

8.3.3.6 Determinación de la solubilidad termodinámica del compuesto RetroABZ (CON-8)

Una vez establecidas las condiciones óptimas del método analítico, se procedió a realizar el estudio de solubilidad termodinámica del compuesto **RetroABZ**. Las concentraciones del compuesto en solución fueron cuantificadas interpolando las lecturas de absorbancia con la curva de calibración correspondiente. En la **Tabla 43** y **Figura 42** se presentan los resultados de las áreas obtenidas, así como la curva de calibración para las soluciones analizadas.

Tabla 43. Curvas de calibración para la determinación de la solubilidad del compuesto **RetroABZ**.

Inyección	Concentración (µg/ml)	Área	Altura	Promedio área	Promedio Área
1	Blanco	Blanco	0	0	0
2	3.75	106742.898	3895.311		
3	3.75	107551.602	3948.427	3921.869	107147.25
4	3.125	74774.094	2579.298		
5	3.125	75216.852	2619.809	2599.5535	74995.473
6	2.5	63496.848	2230.342		
7	2.5	65284.105	2311.286	2270.814	64390.4765
8	1.875	41743.801	1503.516		
9	1.875	43844.5	1557.273	1530.3945	42794.1505
10	1.25	30026.607	1062.978		
11	1.25	29700.4	1051.312	1057.145	29863.5035
12	0.625	14282.907	513.874		
13	0.625	14711.803	533.013	523.4435	14497.355
14	0.3125	6980.504	256.066		
15	0.3125	7031.791	282.196	269.131	7006.1475

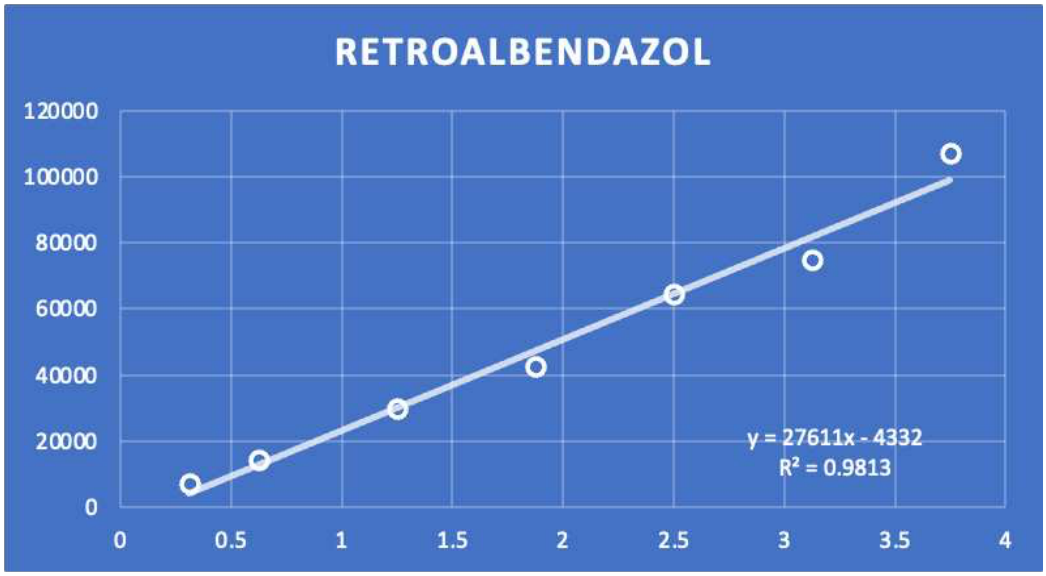


Figura 42. Curva de calibración de la solubilidad del **RetroABZ**.

Como se puede observar en la **Tabla 44**, se analizaron dos muestras con dos inyecciones por cada una. A partir de estos datos, se calculó el promedio de solubilidad para el compuesto **RetroABZ**, obteniéndose un valor de 246.62 µg/mL.

Tabla 44. Solubilidad promedio determinada para el compuesto **RetroABZ**.

Inyección	Altura	Área	Promedio Atura	Promedio Área	Concentración (µg/mL)	Promedio Concentración (µg/mL)
1	320019.625	6841397.5			247.9348629	
2	322903.156	6977050.5	321461.3905	250.3913658	252.8478686	250.3913658
1	304100.844	6527758			236.5756401	
2	320652.375	6874398.5	312376.6095	242.8528576	249.130075	242.8528576
					Promedio	246.62

La solubilidad del **ABZ** fue determinada utilizando el método reportado por Jung y colaboradores, obteniéndose un valor de 10.55 ± 0.70 µg/mL. Este resultado demuestra que el compuesto **RetroABZ** presenta un aumento en solubilidad de 23.3 veces respecto al **ABZ**. Cabe destacar que, para moléculas en etapa de descubrimiento, una solubilidad alta debe ser ≥ 60 µg/mL. Este hallazgo sugiere que los cambios estructurales realizados en las cadenas laterales del **ABZ** están rompiendo la cohesión cristalina, lo que mejora significativamente esta propiedad.

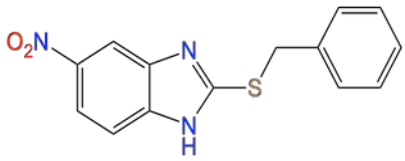
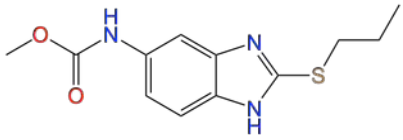
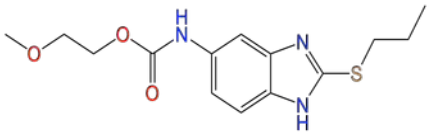
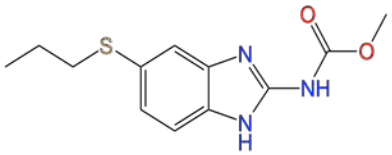
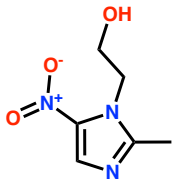
Además, considerando que la actividad antiparasitaria *in vitro* del compuesto **RetroABZ** también mostró un aumento respecto al **ABZ**, estos resultados sugieren que **RetroABZ** podría ser un candidato prometedor para el tratamiento de infecciones por parásitos invasivos, donde el **ABZ** presenta limitaciones terapéuticas debido a su baja solubilidad y biodisponibilidad acuosa.

8.3.3.7 Actividad giardicida *in vivo* en un modelo murino de giardiasis

Se evaluó la actividad antiprotozoaria *in vivo* de los compuestos más activos obtenidos en el estudio de susceptibilidad contra *G. lamblia*, utilizando un modelo murino con ratones CD-1 infectados con trofozoítos de *G. lamblia*. El protocolo experimental siguió la metodología previamente reportada. Los valores de la dosis efectiva media (DE_{50}) obtenidos para los compuestos evaluados se resumen en la **Tabla 45**.

Los resultados mostraron todos los compuestos evaluados presentaron una actividad *in vivo* notablemente superior a la del **ABZ**, destacando al compuesto **RetroABZ** (**CON-8**) con un valor de DE_{50} de 55 µg/kg. Esto indica que **RetroABZ** fue 11 veces más efectivo que el albendazol y 39 veces más potente que el metronidazol.

Tabla 45. Valores DE_{50} de **CON-7**, **RetroABZ** y **CON-9** compuestos de referencia en modelo murino de giardiasis.

Compuesto	Estructura	*G. lambia*	
		$DE_{50}(\mu g/kg)$	$DE_{50}(nmol/kg)$
CON-7		28	98.13
RetroABZ (CON-8)		5	18.84
CON-9		13	42.02
ABZ		55	207.29
MTZ		194	1133.5

8.4 Acoplamiento molecular refinado sobre la α/β-tubulina de *Giardia lamblia*

8.4.1 Modelado por homología de la α/β-tubulina de *Giardia lamblia*

La construcción de las proteínas α/β-tubulina de *Giardia lamblia* se llevó a cabo mediante la herramienta de modelado por homología disponible en el software MOE 2019 (Molecular Operating Environment). Los modelos obtenidos presentaron valores de RMSD de 0.5678 y 0.1863, respectivamente, en comparación con la estructura molde (**Figura 43**).

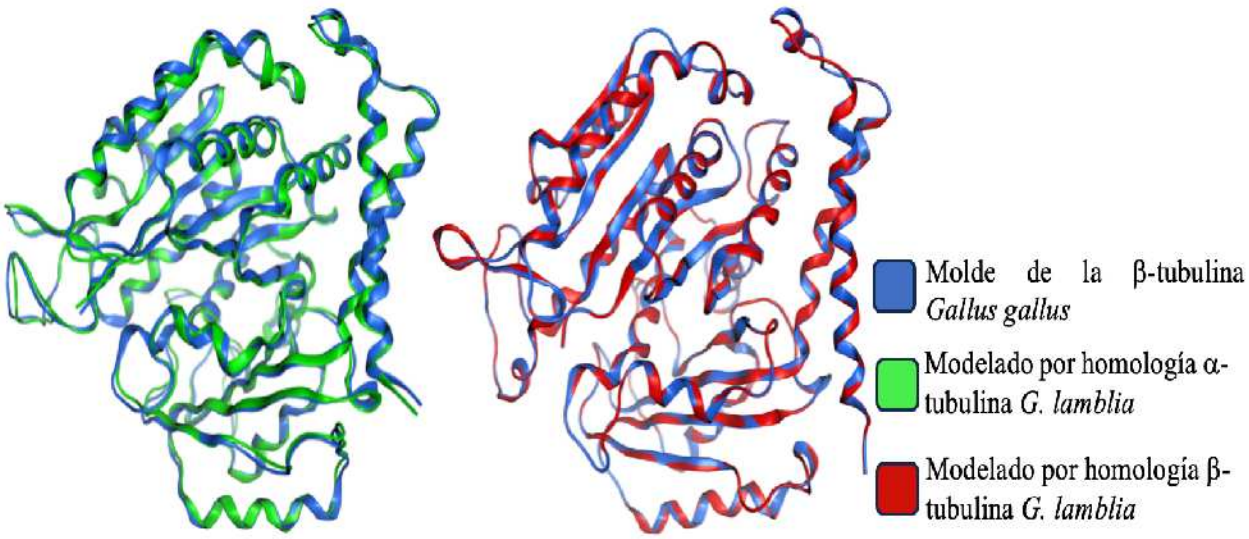


Figura 43. Superposición de las estructuras tridimensionales de los modelos obtenidos mediante modelado por homología: α-tubulina (verde) y β-tubulina (rojo) de *Giardia lamblia* frente a la α/β-tubulina de *Gallus gallus* utilizada como molde (ID PDB: 7OGN).

Se evaluó la calidad estereoquímica del modelo mediante el diagrama de Ramachandran generado en el programa MOE y, además, se validó la estructura secundaria a través de la puntuación QMEAN.

Los resultados del diagrama de Ramachandran (**Figura 44**) mostraron:

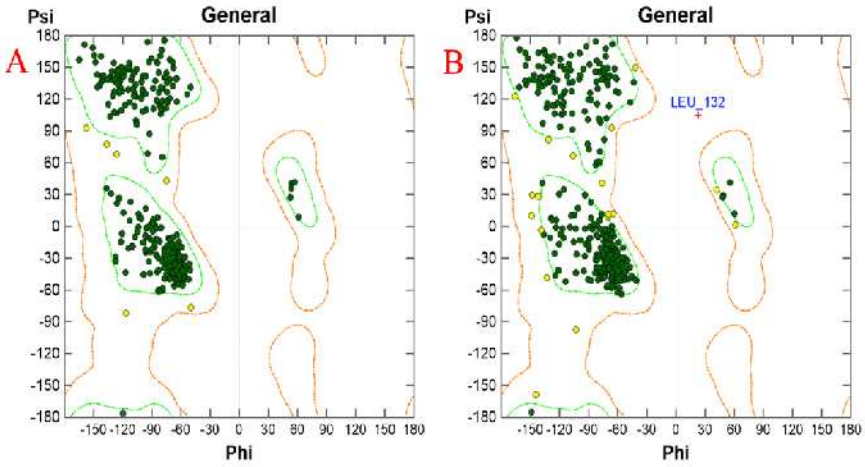
En el caso de la β-tubulina de *G. lamblia*:

- **98.6 %** de los residuos se encuentran en la región central.

- **1.4 %** en regiones permitidas.

Para la **α-tubulina** de *G. lamblia*:

- **95.9 %** de los residuos están en la región central.
- **3.9 %** en regiones permitidas.
- **0.2 %** en regiones atípicas; cabe destacar que este residuo no está localizado en el sitio de unión al parbendazol.



	(A) β-tubilina G. lamblia		(B) α-tubilina G. lamblia	
Residuos en regiones favorecidas	422	98.6	420	95.9
Residuos en regiones permitidas	6	1.4	17	3.9
Residuos en regiones atípicas	-	-	1	0.2

Figura 44. Mapa de Ramachandran generado por MOE, muestra la calidad estereoquímica de la estructura de las tubulinas de *G. lamblia*.

Adicionalmente, el análisis de la puntuación QMEAN arrojó valores de -3.17 y -1.05 para la α/β-tubulina, respectivamente (**Figura 45**). Estos resultados respaldan la calidad del modelo y validan su adecuación para realizar estudios de acoplamiento molecular.

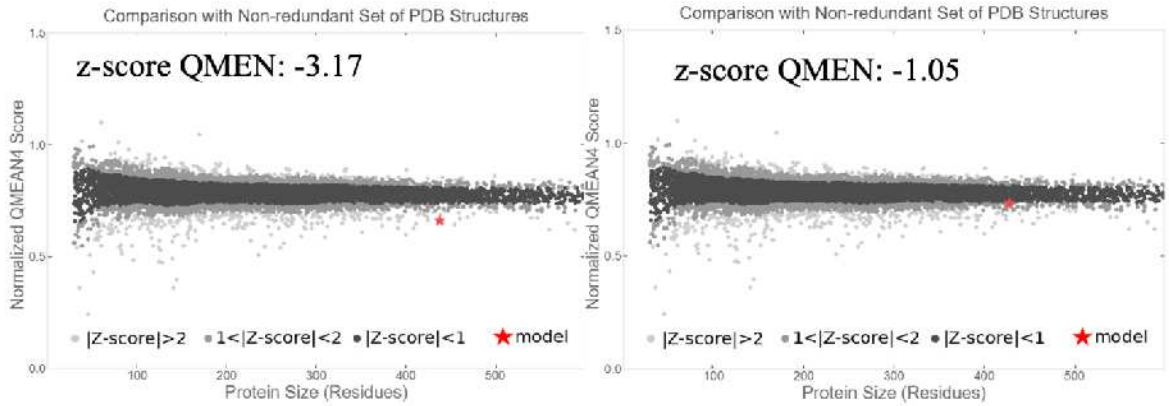


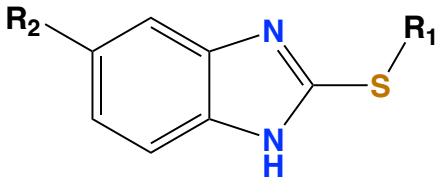
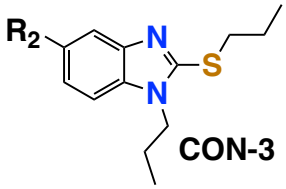
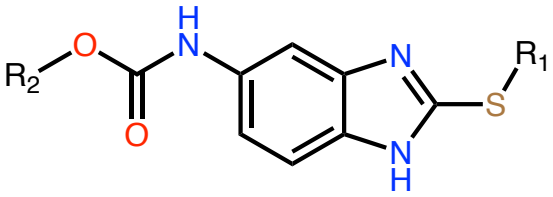
Figura 45. Puntuación QMEN para el modelo por homología de la α/β-tubulina de *G. lamblia.*

8.4.2 Acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados sobre la α/β-tubulina de *G. lamblia*.

Se realizó el acoplamiento molecular mediante el programa MOE 2019 de la serie de compuestos sintetizados sobre el dímero de la α/β-tubulina de *G. lamblia*, con la finalidad de comprender su posible modo de unión e interacciones. De manera general se realizaron 100 corridas, mostrando las 10 poses más representativas de cada molécula. En la **Tabla 35**, se pueden observar los scores obtenidos para estos compuestos.

Como se puede observar en la **Tabla 46**, los compuestos presentaron buenas afinidades en el sitio de unión de la α/β-tubulina de *G. lamblia*, comparables o superiores a los fármacos de referencia **MTZ** y **ABZ.** Estos resultados respaldan la capacidad de los compuestos para interactuar con la diana de interés lo que es esencial para inhibir la formación de microtúbulos en parásitos.

Tabla 46. Scores de los compuestos sintetizados sobre la α/β-tubulina de *G. lamblia*

Compuesto	R_1	R_2	Score (kcal/mol)
		 **CON-3**	α/β-tubulina *G. lamblia* Score (Kcal/mol)
-7.39	-H	$-NO_2$	
CON-2	-Propilo	$-NO_2$	-7.70
CON-3	---	$-NO_2$	-8.18
CON-4	-Etilo	$-NO_2$	-6.95
CON-5	-Isopropilo	$-NO_2$	-7.82
CON-6	-Metilo	$-NO_2$	-7.44
CON-7	-Bencilo	-NO2	-6.96
MTZ	--	--	-7.66
			Score (Kcal/mol)
CON-8	-Propilo	-Metilo	-7.39
CON-9	-Propilo	-2-Metoxietilo	-7.70
CON-10	-Propilo	-Isobutilo	-8.18
CON-12	-Etilo	-2-Metoxietilo	-7.82
CON-18	-Metilo	-2-Metoxietilo	-7.01
CON-19	-Metilo	-Isobutilo	-7.25
ABZ	--	--	-7.02

Debido a que el compuesto **CON-8** (**RetroABZ**) es representativo de este proyecto, en la **Figura 46** se muestran el diagrama 3D de las interacciones mostradas en el acoplamiento molecular sobre la α/β tubulina de *Giardia lamblia.*

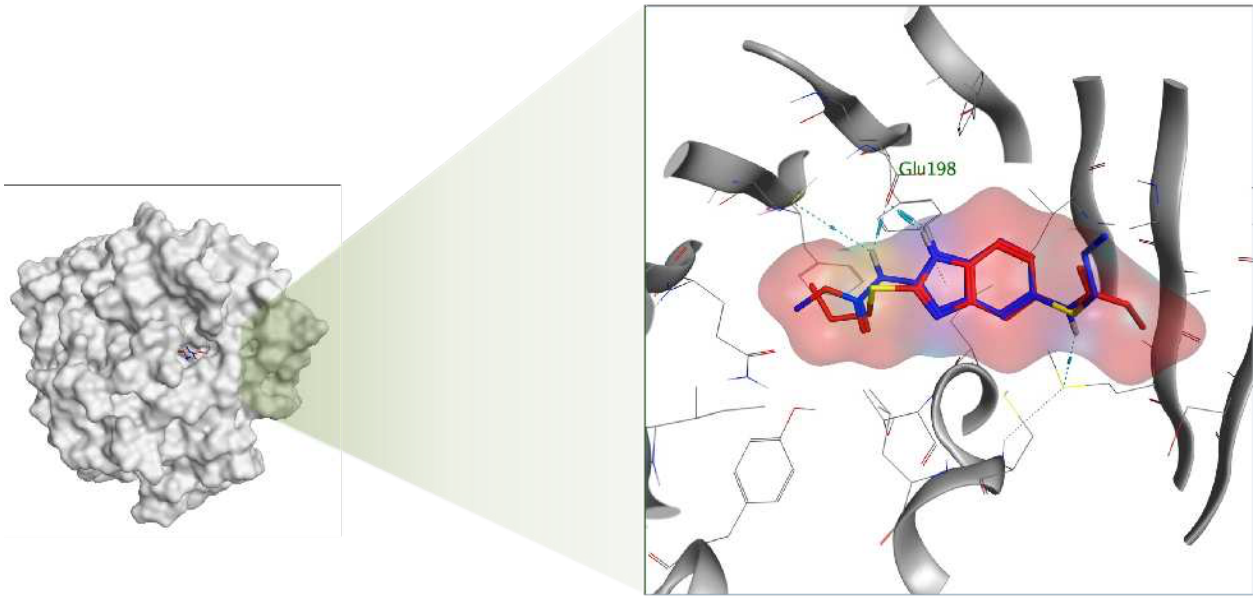


Figura 46. Visualización 3D en el programa MOE del **ABZ** (azul) y el compuesto **RetroABZ** (rojo) sobre la α/β-tubulina de *Giardia lamblia.*

Como se puede observar en la **Figura 46**, tanto el compuesto **CON-8** y el **ABZ**, presentan una disposición espacial similar en el sitio de unión de la α/β-tubulina de *Giardia lamblia*. En donde de manera general se observa que se mantiene la interacción con el residuo Glu198 al igual que el presentado por **ABZ**.

En la **Figura 47** se observa que el **RetroABZ** (verde) mantuvo las mismas interacciones que el fármaco de referencia el **ABZ** (Rojo), con los residuos de aminoácidos Glu198, Cys236 y Leu253 en el sitio de unión de la β-tubulina de *G. lamblia,* además de otras interacciones de tipo Van Der Waals. Debido a las interacciones presentadas por el acoplamiento molecular discutidas anteriormente, se podría predecir que el compuesto **RetroABZ** podría presentar el mismo mecanismo de acción que el **ABZ** el cual es la inhibición de la polimerización de tubulina. Sin embargo, esto tiene que corroborarse por estudios *in vitro*.

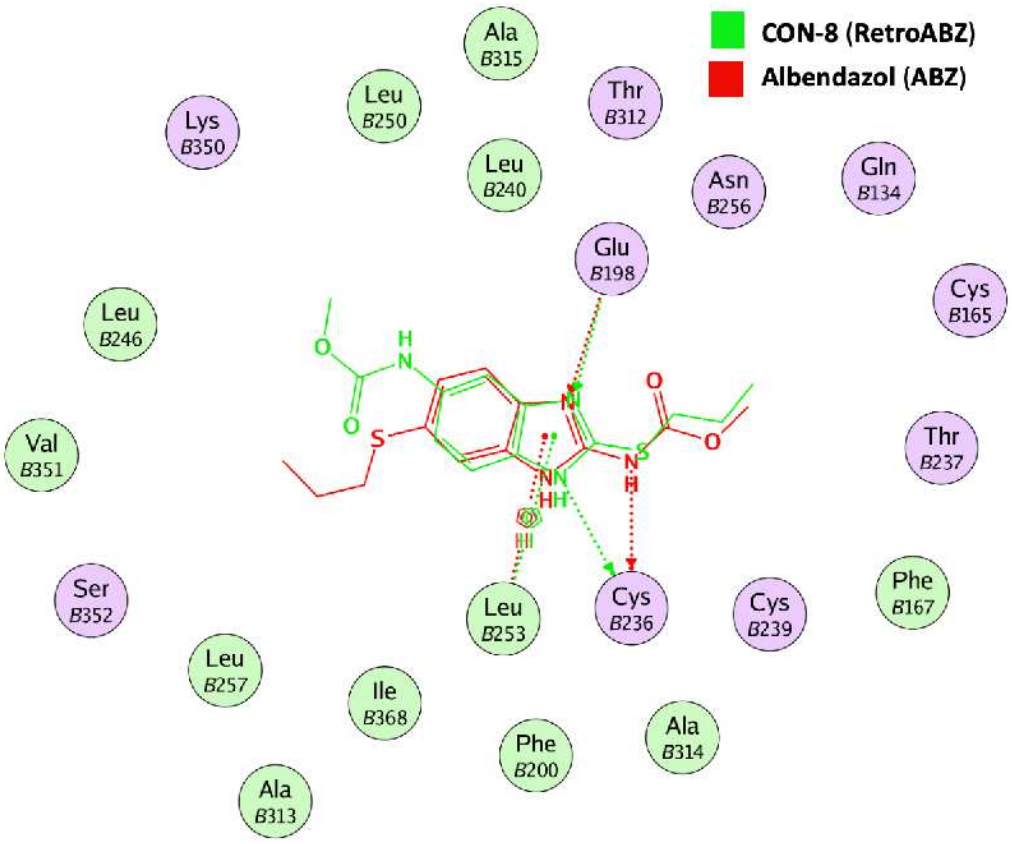


Figura 47. Overlay del compuesto **CON-8** (**RetroABZ**) y el fármaco de referencia **Albendazol** (**ABZ**) en el sitio de unión de la β-tubulina de *G. lamblia*.

8.4.3 Dinámica molecular de CON-8 (RetroABZ) en la α/β-tubulina de *G. lamblia*.

Se realizó la dinámica molecular del compuesto más representativo del proyecto, el cual fue el **RetroABZ**. Este estudio fue de relevancia, ya que proporcionó información detallada sobre la interacción y estabilidad del **RetroABZ** y el **ABZ** dentro del sitio de unión en la α/β-tubulina de *Giardia lamblia*.

Uno de los hallazgos más relevantes fue la diferencia en la estabilidad conformacional de ambos ligandos durante las simulaciones. El análisis de RMSD reveló que el **ABZ** presentó una mayor estabilidad en el sitio de unión, con fluctuaciones conformacionales menores. En cambio, **RetroABZ** mostró una

estabilidad parcial o semiestable, especialmente después de los 60 ns de simulación. Este comportamiento podría interpretarse inicialmente como una desventaja; sin embargo, un análisis más detallado de las interacciones moleculares permitió evidenciar que **RetroABZ** compensa esta inestabilidad con una red más robusta de interacciones hidrofóbicas, particularmente gracias a la orientación del sustituyente tiopropilo (**Figura 49**)

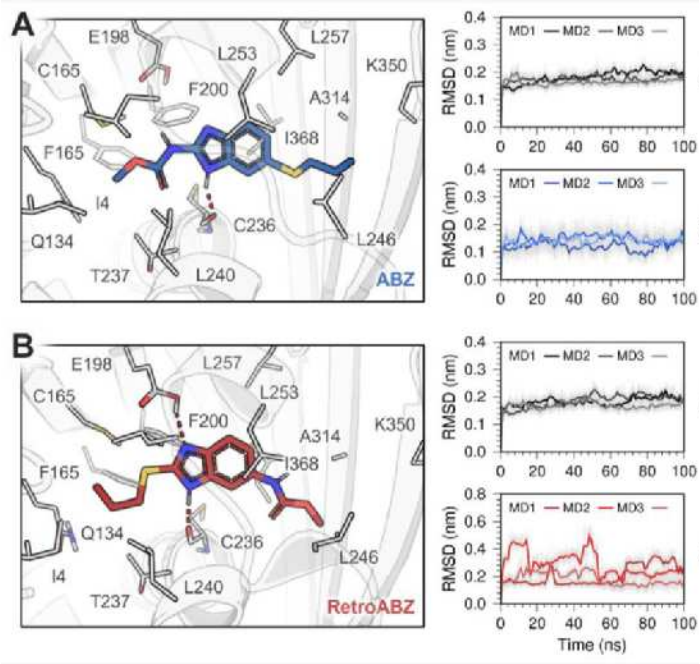


Figura 49. Análisis de las dos simulaciones DM independientes de 100 ns de (**A**) **ABZ** y (**B**) **RetroABZ** en el sitio de union de la α/β-tubulina de *G. lamblia*. A la izquierda de cada figura, el modo de unión más representativo extraído del grupo más poblado de los 50 ns finales de las tres simulaciones DM (DM1 a DM3).

Estas interacciones hidrofóbicas adicionales parecen jugar un papel clave en la afinidad de unión. **RetroABZ** presentó una energia de unión más favorable (-14.09 ± 3.65 kcal/mol) que el **ABZ** (-11.57 ± 3.76 kcal/mol), lo que sugiere una interacción más fuerte en la α/β-tubulina de *G. lamblia*, a pesar de su menor estabilidad estructural durante la simulación.

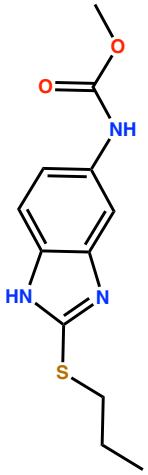
Estos resultados tienen implicaciones relevantes para el diseño racional de fármacos. La capacidad del **RetroABZ** para establecer interacciones hidrofóbicas y una afinidad de unión superior sugiere que modificaciones estructurales adicionales podrían mejorar aún más su estabilidad sin comprometer su eficacia. En conjunto, los datos generados por las simulaciones MD no solo validan a **RetroABZ** como un candidato prometedor frente a *G. lamblia*, sino que también ofrecen directrices claras para su futura optimización estructural.

8.5 RetroABZ vs ABZ

En este estudio, se diseñó y sintetizó de una serie de compuestos de tipo bencimidazoles azufrados, destacando al regioisómero del **ABZ**, denominado **RetroABZ**. Esta molécula demostró un aumento en la potencial de 2.3 veces en comparación a la presentada por **ABZ**, en un estudio de susceptibilidad contra *G. lamblia*, cabe destacar que presento una potencia en el orden nanomolar catalogandolo como un compuesto líder. De manera destacable, **RetroABZ** presentó actividad oral en un modelo murino de giardiasis, superando al fármaco de referencia, con un aumento en la eficacia de 11 veces. Además, el compuesto mostró una citotoxicidad muy baja y un alto índice de selectividad contra *G. lamblia*.

Una observación destacable es que el intercambio estratégico de cadenas laterales en el diseño molecular no solo mantuvo, sino que también aumentó la actividad del compuesto, con un incremento de 23 veces en su solubilidad acuosa en comparación con el fármaco de referencia. Este aumento en la solubilidad es particularmente relevante, ya que la baja solubilidad en agua es una limitación conocida de los compuestos de tipo carbamato de bencimidazol. Con sus propiedades antiparasitarias destacables, tanto *in vitro* como *in vivo*, y su mejora en la solubilidad, el compuesto **RetroABZ** abre nuevas vías para el desarrollo de moléculas bioactivas dirigidas a parásitos sistémicos.

Tabla 47. Análisis de consenso de **RetroABZ** versus **ABZ**.

	RetroABZ	**Albendazol**	**Ganador**
CI_{50} *G. lamblia* (μM)	0.083 ± 0.013	0.189 ± 0.011	
DE_{50} *G. lamblia* (μg/kg)	5	55	
IS (CC_{50} HaCaT/CI_{50} *G. lamblia*)	7083	603	
IS (CC_{50} HaCaT/CI_{50} *G. lamblia*)	3768	407	
Solubilidad acuosa ≥ 60 μg/mL	245.74 ± 4.07	10.55 ± 0.70	
ΔG β-tubulina (kcal/mol)	-14.09 ± 3.65	-11.57 ± 3.76	
Perfil farmacocinético			
ClogP (2-3)	2.91	2.08	

9. CONCLUSIONES

- A través de un análisis de consenso farmacológico se seleccionaron a los bencimidazoles azufrados con las mejores características en el perfil biofarmacéutico, ADMET y farmacodinámico, obteniendo *hits* computacionales seguros, en donde se priorizo su síntesis y evaluación biológica.
- Se sintetizaron y caracterizaron 13 compuestos de tipo bencimidazol azufrados con tiempos de reacción adecuados y rendimientos razonables.
- La mayoría de compuestos evaluados fueron 3.5 veces más activos que el **ABZ** en un estudio de susceptibilidad *in vitro* sobre *G. lamblia*, destacando que todos exhibieron una potencia en el orden nanomolar, catalogándolos como compuestos líderes.
- El compuesto **CON-8** denominado **RetroABZ**, fue 11 veces más activo que el **ABZ** en un estudio *in vivo* sobre un modelo murino parasitado con trofozoítos de *G. lamblia.*
- El **RetroABZ** tuvo una solubilidad acuosa experimental de 245.74 $\pm$ 4.07 μg/mL., lo cual representa un aumento del 23 veces respecto a la obtenida del **ABZ** (10.55 $\pm$ 0.70 μg/mL).
- Los intercambios de las cadenas laterales del **ABZ**, favorecieron la actividad biológica y la solubilidad acuosa en el **RetroABZ**, haciéndolo una opción para las parasitosis invasivas.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de nucleación de la tubulina para evaluar la inhibición de la polimerización de la tubulina.

- Corroborar el perfil toxicológico de los compuestos más prometedores **CON-7**, **CON-8** y **CON-9**, de manera experimental.

- Realizar estudios de evaluación *in vivo* para conocer su efecto en parasitosis invasivas.

- Realizar estudios de solubilidad termodinámica del compuesto **CON-7** Y **9**, para determinar su solubilidad acuosa.

11. PARTE EXPERIMENTAL

11.1 Instrumentos

La síntesis se realizó con una parrilla de calentamiento y agitación magnética marca IKA C-MAG® y matraces bola de 25 y 50 mL, acondicionados con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo.

Para la extracción del disolvente de las reacciones se utilizó un rotaevaporador marca Büchi® acoplado a vacío con una bomba de alto vacío marca Büchi®

Para la determinación de los puntos de fusión de compuestos se hizo uso del aparato Stanford Research System, modelo EZ-Melt®

11.2 Cromatografía en capa fina

Para monitorear el avance de las reacciones químicas se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de aluminio de 2 x 4 cm recubiertas con gel de sílice. Las placas se revelaron con una lámpara de luz ultravioleta UV-254/366 nm, para la elución de las placas cromatográficas se emplearon las fases móviles presentadas en la **Tabla 37**.

Tabla 37. Sistemas empleados en el monitoreo de la síntesis química de los compuestos.

Sistema	Proporción	Composición
I	80:20	Hexano: Acetato de etilo
II	50:35:15	Hexano: Cloroformo: Acetato de etilo
III	50:45:05	Hexano: Acetato de etilo: Metanol

11.3 Síntesis de los compuestos finales

11.3.1 5-Nitro-1*H*-bencimidazol-2-tiol (CON-1)

Inicialmente, se preparó una mezcla de KOH (2.91 g, 52.2 mmol, 2 equiv) en etanol como disolvente y se adicionó CS_2 (1,89 mL, 31.3 mmol, 1.2 equiv). La mezcla de reacción resultante se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 4-Nitro-*o*-fenilendiamina (4 g, 26,1 mmol), y la mezcla se agitó y se pasó a reflujo durante 12 horas. Después de completar la reacción, se realizó la neutralización a pH 7 utilizando una solución de ácido clorhídrico al 10%. Luego se eliminó el disolvente utilizando un sistema de alto vacío, y el residuo resultante se suspendió en agua fría. Los sólidos se recuperaron posteriormente a través de la filtración y se recristalizaron con etanol, produciendo cristales amarillos con un 93 % de rendimiento (4,74 g), m.p. 264.5-266.1 °C. RMN de ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) 2,47 (*s*, 1H, SH) 7,26 (*d*, 1H, J_o = 8.8 Hz, H-7), 7.85 (*d*, 1H, J_m = 2,3 Hz, H-4), 8,04 (*dd*, 1H, J_m = 2,4, J_o = 8,6 Hz, H-6), ppm. RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) 105.1 (C-7), 109.7 (C-4), 119.4 (C-6) 132.8 (C-7a), 138.0 (C-3a), 143.0 (C-5), 172.3 (C-2) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 195 (M^+, 100%), 149 (M-46, 38%).

11.3.2 5-Nitro-2-(propiltio)-1*H*-bencimidazol (CON-2)

Inicialmente, se preparó una solución de **CON-1** en acetonitrilo, a la que se añadió K_2CO_3 (1.41 g, 10,2 mmol, 2 equiv) diluido en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota, una mezcla de cloruro de propilo (0.44 g, 5.63 mmol, 1.1 equiv) diluido en

acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 12 horas en condiciones de reflujo. El disolvente se eliminó utilizando un sistema de alto vacío, y el residuo se suspendió en agua fría. Los componentes sólidos se recuperaron a través de la filtración, y el producto se recristalizó a partir de etanol, dando un sólido amarillo, un rendimiento del 90 % (1,09 g), m.p. 91,9-93.7 °C. ^{1}H RMN (600 MHz, DMSO-d_6) 1.07 (*t*, 3H, J_o = 7.4 Hz, H-3′) 1.80 (*sext*, 2H, J_o = 7.3 Hz, H-2′), 3.29 (*t*, 2H, J_o = 7.2 Hz, H-1′),7.50 (*d*, 1H, J_o =8.8 Hz, H-7),8.09 (*dd*, 1H, J_m = 2.1 Hz, J_o = 8.8 Hz, H-6), 8.30 (*s*, 1H, H-4), ppm. RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) 12,0 (C-3′), 22.7 (C-2′), 33,2 (C-1′) 109,8 (C-7), 112.6 (C-4), 117,5 (C-6), 143.0 (C-5), 157,1 (C-2) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 237 (M+, 18 %), 195 (M-42, 100%).

11.3.3 2-(Propiltio)-1*H*-bencimidazol-5-amina (CON-2red)

A una mezcla de **CON-2** (1 g, 4,2 mmol) en etanol, se añadió Sn^0 (3 g, 25,2 mmol, 6 equiv) y HCl concentrado (7 equiv, 721 μl); la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla se agitó a reflujo durante 12 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución saturada de $NaHCO_3$, se filtró a vacío y el producto líquido de la amina se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción, debido a su inestabilidad química.

11.3.4 5-Nitro-1-propil-2-(propiltio)-1*H*-bencimidazol (CON-3)

Inicialmente, se preparó una solución de **CON-2** en acetonitrilo, a la que se añadió KOH (0.82 g, 20.5 mmol, 4 equiv) diluido en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota,

una mezcla de cloruro de propilo (0.88 g, 11,3 mmol, 2.2 equiv) diluido en acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 12 horas en condiciones de reflujo. El disolvente se eliminó utilizando un sistema de alto vacío, y el residuo se suspendió en agua fría. Los componentes sólidos se recuperaron a través de la filtración, y el producto se recristalizó a partir de etanol, dando un sólido amarillo, un rendimiento del 90 % (1,09 g), m.p. 91,9-93.7 °C.

11.3.5 2-(Etiltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol (CON-4)

Inicialmente, se preparó una solución de **CON-1** (1.5 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo como disolvente, a la que se añadió K_2CO_3 (2.12 g, 15,33 mmol, 2 equiv) diluido en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota, una mezcla de yoduro de etilo (1.19 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 8 horas en condiciones de reflujo. El disolvente se eliminó utilizando un sistema de alto vacío, y el residuo se suspendió en agua fría. Los componentes sólidos se recuperaron a través de la filtración, y el producto se recristalizó a partir de etanol, dando un sólido amarillo, un rendimiento del 88 %, un punto de fusión de 191.1-193.3 : ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d6) 1.38 (*t*, 3H, H-2') 3.31 (*q*, 2H, H-1'), 7.55 (*dd*, 1H, H-6), 8.02 (*d*, 1H, H-7), 8.27 (*s*, 1H, H-4), ppm; 13C NMR (40 MHz, DMSO-d6) 15.0 (C-2'), 25.5 (C-1'), 110.1 (C-7), 113.3 (C-4), 117.2 (C-6), 139.9 (C-7a), 141.8 (C-3a), 144.4 (C-5), 157.0 (C-2) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 223 (M+, 100), 195 (95).

11.3.6 2-(Etiltio)-1*H*-bencimidazol-5-amina (CON-4red)

A una mezcla de **CON-4** (1 g, 5.17 mmol, 1 equiv) en etanol, se añadieron Sn^0 (3.7 g, 31.0 mmol, 6 equiv) y HCl concentrado (1.31 g, 36.19 mmol, 7 equiv); la mezcla

de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla se agitó a reflujo durante 12 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución saturada de $NaHCO_3$, se filtró a vacío y el producto líquido de la amina se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción, debido a su inestabilidad química.

11.3.7 2-(Isopropiltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol (CON-5)

Se preparó una solución de **CON-1** (1.5 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo como disolvente, a la que se añadió K_2CO_3 (2.12 g, 15,33 mmol, 2 equiv) diluido en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota, una mezcla de yoduro de isopropilo (1.30 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 10 horas en condiciones de reflujo. El disolvente se eliminó utilizando un sistema de alto vacío, y el residuo se suspendió en agua fría. Los componentes sólidos se recuperaron a través de la filtración, y el producto se recristalizó a partir de etanol, dando un sólido amarillo, un rendimiento del 89 %, un punto de fusión de 187.4-189.1 ◦C: 1H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 1.49 (*d*, 6H, H-2', H-3') 4.13 (*sept*, 1H, H-1'), 7.49 (*s*, 1H, H-7), 8.15 (*dd*, 1H, J_o=8.8, J_m=2.1, H-6), 8.50 (*s*, 1H, H-4) ppm; 13C NMR (77.3 MHz, $CDCl_3$) 23.8 (C-2', 3'), 39.1 (C-1'), 118.7 (C-4, C-6, C-7) 130.1 (C-7a), 132.4 (C-3a), 134.0 (C-5), 143.4 (C-2) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 237(M+, 30), 195 (100), 149 (65).

11.3.8 2-(Isopropiltio)-1*H*-bencimidazol-5-amina (CON-5red)

A una mezcla de **CON-4** (1.5 g, 6.32 mmol, 1 equiv) en etanol, se añadieron Sn^0 (4.5 g, 37.9 mmol, 6 equiv) y HCl concentrado (1.61 g, 44.24 mmol, 7 equiv); la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla se agitó a reflujo durante 12 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución saturada de $NaHCO_3$, se filtró a vacío y el producto líquido de la amina se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción, debido a su inestabilidad química.

11.3.9 2-(Metiltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol (CON-6)

Se preparó una solución de **CON-1** (1.5 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo como disolvente, a la que se añadió K_2CO_3 (2.12 g, 15,33 mmol, 2 equiv) diluido en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota, una mezcla de yoduro de metilo (1.09 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 8 horas en condiciones de reflujo. El disolvente se eliminó utilizando un sistema de alto vacío, y el residuo se suspendió en agua fría. Los componentes sólidos se recuperaron a través de la filtración, y el producto se recristalizó a partir de etanol, dando un sólido amarillo, un rendimiento del 83 %, un punto de fusión de 179.9-182.6 ◦C: ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 2.73 (*s*, 3H, H-1') 7.58 (*d*, 1H, J_o=8.8, H-7), 8.05 (*dd*, 1H, J_o=8.8, J_m=2.2, H-6), 8.29 (*s*, 1H, H-4) ppm; 13C NMR (40 MHz, DMSO-d6) 13.7 (C-1'), 110.0 (C-7) 113.28 (C-4), 117.35 (C-6), 142.0 (C-5, C-3a, C-7a), 157.6 (C-2) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 209 (M+, 100), 163 (45), 148 (20).

11.3.10 2-(Metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-amina (CON-6red)

A una mezcla de **CON-6** (1.5 g, 8.37 mmol, 1 equiv) en etanol, se añadieron Sn^0 (5.96 g, 50.21 mmol, 6 equiv) y HCl concentrado (2.13 g, 58.6 mmol, 7 equiv); la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla se agitó a reflujo durante 12 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución saturada de $NaHCO_3$, se filtró a vacío y el producto líquido de la amina se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción, debido a su inestabilidad química.

11.3.11 2-(Benciltio)-5-nitro-1*H*-bencimidazol (CON-7)

Se preparó una solución de **CON-1** (1.5 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo como disolvente, a la que se añadió K_2CO_3 (2.12 g, 15,33 mmol, 2 equiv) diluido en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota, una mezcla de cloruro de bencilo (0.97 g, 7.68 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 8 horas en condiciones de reflujo. El disolvente se eliminó utilizando un sistema de alto vacío, y el residuo se suspendió en agua fría. Los componentes sólidos se recuperaron a través de la filtración, y el producto se recristalizó a partir de etanol, dando un sólido amarillo, un rendimiento del 88 %, un punto de fusión de 273.9-275.1 ◦C: 1H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 4.62 (*s*, 2H, H-8), 7.24-7.32 (*m*, 3H, H-3', H-4', H-5'), 7.47 (*d*, 2H, J_o=7.1, H-2', H-6'), 7.59 (*d*, 1H, J_o=8.2, H-7), 8.04 (*dd*, 1H, J_o=8.8, J_m=2.0, H-6), 8.31 (*S*, 1H, H-4) ppm; 13C NMR (40 MHz, DMSO-d6) 35 (C-8), 110.3 (C-7), 113.4 (C-4), 117.4 (C-6), 127.5 (C-3', 5') 128.9 (C-2', C-6'), 129.4 (C-1'), 137.2 (3a, 7a), 142.1 (C-5), 156.3 (C-2) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 285 (M+, 47), 91 (100).

11.3.12 Síntesis de: (2-(propiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de metilo CON-8 (RetroABZ)

A una solución de **CON-2red** (1 g, 4,8 mmol) en CH_2Cl_2, se añadió una mezcla del correspondiente cloroformiato de metilo (0,5 g, 4,8 mmol, 1 equiv) diluido en CH_2Cl_2. Esta mezcla se agitó a 2-3 ◦C durante 8 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución de $NaHCO_3$, el disolvente se eliminó con un sistema de alto vacío y el residuo se suspendió en agua fría. Los sólidos se recuperaron con filtración y se purificaron con una columna de cromatografía, dando un sólido marrón con m.p. 179.5-183.5 ◦C, con rendimiento del 72 % (0,92 g). ^{1}H RMN (600 MHz, DMSO-d_6) 0,99 (*t*, 3H, J_o = 7,3 Hz, H-3′) 1.71 (*sext*, 2H, J_o = 7.3 Hz, H-2′), 3.47 (*t*, 2H, J_o = 7.2 Hz, H-1′), 7.41 (*dd*, 1H, J_m = 2.0, J_o = 8.8, H-6), 7.56 (d, ^{1}H, J_o = 8.8 Hz, H-7), 7.94 (*s*, 1H, H-4), 9.98 (*s*, 1H, carbamato) ppm; ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) 13.2 (C-3′), 23.0 (C-2′), 34.5 (C-1′), 52.3 (C-5′), 101.8 (C-4), 113.8 (265 (M^+, 16%), 223 (M-42, 20%), 191 (M-74, 100%).

11.3.13 Síntesis de: (2-(Propiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de 2-metoxietilo (CON-2)

A una solución de **CON-2red** (1 g, 4,82 mmol) en CH_2Cl_2, se añadió una mezcla del correspondiente cloroformiato de 2-metoxietilo (0,67 g, 4,82 mmol, 1 equiv) diluido en CH_2Cl_2. Esta mezcla se agitó a 2-3 ◦C durante 8 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución de $NaHCO_3$, el disolvente se eliminó con un sistema de alto vacío y el residuo se suspendió en agua fría. Los sólidos se recuperaron con filtración y se purificaron con una columna de cromatografía, dando un sólido marrón con m.p. 144.4-147.4 °C, rendimiento del 68 % (1.014 g). ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 1.09 (*t*, 3H, H-3') 1.81 (*sext*, 2H, H-2'), 3.36 (*s*, 3H, H-7'), 3.52 (*t*, 2H, H-1'), 3.63 (*t*, 2H, H-6'), 4.28 (*t*, 2H, H-5'), 7.48 (*dd*, 1H, H-6), 7.55

(*d*, 1H, H-7), 8.07 (*s*, 1H, H-4), 9.95 (*s*, 1H, carbamato) ppm; 13C NMR (40 MHz, DMSO-d_6) 11.3 (C-3'), 21.2 (C-2'), 33.0 (C-1'), 56.7 (C-7'), 62.0 (C-5'), 68.8 (C-6'), 99.9 (C-4), 111.4 (C-7), 115.5 (C-6), 126.1 (C-5), 131.1 (C-7a), 136.0 (C-3a), 147.8 (C-2), 152.0 (C=O) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 233 (27), 191 (100).

11.3.14 Síntesis de: (2-(etiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de metilo (CON-4)

A una solución de **CON-4red** (1 g, 5.17 mmol) en CH_2Cl_2, se añadió una mezcla del correspondiente cloroformiato de metilo (0.488 g, 5.17 mmol, 1 equiv) diluido en CH_2Cl_2. Esta mezcla se agitó a 2-3 ◦C durante 8 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución de $NaHCO_3$, el disolvente se eliminó con un sistema de alto vacío y el residuo se suspendió en agua fría. Los sólidos se recuperaron con filtración y se purificaron con una columna de cromatografía, dando un sólido marrón con m.p. 191.1-193.3 °C, rendimiento del 88 % (1.14 g). ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 1.33 (*t*, 3H, H-2') 3.23 (*q*, 2H, H-1'), 3.65 (*s*, 3H, H-4'), 7.11 (*dd*, 1H, H-6, J_o=8.8, J_m=2.0), 7.31 (*d*, 1H, H-7, J_o=8.8), 7.65 (*s*, 1H, H-4), 9.56 (*s*, 1H, carbamato) ppm; ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) 15.2 (C-2'), 25.6 (C-1'), 51.5 (C-4'), 109.0 (C-4), 113.3 (C-7), 117.8 (C-6), 133.5 (C-7a, 5), 149.6 (C-3a), 154.2 (C-2), 162.3 (C=O) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 233 (27), 191 (100).

11.3.15 Síntesis de: (2-(etiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il)carbamato de 2-metoxietilo (CON-5)

A una solución de **CON-4red** (1 g, 5.17 mmol) en CH_2Cl_2, se añadió una mezcla del correspondiente cloroformiato de 2-metoxietilo (0.488 g, 5.17 mmol, 1 equiv) diluido

en CH_2Cl_2. Esta mezcla se agitó a 2-3 ◦C durante 8 horas. Al final de la reacción, se neutralizó a pH 7 con una solución de $NaHCO_3$, el disolvente se eliminó con un sistema de alto vacío y el residuo se suspendió en agua fría. Los sólidos se recuperaron con filtración y se purificaron con una columna de cromatografía, dando un sólido marrón con m.p. 187.4-189.1 °C, rendimiento del 89 % (1.36 g). ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 4.65 (*t*, 3H, H-2') 6.06 (*q*, 2H, H-1'), 7.23 (*s*, 3H, H-6'), 8.28 (*t*, 2H, 5'), 8.92 (*t*, 2H, 4'), 11.74 (*dd*, 1H, H-6, J_o=8.6, J_m=2.0), 11.85 (*s*, 1H, H-4), 12.04 (*d*, 1H, H-7, J_o=8.6), 12.45 (*s*, 1H, carbamato) ppm; ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) 20.0 (C-2'), 25.6 (C-1'), 31.1 (C-1'), 63.3 (C-6'), 68.1 (C-4'), 75.5 (C-5'), 114.6 (C-4), 118.4 (C-7), 122.0 (C-6), 138.7 (C-5), 140.5 (C-7a), 144.8 (C-3a), 154.3 (C-2), 158.7 (C=O) ppm; MS: m/z (% rel. int.) 233 (27), 191 (100).

12. ANEXO

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Enhancing Giardicidal Activity and Aqueous Solubility through the Development of "RetroABZ", a Regioisomer of Albendazole: In Vitro, In Vivo, and In Silico Studies †

Carlos Martínez-Conde [1], Blanca Colín-Lozano [1], Abraham Gutiérrez-Hernández [1], Emanuel Hernández-Núñez [2], Lilián Yépez-Mulia [3], Luis Fernando Colorado-Pablo [4], Rodrigo Aguayo-Ortiz [4], Jaime Escalante [5], Julio C. Rivera-Leyva [1], Jessica Nayelli Sánchez-Carranza [1], Elizabeth Barbosa-Cabrera [6] and Gabriel Navarrete-Vazquez [1,*]

1 Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; mcc_ff@uaem.mx (C.M.-C.); clbi_ff@uaem.mx (B.C.-L.); ghaa_ff@uaem.mx (A.G.-H.); julio.rivera@uaem.mx (J.C.R.-L.); jessica.sanchez@uaem.mx (J.N.S.-C.)
2 Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, Unidad Mérida, Merida 97310, Yucatán, Mexico; emanuel.hernandez@cinvestav.mx
3 Unidad de Investigación Medica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Unidad Médica de Alta Especialidad-Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City 06720, Mexico; lilianyepez@yahoo.com
4 Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico City 04510, Mexico; fernando1303@comunidad.unam.mx (L.F.C.-P.); rodaguayo@comunidad.unam.mx (R.A.-O.)
5 Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; jaime@uaem.mx
6 Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, IPN, Mexico City 11340, Mexico; rebc78@yahoo.com.mx
* Correspondence: gabriel_navarrete@uaem.mx; Tel.: +52-777-329-7089 (ext. 2322)
† Taking in part of the Ph.D. thesis of C. Martinez-Conde.

Abstract: Parasitic diseases, including giardiasis caused by *Giardia lamblia* (*G. lamblia*), present a considerable global health burden. The limited effectiveness and adverse effects of current treatment options underscore the necessity for novel therapeutic compounds. In this study, we employed a rational design strategy to synthesize retroalbendazole (**RetroABZ**), aiming to address the limitations associated with albendazole, a commonly used drug for giardiasis treatment. **RetroABZ** exhibited enhanced in vitro activity against *G. lamblia* trophozoites, demonstrating nanomolar potency (IC_{50} = 83 nM), outperforming albendazole (189 nM). Moreover, our in vivo murine model of giardiasis displayed a strong correlation, supporting the efficacy of **RetroABZ**, which exhibited an eleven-fold increase in potency compared to albendazole, with median effective dose (ED_{50}) values of 5 μg/kg and 55 μg/kg, respectively. A notable finding was **RetroABZ**'s significantly improved water solubility (245.74 μg/mL), representing a 23-fold increase compared to albendazole, thereby offering potential opportunities for developing derivatives that effectively target invasive parasites. The molecular docking study revealed that **RetroABZ** displays an interaction profile with tubulin similar to albendazole, forming hydrogen bonds with Glu198 and Cys236 of the β-tubulin. Additionally, molecular dynamics studies demonstrated that **RetroABZ** has a greater number of hydrophobic interactions with the binding site in the β-tubulin, due to the orientation of the propylthio substituent. Consequently, **RetroABZ** exhibited a higher affinity compared to albendazole. Overall, our findings underscore **RetroABZ**'s potential as a promising therapeutic candidate not only for giardiasis but also for other parasitic diseases.

Keywords: benzimidazole; giardicidal; albendazole; solubility; docking

check for updates

Citation: Martínez-Conde, C.; Colín-Lozano, B.; Gutiérrez-Hernández, A.; Hernández-Núñez, E.; Yépez-Mulia, L.; Colorado-Pablo, L.F.; Aguayo-Ortiz, R.; Escalante, J.; Rivera-Leyva, J.C.; Sánchez-Carranza, J.N.; et al. Enhancing Giardicidal Activity and Aqueous Solubility through the Development of "RetroABZ", a Regioisomer of Albendazole: In Vitro, In Vivo, and In Silico Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14949. https://doi.org/10.3390/ijms241914949

Academic Editor: Renata Tisi

Received: 18 September 2023
Revised: 3 October 2023
Accepted: 4 October 2023
Published: 6 October 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Parasitic diseases have emerged as a significant worldwide public health concern, affecting millions of individuals [1]. These diseases are being increasingly favored by various factors, including environmental and climate changes, overpopulation, and globalization [2]. Notably, certain parasitic diseases caused by protozoa fall under the category of neglected tropical diseases, often closely associated with poor hygiene and sanitation conditions [3]. Among these diseases, giardiasis, caused by *G. lamblia* (also known as *Giardia duodenalis* or *Giardia intestinalis*), was classified as a neglected tropical disease in 2004 [4]. Giardiasis stands as the most prevalent protozoan infection in humans, with more than 200 million people worldwide [5], with 50% to 75% of cases resulting from asymptomatic infection [6]. Chronic *Giardia* infections predominantly affect pediatric populations and are linked to persistent diarrhea, growth failure, and cognitive function alterations [5,7]. Currently, several drugs are available for treating symptomatic giardiasis, primarily belonging to the nitroimidazole class, such as metronidazole, tinidazole, secnidazole, and nitazoxanide of the nitrothiazole chemotype [8,9]. However, their clinical utility is limited due to side effects and the emergence of clinical resistance [10]. Alternatively, benzimidazole compounds, namely albendazole and mebendazole, have been reported for their potential in *Giardia* treatment. The compounds of interest, benzimidazole derivatives, demonstrate a lower toxicity profile compared to nitroimidazole-type compounds, making them potential alternatives for helminth and protozoan treatment [11]. Previous reports have supported the therapeutic potential of benzimidazole derivatives in this regard [8,9,12,13]. However, recent investigations have reported resistance of *G. lamblia* to benzimidazole-2-carbamate compounds associated with mutations in β-tubulin E198K [14]. In addition to the above, these compounds suffer from limited water solubility. For instance, albendazole, with a reported solubility of 0.2 μg/mL, exhibits poor gastrointestinal tract absorption, resulting in an oral bioavailability of merely 5%, thereby restricting its use in treating systemic infections [15,16]. The emergence of drug resistance poses a significant obstacle in mitigating the effects of *G. lamblia* infection. Furthermore, the hindered oral bioavailability resulting from its low water solubility exacerbates this issue. Hence, there is an imperative to devise novel compounds with promising antiparasitic properties. In this study, we address these limitations by reporting the design and synthesis of a novel regioisomer compound named **RetroABZ** that involves modifying the position of the side groups of albendazole (Figure 1).

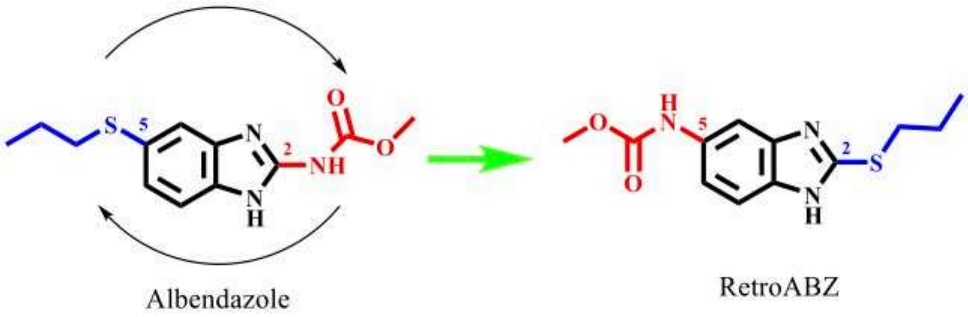


Figure 1. Design of albendazole regioisomer: **RetroABZ**.

RetroABZ is an outcome of a well-thought-out rational design approach that addresses the limitations of current compounds used for treating parasitosis. Albendazole, a broad-spectrum active ingredient effective against parasitic infestations in both humans and animals, suffers from significant drawbacks such as poor solubility and low oral bioavailability. The limited water solubility of benzimidazole carbamates is attributed to the existence of intermolecular hydrogen bonds. Recent research indicates that albendazole's desmotropy arises from its polymorphic nature, wherein two distinct dimeric conformations, namely forms I and II, coexist [17] (Figure 2).

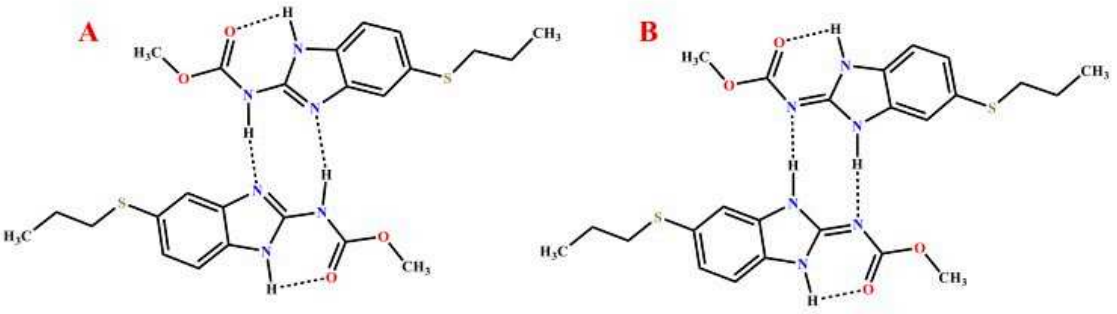


Figure 2. Dimeric structure of desmotropes (**A**) albendazole I and (**B**) albendazole II, adapted from ref. [17].

The presence of intermolecular hydrogen bonding in these dimers is a notable feature, and it is believed that these dimeric networks play a role in the low aqueous solubility of albendazole. To address this limitation, in the present study, the development of a regioisomer of albendazole was pursued, involving modifications to the position of the side groups of the benzimidazole core, with the aim to disrupt the formation of dimeric conformations and consequently enhance the solubility of the new compound named **RetroABZ**, while maintaining or possibly increasing its antiparasitic activity. Herein, we present the collection of in vitro antiprotozoal evaluations combined with in silico and in vivo estimations leading to the concept of in combo screening in drug discovery [18]. This research reflects their dedicated endeavor towards rational drug design with the ultimate goal of enhancing therapeutic agents. Antiparasitic drugs are essential for controlling infections stemming from a range of protozoa, helminths, and ectoparasites. The choice of treatment is dependent upon the particular causative agent within each category. While there exists a repertoire of available drugs, they are not without significant drawbacks, including issues of low solubility and limited bioavailability. Additionally, the emergence of drug resistance poses a substantial concern.

2. Results and Discussion

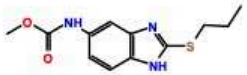
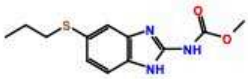
2.1. Drug Design and Chemical Synthesis

In this study, a novel compound, **RetroABZ**, was designed and synthesized as an albendazole regioisomer and evaluated for its potential as a giardicidal agent. The key characteristic of **RetroABZ** is the exchange of side groups with albendazole, aiming to enhance its biopharmaceutical properties, particularly solubility, while maintaining or possibly increasing its antiparasitic activity. Prior studies have indicated that the poor aqueous solubility of benzimidazole-2-carbamates may result from intramolecular and intermolecular hydrogen bonding, leading to dimeric arrangements known as desmotropes of albendazole [17]. Desmotropy, an infrequent phenomenon associated with tautomerism, involves both tautomeric forms being isolable in the solid state. With the regioisomer design, **RetroABZ**, involving the interchange of substituents at positions 2 and 5 of the benzimidazole core, the potential disruption of intramolecular and intermolecular hydrogen bonds may lead to the loss of the crystalline structure, thereby improving its biopharmaceutical properties. Compound **1** (**RetroABZ**) was obtained in four steps, with good yield and reasonable reaction time. The spectroscopic and spectrometric studies were consistent with the expected structure.

2.2. In Vitro Activity against Giardia lamblia

The bioassay results against *G. lamblia* are presented in Table 1. **RetroABZ** demonstrated a giardicidal potency in the nanomolar range with a median inhibitory concentration (IC_{50}) of 83 nM, meanwhile albendazole displayed an IC_{50} value of 196 nM. **RetroABZ** exhibited higher giardicidal activity than albendazole, being 2.4 times more active than albendazole.

Table 1. Physicochemical properties, in vitro bioactivity, and cytotoxicity of **RetroABZ** and reference compound albendazole.

Compound	Mp (°C)	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)		Selectivity Index CC_{50}/IC_{50}	
		G. lamblia	Huh-7	HaCaT	Huh-7	HaCaT
 **RetroABZ**	179.5–183.5	0.083 ± 0.013	312.8 ± 22.2	587.94 ± 18.47	3768	7083
 Albendazole	209.1–210.5	0.196 ± 0.011	79.71 ± 1.0	118.2 ± 1.0	407	603

2.3. Cytotoxicity in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line and Immortalized Human Keratinocytes

The cytotoxicity of **RetroABZ** against a human hepatocellular carcinoma cell line (Huh-7) and immortalized human keratinocytes (HaCaT) was evaluated (Table 1), revealing a very low median cytotoxic concentration (CC_{50} > 300 μM). The selection of Huh-7 cells in toxicological analyses stems from their metabolic profiles, which closely parallel those of typical hepatocytes. This metabolic resemblance is pivotal for accurate assessments of potential toxic biotransformation. The selectivity index (SI), calculated as the ratio of cytotoxicity to biological activity (SI = CC_{50} cells/IC_{50} parasites), is an indicator of whether the antiprotozoal activity of a compound is primarily due to its intrinsic cytotoxicity [19]. When the SI exceeds 10, it suggests that the antiprotozoal activity is not driven by the compound's cytotoxicity [20]. In the case of **RetroABZ**, its nanomolar giardicidal activity combined with its very low cytotoxic effect in both cell lines (Figure 3) resulted in a significantly high selectivity index, surpassing 3500. Comparatively, it has been reported that albendazole exhibits a cytotoxic concentration (CC_{50}) of 79.71 μM against Huh-7 and 118.2 μM vs. HaCaT [21]. These data imply that both **RetroABZ** and albendazole are much more selective against *G. lamblia* than against any mammalian cell.

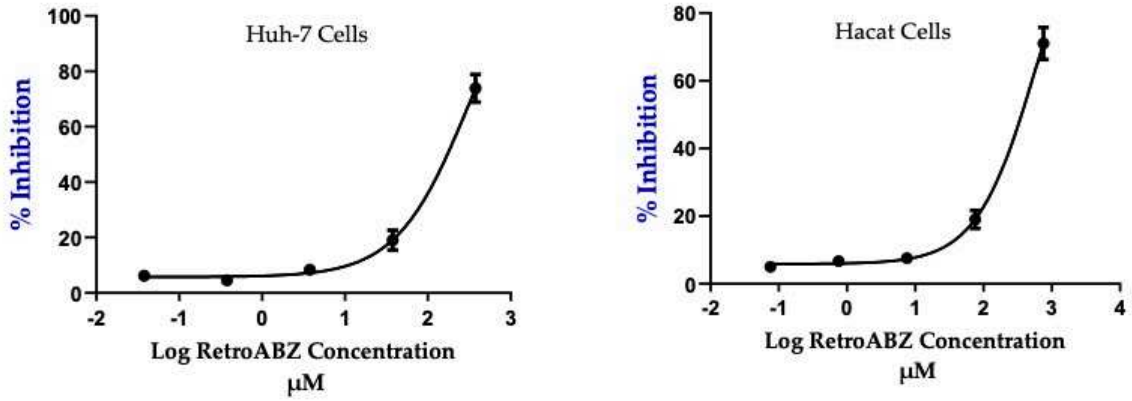


Figure 3. Cytotoxicity of **RetroABZ** in Huh−7 hepatic cells and HaCaT keratinocytes.

2.4. Giardicidal Activity of *RetroABZ* in a Murine Model of Giardiasis

The antiprotozoal activity of the compound **RetroABZ** was evaluated in CD-1 mice infected with *G. lamblia* trophozoites following the methodology previously reported [20]. Table 2 presents the ED_{50} values for the compounds assessed. **RetroABZ** exhibited remarkably higher potent in vivo activity against *G. lambia*, with an ED_{50} value of 5 μg/kg (18.84 nmol/kg) of body weight in comparison to albendazole (55 μg/kg). **RetroABZ** demonstrated 11 times higher giardicidal activity than the reference drug, albendazole.

Furthermore, **RetroABZ** exhibited 39-fold higher potency compared to metronidazole, which is another frequently prescribed drug for the treatment of giardiasis.

Table 2. In vivo assay (ED_{50}) of RetroABZ, albendazole, and metronidazole against *G. lamblia* (WB strain) in experimentally infected CD-1 mice.

Compound	ED_{50} (μg/kg)	ED_{50} (nmol/kg)
RetroABZ	5	18.8
Albendazole	55	207.3
Metronidazole	194	1133.5

2.5. Solubility

Chromatographic conditions were optimized to achieve a short runtime, adequate retention, and acceptable peak shapes. Thus, different compositions of the organic diluents and the aqueous part (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, *v*/*v*) were tested on a Phenomenex Luna C_{18} column. Finally, the most favorable separation for the analytes albendazole and **RetroABZ**, ensuring an adequate response and improved peak shape, was achieved using a mobile phase consisting of 60% methanol and 40% water (*v*/*v*) at a flow rate of 1 mL/min. Figure 4 illustrates the retention time for **RetroABZ** at 6.932 min, indicating a satisfactory outcome.

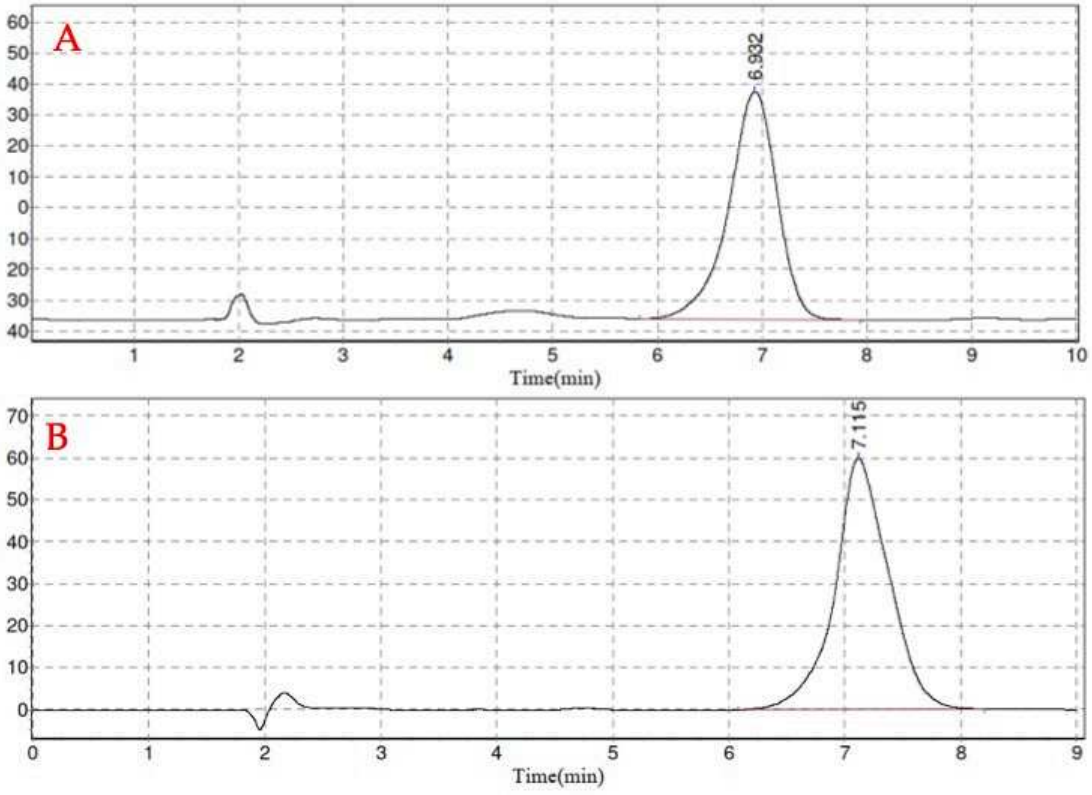


Figure 4. Retention time for **RetroABZ** (6.932 min, (**A**)) and albendazole (7.115 min, (**B**)).

The water solubility of **RetroABZ** at 37 °C is presented in Table 3. It is noteworthy that the solubility of this new benzimidazole derivative was remarkably higher, measuring 245.7 μg/mL, in contrast to the experimental solubility of albendazole (10.55 μg/mL), reflecting a substantial 23-fold increase. It is remarkable to acknowledge that prior researchers have documented the solubility of albendazole at 25 °C to be 0.02 μg/mL [22].

Table 3. Solubility of **RetroABZ** and albendazole in water.

Compound	Conditions	Solubility (μg/mL)
RetroABZ	37 ± 2 °C	245.74 ± 4.07
Albendazole	37 ± 2 °C	10.55 ± 0.70

The substantial enhancement in **RetroABZ**'s solubility could be attributed to the disruption of the crystal lattice formed with hydrogen bonds in albendazole desmotropes, which are no longer present when the carbamate substituent shifts from position 2 to position 5. This observation is further supported with the observed decrease of 30 °C in **RetroABZ**'s melting point, indicating a weakened crystal lattice compared to albendazole, as depicted in Figure 5.

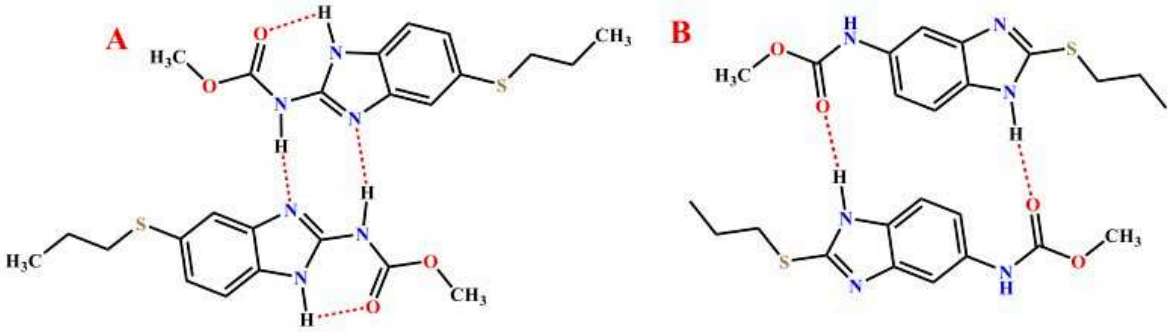


Figure 5. The potential disruption of inter– and intramolecular hydrogen bonds in the albendazole (**A**) and its regioisomer **RetroABZ** (**B**) may have an impact on their crystallinity, solubility, and melting point.

The efficacy of albendazole is frequently hindered by its limited intestinal absorption, primarily attributed to its low aqueous solubility. Enhancing its dissolution could potentially ameliorate this issue. This low water solubility leads to inadequate absorption from the gastrointestinal tract and consequently results in low oral bioavailability of albendazole (less than 5%), a substantial drawback for systemic use. Enhancing the aqueous solubility of small molecules is a pivotal approach to mitigate these challenges. One alternative strategy involves disrupting molecular planarity/symmetry [23]. The data obtained in the present study showcase a noteworthy enhancement in water solubility for **RetroABZ**, exhibiting a 23-fold increase when compared to albendazole. This advancement underscores the potential of **RetroABZ** as a significant improvement in this regard.

2.6. In Silico Pharmacokinetic Profile

The Lipinski rule of five has emerged as a significant parameter in rational drug development, yet its importance in the selection or discrimination of antiparasitic molecules has been subject to questioning. The strict application of these rules has led to the removal of numerous potential antiparasitic drugs from the priority list. Considering this aspect, an in silico pharmacological analysis was conducted to estimate the biopharmaceutical, pharmacodynamics, and pharmacokinetic profiles of the compounds. Previous studies have reported the use of an in silico pharmacological consensus analysis (PHACA), which combines biopharmaceutical, pharmacodynamic, pharmacokinetic, and toxic predictions to identify compounds with favorable properties [24]. For the estimation of the ADMET (absorption, distribution metabolism, excretion, and toxicity) profile of compounds **RetroABZ** and albendazole, the ADMETLab 2.0 (https://admetmesh.scbdd.com, accessed on 30 September 2022) predictor was utilized [25].

In the ADMET profile calculations (Table 4), **RetroABZ** exhibited substantial intestinal absorption prediction even better than that of albendazole, indicating a high likelihood of crossing the blood–brain barrier. The evaluation of distribution parameters, including plasma protein binding, ideally should be less than 95%, but interestingly, **RetroABZ** was the only compound that did not meet this criterion. Regarding metabolic stability, all compounds demonstrated low values as substrates for the primary metabolizing enzyme CYP3A4, while displaying higher values as substrates for the enzyme CYP2D6, which means that this enzyme will be the one that biotransforms the compound. Estimation of excretion parameters indicated satisfactory clearance values for both compounds, leading to a prolonged half-life of over 3 h. In terms of toxicity assessment, all compounds showed a low probability of hERG (human ether-a-go-go-related gene) channel blockade, indicating no cardiotoxicity. Furthermore, they exhibited low acute oral toxicity in rat models.

Table 4. Pharmacokinetic predictive values calculated with ADMETLab 2.0 for compounds **RetroABZ** and albendazole.

	Model	Compounds	
		RetroABZ 	**Albendazole** 
A	Gastrointestinal absorption	(+++)	(+)
	Blood–brain barrier permeant	(++)	(−−)
D	Plasma protein binding	96%	80%
	Volume distribution	0.68 L/kg	0.69 L/kg
M	CYP3A4 substrate	(−−) Low	(−−) Low
	CYP2D6 substrate	(++) Medium	(++) Medium
E	Clearance	6.0 mL/min/Kg	6.9 mL/min/Kg
	Half-life ($T_{\frac{1}{2}}$)	>3 h	>3 h
T	hERG blockers	(−−−)	(−−)
	Rat oral acute toxicity	(−−−)	(−−)

The prediction probability values are transformed into six symbols: 0–0.1 (−−−), 0.1–0.3 (−−), 0.3–0.5 (−), 0.5–0.7 (+), 0.7–0.9 (++), and 0.9–1.0 (+++).

2.7. Docking Studies

After conducting in vitro antiparasitic assays, computational investigations were carried out to explore the potential molecular-level mechanisms of action of **RetroABZ**. In this work, we conducted the molecular modeling studies using the α/β-tubulin heterodimer of *G. lamblia*. This choice was guided by the established connection with the original compounds, as various benzimidazole carbamate compounds like albendazole have demonstrated their effectiveness against *Giardia* by inhibiting β-tubulin polymerization [26]. While the benzimidazole binding site is primarily located in β-tubulin, the inclusion of α-tubulin in our model is justified due to its interaction with the H8 helix of the β monomer [27]. This interaction is pivotal in influencing pocket formation and water exposure [28]. Moreover, it is crucial to consider the α subunit during the docking studies to ensure that the ligand predominantly binds within the pocket rather than at the protein's interface. Figure 6 shows the outcomes of the molecular docking analysis, revealing that both **RetroABZ** and albendazole have the capability to bind within the same binding site in the β-tubulin as other carbendazim derivatives. The three-dimensional binding models for these compounds suggest the establishment of hydrogen bond (HB) interactions with the Glu198 side chain and Cys236 main chain. The CNN (convolutional neural networks) score demonstrated that both compounds exhibit similar affinities to the binding site.

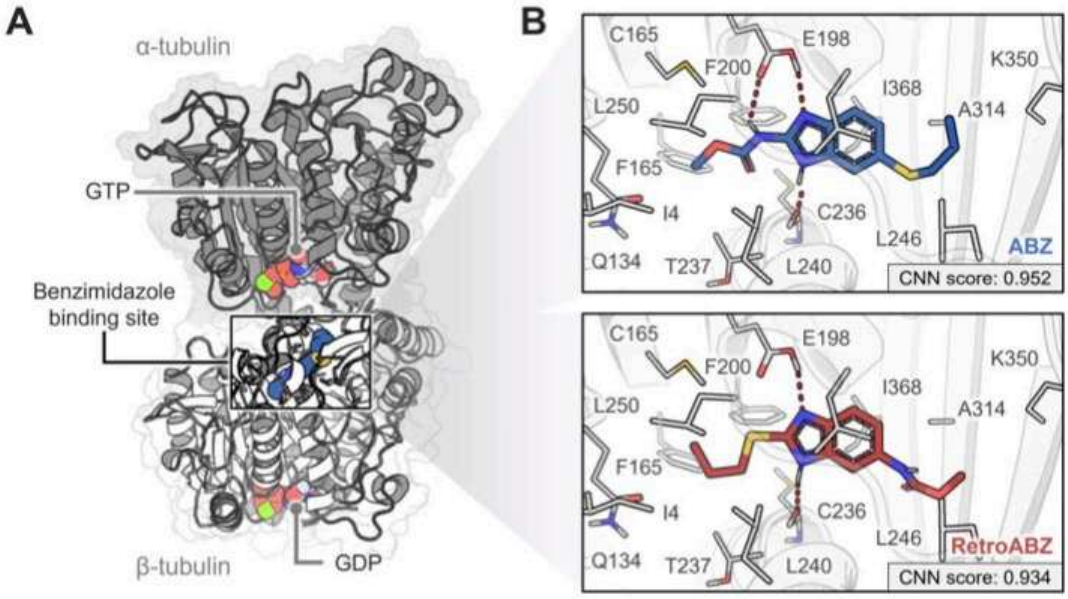


Figure 6. (**A**) Depiction of *G. lamblia* α/β-tubulin heterodimer model highlighting the binding sites of the GDP, GTP, and benzimidazoles (i.e., mebendazole, nocodazole, and parbendazole). (**B**) Binding mode of albendazole (upper panel) and **RetroABZ** (lower panel) at the benzimidazole-binding site.

2.8. Molecular Dynamics

To assess the stability of protein–ligand complexes, we conducted three independent 100 ns molecular dynamics (MD) simulations using the GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) program. Figure 7 presents the analysis of the MD simulations for both systems. The RMSD (root-mean-square deviation) of the α/β-tubulin backbone demonstrated that the heterodimer reached equilibrium within the simulated time in all three replicates for both systems. On the other hand, the ligand RMSD suggests that albendazole exhibits greater stability at the binding site, displaying minor conformational changes within 0.2 nm. In contrast, **RetroABZ** shows a semi-stable state after 60 ns of simulations in all three replicates. An analysis of the hydrogen bond interaction fraction (IF_{HB}) might indicate that the higher stability of albendazole compared to **RetroABZ** could be attributed to the former displaying hydrogen bonds with Glu198 and Cys236 for longer periods. This, in turn, led to a higher percentage of structures in the first cluster for albendazole. However, **RetroABZ** gains a clear advantage over albendazole by forming a greater number of hydrophobic interactions with the binding site. The benzimidazole site contains a deep region with numerous hydrophobic residues, typically accommodating the carbamate group. In the case of **RetroABZ**, the propylthio substituent is oriented towards this region, promoting interactions with the hydrophobic residues of this embedded pocket, and preserving the interactions formed with albendazole. Furthermore, the Molecular-Mechanics–Poisson–Boltzmann Surface Area (MM/PBSA) calculations demonstrated that these new hydrophobic interactions also resulted in a better affinity of **RetroABZ** ($\Delta G_{bind} = -14.09 \pm 3.65$ kcal/mol) compared to albendazole ($\Delta G_{bind} = -11.57 \pm 3.76$ kcal/mol). These findings suggest that these hydrophobic interactions could be responsible for the heightened antiparasitic effectiveness of **RetroABZ**. It is important to keep in mind that intermolecular interactions observed during molecular dynamics simulations should be interpreted with caution, as force fields typically involve estimation errors. In this case, the hydrogen bond formed between benzimidazole and the Glu198 residue may indeed have a longer average lifetime than estimated. Additionally, there might be other interactions like CH-π or π–π interactions that are not reliably analyzed using molecular mechanics approaches.

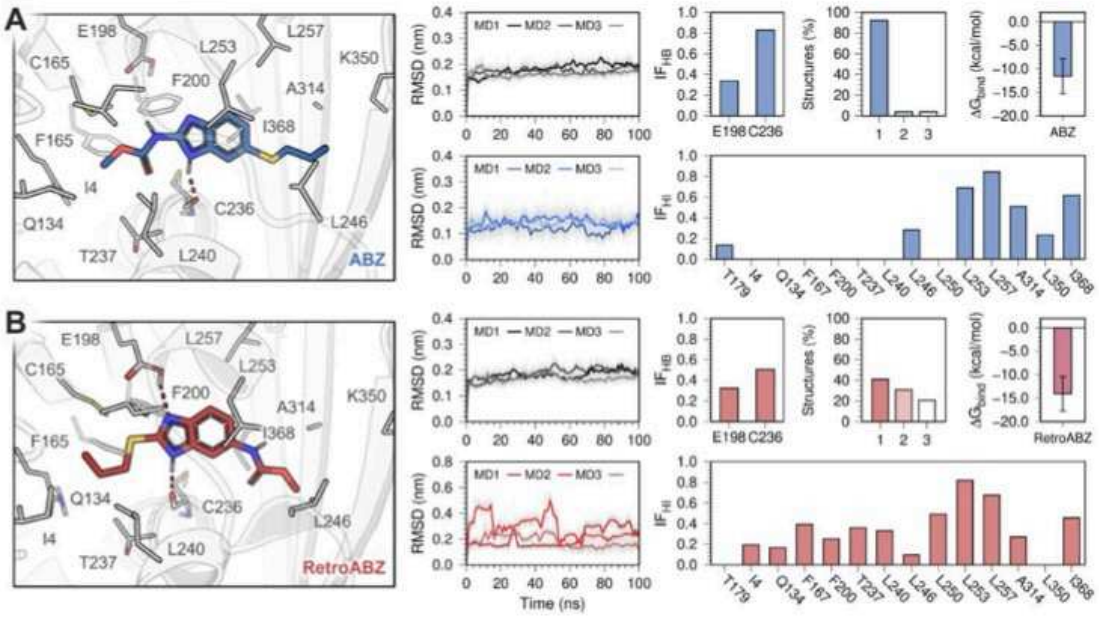


Figure 7. Analysis of the three independent 100 ns MD simulations of (**A**) albendazole and (**B**) **RetroABZ** complexed with *G. lamblia* α/β-tubulin model. On the left, the most representative binding mode extracted from the most populated cluster from the final 50 ns of the three MD simulations (MD1 to MD3). The graphs illustrate the RMSD of both the α/β-tubulin heterodimer backbone and the ligand throughout the 100 ns simulation. The plots on the right display the fraction of hydrophobic (IF_{HI}) and hydrogen bond (IF_{HB}) intermolecular interaction between the ligands and the protein, along with the percentage of structures occupying the first three clusters and the binding free energy computed via gmx_MMPBSA.

2.9. In Silico Pharmacological Consensus Analysis

To highlight the merits of the evaluated compound, an in silico pharmacological consensus analysis was conducted [24], taking into consideration the aforementioned results. As depicted in Table 5, **RetroABZ** displayed more favorable properties compared to albendazole, the reference drug used for treating giardiasis and the first-line agent for treating helminthic infections. **RetroABZ** exhibited 2.4 times greater in vitro activity against *G. lamblia* than albendazole, and the in vivo results exhibited a good correlation with the in vitro studies. It is worth noting that only a few adverse events related to albendazole treatment have been reported; however, most of these are associated with the use of high doses in systemic infections [29,30]. The notable improvement in the water solubility of **RetroABZ** creates opportunities for investigating new derivatives that can effectively target invasive parasites, addressing significant limitations associated with albendazole's poor water solubility.

Table 5. Consensus analysis of **RetroABZ** versus albendazole.

	RetroABZ	Albendazole	Winner
In vitro IC_{50} *G. lamblia* (μM)	0.083 ± 0.013	0.189 ± 0.011	
In vivo ED_{50} *G. lamblia* (μg/kg)	5	55	
SI CC_{50} HaCaT/IC_{50} *G. lamblia*	7083	603	
SI CC_{50} Huh-7/IC_{50} *G. lamblia*	3768	407	
Solubility ≥ 60 μg/mL	245.74 ± 4.07	10.55 ± 0.70	
In silico affinity ΔG_{bind} (kcal/mol)	−14.09 ± 3.65	−11.57 ± 3.76	
In silico pharmacokinetic profile			
ClogP (2–3)	2.91	2.08	**RetroABZ**

To visualize the pharmacological consensus analysis, we used a color code indicating chances that the compound has drug-like properties, as follows: green (very satisfactory) and red (unsatisfactory).

Several challenges might arise during further antiprotozoal drug development. It is crucial to refine lead compounds to align with specific product profiles, a step that frequently determines the pace of progress in drug discovery projects. Thorough evaluation in various animal models, with meticulous attention to formulation, will be essential. Notably, antiparasitic drug discovery and development do not primarily hinge on market forces. Therefore, it is imperative to engage the triple helix of academia, industry, and government, ensuring their collaborative involvement in the process.

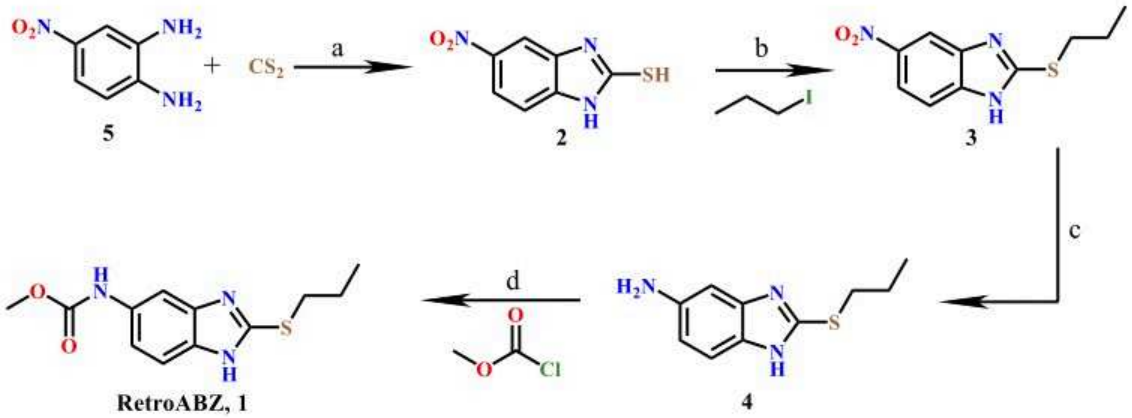
3. Materials and Methods

3.1. Chemicals and Analytical Methods

The starting materials and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA) and were utilized without any additional purification. Melting points were determined employing an EZ-Melt MPA120 automated melting point apparatus from Stanford Research Systems (Sunnyvale, CA, USA), and are uncorrected. Reactions were monitored using thin-layer chromatography on 0.2 mm precoated silica gel 60 F254 Merck plates (Darmstadt, Germany). ^{1}H NMR spectra were recorded on a Varian Oxford (600 MHz) spectrometer (Palo Alto, CA, USA), while ^{13}C NMR (150 MHz) spectra were acquired as well. Chemical shifts are expressed in ppm with respect to tetramethylsilane (Me_4Si, $\delta = 0$) in DMSO-d_6 and $CDCl_3$; *J* values are denoted in Hz. Abbreviations like *s* (singlet), *d* (doublet), *q* (quartet), *dd* (doublet of doublet), *t* (triplet), and *m* (multiplet) are used. Mass spectrometry data were obtained on a JEOL JMS-700 spectrometer (Tokyo, Japan) via electronic impact. Main spectra can be consulted in the Supplementary Material.

3.1.1. Chemical Synthesis

The sequence shown in Scheme 1 was followed. Compound **2** was prepared from 4-nitro-1,2-phenylenediamine (**5**) and a mixture of ethanol, potassium hydroxide, and carbon disulfide, to give 5-nitro-1*H*-benzo[d]imidazole-2-thiol (**2**). Subsequently, a mixture containing acetonitrile, potassium carbonate, and compound **2** was treated with propyl iodide, to afford 5-nitro-2-(propylthio)-1*H*-benzo[d]imidazole (**3**). The reduction of the nitro group was performed using a mixture of metallic tin, water, and hydrochloric acid at reflux, leading to 2-(propylthio)-1*H*-benzo[d]imidazol-5-amine (**4**). In the last step, amine **4** was reacted with methyl chloroformate in tetrahydofurane as a solvent at a low temperature to obtain the methyl carbamate **RetroABZ** (**1**).



Scheme 1. Reagent and conditions for the synthesis of **RetroABZ**: (**a**) EtOH, 2.5 equiv KOH, 80 °C, 12 h; (**b**) MeCN, K_2CO_3, 2–4 °C, 8 h; (**c**) EtOH, 6 equiv Sn^0, 7 equiv HCl, H_2O, 80 °C, 8 h; (**d**) THF, $NaHCO_3$, 2–4 °C, 8 h.

3.1.2. 5-Nitro-1*H*-benzo[d]imidazole-2-thiol (**2**)

The synthesis of compound **2** followed the method outlined by Van Allan [31]. Initially, a mixture of KOH (2.91 g, 52.2 mmol, 2 equiv) in ethanol was prepared, and CS_2 (1.89 mL,

31.3 mmol, 1.2 equiv) was subsequently added. The resulting reaction mixture was stirred for 15 min at room temperature. Next, 4-nitrobenzene-1,2-diamine (4 g, 26.1 mmol) was added, and the mixture was further stirred at reflux for 12 h. After completion of the reaction, neutralization to pH 7 was achieved using a 10% hydrochloric acid solution. The solvent was then removed utilizing a high-vacuum system, and the resulting residue was suspended in cold water. The solids were subsequently recovered through filtration and were recrystallized from ethanol, yielding 93% (4.74 g) of yellow crystals, m.p. 264.5-266.1 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 2.47 (*s*, 1H, SH) 7.26 (*d*, 1H, J_o = 8.8 Hz, H-7), 7.85 (*d*, 1H, J_m = 2.3 Hz, H-4), 8.04 (*dd*, 1H, J_m = 2.4, J_o = 8.6 Hz, H-6), ppm. ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) 105.1 (C-7), 109.7 (C-4), 119.4 (C-6) 132.8 (C-7a), 138.0 (C-3a), 143.0 (C-5), 172.3 (C-2) ppm; MS: *m/z* (% rel. int.) 195 (M^+, 100%), 149 (M-46, 38%).

3.1.3. 5-Nitro-2-(propylthio)-1*H*-benzo[d]imidazole (**3**)

Compound **3** was prepared following the procedure outlined by Soria-Arteche [32]. Initially, a solution of **2** in acetonitrile was prepared, to which K_2CO_3 (1.41 g, 10.2 mmol, 2 equiv) diluted in water was added. The reaction mixture was stirred for 15 min at room temperature. Subsequently, a mixture of the propyl iodide diluted in acetonitrile was added dropwise. The resulting mixture was stirred for 12 h at 2–3 °C. Thereafter, the solvent was removed using a high-vacuum system, and the residue was suspended in cold water. The solid components were recovered through filtration, and the product was recrystallized from ethanol, giving a yellow solid, yield 90% (1.09 g), m.p. 91.9–93.7 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 1.07 (*t*, 3H, J = 7.4 Hz, H-3′) 1.80 (sext, 2H, J = 7.3 Hz, H-2′), 3.29 (*t*, 2H, J = 7.2 Hz, H-1′), 7.50 (*d*, 1H, J_o = 8.8 Hz, H-7), 8.09 (*dd*, 1H, J_m = 2.1, J_o = 8.8 Hz, H-6), 8.30 (s, 1H, H-4), ppm. ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) 12.0 (C-3′), 22.7 (C-2′), 33.2 (C-1′) 109.8 (C-7), 112.6 (C-4), 117.5 (C-6), 143.0 (C-5), 157.1 (C-2) ppm; MS: *m/z* (% rel. int.) 237 (M^+, 18%), 195 (M-42, 100%).

3.1.4. 2-(Propylthio)-1*H*-benzo[d]imidazol-5-amine (**4**)

To a mixture of **3** (1 g, 4.2 mmol) in ethanol, Sn^0 (3 g, 25.2 mmol, 6 equiv) and concentrated HCl (7 equiv, 721 mL) were added; the reaction mixture was stirred for 15 min at room temperature. After, the mixture was stirred at reflux for 12 h. At the end of the reaction, it was neutralized to pH 7 with a saturated $NaHCO_3$ solution; it was filtrated and the solvent was removed with a high-vacuum system, and the amine liquid product was used immediately for the next reaction, due to its chemical instability.

3.1.5. Methyl (2-(propylthio)-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)carbamate (**RetroABZ**, **1**)

To a solution of amine **4** (1 g, 4.8 mmol) in CH_2Cl_2, a mixture of the corresponding methyl chloroformate (0.5 g, 4.8 mmol, 1 equiv) diluted in CH_2Cl_2 was added dropwise. This mixture was stirred at 2–3 °C for 8 h. At the end of the reaction, it was neutralized to pH 7 with a $NaHCO_3$ solution, the solvent was removed with a high-vacuum system, and the residue was suspended in cold water. The solids were recovered with filtration, and purified with a chromatography column, giving a brown solid with m.p. 179.5–183.5 °C, yield 72% (0.92 g). ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) 0.99 (*t*, 3H, J = 7.3 Hz, H-3′) 1.71 (sext, 2H, J = 7.3 Hz, H-2′), 3.47 (*t*, 2H, J = 7.2 Hz, H-1′), 7.41 (*dd*, 1H, J_m = 2.0, J_o = 8.8, H-6), 7.56 (*d*, 1H, J_o = 8.8 Hz, H-7), 7.94 (*s*, 1H, H-4), 9.98 (*s*, 1H, carbamate) ppm; ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) 13.2 (C-3′), 23.0 (C-2′), 34.5 (C-1′), 52.3 (C-5′), 101.8 (C-4), 113.8 (C-7), 116.9 (C-6), 128.8 (C-5), 133.6 (C-7a), 137.3 (C-3a), 150.2 (C-2), 154.5 (C=O) ppm; MS: *m/z* (% rel. int.) 265 (M^+, 16%), 223 (M-42, 20%), 191 (M-74, 100%).

3.2. Biological Assays

3.2.1. In Vitro Giardicidal Assay

G. lamblia strain WB was cultured in a TYI-S-33 medium (Manassas, VA, USA) supplemented with 10% calf serum and bovine bile. In vitro susceptibility tests were conducted using 4 × 10^4 trophozoites of *G. lamblia*. These trophozoites were incubated for 48 h at

37 °C with incremental concentrations of both **RetroABZ** and albendazole, using DMSO (0.05%) as a cosolvent. Additionally, a control group was incubated solely in a culture medium containing DMSO. Following the incubation period, the trophozoites were washed and subcultured in a fresh medium without drugs for an additional 48 h. Subsequently, the trophozoites count was performed, and the median inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated with a Probit analysis. All experimental procedures were replicated in triplicate [19,33].

3.2.2. In Vitro Cytotoxic Assay

The cytotoxic assay of **RetroABZ** was carried out in Huh-7 (human hepatocellular carcinoma cell line) cells acquired from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). We also included an immortalized human epidermal keratinocyte line (HaCaT) as a control of non-cancerous cells [34]. The cells were cultured in a DMEM medium (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB, Invitrogen) and 2 mM glutamine. All cultures were maintained under standard culture conditions (37 °C and 5% CO_2). For the cytotoxic assessment in a 96-well plate, 5000 cells per well were planted. A stock solution of **RetroABZ** was solubilized in DMSO, and a concentration/response curve was generated using concentrations of 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 µg/mL for Huh-7, while for Hacat (200, 20, 2, 0.2, and 0.02) and negative control 0.05% DMSO in a culture medium, the cells were then incubated for 48 h. The cellular viability was next calculated utilizing the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions [35]. The experiments were carried out in triplicate in separate experiments. The Prism 8.0 statistical tool (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to examine the data, and a regression analysis was used to obtain the IC_{50}.

3.2.3. In Vivo Antigiardial CD-1 Mouse Model

The in vivo antigiardial activity of the compounds was assessed following a previously described phenotypic drug screening method [20,36]. Female CD-1 mice (16–24 g) were obtained from the animal house facility at Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, and were maintained under standard laboratory conditions. The experimental protocols were reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee, ensuring compliance with the guidelines for the care and use of laboratory animals. The giardicidal effect of **RetroABZ** was evaluated on mice infected with trophozoites of the *G. lamblia* WB strain. Mice were orally treated with a mebendazole solution (10 mg/mouse/day) for 3 consecutive days to ensure their freedom from any potential protozoan infections. One week after treatment, three consecutive fecal examinations were conducted to confirm the absence of protozoan infections before proceeding with experimental infection. Mice (n = 6 per group) were intragastrically infected with 1×10^6 trophozoites in 300 µL of a TYI-S-33 medium (Manassas, VA, USA) using a silastic tube (0.0025 in. outside diameter) attached to a 1 mL syringe. Six days after infection, mice were treated intragastrically with 300 µL of **RetroABZ** dissolved in 1 mL of a 2% DMSO solution in water. Albendazole was included as a positive control and a control group received the vehicle alone (2% DMSO solution). Five single doses (0.018, 0.037, 0.075, 0.15, and 0.3 mg/kg) of both compounds were evaluated. Forty-eight hours after the treatment (8 days post-infection), the mice were euthanized, and the entire small intestine was removed, opened longitudinally, and placed in 10 mL of a 10% PAF fixer for a minimum of 2 h. Tubes were then vortexed to ensure complete detachment of the trophozoites, and the number of organisms present was calculated for both the treated and control groups. Five single doses of selected compounds were tested, with albendazole used as a positive control [20].

3.2.4. Statistical Analysis

A data analysis was performed utilizing a Probit analysis. The percentage of surviving trophozoites was calculated by comparing their growth with the control group. To deter-

mine the dose required to kill 50% of the trophozoites (ED_{50}), along with the 95% confidence limits, a Probit plot against the logarithm of the drug concentration was generated.

3.3. Determination of Thermodynamic Solubility

The aqueous solubility of **RetroABZ** was assessed using the shake-flask saturation method, as described in previous studies [37]. To prepare saturated solutions of the compound, an excess amount of **RetroABZ** and albendazole (6 mg) was stirred into 6 mL of bidistilled water for 48 h at a constant temperature of 37 ± 2 °C. Subsequently, the solution was filtered through a 0.2 µm filter (Phenex-NY 4mm, Torrance, CA, USA). The aqueous solubility of the compound was then determined using an HPLC method. Experimentally, the compound **RetroABZ** was analyzed with high-performance liquid chromatography (HPLC PerkinElmer 200, Waltham, Massachusetts). The HPLC analysis was performed using an ultraviolet detector (UV/VIS 200). The analite was monitored at a wavelength of 254 nm. Chromatographic separation was performed using a Phenomenex Luna C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm, Torrance, CA, USA). The mobile phase utilized in the study consisted of a mixture of methanol and water in a ratio of 60:40 (*v*/*v*). The elution from the stationary phase was conducted at a constant flow rate of 1 mL/min (isocratic mode). Aliquots of 20 µL were injected into the HPLC system and the total run time for each injection was set at 10 min; the analysis was performed for triplicate. Albendazole was assessed using the method reported by Jung et al. [38]. Albendazole was analyzed with high-performance liquid chromatography, monitored at a wavelength of 254 nm. Chromatographic separation was performed using a Phenomenex Luna C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm). The mobile phase utilized was a mixture of methanol and a 0.05 M phosphate buffer (pH 5.7), 70:30 (*v*:*v*). The flow rate was kept constant at 1 mL/min. To prepare the saturated solution of the compound (1 mg/mL), it was stirred for 48 h at a constant temperature of 37 ± 2 °C. Subsequently, the solution was filtered through a 0.2 µm filter (Phenex-NY 4 mm). Aliquots of 20 µL were injected into the HPLC system, and the analysis was performed for triplicate.

3.4. In Silico Studies

3.4.1. Ligand Preparation

The tridimensional structures of albendazole and **RetroABZ** were constructed and processed using the OpenBabel toolbox [39]. The structures underwent additional parametrization within the PlayMolecule web server [40] using General Amber force field 2 (GAFF2) with AM1-BCC atomic charges, and employing ANI-2x for dihedral angle fixing [40–42]. For the dihedral fitting, we used the DFT (density-functional theory) functional wB97X-D with the quantum mechanics basis 6–311++G**. The resultant Amber topologies produced with the platform were translated into GROMACS files (.gro and .itp) using the Antechamber Python Parser Interface (ACPYPE) [43]. Once again, partial charges were set with AM1–BCC and GAFF2 atom types were used.

3.4.2. Homology Modelling

Currently, there is a lack of experimentally determined crystallographic structures for *G. lamblia* α- and β-tubulin. However, alternative approaches, such as homology modeling, have been utilized in previous studies as an alternative approach [26]. In our research, we embarked on the task of creating a model for *G. lamblia* α- and β-tubulin using MOE 2020.0901 software. Specifically, we focused on amino acid residues 1–438 of the α-tubulin and 1–428 of the β-tubulin sequence of *G. lamblia*. To accomplish this, we carefully selected a suitable template protein from the Protein Data Bank (PDB) that exhibited homologous characteristics with our target protein. A suitable template was identified in *Gallus gallus* tubulins (PDB ID: 7DBC) for our modeling purposes [44]. The selection of this particular template was based on its association with a ligand–receptor complex involving the carbamate-type compound parbendazole, which played a crucial role in our decision-making process. An interesting observation is the molecular resemblance between the cocrystallized ligand and **RetroABZ**, implying a potential similarity in their binding

modes. The generated model was assessed using the QMEAN score through the web interface (https://swissmodel.expasy.org/qmean/ accessed on 12 November 2022) [45] and the overall geometry quality of the model was evaluated using the Ramachandran plot constructed with MOE 2020.0901 (Montreal, QC, Canada).

3.4.3. Molecular Docking

Docking calculations were performed using Gnina 1.0 [46]. Except for the amide group, all torsions of the ligands were allowed to rotate. For the protein, Gasteiger charges were assigned, and non-polar hydrogen atoms were merged. The search box was centered on the parbendazole binding site of the *G. lamblia* α/β-tubulin model, with dimensions of 30 Å on each side. An exhaustiveness value of 100 was utilized for the search and the convolutional neural network (CNN) score was employed to retrieve the most reliable pose of each ligand. The molecular docking protocol was validated by redocking the parbendazole into the binding site on the β-tubulin model. The root-mean-square deviation (RMSD) between the reference ligand and the docked structures was less than 2.0 Å. This value indicates that the parameters for docking simulations are good in reproducing the pose in the protein.

3.4.4. Molecular Dynamics

Molecular dynamics (MD) simulations were conducted to assess the stability of protein–ligand complexes. For this purpose, three independent simulations of albendazole and **RetroABZ** (MD1 to MD3) bound to the *G. lamblia* α/β-tubulin heterodimer were carried out, each spanning 100 ns. All the simulations were performed using the GROMACS 2022.5 [47] software package and the AMBER14SB force field [48]. The systems were solvated in cubic boxes using the TIP3P water model and were neutralized by introducing sodium and chloride ions to achieve a concentration of 0.15 M. Topologies of GTP and GDP molecules were taken from Meagher et al.'s [49] study. The simulations included energy minimization using the steepest-descent algorithm and equilibration for 1 ns under both NVT and NPT ensembles in each system. The temperature was held at 300 K through the V-rescale coupling thermostat [50], while the Parrinello–Rahman barostat [51] maintained isotropic pressure at 1.0 bar. The Linear Constraint Solver (LINCS) algorithm was employed to apply holonomic constraints to hydrogen atom bonds. A cutoff radius of 1.2 nm was set for van der Waals and short-range electrostatic interactions, whereas the Particle Mesh Ewald (PME) method was used for approximating long-range electrostatic calculations. The MD analysis was conducted using GROMACS built-in tools. This included calculating the backbone root-mean-square deviation (RMSD), ligand RMSD after fitting it to the tubulin backbone using least squares, hydrogen bonding interaction fraction (IF_{HB}), and clustering analysis based on ligand RMSD using a 0.15 nm cutoff with the gromos method. The hydrophobic interaction fraction (IF_{HI}) was computed using the Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) [52]. Finally, the binding free energy (ΔG_{bind}) was determined using the Molecular-Mechanics–Poisson–Boltzmann Surface Area (MM/PBSA) approach with the gmx_MMPBSA [53] tool. We employed the AMBER14SB force field, modified GB model 1 (GB-OBC1) for solvent polarization calculations, and the interaction entropy (IE) [54] method to compute the entropic component. The intermolecular interactions, clustering analysis, and binding free energy calculations were computed from the final 50 ns of the three MD simulations.

4. Conclusions

In this study, we present the design and synthesis of a novel regioisomer of albendazole, called **RetroABZ**. This molecule demonstrated highly potent in vitro activity against *G. lamblia*, displaying remarkable efficacy in the nanomolar range. Notably, **RetroABZ** exhibited oral activity in a mouse model of giardiasis, surpassing the reference drug, albendazole, by an impressive 11-fold difference in terms of efficacy. Furthermore, the compound exhibited very low cytotoxicity and displayed a high selectivity index against *G. lamblia*. A notable observation is that the strategic exchange of side chains in the molecular design not

only maintained but also augmented the compound's activity, along with an exceptional 23-fold increase in solubility compared to the reference drug. This enhancement in solubility is particularly noteworthy, as low water solubility is a known limitation of benzimidazole carbamate compounds. With its compelling in vitro and in vivo antiparasitic properties and improved solubility, the compound **RetroABZ** opens new avenues for the development of bioactive molecules targeting systemic parasites. On the other hand, the limitations of this study lie in the fact that the findings are in the early preclinical stage. Upon identifying a lead candidate (**RetroABZ**), the customary progression in preclinical development involves several key endeavors: synthesizing the active pharmaceutical ingredient, preformulation studies, development and validation of analytical and bioanalytical methods, as well as assessments of metabolism, pharmacokinetics, and toxicology. Furthermore, it would be imperative to evaluate the compound on *Giardia* strains that have demonstrated resistance to benzimidazole carbamates. Ongoing efforts are directed toward further optimizing this compound to gain deeper insights into its structure–activity relationships.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241914949/s1.

Author Contributions: C.M.-C. performed the synthesis of all compounds, acquired the HPLC solubility assay data, and analyzed the chemical and biological results. R.A.-O., L.F.C.-P. and A.G.-H. performed and analyzed the molecular docking and dynamics of protein complexes. J.E., B.C.-L. and E.H.-N. performed and interpreted the spectroscopic analysis using nuclear magnetic resonance and drafted some parts of the manuscript. L.Y.-M. carried out and explained the in vitro giardicidal assays and drafted some parts of the manuscript. J.C.R.-L. determined the thermodynamic solubility assay. J.N.S.-C. performed the cytotoxicity assays. E.B.-C. carried out the in vivo antigiardial assay on the CD-1 mouse model. G.N.-V. developed the concept, designed the compounds, acquired funding, and prepared and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Institutional Review Board Statement: The animal study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Escuela Superior de Medicina, IPN (protocol code: 20102201) and by the Review Board of Universidad Autónoma Metropolitana (protocol code: 1857; date of approval: 31 January 2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: C. Martinez-Conde received a CONACYT fellowship (778190) in order to conduct Doctoral studies. This paper is dedicated to the memory of Araceli Vazquez-Velarde †.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no competing interest.

References

1. Ung, L.; Stothard, J.R.; Phalkey, R.; Azman, A.S.; Chodosh, J.; Hanage, W.P.; Standley, C.J. Towards global control of parasitic diseases in the Covid-19 era: One Health and the future of multisectoral global health governance. *Adv. Parasitol.* **2021**, *114*, 1–26. [PubMed]
2. Short, E.E.; Caminade, C.; Thomas, B.N. Climate Change Contribution to the Emergence or Re-Emergence of Parasitic Diseases. *Infect. Dis.* **2017**, *10*, 1178633617732296. [CrossRef] [PubMed]
3. Engels, D.; Zhou, X.N. Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infect. Dis. Poverty* **2020**, *9*, 10. [CrossRef] [PubMed]
4. Savioli, L.; Smith, H.; Thompson, A. Giardia and Cryptosporidium join the "Neglected Diseases Initiative". *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 203–208. [CrossRef] [PubMed]
5. Giallourou, N.; Arnold, J.; McQuade, E.T.R.; Awoniyi, M.; Becket, R.V.T.; Walsh, K.; Herzog, J.; Gulati, A.S.; Carroll, I.M.; Montgomery, S.; et al. Giardia hinders growth by disrupting nutrient metabolism independent of inflammatory enteropathy. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 2840. [CrossRef]
6. Argüello-García, R.; Ortega-Pierres, M.G. *Giardia duodenalis* Virulence "To Be, or Not To Be". *Curr. Trop. Med. Rep.* **2021**, *8*, 246–256. [CrossRef]

7. Ryan, U.; Hijjawi, N.; Feng, Y.; Xiao, L. Giardia: An under-reported foodborne parasite. *Int. J. Parasitol.* **2019**, *49*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
8. Zheng, Y.; Müller, J.; Kunz, S.; Siderius, M.; Maes, L.; Caljon, G.; Müller, N.; Hemphill, A.; Sterk, G.J.; Leurs, R. 3-nitroimidazo[1,2-b]pyridazine as a novel scaffold for antiparasitics with sub-nanomolar anti-*Giardia lamblia* activity. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2022**, *19*, 47–55. [CrossRef]
9. Mendez-Cuesta, C.A.; Herrera-Rueda, M.A.; Hidalgo-Figueroa, S.; Tlahuext, H.; Moo-Puc, R.; Chale-Dzul, J.B.; Chan-Bacab, M.; Ortega-Morales, B.O.; Hernandez-Nuñez, E.; Mendez-Lucio, O.; et al. Synthesis, Screening and in silico Simulations of Anti-Parasitic Propamidine/Benzimidazole Derivatives. *Med. Chem.* **2017**, *13*, 137–148. [CrossRef]
10. Ansell, B.R.; McConville, M.J.; Ma'ayeh, S.Y.; Dagley, M.J.; Gasser, R.B.; Svärd, S.G.; Jex, A.R. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 888–901. [CrossRef] [PubMed]
11. Argüello-García, R.; Leitsch, D.; Skinner-Adams, T.; Ortega-Pierres, M.G. Drug resistance in Giardia: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis. *Adv. Parasitol.* **2020**, *107*, 201–282.
12. Hernández-Núñez, E.; Tlahuext, H.; Moo-Puc, R.; Moreno, D.; González-Díaz, M.O.; Navarrete-Vázquez, G. Design, synthesis and biological evaluation of 2-(2-amino-5(6)-nitro-1H-benzimidazol-1-yl)-narylacetamides as antiprotozoal agents. *Molecules* **2017**, *22*, 579. [CrossRef]
13. Hernández-Ochoa, B.; Martínez-Rosas, V.; Morales-Luna, L.; Calderón-Jaimes, E.; Rocha-Ramírez, L.M.; Ortega-Cuellar, D.; Rufino-González, Y.; González-Valdez, A.; Arreguin-Espinosa, R.; Enríquez-Flores, S.; et al. Pyridyl Methylsulfinyl Benzimidazole Derivatives as Promising Agents against *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Molecules* **2022**, *27*, 8902. [CrossRef] [PubMed]
14. Emery-Corbin, S.J.; Su, Q.; Tichkule, S.; Baker, L.; Lacey, E.; Jex, A.R. In vitro selection of *Giardia duodenalis* for Albendazole resistance identifies a β-tubulin mutation at amino acid E198K. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2021**, *16*, 162–173. [CrossRef]
15. Wu, Z.; Medlicott, N.J.; Razzak, M.; Tucker, I.G. Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 225–232. [CrossRef] [PubMed]
16. Ghanbarzadeh, S.; Khalili, A.; Jouyban, A.; Emami, S.; Javadzadeh, Y.; Solhi, M.; Hamishehkar, H. Dramatic improvement in dissolution rate of albendazole by a simple, one-step, industrially scalable technique. *Res. Pharm. Sci.* **2016**, *11*, 435–444. [PubMed]
17. Chattah, A.K.; Zhang, Z.; Mroue, K.H.; Pfund, L.Y.; Longhi, M.R.; Ramamoorthy, A.; Garnero, C. Investigating Albendazole Desmotropes by Solid-State NMR Spectroscopy. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 731–741. [CrossRef]
18. Colín-Lozano, B.; Estrada-Soto, S.; Chávez-Silva, F.; Gutiérrez-Hernández, A.; Cerón-Romero, L.; Giacoman-Martínez, A.; Almanza-Pérez, J.C.; Hernández-Núñez, E.; Wang, Z.; Xie, X.; et al. Design, Synthesis and in Combo Antidiabetic Bioevaluation of Multitarget Phenylpropanoic Acids. *Molecules* **2018**, *23*, 340. [CrossRef]
19. Rocha-Garduño, G.; Hernández-Martínez, N.A.; Colín-Lozano, B.; Estrada-Soto, S.; Hernández-Núñez, E.; Prieto-Martínez, F.D.; Medina-Franco, J.L.; Chale-Dzul, J.B.; Moo-Puc, R.; Navarrete-Vázquez, G. Metronidazole and secnidazole carbamates: Synthesis, antiprotozoal activity, and molecular dynamics studies. *Molecules* **2020**, *25*, 793. [CrossRef]
20. Colín-Lozano, B.; León-Rivera, I.; Chan-Bacab, M.J.; Ortega-Morales, B.O.; Moo-Puc, R.; López-Guerrero, V.; Hernández-Núñez, E.; Argüello-Garcia, R.; Scior, T.; Barbosa-Cabrera, E.; et al. Synthesis, in vitro and in vivo giardicidal activity of nitrothiazole-NSAID chimeras displaying broad antiprotozoal spectrum. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3490–3494. [CrossRef]
21. Elmaaty, A.A.; Darwish, K.M.; Chrouda, A.; Boseila, A.A.; Tantawy, M.A.; Elhady, S.S.; Shaik, A.B.; Mustafa, M.; Al-Karmalawy, A.A. In Silico and in Vitro Studies for Benzimidazole Anthelmintics Repurposing as VEGFR-2 Antagonists: Novel Mebendazole-Loaded Mixed Micelles with Enhanced Dissolution and Anticancer Activity. *ACS Omega* **2022**, *7*, 875–899. [CrossRef]
22. Meena, A.K.; Sharma, K.; Kandaswamy, M.; Rajagopal, S.; Mullangi, R. Formulation development of an albendazole self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) with enhanced systemic exposure. *Acta Pharm.* **2012**, *62*, 563–580. [PubMed]
23. Ishikawa, M.; Hashimoto, Y. Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1539–1554. [CrossRef] [PubMed]
24. Domínguez-Mendoza, E.A.; Galván-Ciprés, Y.; Martínez-Miranda, J.; Miranda-González, C.; Colín-Lozano, B.; Hernández-Núñez, E.; Hernández-Bolio, G.I.; Palomino-Hernández, O.; Navarrete-Vazquez, G. Design, synthesis, and in silico multitarget pharmacological simulations of acid bioisosteres with a validated in vivo antihyperglycemic effect. *Molecules* **2021**, *26*, 799. [CrossRef]
25. Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; et al. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucl. Acids Res.* **2021**, *2*, W5–W14. [CrossRef] [PubMed]
26. Aguayo-Ortiz, R.; Méndez-Lucio, O.; Romo-Mancillas, A.; Castillo, R.; Yépez-Mulia, L.; Medina-Franco, J.L.; Hernández-Campos, A. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β-tubulin binding site model. *J. Mol. Graph.* **2013**, *45*, 26–37. [CrossRef]
27. Eren, E.; Watts, N.R.; Sacett, D.L.; Wingfield, P.T. Conformational changes in tubulin upon binding cryptophycin-52 reveal its mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101138. [CrossRef]
28. Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli RB, G.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossow, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13775–13779. [CrossRef]
29. Buscemi, C.; Randazzo, C.; Buscemi, P.; Caldarella, R.; Lombardo, M.; Buscemi, S. Very Prolonged Treatment with Albendazole of a Case of Disseminated Abdominal Cystic Echinococcosis. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8*, 449. [CrossRef]

30. Granados, C.E.; Reveiz, L.; Uribe, L.G.; Criollo, C.P. Drugs for treating giardiasis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *2*, CD007787. [CrossRef]
31. Lukovnikov, A.F.; Fedorov, B.P.; Vasil'eva, A.G.; Krasnyanskaya, E.A.; Levin, P.I.; Gol'dfarb, Y.L. Benzimidazole derivatives as inhibitors of the oxidation of polypropylene and the effect of p-hydroxydiphenylamine on their efficiency. *Polym. Sci.* **1964**, *5*, 908–913. [CrossRef]
32. Soria-Arteche, O.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Hurtado-De La Peña, M.; Navarrete-Vázquez, G.; Medina-Franco, J.L.; Gómez-Flores, K. Studies on the Selective S-oxidation of Albendazole, Fenbendazole, Triclabendazole, and Other Benzimidazole Sulfides. *J. Mex. Chem. Soc.* **2005**, *49*, 353–358.
33. Navarrete-Vázquez, G.; Yépez, L.; Hernández-Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; González, J.; Martínez-Fernández, A.; Martínez-Grueiro, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4615–4622. [CrossRef]
34. Boukamp, P.; Petrussevska, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 761–771. [CrossRef] [PubMed]
35. Sánchez-Carranza, J.N.; Alvarez, L.; Marquina-Bahena, S.; Salas-Vidal, E.; Cuevas, V.; Jiménez, E.W.; Veloz, G.R.A.; Carraz, M.; González-Maya, L. Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules* **2017**, *22*, 666. [CrossRef]
36. Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R. In vivo antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 552–554. [CrossRef]
37. Rojas-Aguirre, Y.; Castillo, I.; Hernández, D.J.; Nogueda-Torres, B.; Márquez-Navarro, A.; Villalobos, J.C.; Sánchez-Bartéz, F.; Sánchez-Torres, L.; Gracia-Mora, I.; Castillo, R.; et al. Diversity in the supramolecular interactions of 5,6-dichloro-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole with modified cyclodextrins: Implications for physicochemical properties and antiparasitic activity. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 471–479. [CrossRef] [PubMed]
38. Hurtado, M.; Medina, M.T.; Sotelo, J.; Jung, H. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for albendazole and its main metabolite albendazole sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr.* **1989**, *494*, 403–407. [CrossRef] [PubMed]
39. O'Boyle, N.M.; Banck, M.; James, C.A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G.R. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **2011**, *3*, 33. [CrossRef] [PubMed]
40. Galvelis, R.; Doerr, S.; Damas, J.M.; Harvey, M.J.; De Fabritiis, G.A. Scalable Molecular Force Field Parameterization Method Based on Density Functional Theory and Quantum-Level Machine Learning. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 3485–3493. [CrossRef]
41. Bannwarth, C.; Caldeweyher, E.; Ehlert, S.; Hansen, A.; Pracht, P.; Seibert, J.; Spicher, S.; Grimme, S. Extended tight-binding quantum chemistry methods. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2021**, *11*, e1493. [CrossRef]
42. Devereux, C.; Smith, J.S.; Huddleston, K.K.; Barros, K.; Zubatyuk, R.; Isayev, O.; Roitberg, A.E. Extending the Applicability of the ANI Deep Learning Molecular Potential to Sulfur and Halogens. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 4192–4202. [CrossRef]
43. Sousa da Silva, A.W.; Vranken, W.F. ACPYPE—AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 367. [CrossRef]
44. Wu, C.Y.; Wang, Y.X. PPA in Complex with Tubulin. 2021. Available online: https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00007dbc (accessed on 5 January 2022).
45. Studer, G.; Rempfer, C.; Waterhouse, A.M.; Gumiennny, R.; Haas, J.; Schwede, T. QMEANDisCo distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 1765–1771. [CrossRef]
46. McNutt, A.T.; Francoeur, P.; Aggarwal, R.; Masuda, T.; Meli, R.; Ragoza, M.; Sunseri, J.; Koes, D.R. GNINA 1.0: Molecular docking with deep learning. *J. Cheminform.* **2021**, *13*, 43. [CrossRef]
47. Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páall, S.; Smith, J.C.; Hess, B.; Lindah, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25. [CrossRef]
48. Maier, J.A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696–3713. [CrossRef] [PubMed]
49. Meagher, K.L.; Redman, L.T.; Carlson, H.A. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1016–1025. [CrossRef] [PubMed]
50. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101. [CrossRef]
51. Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190. [CrossRef]
52. Adasme, M.F.; Linnemann, K.L.; Bolz, S.N.; Kaiser, F.; Salentin, S.; Haupt, V.J.; Schroeder, M. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucl. Acids Res.* **2021**, *49*, W530–W534. [CrossRef] [PubMed]
53. Valdés-Tresanco, M.S.; Valdés-Tresanco, M.E.; Valiente, P.A.; Moreno, E. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17*, 6281–6291. [CrossRef] [PubMed]
54. Duan, L.; Liu, X.; Zhang, J.Z.H. Interaction Entropy: A New Paradigm for Highly Efficient and Reliable Computation of Protein–Ligand Binding Free Energy. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5722–5728. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

13. REFERENCIAS

1. Neglected tropical diseases. https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases (Consultado 09 de Junio de **2024**)
2. Vanderslott, S. Neglected Tropical Diseases Creating a New Disease Grouping. *Nat. Cult.* **2020**, *15* (1), 78–110.
3. Hotez, P. J.; Fenwick, A.; Savioli, L.; Molyneux, D. H. Rescuing the Bottom Billion through Control of Neglected Tropical Diseases. *Lancet* **2009**, *373* (9674), 1570–1575. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60233-6.
4. Rojo-Marcos, G.; Cuadros-González, J. Malaria and Intestinal Protozoa. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2016**, *34* (3), 191–204.
5. Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)Benzimidazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (2), 187–190.
6. Mahmud, R.; Lim, Y. A. L.; Amir, A. *Medical Parasitology: A Textbook*; Springer: Cham, Switzerland, 2017.
7. Patterson, S.; Wyllie, S. Nitro Drugs for the Treatment of Trypanosomatid Diseases: Past, Present, and Future Prospects. *Trends Parasitol.* **2014**, *30* (6), 289–298.
8. Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Soria-Arteche, O.; Hernández-Hernández, M.; Yépez-Mulia, L. Synthesis and Biological Activity of 2-(Trifluoromethyl)-1H-Benzimidazole Derivatives against Some Protozoa and *Trichinella spiralis*. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (7), 3135–3141.
9. Vanderslott, S. Neglected Tropical Diseases. *Nature and Culture* **2020**, *15*, 78–110. DOI: 10.3167/nc.2020.150105.

10. Ahmed, M. Intestinal Parasitic Infections in 2023. *Gastroenterology Res.* **2023**, *16* (3), 127–140.
11. Su, Q.; Baker, L.; Emery, S.; Balan, B.; Ansell, B.; Tichkule, S.; Mueller, I.; Svärd, S. G.; Jex, A. Transcriptomic Analysis of Albendazole Resistance in Human Diarrheal Parasite *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2023**, *22*, 9–19.
12. Plutzer, J.; Ongerth, J.; Karanis, P. *Giardia* Taxonomy, Phylogeny and Epidemiology: Facts and Open Questions. *J. Hyg. Environ.* **2010**, *213* (5), 321–333.
13. Leung, A. K. C.; Leung, A. A. M.; Wong, A. H. C.; Sergi, C. M.; Kam, J. K. M. Giardiasis: An Overview. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **2019**, *13* (2), 134–143.
14. Ankarklev, J.; Jerlström-Hultqvist, J.; Ringqvist, E.; Troell, K.; Svärd, S. G. Behind the Smile: Cell Biology and Disease Mechanisms of *Giardia* Species. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (6), 413–422.
15. Reber, S.; Singer, M.; Frischknecht, F. Cytoskeletal Dynamics in Parasites. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2024**, *86*.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Giardiasis. https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html (accessed 2023-01-13).
17. Müller, J.; Müller, N. Nitroreductases of bacterial origin in *Giardia lamblia*: Potential role in detoxification of xenobiotics. *MicrobiologyOpen.* **2019**, *8*, e904.
18. Müller, J.; Schildknecht, P.; Müller, N. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in Giardia lamblia: characterization of a novel nitroreductase (GlNR2), *JAC*. **2013**, 68 (8), 1781–1789,
19. Duwor, S.; Brites, D.; Mäser, P. Phylogenetic Analysis of Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase, a Redox Enzyme Involved in the Pharmacological Activation of Nitro-Based Prodrugs in Bacteria and Protozoa. *Biology* **2024**, *13*, 178.

20. Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance; Mayers, D. L., Ed.; Volume 1; Springer: Cham, **2017**.
21. Vivancos, V.; González-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, M. Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment**.** *Curr. Top. Med. Chem.* **2018,** *18* (15), 1287–1303.
22. Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Semana 01, **2025**.
23. Heyworth, M. F. Diagnostic Testing for Giardia Infections**.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2014,** *108* (3), 123–125.
24. Gardner, T. B.; Hill, D. R. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001,** *14* (1), 114–128.
25. Watkins, R. R.; Eckmann, L. Treatment of Giardiasis: Current Status and Future Directions. *Curr. Infect. Dis. Rep.***2014,** *16*, 396.
26. Gardner, T. B.; Hill, D. R. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001,** *14* (1).
27. Su, Q.; Baker, L.; Emery, S.; Balan, B.; Ansell, B.; Tichkule, S.; Mueller, I.; Svärd, S. G.; Jex, A. Transcriptomic Analysis of Albendazole Resistance in Human Diarrheal Parasite *Giardia duodenalis***.** *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2023,** *22*, 9–19.
28. Nosala, C.; Dawson, S. C. The Critical Role of the Cytoskeleton in the Pathogenesis of ***Giardia*****.** *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* **2015,** *2* (4), 155–162.
29. Yadav, G.; Ganguly, S. Structure Activity Relationship (SAR) Study of Benzimidazole Scaffold for Different Biological Activities: A Mini-Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015,** *97* (1), 419–443.
30. Duarte, C., Barreiro, E., & Fraga, C. (2007). Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 7(11).
31. Phan, N.-K.-N.; Huynh, T.-K.-C.; Nguyen, H.-P.; Le, Q.-T.; Nguyen, T.-C.-T.; Ngo, K.-K.-H.; Nguyen, T.-H.-A.; Ton, K. A.; Thai, K.-M.; Hoang, T.-K.-D. Exploration of Remarkably Potential Multitarget-Directed N-Alkylated-2-(substituted

phenyl)-1H-benzimidazole Derivatives as Antiproliferative, Antifungal, and Antibacterial Agents. *ACS Omega* **2023**, *8.*

32. Emery-Corbin, S. J.; Su, Q.; Tichkule, S.; Baker, L.; Lacey, E.; Jex, A. R. In Vitro Selection of *Giardia duodenalis* for Albendazole Resistance Identifies a β-Tubulin Mutation at Amino Acid E198K. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.***2021**, *16*, 162–173.
33. Argüello-García, R.; Leitsch, D.; Skinner-Adams, T.; Ortega-Pierres, M. G. Drug Resistance in *Giardia*: Mechanisms and Alternative Treatments for Giardiasis. In *Advances in Parasitology*; Ortega-Pierres, M. G., Ed.; Academic Press: 2020; Vol. 107, pp 201–282.
34. Baell, J.; Walters, M. A. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* **2014**, *513* (7519), 481–483.
35. Veerasamy, R.; Roy, A.; Karunakaran, R.; Rajak, H. Structure–Activity Relationship Analysis of Benzimidazoles as Emerging Anti-Inflammatory Agents: An Overview. *Pharmaceuticals* **2021,** *14* (7).
36. Pattanayak, P.; Panigrahi, D.; Kumari, S.; Yadav, H. N.; Ashby, C. R.; Kerber, S.; Shahwan, M. J. S. A.; Tiwari, A. K.; Mishra, G. P. Benzimidazoles in Helminthiasis Chemotherapy: Developments and Challenges. *J. Mol. Struct.* **2024,** *1295*.
37. Gaba, M.; Singh, S.; Mohan, C. Benzimidazole: An Emerging Scaffold for Analgesic and Anti-Inflammatory Agents**.** *Eur. J. Med. Chem.* **2014,** *76*, 494–505.
38. Navarrete-Vázquez, G.; Chávez-Silva, F.; Argotte-Ramos, R.; Rodríguez-Gutiérrez, M. D. C.; Chan-Bacab, M. J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Hernández-Nuñez, E. Synthesis of Benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A Comparative Study of Their In Vitro Broad-Spectrum Antiprotozoal Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011,** *21*(10), 3168–3171.
39. Kaur Bhatia, R. Anti-Protozoal Potential of Heterocyclic Compounds Against Giardiasis. *Curr. Bioact. Compd.***2018,** *15* (3), 280–288.

40. Martínez-Conde, C.; Colín-Lozano, B.; Gutiérrez-Hernández, A.; Hernández-Núñez, E.; Yépez-Mulia, L.; Colorado-Pablo, L. F.; Aguayo-Ortiz, R.; Escalante, J.; Rivera-Leyva, J. C.; Sánchez-Carranza, J. N.; et al. Enhancing Giardicidal Activity and Aqueous Solubility through the Development of "RetroABZ," a Regioisomer of Albendazole: *In Vitro*, *In Vivo*, and *In Silico* Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2023,** *24*, 14949.
41. Yan, H.; Zhong, X.; Liu, Y. Improving the Solubility, Stability, and Bioavailability of Albendazole through Synthetic Salts. *Molecules* **2024,** *29*, 3571.
42. Juhász, L.; Tóth, G.; Koczka, K.; Bóna, B.; Papp, G. Development and Validation of a HILIC–MS/MS Method for the Quantification of Seven Antiparasitic Benzimidazoles and Their Metabolites in Bovine Plasma. *Acta Chromatogr.* 2021, 33 (3), 145–156.
43. Farghaly, A.M.; Rizk, O.H.; Darwish, I.; Hamza, M.; Altowyan, M.S.; Barakat, A.; Teleb, M. Design, Synthesis, Pharmacodynamic and *In Silico* Pharmacokinetic Evaluation of Some Novel Biginelli-Derived Pyrimidines and Fused Pyrimidines as Calcium Channel Blockers. *Molecules* **2022**, *27*, 2240.
44. Cheong, J. E.; Zaffagni, M.; Chung, I.; Xu, Y.; Wang, Y.; Jernigan, F. E.; Zetter, B. R.; Sun, L. Synthesis and Anticancer Activity of Novel Water-Soluble Benzimidazole Carbamates. *Eur. J. Med. Chem.* **2018,** *20* (144), 372–385.
45. Chattah, A. K.; Zhang, Z.; Mroue, K. H.; Pfund, L. Y.; Longhi, M. R.; Ramamoorthy, A.; Garnero, C. Investigating Albendazole Desmotropes by Solid-State NMR Spectroscopy. *Mol. Pharm.* **2015,** *12*, 731–741.
46. Juaristi, E.; Rodriguez, L**.** Importancia de la Computación en la Ciencia y en Nuestra Vida Diaria**;** Colegio Nacional, **2016**.
47. Lombardo, F.; Desai, P. V.; Arimoto, R.; Desino, K. E.; Fischer, H.; Keefer, C. E.; Petersson, C.; Winiwarter, S.; Broccatelli, F. In Silico Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics (ADME-PK): Utility and Best Practices. An Industry Perspective from the International

Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (22), 9097–9113.

48. Leelananda, S. P.; Lindert, S. Computational Methods in Drug Discovery. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016,** *12* (12), 2694–2718.
49. Domínguez-Mendoza, E. A.; Galván-Ciprés, Y.; Martínez-Miranda, J.; Miranda-González, C.; Colín-Lozano, B.; Hernández-Núñez, E.; Hernández-Bolio, G. I.; Palomino-Hernández, O.; Navarrete-Vazquez, G. Design, Synthesis, and *In Silico* Multitarget Pharmacological Simulations of Acid Bioisosteres with a Validated *In Vivo* Antihyperglycemic Effect. *Molecules* **2021,** *26* (4), 799.
50. Di, L.; Kerns, E. H. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design, and Methods: From ADME to Toxicity Optimization*, 1st ed.; Academic Press: New York, **2008**.
51. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001,** *46*(1–3), 3–26.
52. Gutiérrez-Hernández, A.; Estrada-Soto, S.; Martínez-Conde, C.; Gaona-Tovar, E.; Medina-Franco, J. L.; Hernández-Núñez, E.; Hidalgo-Figueroa, S.; Castro-Moreno, P.; Ibarra-Barajas, M.; Navarrete-Vázquez, G. Synthesis, Biosimulation and Pharmacological Evaluation of Benzimidazole Derivatives with Antihypertensive Multitarget Effect. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2024**, 129879.
53. Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011,** *7* (2), 146–157.
54. Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. Molecular Docking. *Methods Mol. Biol.* **2008,** *443*, 365–382.
55. Molecular Operating Environment (MOE), 2022.02; Chemical Computing Group ULC, 910-1010 Sherbrooke St. W., Montreal, QC H3A 2R7, 2024.
56. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C**.** SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-Modeling Server. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (13), 3381–3385.

57. Löhning, A. E.; Levonis, S. M.; Williams-Noonan, B.; Schweiker, S. S. A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (18), 2023–2040.
58. *Benkert, P.; Künzli, M.; Schwede, T.* QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucleic Acids Res*. ***2009,*** 37 *(Web Server issue), W510–W514.*
59. Schrödinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System,* Version 2.0; Schrödinger, LLC, **2020**.
60. Corey, E. J.; Cheng, X. M. *The Logic of Chemical Synthesis*; John Wiley & Sons, **1989**.
61. Lukovnikov, A. F.; Fedorov, B. P.; Vasil'eva, A. G.; Krasnyanskaya, E. A.; Levin, P. I.; Gol'dfarb, Y. L. Benzimidazole Derivatives as Inhibitors of the Oxidation of Polypropylene and the Effect of p-Hydroxydiphenylamine on Their Efficiency. *Polym. Sci.* **1964,** *5*, 908–913.
62. Soria-Arteche, O.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Hurtado-De La Peña, M.; Navarrete-Vázquez, G.; Medina-Franco, J. L.; Gómez-Flores, K. Studies on the Selective S-Oxidation of Albendazole, Fenbendazole, Triclabendazole, and Other Benzimidazole Sulfides. *J. Mex. Chem. Soc.* **2005,** *49*, 353–358.
63. Rocha-Garduño, G.; Hernández-Martínez, N. A.; Colín-Lozano, B.; Estrada-Soto, S.; Hernández-Núñez, E.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L.; Chale-Dzul, J. B.; Moo-Puc, R.; Navarrete-Vázquez, G. Metronidazole and Secnidazole Carbamates: Synthesis, Antiprotozoal Activity, and Molecular Dynamics Studies. *Molecules* **2020,***25*, 793.
64. Navarrete-Vázquez, G.; Yépez, L.; Hernández-Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; González, J.; Martínez-Fernández, A.; Martínez-Grueiro, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of Albendazole and Mebendazole Analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2003,** *11*, 4615–4622.
65. Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J. Cell Biol.* **1988,** *106*, 761–771.

66. Sánchez-Carranza, J. N.; Alvarez, L.; Marquina-Bahena, S.; Salas-Vidal, E.; Cuevas, V.; Jiménez, E. W.; Veloz, G. R. A.; Carraz, M.; González-Maya, L. Phenolic Compounds Isolated from *Caesalpinia coriaria* Induce S and G2/M Phase Cell Cycle Arrest Differentially and Trigger Cell Death by Interfering with Microtubule Dynamics in Cancer Cell Lines. *Molecules* **2017,** *22*, 666.
67. Colín-Lozano, B.; León-Rivera, I.; Chan-Bacab, M. J.; Ortega-Morales, B. O.; Moo-Puc, R.; López-Guerrero, V.; Hernández-Núñez, E.; Argüello-Garcia, R.; Scior, T.; Barbosa-Cabrera, E.; et al. Synthesis, In Vitro and In Vivo Giardicidal Activity of Nitrothiazole-NSAID Chimeras Displaying Broad Antiprotozoal Spectrum. *Bioorg. Med. Chem. Lett***. 2017**, *27* (15), 3490–3494.
68. Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R. In Vivo Antigiardial Activity of Three Flavonoids Isolated from Some Medicinal Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*(3), 552–554.
69. Medina-Franco, J. L.; Martinez-Mayorga, K.; Fernández-de Gortari, E.; Kirchmair, J.; Bajorath, J. Rationality over Fashion and Hype in Drug Design. *F1000Res.* **2021**, *10*, Chem Inf Sci-397.
70. Chang, Y.; Hawkins, B. A.; Du, J. J.; Groundwater, P. W.; Hibbs, D. E.; Lai, F. A Guide to In Silico Drug Design. *Pharmaceutics*, **2023**, *15* (1), 49.
71. Niazi, S. K.; Mariam, Z. Computer-Aided Drug Design and Drug Discovery: A Prospective Analysis. *Pharmaceuticals,* **2024**, *17* (1), 22.
72. Rojas-Aguirre, Y.; Castillo, I.; Hernández, D. J.; Nogueda-Torres, B.; Márquez-Navarro, A.; Villalobos, J. C.; Sánchez-Bartéz, F.; Sánchez-Torres, L.; Gracia-Mora, I.; Castillo, R.; et al. Diversity in the Supramolecular Interactions of 5,6-Dichloro-2-(Trifluoromethyl)-1H-Benzimidazole with Modified Cyclodextrins: Implications for Physicochemical Properties and Antiparasitic Activity. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (1), 471–479.
73. Hurtado, M.; Medina, M. T.; Sotelo, J.; Jung, H. Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Albendazole and Its Main Metabolite

Albendazole Sulphoxide in Plasma and Cerebrospinal Fluid. **J.** Chromatogr. **1989**, *494*, 403–407.

74. Molinspiration Cheminformatics Free Web Services. Available online: https://www.molinspiration.com (accessed January 15, **2025**).
75. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25.
76. Manallack, D. T. The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspect. Medicin. Chem.* **2007**, *17* (1), 25–38.
77. Hubatsch, I.; Ragnarsson, E.; Artursson, P. Determination of Drug Permeability and Prediction of Drug Absorption in Caco-2 Monolayers. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), 2111–2119.
78. Di, L.; Kerns, E. H. Profiling Drug-Like Properties in Discovery Research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (3), 402–408.
79. Lin, J. H.; Yamazaki, M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics: Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42* (1), 59–98.
80. Onakpoya, I. J.; Heneghan, C. J.; Aronson, J. K. Post-Marketing Withdrawal of 462 Medicinal Products Because of Adverse Drug Reactions: A Systematic Review of the World Literature. *BMC Med.* **2016**, *14* (1), 10.
81. Guengerich, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (1), 70–83.
82. Maurice, M.; Pichard, L.; Daujat, M.; Fabre, I.; Joyeux, H.; Domergue, J.; Maurel, P. Effects of Imidazole Derivatives on Cytochromes P450 from Human Hepatocytes in Primary Culture. ***FASEB J.*** **1992**, *6* (2), 752–763.
83. Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M. hERG Potassium Channels and Cardiac Arrhythmia. *Nature***. 2006**, *440*(7083), 463–469.
84. Redfern, W. S.; Carlsson, L.; Davis, A. S.; Lynch, W. G.; MacKenzie, I.; Palethorpe, S.; Siegl, P. K.; Strang, I.; Sullivan, A. T.; Wallis, R.; et al. Relationships between Preclinical Cardiac Electrophysiology, Clinical QT Interval Prolongation and Torsade de Pointes for a Broad Range of Drugs:

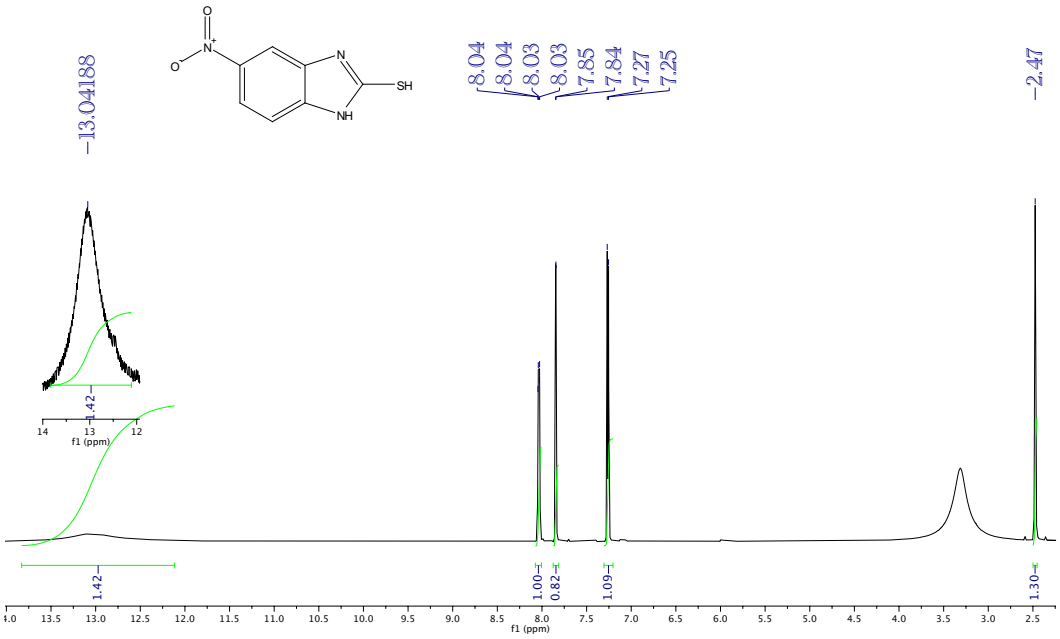
Evidence for a Provisional Safety Margin in Drug Development. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *58* (1), 32–45.

85. Seal, S.; Williams, D.; Hosseini-Gerami, L.; Mahale, M.; Carpenter, A. E.; Spjuth, O.; Bender, A. Improved Detection of Drug-Induced Liver Injury by Integrating Predicted In Vivo and In Vitro Data. *Chem. Res. Toxicol.* **2024**, *37* (8), 1290–1305.
86. Hosack, T.; Damry, D.; Biswas, S. Drug-Induced Liver Injury: A Comprehensive Review. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2023**.
87. Boelsterli, U. A.; Ho, H. K.; Zhou, S.; Leow, K. Y. Bioactivation and Hepatotoxicity of Nitroaromatic Drugs. *Curr. Drug Metab.* **2006**, *7* (7), 715–727.
88. Piloiu, C.; Dumitrascu, D. L. Albendazole-Induced Liver Injury. Am. J. Ther. **2021**, *28*, e335–e340.
89. Molinspiration Cheminformatics. Molinspiration Property Calculator. 2024. Available online: https://www.molinspiration.com (accessed January 15, **2025**).
90. Swanson, K.; Walther, P.; Leitz, J.; Mukherjee, S.; Wu, J. C.; Shivnaraine, R. V.; Zou, J. ADMET-AI: A Machine Learning ADMET Platform for Evaluation of Large-Scale Chemical Libraries. *Bioinformatics*. **2024**, *40* (7).
91. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
92. Lee, S. K.; Chang, G. S.; Lee, I. H.; Chung, J. E.; Sung, K. Y.; No, K. The PreADME: PC-Based Program for Batch Prediction of ADME Properties. In *EuroQSAR 2004*, Istanbul, Turkey, **2004**; pp 9.5–10.
93. Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. admetSAR 2.0: Web-Service for Prediction and Optimization of Chemical ADMET Properties. *Bioinformatics.* **2019**, *35* (6), 1067–1069.
94. Dong, J.; Wang, N.; Yao, Z.; Zhang, L.; Cheng, Y.; Ouyang, D.; Lu, A.; Cao, D. ADMETlab: A Platform for Systematic ADMET Evaluation Based on a

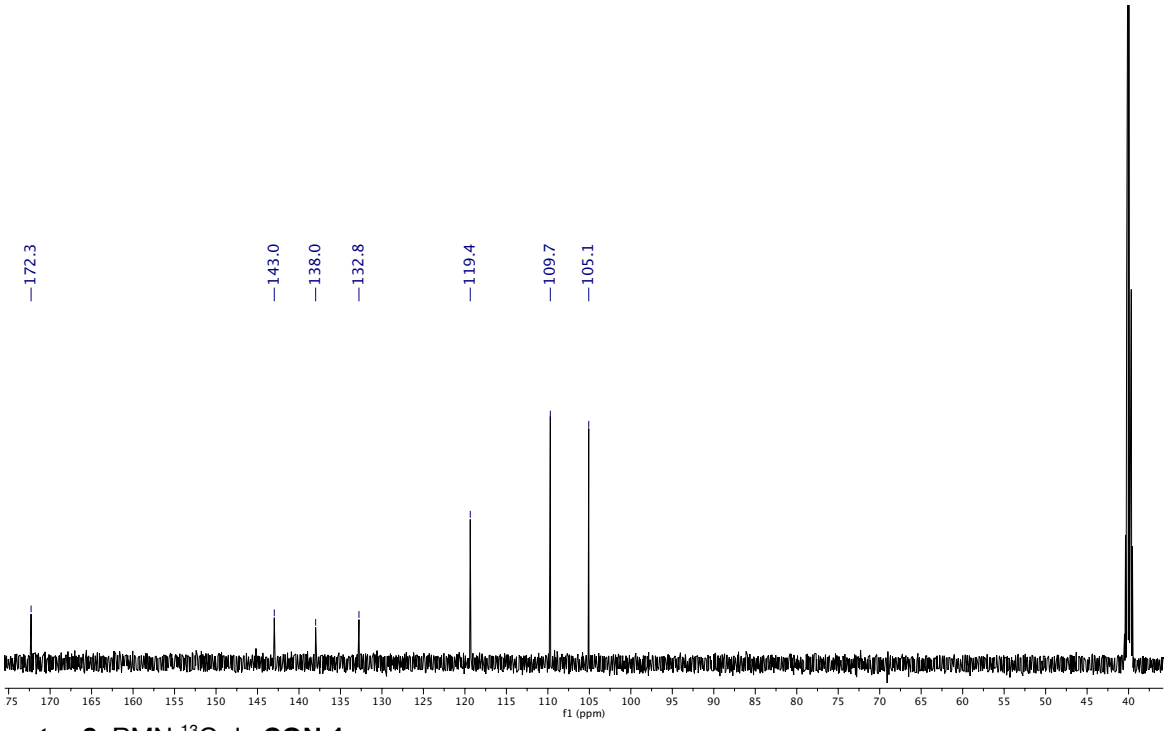
Comprehensively Collected ADMET Database. *J. Cheminform.* **2018**, *10* (1), 29.

95. ACD/Tox Suite. Advanced Chemistry Development. Available online: https://www.acdlabs.com (accessed January 15, **2025**).
96. Filimonov, D. A.; Lagunin, A. A.; Gloriozova, T. A.; Rudik, A. V.; Druzhilovskii, D. S.; Pogodin, P. V.; Poroikov, V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the PASS Online Web Resource. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, *50* (3), 444–457.

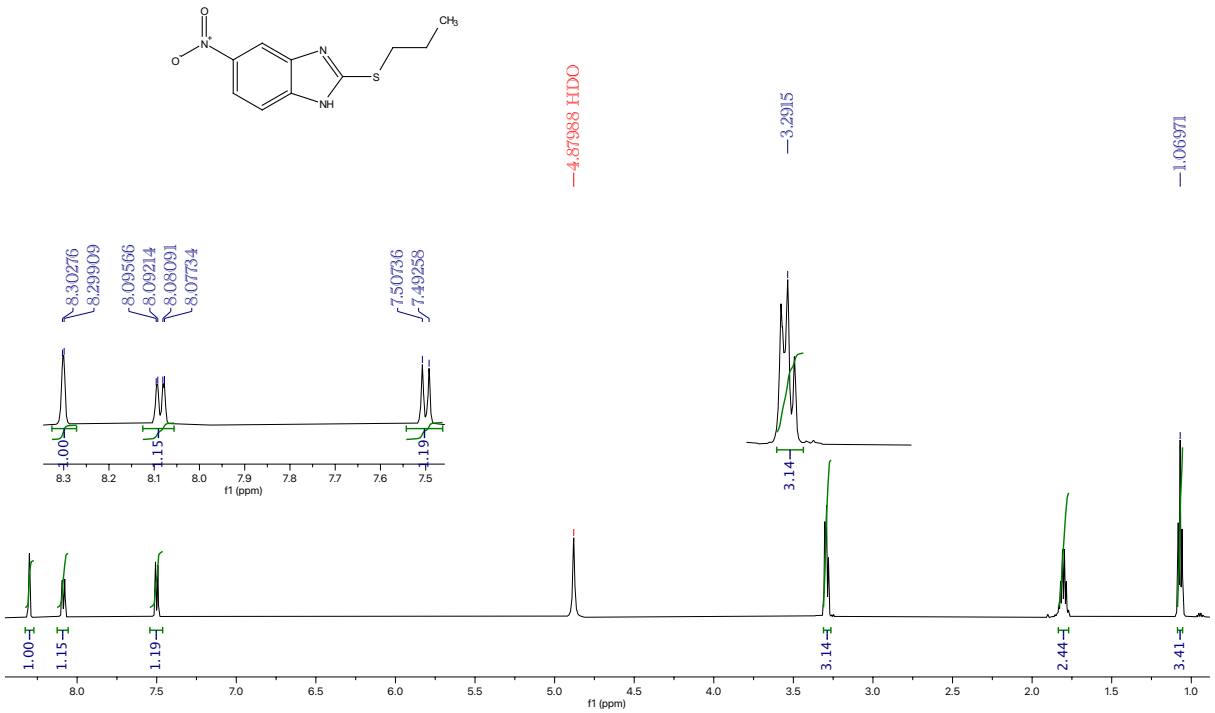
14. ESPECTROS



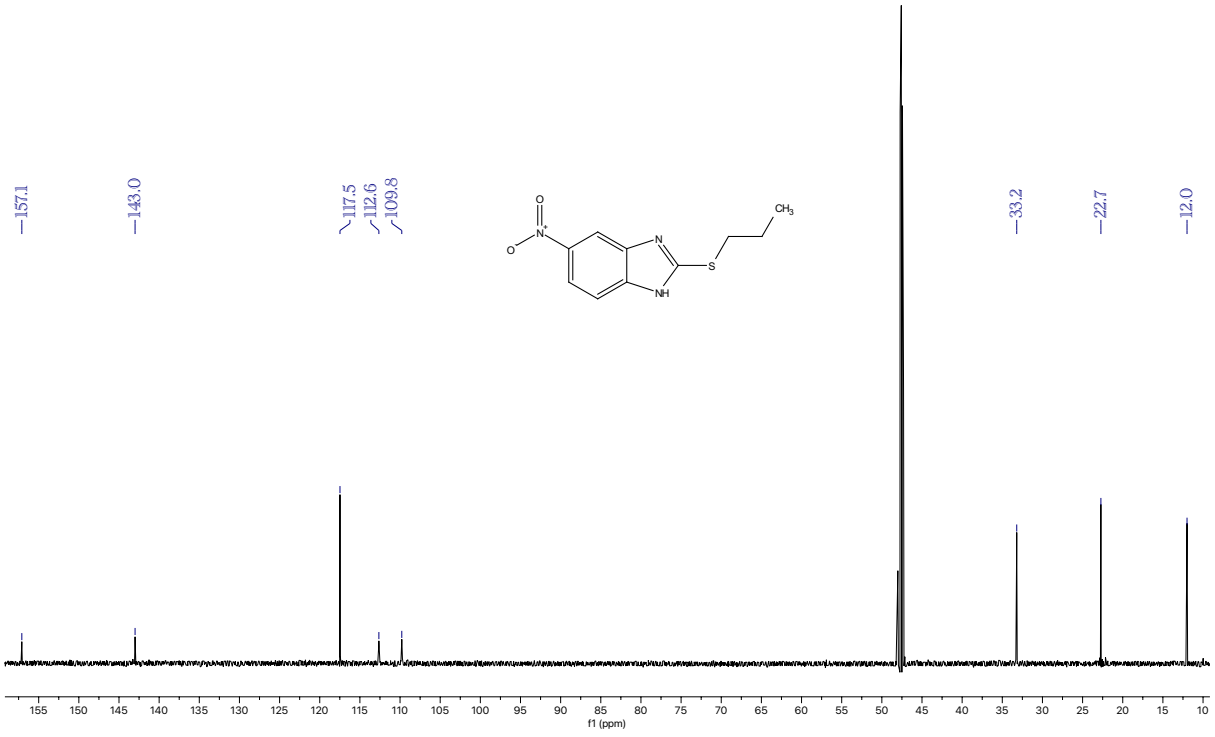
Espectro 1. RMN ^{1}H de **CON-1**



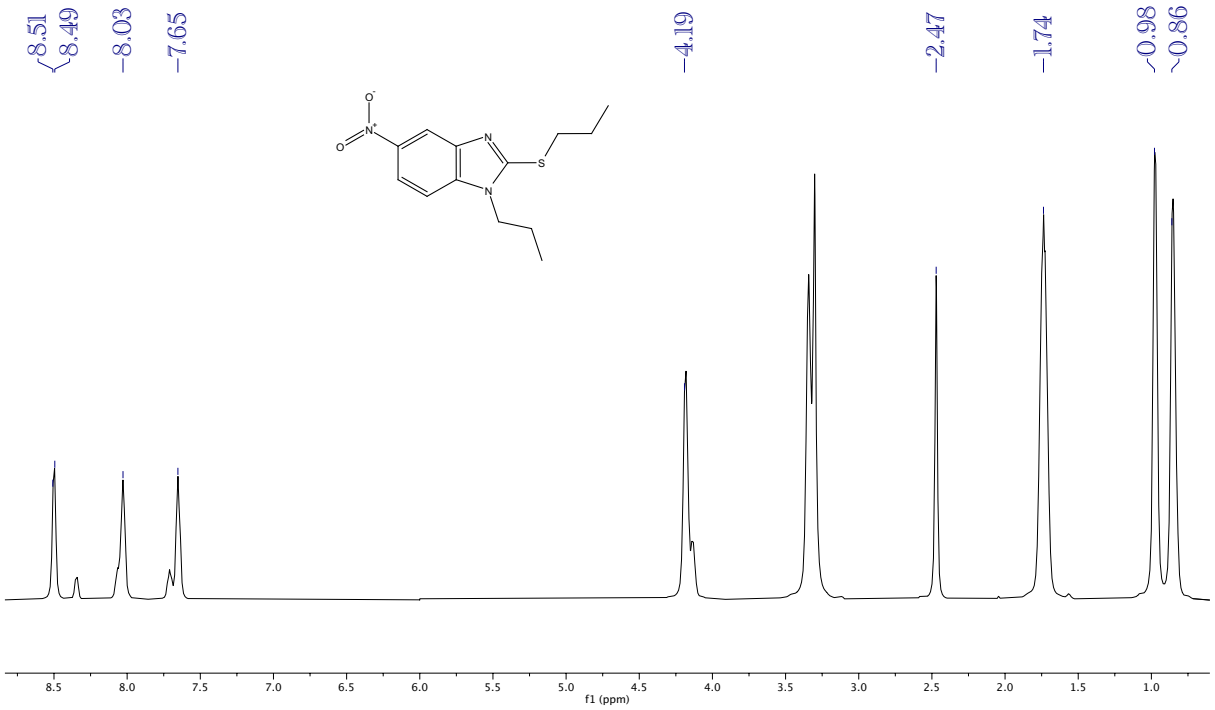
Espectro 2. RMN ^{13}C de **CON-1**



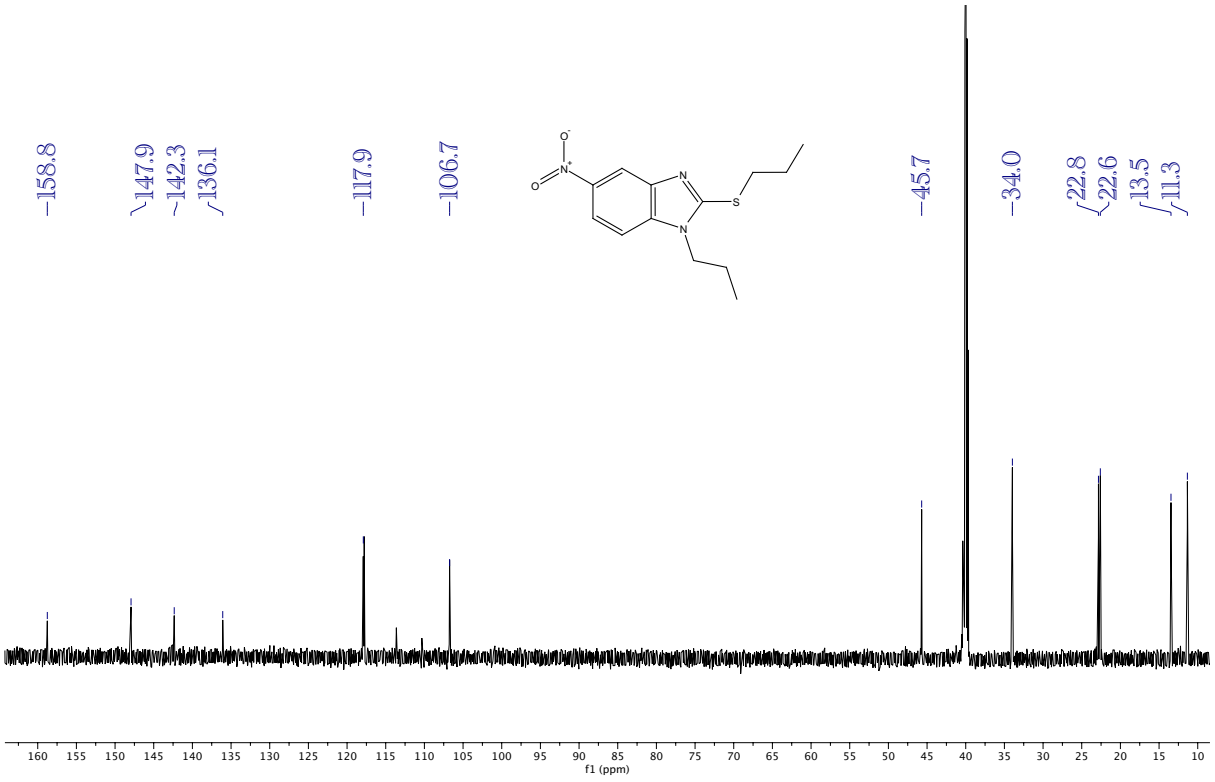
Espectro 3. RMN ^{1}H de **CON-2**



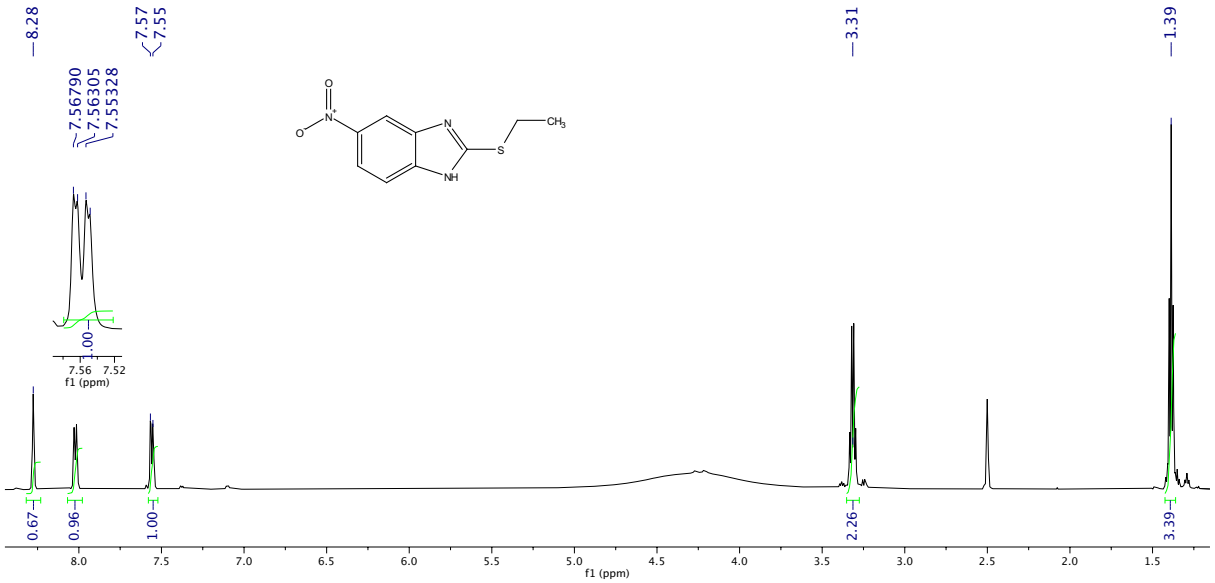
Espectro 4. RMN ^{13}C de **CON-2**



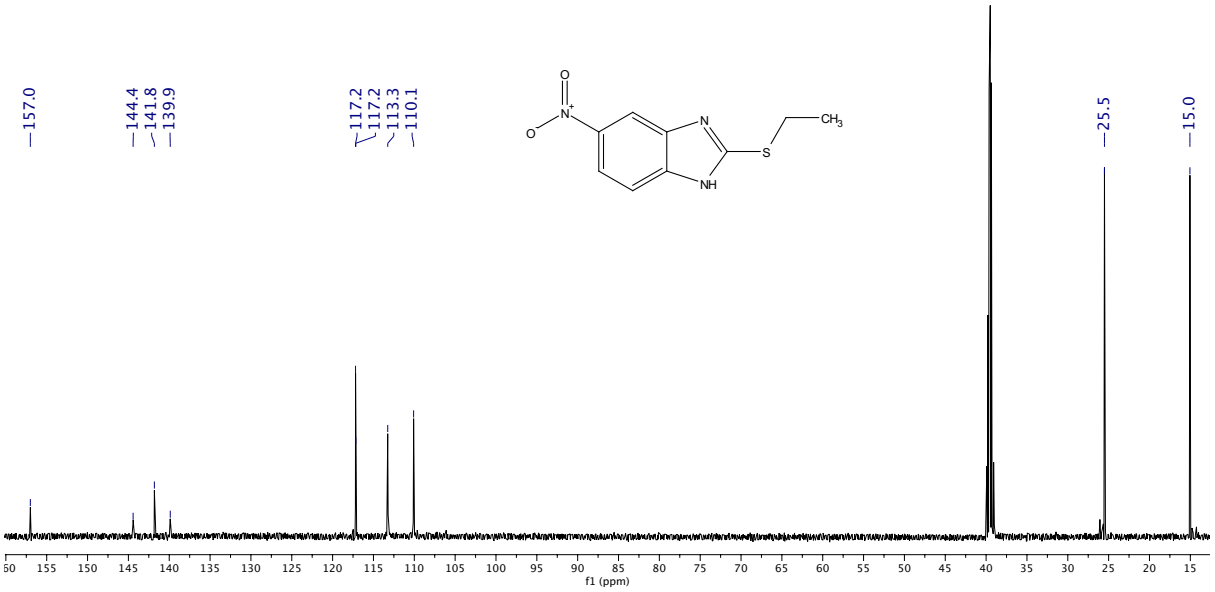
Espectro 5. RMN ^{1}H de **CON-3.**



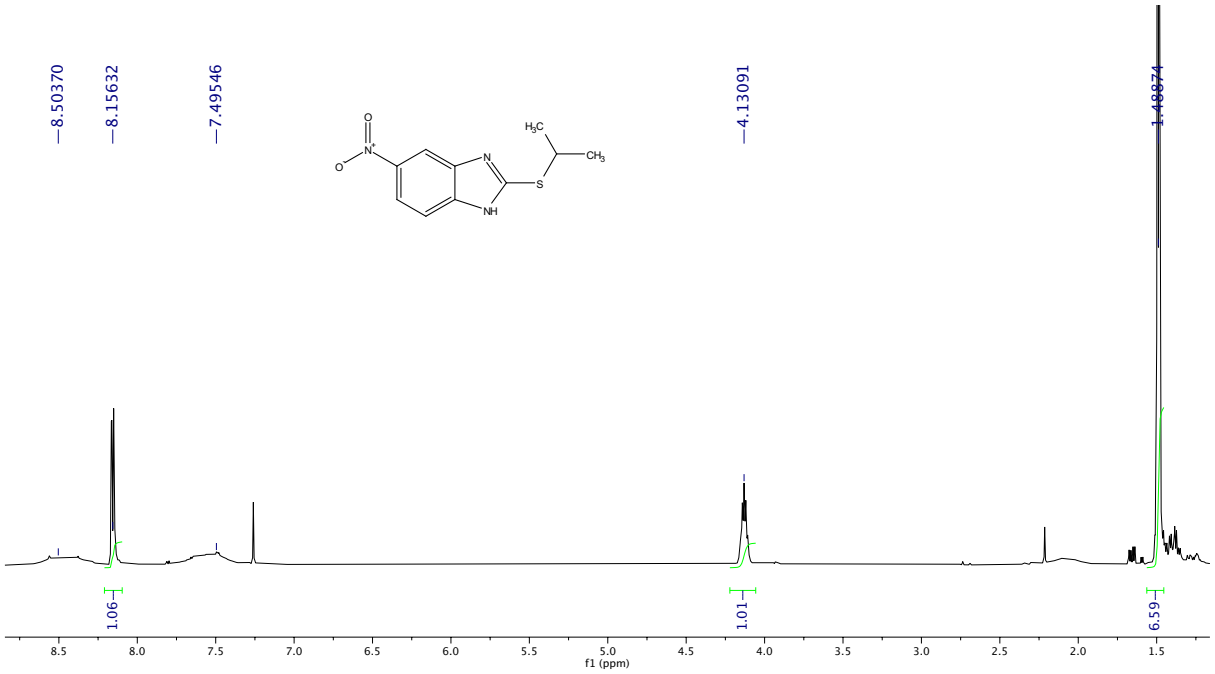
Espectro 6. RMN ^{13}C de **CON-3.**



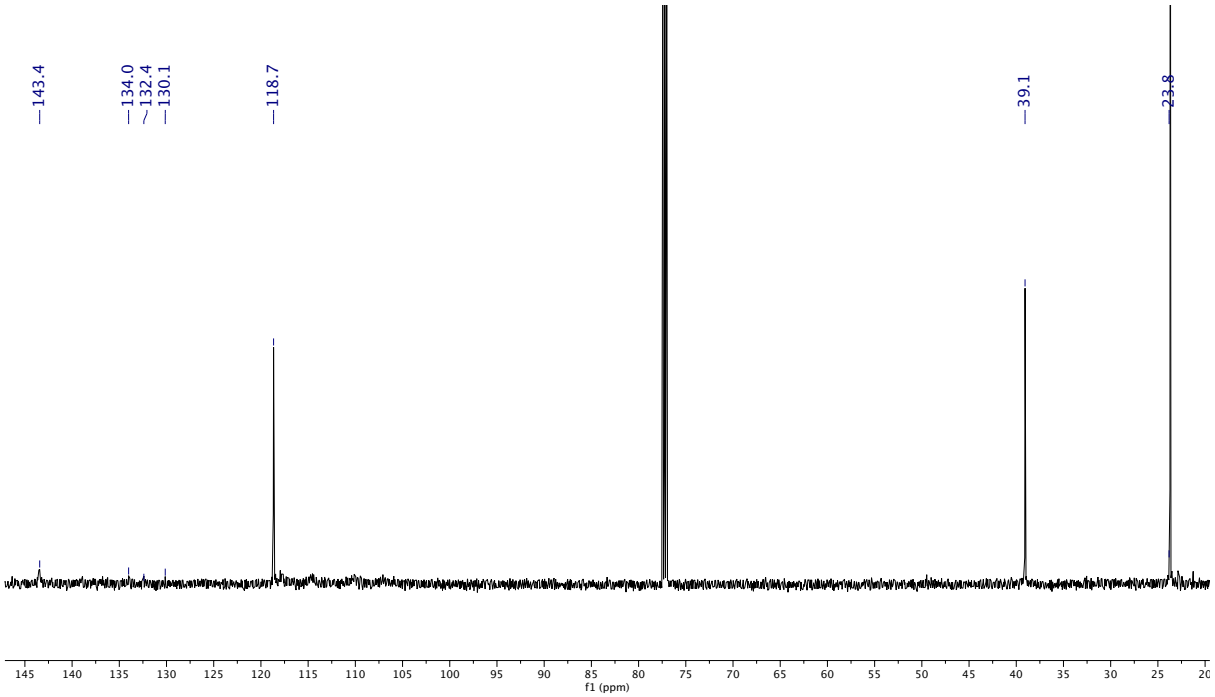
Espectro 5. RMN ^{1}H de **CON-4**



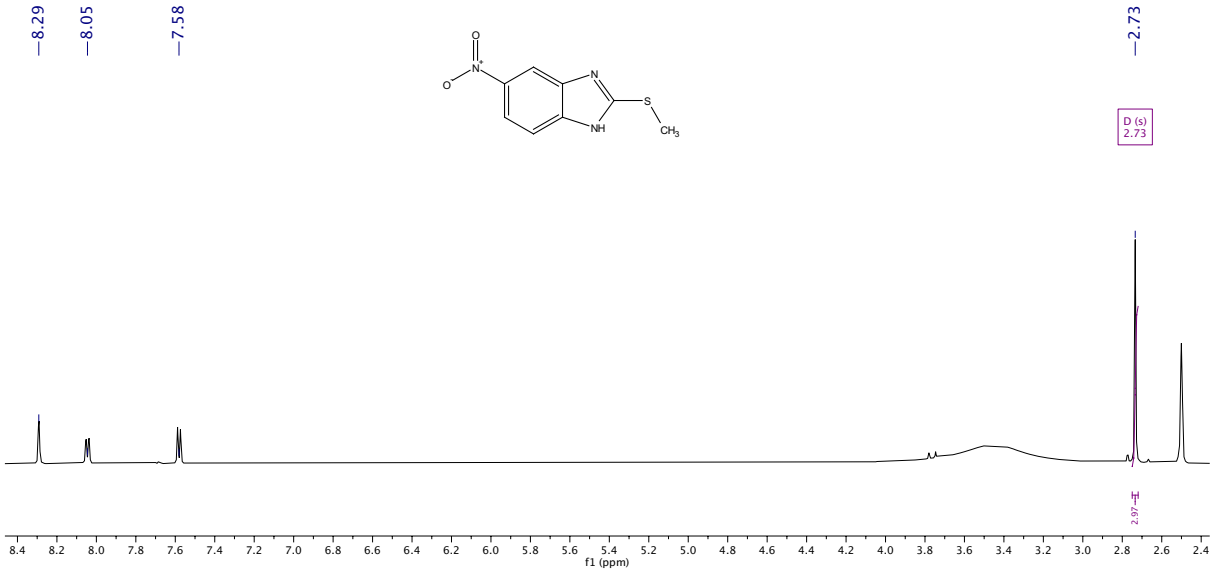
Espectro 6. RMN ^{13}C de **CON-4**



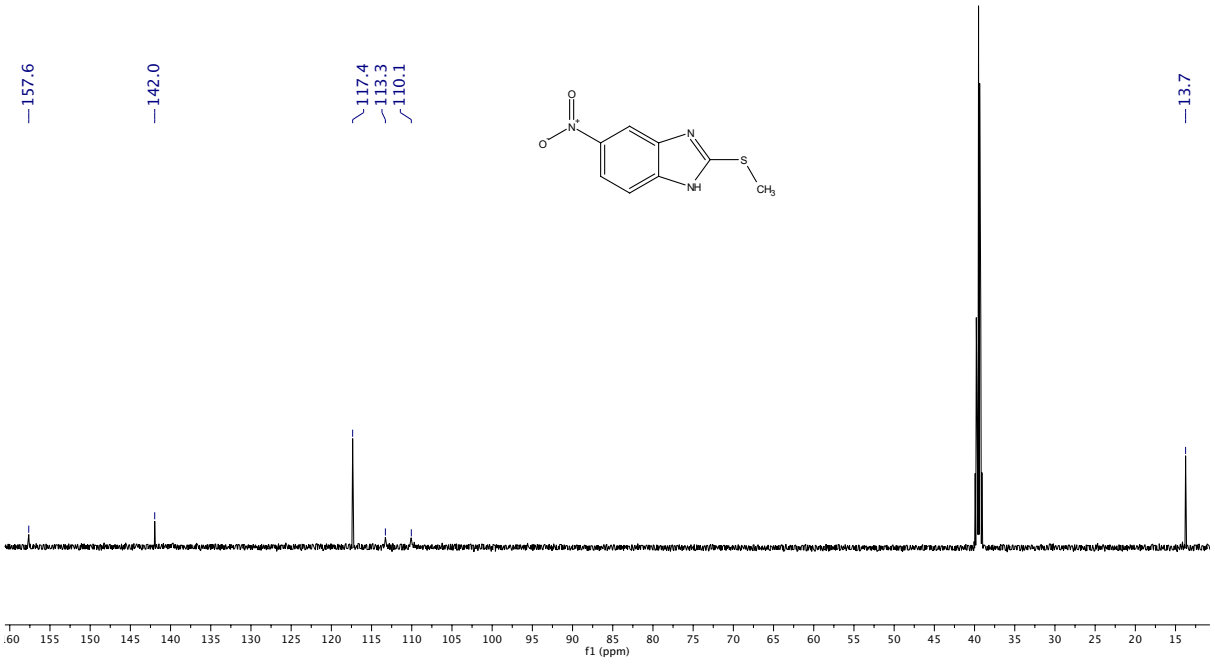
Espectro 7. RMN ^{1}H de **CON-5.**



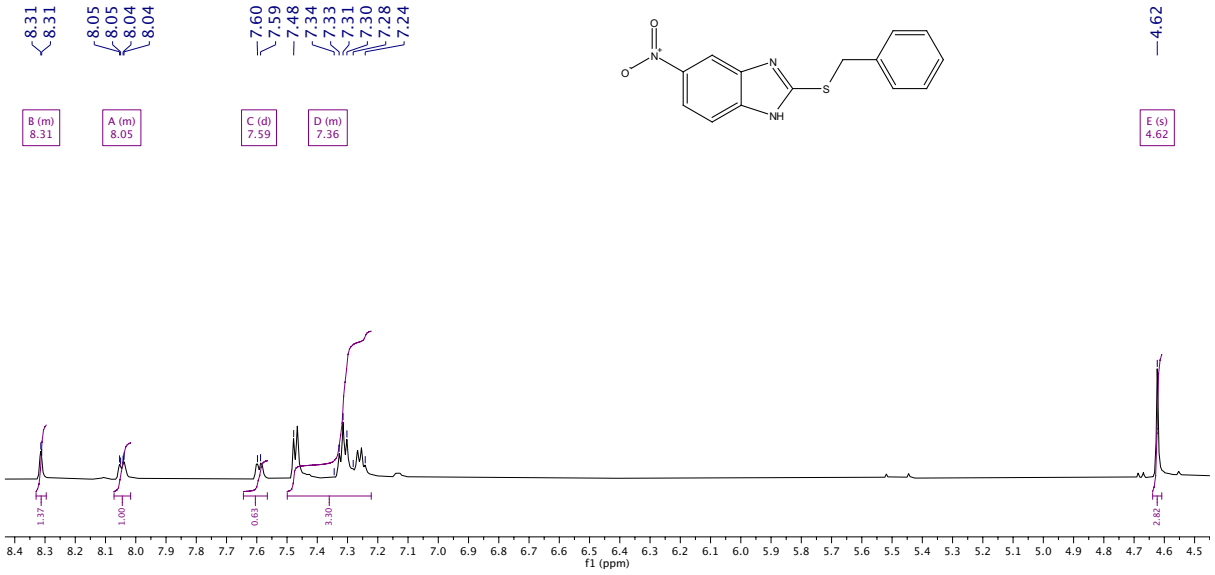
Espectro 8. RMN ^{13}C de **CON-4**



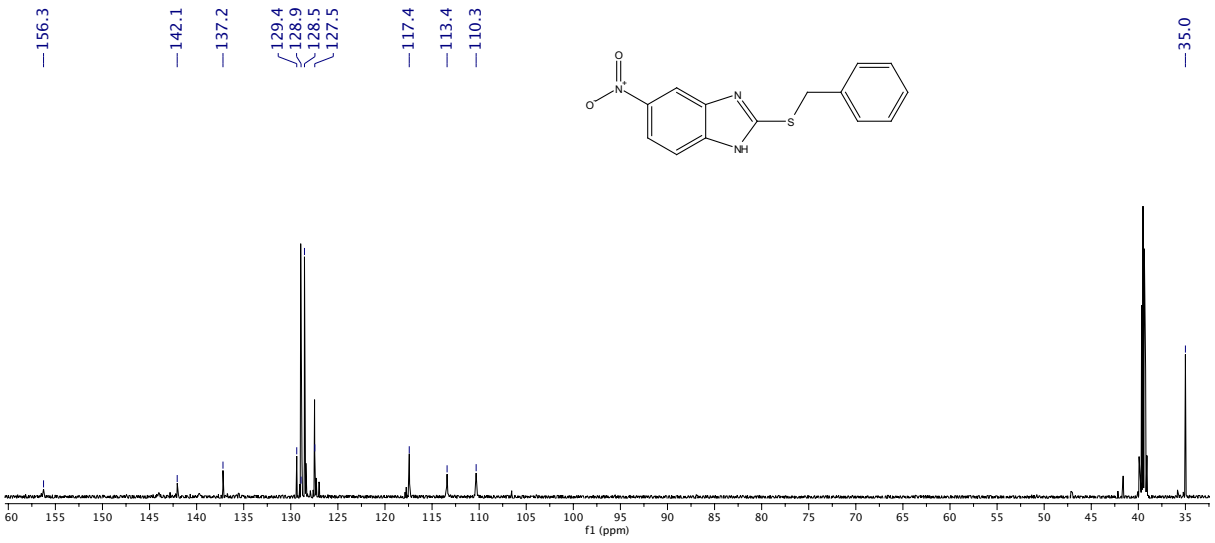
Espectro 9. RMN ^{1}H de **CON-6.**



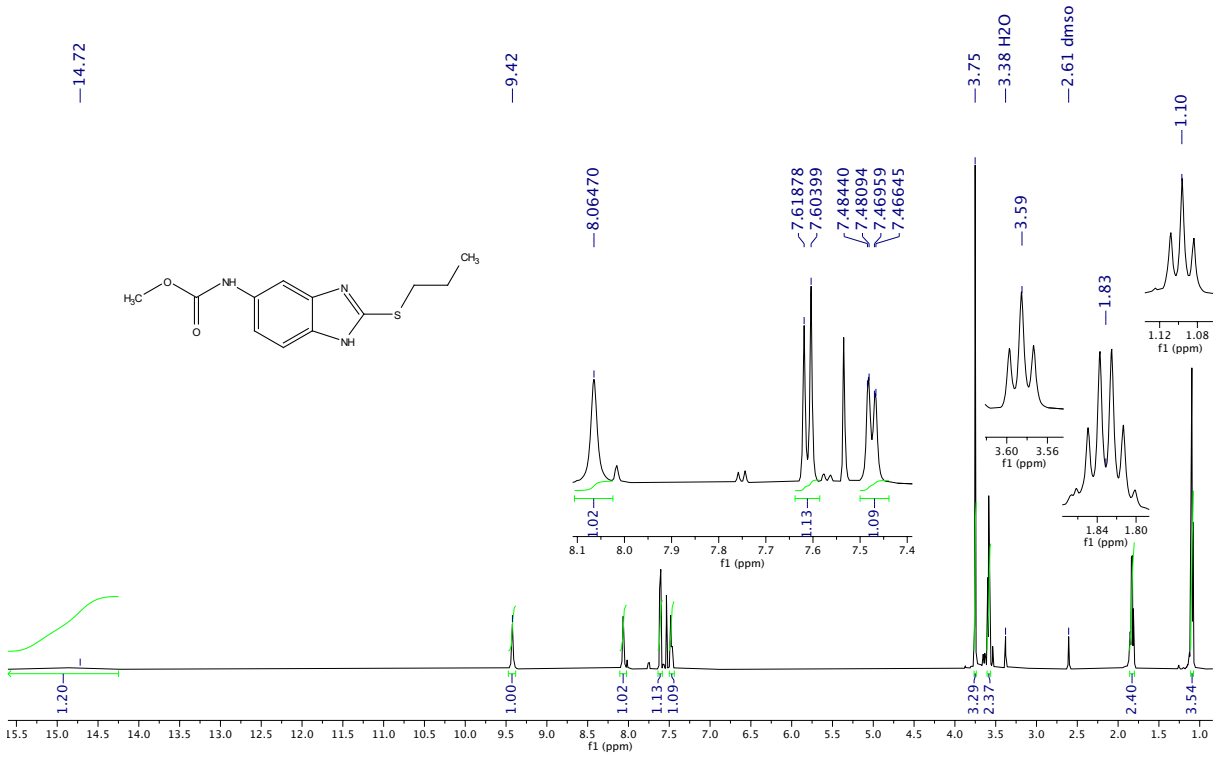
Espectro 10. RMN ^{13}C de **CON-6**



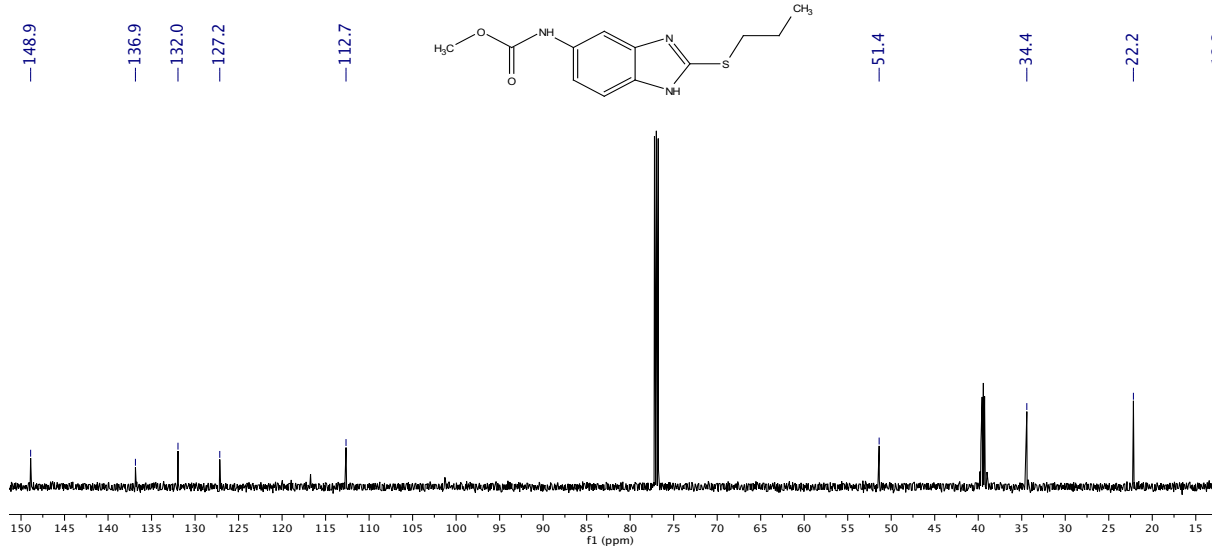
Espectro 11. RMN ^{1}H de **CON-7.**



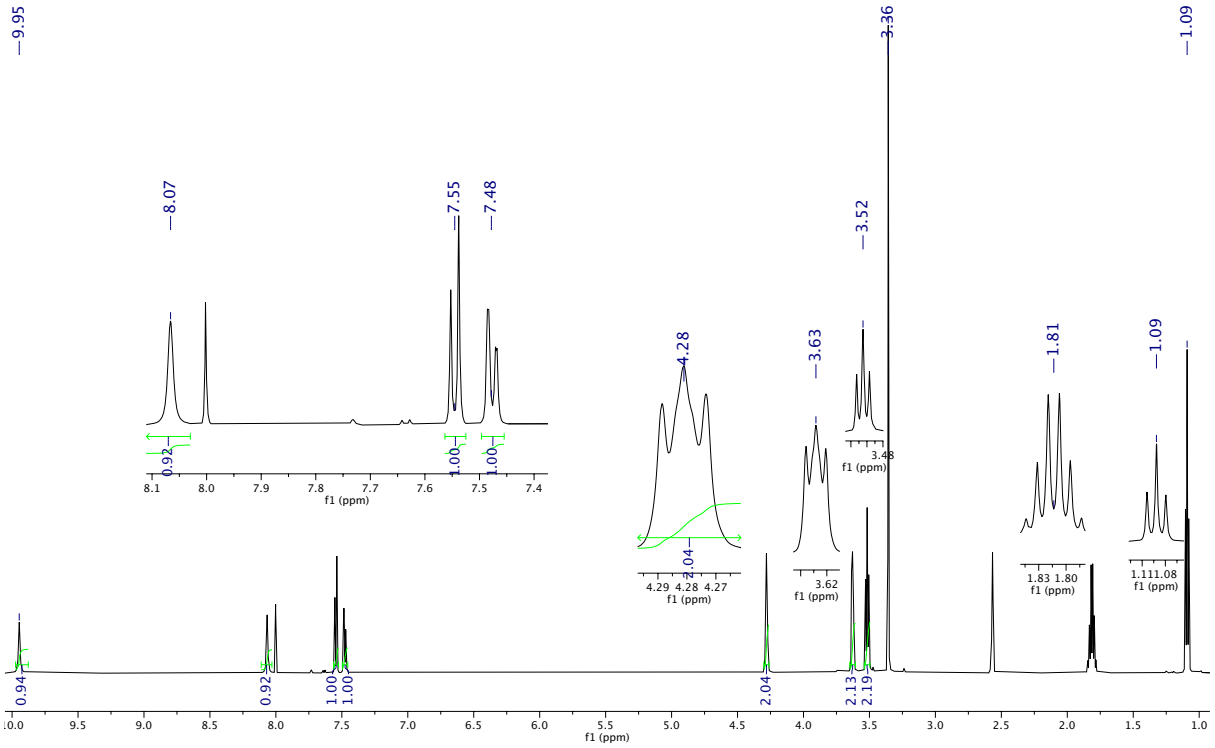
Espectro 12. RMN ^{13}C de **CON-7**



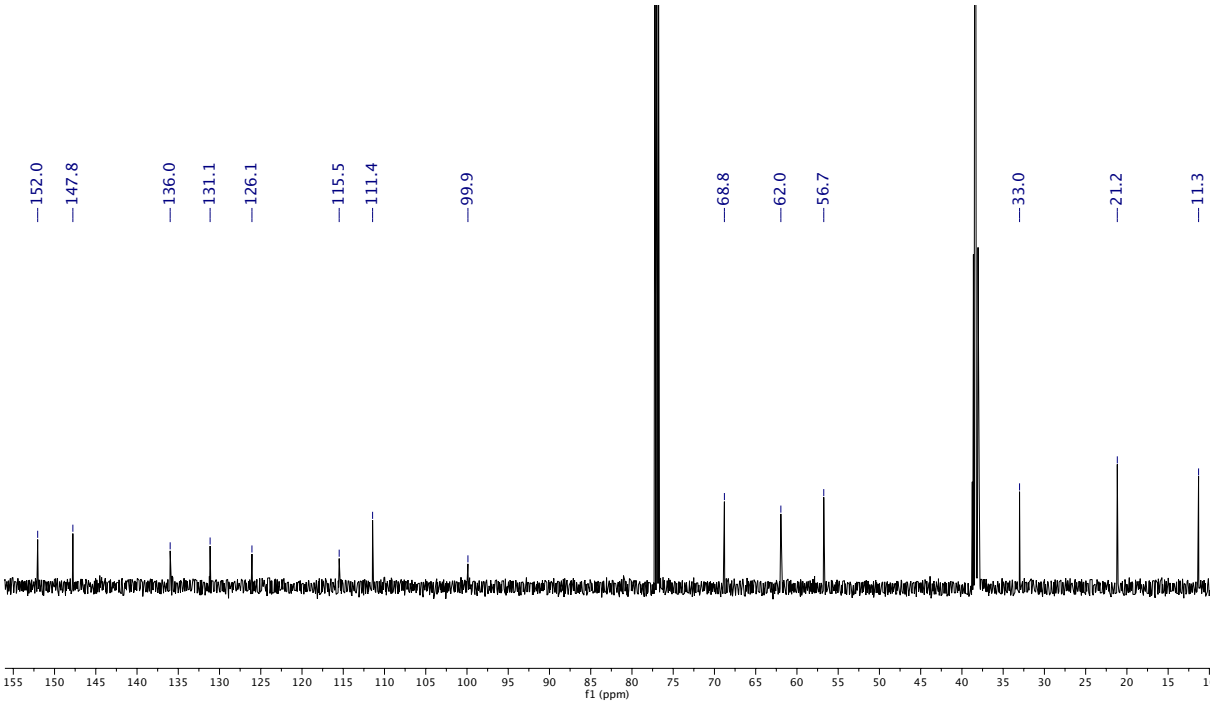
Espectro 13. RMN ^{1}H de **CON-8.**



Espectro 14. RMN ^{13}C de **CON-8.**



Espectro 15. RMN ^{1}H de **CON-9.**



Espectro 16. RMN ^{13}C de **CON-9**

ESPECTROS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

XIV ENCUENTRO DE ESTUDIANTES DE POSGRADO EN FARMACIA

UAEM Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

La Facultad de Farmacia a través de la Secretaría de Investigación, la Jefatura de Posgrado y el Consejo Estudiantil de Posgrado

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: ***Martínez-Conde Carlos,*** *Navarrete-Vázquez Gabriel, Colín-Lozano Blanca y Escalante-García Jaime.*

Por la PRESENTACIÓN DEL TRABAJO LIBRE titulado

"DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

en el 14vo. Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Celebrado de forma virtual el 27 de noviembre del 2020, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Coordinador Comité Organizador

Facultad de Farmacia

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

XIV ENCUENTRO DE ESTUDIANTES DE POSGRADO EN FARMACIA

UAEM Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

La Facultad de Farmacia a través de la Secretaría de Investigación, la Jefatura de Posgrado y el Consejo Estudiantil de Posgrado

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A: Martínez-Conde Carlos

Por obtener el SEGUNDO LUGAR en la evaluación de TRABAJOS LIBRES, en el área de QUÍMICA FARMACÉUTICA para el grado de DOCTORADO, con el trabajo titulado

"DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

en el 14vo. Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Celebrado de forma virtual el 27 de noviembre del 2020, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Coordinador Comité Organizador

La Academia Mexicana de Química Orgánica

OTORGA LA PRESENTE

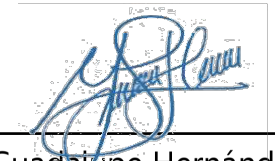
CONSTANCIA A:

Martínez-Conde Carlos, Colín-Lozano Blanca, Escalante-García Jaime, Navarrete-Vázquez Gabriel

Por su participación con el cartel titulado:

Diseño, síntesis y actividad farmacológica de bencimidazoles azufrados

En el marco de la XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica celebrada en modalidad virtual del 19 al 23 de abril del 2021



Dra. Ma. Guadalupe Hernández Linares
Presidenta de la AMQO

XV Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Facultad de Farmacia

La Facultad de Farmacia de la UAEM a través de su Secretaría de Investigación, Jefatura de Posgrado y Consejo Estudiantil de Posgrado en Farmacia

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A: **Carlos Martínez Conde**

Por haber sido ganador, como ***MEJOR TRABAJO LIBRE***, en el área de ***QUÍMICA FARMACÉUTICA***, y por participar como ***PONENTE*** con el trabajo titulado:

"Diseño, síntesis y acción antiparasitaria in silico de tiobencimidazoles"

en el **15vo Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia**

Celebrado de forma virtual el 29 de noviembre del 2021, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernandez Baltazar Director Facultad de Farmacia	Dra. Dea Herrera Ruiz Secretaria de Investigación Facultad de Farmacia	Dr. Sergio Alcalá Alcalá Jefe de Posgrado Facultad de Farmacia

VIII Simposio

Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos

POSGRADOS EN CIENCIAS QUIMICO BIOLOGICAS

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química

Colegio de Química Farmacéutica

Otorgan la presente **Constancia** a:

Carlos Martínez-Conde, Gabriel Navarrete-Vázquez, Blanca Iris Colín- Lozano, Jaime Escalante-García, Emanuel Hernández-Núñez, Jessica Nayelli Sánchez-Carranza

Por su participación en la sesión de **Carteles Estudiantiles** del VIII Simposio "Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos", con el trabajo titulado:
"Diseño, síntesis y actividad farmacológica de bencimidazoles azufrados"

Realizado los días 22 y 23 de junio de 2022

"Por Mi Raza Hablará El Espíritu"

Ciudad Universitaria, CdMx, a 15 de julio de 2022.

Dr. Francisco Hernández Luis
Jefe Depto. de Farmacia

Dr. Alfonso S. Lira Rocha
Comité Organizador

Dr. Antonio Romo Mancillas
Comité Organizador

X SIMPOSIO

Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos

Simposio en honor al
Dr. Rafael Castillo Bocanegra



Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

Colegio de Química Farmacéutica

Otorgan la presente **Constancia** a:

Carlos Martínez-Conde, Blanca Colín-Lozano, Emanuel Hernández-Nuñez, Lilián Yépez-Mulia, Rodrigo Aguayo-Ortiz, Jaime Escalante-García, Julio C. Rivera-Leyva, Jessica N. Sánchez-Carranza, Elizabeth Barbosa-Cabrera, Gabriel Navarrete-Vazquez

Por su participación en la sesión de **Carteles Estudiantiles** del X Simposio "Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos", con el trabajo titulado:

Optimización de la actividad giadicida y la solubilidad a través del desarrollo del Retroalbendazol un regioisómetro del albendazol

Realizado los días 12 y 13 de junio de 2024

"Por Mi Raza Hablará El Espíritu"

Ciudad Universitaria, CdMx, a 28 de junio de 2024.

Dr. Francisco Hernández Luis
Jefe Depto. de Farmacia

Dr. Alfonso S. Lira Rocha
Comité Organizador

Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz
Comité Organizador

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., a 10 de diciembre de 2024
Folio: FF/CIP/OF/094/2024

Asunto: asignación de jurado

M. en F. CARLOS MARTINEZ CONDE
ALUMNO DEL DOCTORADO EN FARMACIA

PRESENTE

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión ordinaria del 9 de diciembre de 2024, **designó** a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada **"DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"**,

Sinodal		**Adscripción**
Presidente	Dra. Dea Herrera Ruiz	Facultad de Farmacia-UAEM
Secretario	Dra. Judith González Christen	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal 1	Dra. Elizabeth Barbosa Cabrera	Escuela Superior de Medicina, IPN
Vocal 2	Dr. Germán Bernal Fernández	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal 3	Dr. José Luis Medina Franco	UNAM
Suplente 1	Dr. Jaime Escalante García	CIQ-UAEM
Suplente 2	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito borrador de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos. Además de dar seguimiento a la respuesta de los sinodales asignados, quienes tendrán que resolver de su aceptación o rechazo para formar parte de esta comisión y jurado dentro de un plazo de 5 días hábiles después de la entrega del presente oficio.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por una humanidad culta"

e-firma-UAEM
Dr. Germán Bernal Fernández
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

c.c.p Dra. Dea Herrera Ruiz, Dra. Judith González Christen, Dra. Elizabeth Barbosa Cabrera, Dr. Germán Bernal Fernández, Dr. José Luis Medina Franco, Dr. Jaime Escalante García y Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
c.p. Archivo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2024-12-10 17:02:14 | FIRMANTE

OfMtSS+IcIHtF0jehIvo0HJfl+VDpZ0eGuMJh4fQmYbXtXBgJ3swkqHbmtaYFHIf35ikfbwHA9KwWXmutYVV0jSi3Ml/uy4feDxuGquW8JLBqLsq1KXZqtLKrqM7o/KdeV2Xd/7IGP9xKj
jWWlhfeCpsnlwA7JJTqIlUuupu7ojKLLqonywaCIuHcPTUGH86VcykrlOHxT5qvzZsd7zJDE8UHODOAtgyQjeBbN1rB76qCz1VU4A3ipKVAaa0VidCnwUIKzBXY9G5xDwJCtIVoyhn
MIOBQv3bkx5Rei8TOTG57VYo3x4snIY9aZaCgGXGKxbYOtB3ZxmH3y8gwESROg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

QyTmX9rsR

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8Bmhf7x6GrB82DWp2DLItYoRGySslfQi

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Martínez Conde

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
_X_ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Dea Herrara Ruiz**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

_x_ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Dea Herrera Ruiz
[Nombre y firma del jurado]

07 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2025-04-07 15:08:12 | FIRMANTE

lerNrCBxos6QRIcu9ODgzPOQIjajY0X7r8dAYXjEI3by+UbLhrNEOhsR9pIOimzLLijeFfFYa/pUlERj5/0GiAgqfHJpkKTI7Kx/zWj6HvXnAzGV+t5g53C+l7HpHdRzy/Bn7+TP0fyyuxF3qrmPPatR3I/xZl0QJIg1Se8zFH8ErfF4ytWb7iFl/1FuWdJvgyge63v9umETOTjoBN84hUTH//LXPq9PPfwvd0VXAHddodu9LH2s1CtbXS+iqPfO09wIBGJBUzEdtmv8y0R7x+W6CmHyiZQykyZlW2n4imQI3Wxu6o48927OstOJ4CewfWUJjBijQJYi9KrQ8ieKyg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

mZwoERhci

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/bfAI9yCIeWN0pIBVh6hKtcVi9ieDFSSU

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Martínez Conde

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
_X_ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Judith González Christen**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

_x_ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Judith González Christen
[Nombre y firma del jurado]

07 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2025-04-08 08:19:07 | FIRMANTE

ok6+J6MIN1l79QaT6YecvMTs2N4VW40aR92jM2EzZfaDTwUOWRYHljt37nZxcdUbx5EsAXksG7OAdr8Kaz0v8kkLYAOkQ/z5jxZrcUBUfH6WEHcsma0XLXQcZjpSwERFECPDtd
/XO045q3KTLTX30bomxTk53vLZAfvuuhfodLc5gLlAafhNOeSDqVg7ZOBj3EnJQvvRwzWWP1lw1aUgOGTfJZpcsG0efuKw+mzbNYswHgZ+YRA+9KlfLGuYX1Yp9Ew9PH6Kevw
RiR+EQQzZH1EnAkP/EDeHQDCo/tfq0Ofl8CC22vnM1WKf7kakq5SChh/IDgY3vdRqiYYBJI+1eg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

849SHrFfD

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8RtggxIlafMr8lCyysixevkThY1ya6lV

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Martínez Conde

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
_X_ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Elizabeth Barbosa Cabrera**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

_x_ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Elizabeth Barbosa Cabrera
[Nombre y firma del jurado]

07 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

REYNA ELIZABETH BARBOSA CABRERA | Fecha:2025-04-29 10:35:45 | FIRMANTE

cYGdGpot0VfCRO5seBTNi/NU3mBp2dDrr8oFMW8NLKjqZGpfvTU/hLU6HTGRT80Ua6V5IebAKWLMuHhIG26BbpQmyiEKelg3LdMVPFKcSSSgWTKPbqgW/ErjYDT+NnLE84/LGxi6rtThsW9hjJ5eINaD2JIVql6lr0Sc9qIeEYXMUa21W5i9sRAjcWjpzOKOXdXT7MbfqurTS/jDMvwUFvkz+pWW4DcXzWsdHGp3StCq+ZamVPQUYRafINMwsmhkYajMfFdPZK0e+tmzh4IB/7FTY3HzHBJBozkqkITgPZN/kYTSDOeCTU29VSPf3Jssr9kuqGyVnI20OMQT2KaPJw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

37CgmbGeZ

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/80um2jTCBNdC8Q7p5CE6rV8C8usvwzkp

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Martínez Conde

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
_X_ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Germán Bernal Fernández**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

_x_ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. Germán Bernal Fernández
[Nombre y firma del jurado]

07 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2025-04-07 14:10:41 | FIRMANTE

FJkog6XZU5SV4ZqFQ+WYgzvT5DEwC0Hq+jTsXO5E2UmVD9lS77X6lqvDTajzccP9pQs0wxLReKemDGGGcaaFSWUrU/sEyyTuBQSed5PE3cHJv2Z0CKZvGwbj/FkQQyrS1RHFTubncvy++fXYOGBllQ/fR5JZfLzPkQq5j3P52XG6h9eXf5VADgDsybP+yrE6Kq0a6241H2umlddMLZpWqyIUOLPUL7/ZdBiOqcb8l1puMxfamTWOZ/PqZTRsYszO+1DdrynK5owRRa4bTfgfds88nJCbGKDUaWoiW9AHFMNC/zq7gxQ/9l6+IZIJLxmPZM0ewkCEu56SADanJvGihQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

zMwGISZ96

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Uc809CMVsJukPEwQihnxBLvqb5OCcYhu

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Martínez Conde

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
_X_ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. José Luis Medina Franco**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

_x_ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. José Luis Medina Franco
[Nombre y firma del jurado]

07 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JOSE LUIS MEDINA FRANCO | Fecha:2025-04-07 12:47:14 | FIRMANTE

aAKkHAzi3+7AycOBiYal3t8hv5aICOKpuN2crkIGg2k/GWfBCe08Wkkh7Qc92/2Zehp2N+clyDg91UlU/q4e3Aal9U9nIS8Wm+6mEJay3NtaWTvD1wlSpdF7hclndEQ4Fkgb8W6GFN9RvEmIOmIVxdVYhOQKYept5r+x0Y24OMbYzsnir6C8HvMtUwGYLeK3aQV3AOBGj3EsfcdU9i5DQdIoTc4rMvXl0AWaEdxqEtd2JgHA3KAgo70WQt0qtwrlWHygRzcXTKlJnhoBjYqvpYXsHsSeeFoMGr0hGjycGx1O5Oe/jxxnkSjxohqKBhOzmgC3yD7anfEV43eAHGZpzQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

H8zpU5ft1

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JHaXpI2OjjPQucvcPyJ2Y9KkSFlrvcVI

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Martínez Conde

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
_X_ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Jaime Escalante García**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

_x_ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. Jaime Escalante García
[Nombre y firma del jurado]

07 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JAIME ESCALANTE GARCIA | Fecha:2025-04-07 17:15:40 | FIRMANTE

wEqnBMDfvuFjXSm2jwuio7Wsku9PSotnMcBGNgan9Z6ntO1twy4MZq0yTvuxZAsOgMdJTo1P1EnwwHFGO9z8GQS5thuIMQq95aGLbGTMjB+5l9lSCXrKgnjIn7u0s6uEHReYDvGfEHxgBCbM5fQxKhJoC3kfETUYAChULzor7KQZPll+IQYbrAMYfDKS7RgmnBza8r5qPRXAncqL5pqXAkQwF5Qwux+E3EnquI2aaJTDN9iAD0Hc8zqfjAazBU3bVbxjQTRrd56+Ks92L3TWmoMWq7vuPVtu2fp32/lYBHmmlCScTdkACUK58qJ+enxJ2oZ9/FDzI4d+DjhTL6PFA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

ugXz58HLY

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9zerYjWQYEYfMJlTOIQKaOt3B3V9FD60

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Martínez Conde

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE BENCIMIDAZOLES AZUFRADOS"

Grado a obtener:

____ Maestría en Farmacia
_X_ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

_x_ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez
[Nombre y firma del jurado]

07 de abril de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2025-04-07 23:10:20 | FIRMANTE

ag8JLtXZX3+TeTbgXQJN4UJ3sGAVSWQdr6rBnf9IRjP+B46Nfk3DD5VutWpNzY276Bpe/kYoPiiW8wo72Z+C4AREsc4lAbOQrdSldqxxBD+YJ9dYIoj2Sj77693WpUc6OYa8Qo9S
NyFKjAcrWZT6+KmP4+u2zuKxSSR0JSReIiYJFjH1frCyrbi9aP3IAQfedeRgYlGK9m+3w4HsG0Gofhi+3+cBHoEbi3JLmSjH3mry0mMsOpiNCEEqSs8UUrWRC5MVNscwGrcaHXT
uRm9gPjiYsISZTJlNaXeGgtwg4MokpHNZrCK8P2Ewp1AP3iMoeL/eMuoSOUUdu3kUxbXq5g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

CTWgKtDkV

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Wz2wNKOHOmko0DVxlrO6ri7sPCY3IDPT