

00524
179



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**SINTESIS DE CARBOXAMIDAS 1-METILBENCIMIDAZOLICAS
CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA**

• Dirección General de Bibliotecas •
• difundir en formato electrónico e impreso
• unido de mi trabajo recepción

NOMBRE: Eduardo Sandoval

Rivera

CHA: 09/09/03

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
EDUARDO SANDOVAL RIVERA



MEXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Prof. Ofelia Espejo González

VOCAL

Prof. Andrés Guillermo Martínez Casas

SECRETARIO

Prof. María Alicia Hernández Campos

1er SUPLENTE

Prof. Ramón Marcos Soto Hernández

2do SUPLENTE

Prof. Miguel Ángel Martínez Suárez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 122, Departamento de Farmacia,
Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR


M. en C. María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO


Dr. Rafael Castillo Bocanegra

SUSTENTANTE


Eduardo Sandoval Rivera

DEDICATORIAS

A ti mamá, que gracias a todos tus esfuerzos, a tu gran apoyo, pero sobre todo a tus sacrificios, hoy puedo decir que soy un hombre de bien. Sé que anhelabas hacia mucho este momento y nada me hace más feliz que cumplir tu gran sueño: ver a tu hijo titulado. Gracias por todo ma'.

A Oli y Yola, por ser unas extraordinarias hermanas y por compartir juntos momentos alegres y tristes. Quiero que sepan que siempre podrán contar conmigo.

Y a mi mejor amiga Blanca, por ser una de las personas más nobles, más bellas, pero sobre todo, más importantes en mi vida. Gracias a ti pasé uno de los momentos más agradables de mi vida, nunca te olvidaré.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de formar parte de ella, por permitir mi formación desde la preparatoria.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el financiamiento y beca otorgados a través del proyecto PAPIIT IN 204998.

Al CONACYT por el apoyo brindado al proyecto G-34851-M y por la beca otorgada durante la realización de esta tesis.

A todos el personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), en especial a *Nayeli López Balbiaux* y *Yeni Islas* por su colaboración en la realización de los espectros.

A todos mis maestros de la Licenciatura por compartirme sus conocimientos, por sus orientaciones y consejos que me siguen motivando el interés por esta disciplina.

A mis tíos *Marcelino* y *Virgina*, y por supuesto a mis primos *Armando*, *Jacqueline* y *Socorro* por el hecho de ser mi familia, por todo el apoyo, cariño y buenos deseos que siempre me han brindado a mí, a mi mamá y a mis hermanas.

A todos mis compañeros del laboratorio 122, por formar parte de un gran grupo, por ser como de mi familia, por compartir tanta anécdotas juntos. En verdad los aprecio mucho, en especial a *Sergio Rodríguez Morales* por que además de ser mi maestro en este laboratorio, es un gran amigo que siempre procura el bien de los demás. Gracias por tus consejos y apoyo.

A *Nayeli* porque además de ser mi compañera con la cual crecí en estos años, es una de mis grandes amigas. Te quiero muchísimo chaparra.

Pero sobre todo....

Al *Dr. Rafael Castillo Bocanegra* por ser parte de su equipo de trabajo, por hacerme sentir como en una gran familia, por su sencillez y su gran corazón. Por todas sus orientaciones, confianza y consejos para mi desarrollo profesional. Gracias por todo Doc.

A la M. en C. *Ma. Alicia Hernández Campos* por compartir conmigo su amistad y sus conocimientos, que me permitieron desarrollarme en esta bonita área de la Química. Gracias por todo mayestra querida.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Introducción | 1 |
| 1. Antecedentes | 3 |
| 1.1. Helminthiasis | 3 |
| 1.2. Protozoosis | 4 |
| 1.3. Epidemiología de Enfermedades parasitarias en México | 5 |
| 1.3.1. Ascariosis, oxiuriasis y otras helmintiasis | 5 |
| 1.3.2. Amibiasis intestinal, giardiasis y tricomonirosis | 7 |
| 1.4. Los bencimidazoles como fármacos antihelmínticos | 7 |
| 1.4.1. Relaciones Estructura-Actividad en Bencimidazoles | 9 |
| 1.4.2. Modificaciones en la posición 5(6) del anillo de bencimidazol | 10 |
| 1.4.3. Modificaciones en la posición 2 del anillo de bencimidazol | 11 |
| 1.5. Mecanismo de acción de los bencimidazoles | 13 |
| 1.5.1. Microtúbulos y tubulina | 13 |
| 1.5.2. Bencimidazol 2-carbamatos de metilo | 14 |
| 1.5.3. Triclabendazol | 14 |
| 1.6. <i>Trichinella spiralis</i> como modelo biológico para la evaluación antihelmíntica | 15 |
| 1.6.1. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> | 15 |
| 1.6.2. Ensayo colorimétrico con sal de tetrazolio (MTT) y metasulfato de fenazina (PMS) | 16 |
| 1.7. Los bencimidazoles como fármacos antiprotozoarios | 16 |
| 1.7.1. 1-Metilbencimidazoles | 17 |
| 1.8. Generalidades sobre Bencimidazoles | 19 |
| 1.8.1. Síntesis de Bencimidazoles | 20 |
| 1.8.2. Síntesis de 1-metilbencimidazoles | 21 |
| 1.8.2.1. A partir de bencimidazoles | 21 |
| 1.8.3. Síntesis de <i>N</i> -metil- <i>o</i> -nitroanilinas | 22 |
| 1.8.3.1. A partir de <i>orto</i> -cloronitrobenzenos | 22 |

| | |
|--|----|
| 1.8.3.2. Por metilación directa de <i>o</i> -nitroanilinas | 23 |
| 1.8.3.3. Por <i>N</i> -metilación de acetanilidas (acetamidas) | 23 |
| 1.8.4. Síntesis de carboxamidas | 23 |
| 1.8.4.1. A partir de halogenuros de ácido | 24 |
| 1.8.4.2. A partir de ésteres | 24 |
| 1.8.4.3. A partir de ácidos utilizando un agente acoplante | 25 |
| 2. Planteamiento del problema | 26 |
| 3. Objetivos | 27 |
| 4. Procedimiento experimental | 28 |
| 4.1. Síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas | 28 |
| 4.1.1. Síntesis de la <i>N</i> -metil-1,2-feniléndiamina | 28 |
| 4.1.2. Síntesis del ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazo15-carboxílico (36) | 30 |
| 4.1.3. Síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas | 31 |
| 4.2. Parte biológica | 31 |
| 4.2.1. Evaluación de la actividad antihelmíntica de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas | 31 |
| 4.2.2. Evaluación de la actividad giardicida de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas | 32 |
| 5. Resultados | 33 |
| 5.1. Parte química | 33 |
| 5.2. Parte biológica | 38 |
| 5.2.1. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> | 38 |
| 5.2.2. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre <i>Giardia lamblia</i> | 38 |

| | |
|---|----|
| 6. Discusión de Resultados | 40 |
| 6.1. Parte Química | 40 |
| 6.2. Parte Biológica | 47 |
| 7. Conclusiones | 49 |
| Parte experimental | 50 |
| Bibliografía | 61 |
| Apéndice | |
| Espectros | |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1 | Datos epidemiológicos de las helmintiasis por grupos de edad en México durante el 2001 | 6 |
| Figura 2. | Datos epidemiológicos de la amibiasis intestinal y de la giardiasis por grupos de edad en México durante el 2001 | 7 |
| Figura 3. | Sitios donde se han llevado a cabo cambios estructurales en el anillo de Bencimidazol | 9 |
| Figura 4. | Reacción de la reducción celular del MTT catalizada por PMS | 16 |
| Figura 5. | Tautómeros del bencimidazol (no se pueden separar) | 19 |
| Figura 6. | Isómeros bencimidazólicos (se pueden separar) | 19 |
| Figura 7. | Método general de preparación de derivados del bencimidazol. | 20 |
| Figura 8. | Método de síntesis de 2-mercaptobencimidazoles | 20 |
| Figura 9. | Método de preparación de derivados 2-metiltiobencimidazoles | 20 |
| Figura 10. | <i>N</i> -metilación de bencimidazoles con acetales dimetilados | 21 |
| Figura 11. | Metilación de bencimidazoles vía aminación reductiva. | 21 |
| Figura 12. | Metilación de bencimidazoles 5,6-disustituídos | 21 |
| Figura 13. | Síntesis de <i>N</i> -metil- <i>o</i> -nitroanilinas por <i>S_NA</i> del 2-cloronitrobenzeno | 22 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Metilación directa de <i>o</i> -nitroanilinas | 22 |
| Figura 15. <i>N</i> -metilación de acetanilidas que poseen un grupo nitro en posición <i>orto</i> | 23 |
| Figura 16. Formación de carboxamidas a partir de halogenuros de ácido | 24 |
| Figura 17. Formación de carboxamidas a partir de ésteres | 24 |
| Figura 18. Formación de carboxamidas utilizando el agente activante DCC | 25 |
| Figura 19. Formación de carboxamidas utilizando el agente activante CDI | 25 |
| Figura 20. Tautomería protónica presente en la carboxamida 19 y que origina la existencia de dos isómeros con las relaciones estructurales 1,5 | 26 |
| Figura 21. Productos secundarios posiblemente obtenidos en la hidrólisis del compuesto 32 . | 43 |
| Figura 22. Equilibrio tautomérico <i>tiol-tiona</i> que presenta el compuesto 34 . | 44 |

LISTA DE TABLAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabla 1. | Prevalencia mundial de helmintos intestinales | 3 |
| Tabla 2. | Algunos agentes bencimidazólicos utilizados en medicina clínica | 9 |
| Tabla 3. | Actividad antihelmíntica de algunas carboxamidas que combinan las características del triclabendazol y del compuesto CDR1 87-144 | 12 |
| Tabla 4. | Actividad giardicida de 1-metilbencimidazoles clorados | 18 |
| Tabla 5. | Constantes físicas de los intermediarios y compuestos finales sintetizados. | 34 |
| Tabla 6. | Constantes físicas de los intermediarios y compuestos finales sintetizados | 35 |
| Tabla 7. | Datos espectroscópicos y espectrométricos de los intermediarios y compuestos finales preparados | 36 |
| Tabla 8. | Porcentaje de reducción de la viabilidad <i>in vitro</i> de las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> por las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas | 38 |
| Tabla 9. | Concentraciones letales de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas | 39 |
| Tabla 10 | Porcentaje de reducción de la viabilidad <i>in vitro</i> de las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> por la carboxamidas 1-metilbencimidazólicas con relación estructural [1,6] | 47 |
| Tabla 11. | Actividad giardicida de carboxamidas 1-metilbencimidazólicas | 48 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Esquema 1. | Ruta de síntesis para obtener a la <i>N</i> -metil-1,2-feniléndiamina 33 | 29 |
| Esquema 2. | Ruta de síntesis para obtener al compuesto 36 . | |
| Esquema 3. | Esquema de síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas 37 y 38 a partir de 36 . | |
| Esquema 4. | Mecanismo de fragmentación del compuesto 29 | 41 |
| Esquema 5. | Obtención del <i>N</i> -metilacetamido utilizando una base y sulfato de dimetilo. | 42 |
| Esquema 6. | Mecanismo de fragmentación del compuesto 37 para dar el pico base de <i>m/z</i> 239. | 45 |
| Esquema 7. | Mecanismo de fragmentación del compuesto 38 para producir la especie [$M^{+}-1$] de <i>m/z</i> 336. | 46 |

INTRODUCCIÓN

Los parásitos intestinales son los agentes infecciosos más comunes en los humanos. Éstos se encuentran ampliamente diseminados alrededor del mundo, sin embargo, los países tropicales y subtropicales los que reúnen las características geográficas y climatológicas que favorecen la prevalencia de la mayoría de estos organismos.

Las parasitosis intestinales, tanto helmintiosis como protozoosis, son causa de morbilidad y mortalidad principalmente en la población infantil y de adultos jóvenes. Datos, recientes, obtenidos por la OMS alertan sobre una crisis de proporción mundial provocada por estas enfermedades infecciosas, que amenaza las ganancias obtenidas en décadas anteriores tanto en salud como en esperanza de vida.

Dentro de los fármacos que más se han empleado en el tratamiento de las helmintiosis están los derivados bencimidazol 2-carbamato de metilo, como el mebendazol y albendazol. Estos fármacos han demostrado una gran actividad, así como un amplio espectro de acción en infecciones intestinales, pero su baja solubilidad en agua reduce en gran medida su capacidad de absorberse, y por tanto, su eficacia en infecciones de tipo sistémicas, también se ve reducida. Para tratar de resolver este problema se sintetizaron nuevos derivados del tipo bencimidazólico como el triclabendazol y el CDRI 87-144. Recientemente, nuestro grupo de investigación sintetizó una serie de 5-aminocarbonilbencimidazoles (carboxamidas), los cuales presentaron buena actividad contra el helminto *Trichinella spiralis*. Pero estos compuestos presentan tautomería protónica, lo que origina la existencia de dos isómeros, quedando la interrogante de cuál de éstos es el responsable de la actividad biológica, y si el H en la posición 1 es indispensable para la actividad antiparasitaria.

Por otro lado, la mayoría de los fármacos disponibles para el tratamiento de las protozoosis tienen graves efectos colaterales. Por ejemplo, la terapéutica utilizada para tratar a pacientes asintomáticos infectados con *Giardia lamblia*, protozooario de importancia por su morbilidad que se relaciona con diarreas agudas y crónicas, incluye a los fármacos metronidazol, quinacrina y furazolidona. Pero los efectos secundarios de estos fármacos incluyen náuseas y carcinogénesis (metronidazol), psicosis tóxica (quinacrina) y baja efectividad (furazolidona). Pero recientemente se

Introducción

ha demostrado que bencimidazoles como el albendazol, mebendazol, flubendazol y fenbendazol, tienen un efecto similar al metronidazol, fármaco de elección en el tratamiento de algunas protozoosis, lo cual abre una nueva posibilidad para el tratamiento de estas enfermedades.

Es por eso que en esta tesis se pretende sintetizar carboxamidas 1-metilbencimidazólicas con el objetivo de obtener compuestos estructuralmente definidos y así poder averiguar qué isómeros son los responsables de la actividad antihelmíntica. Por otra parte, también se pretende evaluar la actividad antiprotozoaria debido a que los derivados del 1-metilbencimidazol sintetizados en nuestro grupo de trabajo mostraron una muy buena actividad contra los trofozoitos de *G. lamblia*. De esta manera, también, se busca aportar información valiosa sobre los requerimientos estructurales para la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria.

I. ANTECEDENTES

Las enfermedades parasitarias, tanto helmintiosis como las protozoosis como las, siguen siendo el principal problema de salud pública en países tropicales en vías de desarrollo. Las infecciones por estos parásitos son responsables de elevados índices de morbilidad y mortalidad, además del subdesarrollo socioeconómico en esas regiones. De acuerdo a estimaciones de la OMS, el número de víctimas debido a enfermedades parasitarias es de aproximadamente 3.5 millones en todo el mundo.¹ Las infecciones por gusanos con gancho, la malaria y la amibiosis son responsables de la muerte de 50,000 a 60,000; 1,000,000 a 2,000,000; 40,000 a 110,000 pacientes, respectivamente, cada año.¹

1.1. Helmintiosis

A pesar de que las enfermedades por helmintos (infecciones por gusanos) se encuentran dentro de las primeras enfermedades conocidas por el hombre, su impacto en la salud humana y animal se apreció hasta el trabajo realizado por Stoll en 1947 quien hizo un estudio sobre la situación del parasitismo a nivel mundial,^{2,3} ésta ha cambiado de manera proporcional al aumento en la población mundial (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia mundial de helmintos intestinales

| | 1947 ^a | 1999 ^b |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | 650 ^c | 1472 |
| <i>Ancyllostoma</i> (hookworms) | 450 | 1298 |
| Trichuriasis | 350 | 1049 |
| Enterobiosis | 209 | 300-500 |

^aPoblación mundial estimada de 2100 millones. ^bPoblación mundial estimada en 6000 millones. ^cEn millones de personas.

La intensidad de la infección por *Ascaris lumbricoides*, *Trichiuris trichiura* y por anquilostomas tiene sus niveles más altos en el grupo de niños de edad preescolar. Las tasas de mortalidad debida a estos nematodos se encuentra actualmente alrededor de 200 000 muertes anuales⁴.

La importancia en la salud pública de estas infecciones reside en el impacto crónico que tienen en la nutrición y en la salud humana. Los estudios realizados en India, Kenia, Indonesia, Myanmar y Tanzania demostraron que el estado nutricional medido en cuanto a talla, peso e incremento en el grosor de la piel mejoraba después de la desparasitación.⁴

Se sabe que la infección por *A. lumbricoides* está asociada a una mala digestión de las grasas y a la reducción en la absorción de vitaminas. La infección masiva por este parásito causa dolor abdominal, debilidad, pérdida de apetito, náuseas, estreñimiento o diarrea. Por otro lado, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* son parásitos que se alimentan de sangre y producen pérdida crónica de sangre; estas infecciones están fuertemente asociadas a anemia por deficiencia de hierro, lo que afecta de manera importante el crecimiento de los niños, el aprovechamiento escolar, el embarazo y la productividad en el trabajo.²

Otra de las helmintosis importantes como problema de salud pública en países tropicales es la tricurosis o tricocefalosis. El grupo de edad con mayor riesgo son los preescolares, millones de niños infectados tienen retraso en su crecimiento y desarrollo². Las cargas parasitarias elevadas de *T. trichiura* provocan el síndrome disentérico, la disentería crónica, prolapso rectal, y anemia por deficiencia de hierro y tasas de crecimiento muy reducidas.⁵

La enterobiosis (oxiuriasis) causada por *Enterobius vermicularis*, provoca diarrea y, cuando los parásitos entran a la vagina, producen vulvitis y vaginitis.

Además, las infecciones por helmintos en la ganadería dañan considerablemente la producción de leche, grasa, carne, huevos, mantequilla, lana, piel, teniendo, por tanto, un fuerte impacto socioeconómico en países con industrias ganadera y láctea.

1.2. Protozoosis

En lo que se refiere a las infecciones por protozoarios se sabe que invaden preferentemente el tracto gastrointestinal, además de hígado, bazo, la circulación sanguínea y otras cavidades. Las protozoosis intestinales más importantes para el hombre son la amebiasis, giardiasis, tricomonirosis, negleriosis y toxoplasmosis.

Entamoeba histolytica, agente causal de la amibiasis, afecta a casi 50 millones de personas alrededor del mundo, de los cuales, cerca de 100 mil pacientes mueren cada año.⁵ Provoca diarreas, estreñimiento de carácter intermitente, flatulencia y dolor abdominal de tipo espasmódico.

La giardiosis es otra enfermedad ampliamente extendida que infecta a casi 200 millones de personas en el mundo.⁶ Más del 60 % de los niños infectados con *Giardia lamblia* desarrollan sintomatología asociada con diarrea explosiva, flatulencia y dolor epigástrico. Se ha observado que las cargas parasitarias elevadas interfieren con los mecanismos de absorción de grasas y vitaminas liposolubles, así como la absorción de lactosa, glucosa, xilosa y vitaminas A y B₁₂.⁴

La tricomoniosis es una infección de transmisión sexual causado por *Trichomonas vaginalis*, que generalmente invade la vagina y los tejidos uretrales. Más de 200 millones de personas alrededor del mundo se infectan con este parásito cada año,⁴ provocando descargas vaginales y ardor vaginal.

1.3. Epidemiología de Enfermedades parasitarias en México

1.3.1. Ascariosis, oxiuriasis y otras helmintosis

Las infecciones por estos helmintos intestinales siguen siendo un problema de salud pública, debido a que junto con las amibiasis, están dentro de las 20 principales causas de enfermedad en México.

La distribución de la ascariosis por grupos de edad se concentra en los grupos de individuos menores de 15 años, con una incidencia mayor en la población de 1 a 4 años.⁴ En este grupo ha habido una disminución en la tasa de morbilidad de 1995 al año 2001.⁷ Después de 15 años, la infección disminuye a tasas menores a 500 casos/100 000 habitantes. Por otro lado, no existen diferencias significativas en las tasas de morbilidad en el resto de los grupos de edad durante los años analizados.⁴

La infección por oxiuros afecta principalmente al grupo de individuos menores de 15 años, sin embargo, las tasas más altas se encuentran en el grupo entre 1 y 4 años, en este caso la tasa llega a los 500 casos/100 000 habitantes, tasa observada en el año 1995; a partir de ese año se observa una disminución en la tasa hasta 260 casos/100 000 habitantes en el año 2001. En el resto de los grupos de edad la distribución es muy homogénea manteniéndose en menores a 100 casos/100 000 habitantes.

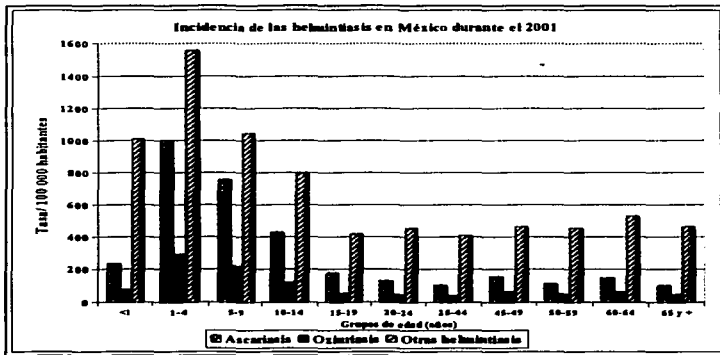


Figura 1. Datos epidemiológicos de las helmintiasis en México por grupos de edad durante el 2001

Dentro del grupo de enfermedades clasificadas como otras helmintiasis están la strongiloidosis, necatoriosis, trichuriasis, uncinariosis e himenolepiosis. En este caso, las tasas de morbilidad en nuestro país son aún más altas que las observadas en ascariosis. El comportamiento de la distribución de la infección por grupos de edad nuevamente se concentra en los grupos de edad menores a 15 años,⁴ lo que coincide con lo encontrado en la amibiosis intestinal y la ascariosis. En este caso las tasas promedio de morbilidad a nivel nacional en los 6 años analizados están entre 700 y 1 000 casos/100 000 habitantes. Las tasas de morbilidad del resto de los grupos de edad no se han modificado a través de los años estudiados cuyas tasas se mantienen en alrededor de 500 casos/100 000 habitantes.⁷

1.3.2. Amibiasis intestinal y giardiosis

La amibiasis intestinal tiene una alta incidencia en México. Los grupos de edad afectados son principalmente los menores de 14 años, pero las tasas de morbilidad más altas corresponden a los menores de 1 año.^{4,7} En nuestro país, las tasas mayores de morbilidad de la giardiosis se observan en los grupos de menores de 5 años, el punto máximo corresponde al grupo de niños entre 1 y 4 años.

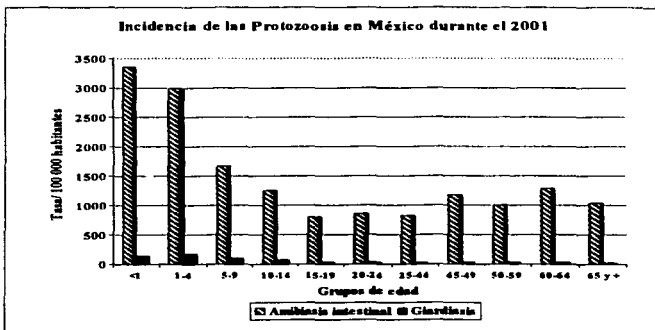
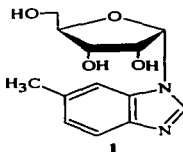


Figura 2. Datos epidemiológicos de la amibiasis intestinal y de la giardiosis por grupos de edad.

1.4. Los bencimidazoles como fármacos antihelmínticos

El interés en el anillo de bencimidazol como un núcleo para desarrollar fármacos con potencial actividad se estableció en la década de los 50's cuando se encontró que el 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofurasonil)bencimidazol (1) era parte integral de la estructura de la vitamina B₁₂.

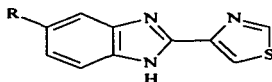


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Antecedentes

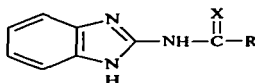
El descubrimiento en 1961 de que el 2-(4-tiazolil)bencimidazol (Tiabendazol, **2**) presentaba una potente actividad y amplio espectro contra parásitos gastrointestinales abrió una nueva era en el tratamiento de las enfermedades parasitarias mediante el diseño de una nueva generación de antihelmínticos.

Sin embargo, el Tiabendazol tiene la desventaja de ser fácilmente metabolizado al 5-hidroxtiabendazol (**3**), el cual posee una vida media de sólo 11 minutos en ratas,^{1,6} reduciendo así, la efectividad del fármaco. Para prevenir esta hidroxilación enzimática en la posición 5, los investigadores de la casa Merck sintetizaron una variedad de tiabendazoles sustituidos en 5, de los cuales el 2-(4-tiazolil)-5-[(isopropilcarbonil)amino]bencimidazol (cambendazol, **4**) mostró una mejor actividad antihelmíntica, debida probablemente, a su tiempo de vida media 10 veces más larga que el del Tiabendazol.¹



- 2** R = H
- 3** R = OH
- 4** R = NHCOO-iPr

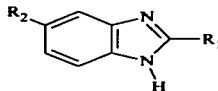
Otro avance en el estudio de las relaciones estructura-actividad de los bencimidazoles fue realizado en los laboratorios Smith Kline & French, donde se encontró que la sustitución del anillo de tiazol del Tiabendazol por un grupo tiocarbamato condujo al compuesto **5** con una elevada actividad antihelmíntica.⁶ Posteriores investigaciones en esta dirección resultaron en la síntesis de 2-acilaminobencimidazoles (**6**), bencimidazol-2-carbamatos de alquilo (**7**) y los 2-bencimidazolilureas (**8**) con marcada actividad antihelmíntica



- 5** X = S, R = OEt
- 6** X = O, R = Alquilo
- 7** X = O, R = Alcoxi
- 8** X = O, R = NR₁R₂

La actividad óptima fue observada en los bencimidazol-2-carbamatos de metilo sustituidos en la posición 5(**6**), lo que llevó al descubrimiento del 5-butilbencimidazol-2-carbamato de metilo (perbendazol, **9**). Posteriormente, varios fármacos (**10-14**) fueron introducidos en medicina veterinaria y humana (Tabla 2).

Tabla 2. Algunos agentes benzimidazólicos utilizados en medicina clínica



| Compuesto | Nombre | R ₁ | R ₂ |
|-----------|---------------|----------------------|-------------------------------------|
| 9 | Parbendazol | NHCOOCH ₃ | <i>n</i> -Bu |
| 10 | Mebendazol | NHCOOCH ₃ | COC ₆ H ₅ |
| 11 | Fluobendazol | NHCOOCH ₃ | COC ₆ H ₄ F-4 |
| 12 | Ciclobendazol | NHCOOCH ₃ | COC ₃ H ₇ |
| 13 | Albendazol | NHCOOCH ₃ | <i>S-n</i> Pr |
| 14 | Fenbendazol | NHCOOCH ₃ | SC ₆ H ₅ |

En la actualidad, el albendazol (13) se ha caracterizado por ser el bencimidazol con el espectro antihelmíntico más amplio que se ha obtenido hasta la fecha. El albendazol en dosis únicas de 400 mg ha sido efectivo contra casi todas las infecciones intestinales ocasionadas por nemátodos: *A. lumbricoides*, *E. vermicularis*, *T. trichiura*, *A. duodenale* y *N. americanus*. El mebendazol ha sido desplazado por el albendazol ya que aunque su espectro antihelmíntico es similar, requiere de tres días de tratamiento para las helmintosis intestinales.

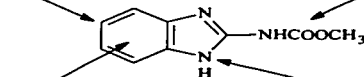
1.4.1. Relaciones Estructura-Actividad en Bencimidazoles

Los sitios donde se han llevado a cabo las principales modificaciones estructurales en el núcleo del bencimidazol para obtener mejores fármacos antihelmínticos se presentan en la Figura 3.

Sitio C: Cambios en el volumen estérico del sustituyente en posición 5(6)

Sitio B: Cambios en la naturaleza del sustituyente en la posición 2

Sitio D: Cambios en la naturaleza molecular del anillo de bencimidazol



Sitio A: Sustitución del átomo de hidrógeno de la posición 1

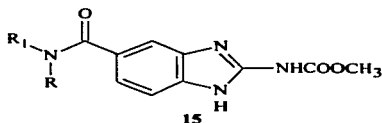
Figura 3. Sitios donde se han llevado a cabo cambios estructurales en el anillo de bencimidazol.⁶

- Sitio A.** Una enorme cantidad de 1-alquil, 1-aril, 1-arilalquil y 1-acilbencimidazoles han sido sintetizadas con la intención de entender el papel del átomo de hidrógeno en la actividad antihelmíntica. Pero parece que la presencia del hidrógeno en la posición 1 del bencimidazol es necesaria para la actividad antihelmíntica debido a que todos los intentos en la preparación de bencimidazoles 1-sustituídos conducen a una disminución (diez a veinte veces) o pérdida de la actividad.^{1,6,8}
- Sitio B.** La presencia de un grupo carbamato es esencial para potenciar la actividad. El cambio por un grupo amida reduce la actividad unas diez veces, mientras que la función amina elimina la actividad. El incremento en el tamaño del carbamato de metilo a etilo puede incrementar la actividad 1.2 a 2 veces. Sin embargo, incrementos mayores como carbamatos de propilo, butilo y pentilo, reducen la actividad.⁸
- Sitio C.** Los 5(6)-alquil, cicloalquil, fenil y heteroarilcarbonilbencimidazol-2-carbamatos mostraron elevada acción antihelmíntica,¹ siendo el más efectivo el 5(6)-benzoilbencimidazol-2-carbamato de metilo (mebendazol, **10**). También se prepararon una serie de 5(6)-alquiltiobencimidazol-2-carbamatos que, junto con sus sulfóxidos, mostraron gran actividad.⁶ El fenbendazol (**14**) y el albendazol (**15**), exhibieron la actividad antihelmíntica de más amplio espectro.
- Sitio D.** El reemplazo del NH del núcleo de bencimidazol por S, o O para formar benzotiazoles y benzoxazoles respectivamente, eliminan la actividad. Por otro lado, los indoles poseen baja actividad.⁸

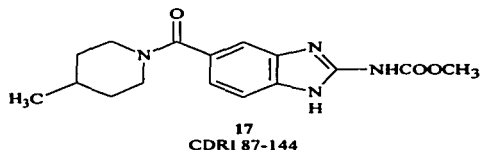
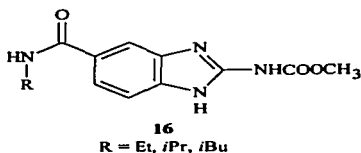
1.4.2. Modificaciones en la posición 5(6) del anillo de bencimidazol

La presencia de diversos grupos en la posición 5(6) de bencimidazoles 2-sustituídos es un factor importante para determinar el perfil biológico de los compuestos de esta clase. Los sustituyentes en esta posición no solo protegen a la molécula de sufrir una fácil hidroxilación en la posición 5, resultando en metabolitos débilmente activos o inactivos, sino que también ayuda a establecer una respuesta terapéutica contra helmintos entéricos y helmintos que habitan los tejidos.

Así, la introducción de un grupo funcional carboxamida aumentó considerablemente el perfil biológico de los 5-aminocarbonilbencimidazol-2-carbamatos resultantes debido a que los compuestos generados mostraron un amplio espectro de actividad contra varios helmintos intestinales y sistémicos (15).⁹



Los compuestos de este grupo que mostraron más efectividad fueron 16, que presentó casi 100 % de actividad macrofilaricida;^{1,6,9} mientras que el compuesto **CDRI 87-144** (17) mostró un amplio espectro de actividad contra helmintos intestinales¹⁰.



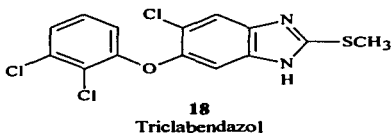
1.4.3. Modificaciones en la posición 2 del anillo de bencimidazol

A pesar de que los bencimidazol-2-carbamatos poseen un amplio espectro de actividad contra diferentes helmintos intestinales, prácticamente todos ellos son insolubles en agua. Esto provoca que tengan una pobre absorción a través del tracto gastrointestinal y sean, por tanto, débilmente activos o ineficaces contra helmintos que invaden los tejidos causando enfermedades como la filariosis, triquinosis, dracunculosis, hidatidosis y cisticercosis.

En un intento para aumentar la solubilidad de los bencimidazoles, se sintetizó al triclabendazol,⁶ 6-cloro-5-[(2,3-dicloroetil)oxi]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**18**), otro tipo de bencimidazol antihelmíntico. En este compuesto se aprecian dos sustituyentes en las posiciones 5 y

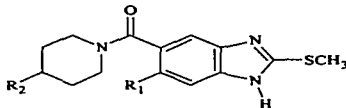
Antecedentes

6, además de la presencia de un grupo metil tio (-SCH₃) en lugar del carbamato de metilo en la posición 2. Con estos cambios estructurales se disminuyó la polaridad y al mismo tiempo se incrementó la absorción de tal forma que, estudios realizados en humanos, mostraron resultados satisfactorios contra *Fasciola hepatica*, helminto de diseminación sistémica, a dosis de 10 y 12 mg/kg.¹¹



Con la finalidad de preparar nuevos compuestos antihelmínticos y poder obtener más información acerca de los requerimientos estructurales para la actividad biológica, en nuestro grupo de trabajo, se diseñaron y sintetizaron nuevas carboxamidas benzimidazólicas las cuales tienen un grupo aminocarbonil en la posición 5 y un grupo metil tio en la posición 2; combinando de esta manera las características del triclabendazol y del CDRI 87-144.¹² Dentro de estas nuevas carboxamidas, **19** y **20** tuvieron una reducción similar a la del albendazol sobre la capacidad metabólica de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* con respecto al albendazol (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad antihelmíntica de algunas carboxamidas que combinan las características del triclabendazol y del compuesto CDRI 87-144¹²



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | % de reducción de la capacidad metabólica de las larvas de <i>T. spiralis</i> | | | | |
|------------|----------------|-----------------|---|-------|--------|---------|----------|
| | | | Concentración (μM) | | | | |
| | | | 3.77 | 0.377 | 0.0377 | 0.00377 | 0.000377 |
| 19 | Cl | H | 48 | 29 | 19 | 15 | 12 |
| 20 | Cl | CH ₃ | 35 | 25 | 23 | 18 | 9 |
| Albendazol | | | 46 | 35 | 27 | 25 | 18 |

1.5. Mecanismo de acción de los bencimidazoles

1.5.1. Microtúbulos y tubulina

Los microtúbulos son estructuras fibrilares y poliméricas de tubulina que son comunes en la mayoría de las células eucarióticas.

La tubulina es una proteína globular que se compone de dos subunidades denominadas α y β , de 55 000 y 53 000 Da y de una longitud secuencial de 450 y 445 aminoácidos respectivamente. La tubulina es una proteína de unión al trifosfato de guanosa (GTP) que contiene sitios de alta afinidad tanto para iones Ca^{2+} como para iones Mg^{2+} . La hidrólisis de GTP está directamente acoplada con la polimerización de los microtúbulos.

La participación de los microtúbulos en el ambiente intracelular es de gran importancia, ya que están involucrados en procesos fisiológicos que se basan en su capacidad para polimerizarse y despolimerizarse, y entre los que están:

- Formación del huso acromático en la división celular
- Transporte intracelular
- Secreción celular
- Absorción de nutrientes
- Mantenimiento de la forma celular

Estas funciones pueden ser bloqueadas tanto por agentes que inhiban el ensamblaje como por aquellos que inhiban la despolimerización de los microtúbulos.

La interrupción del equilibrio tubulina-microtúbulo puede ser ocasionado por sustancias conocidas como inhibidores de microtúbulos (producidos por hongos, plantas, organismos marinos, de origen sintético), provocando una cascada de cambios bioquímicos y/o fisiológicos en el ambiente intracelular lo que trae consigo, la pérdida de la homeostasis celular. La mayoría de estos inhibidores son capaces de unirse a los microtúbulos por el extremo extensible de éste, inhibiendo su crecimiento; mientras que el microtúbulo puede estar disociándose por el otro extremo, ocasionando con esto, la pérdida neta de la longitud del microtúbulo. Es por eso que los efectos letales son más evidentes en las células en división o en crecimiento.

1.5.2. Bencimidazol 2-carbamatos de metilo

Estudios de inhibición de la polimerización llevadas a cabo con muestras de tubulina procedentes de varios organismos, han mostrado que los bencimidazol 2-carbamato de metilo (como albendazol y mebendazol) se unen en el mismo sitio que lo hace la colchicina, el cual parece estar localizado en la subunidad β de la tubulina entre los aminoácidos 239 y 354.⁸

Se ha postulado que esta unión podría deberse a una reacción de sustitución nucleofílica entre el grupo carbamato de metilo y los grupos sulfhidrilos de las cisteínas localizadas en la β tubulina. Se cree que en esta región se lleva a cabo el ensamblaje de las unidades de tubulina que dan lugar al crecimiento de los microtúbulos.

Los bencimidazoles 2-carbamato presentan acción selectiva sobre la tubulina de las células de los nematodos que sobre la de mamíferos. Estudios *in vivo* de mostraron que el fenbendazol y el mebendazol fueron 250 y 400 veces, respectivamente, más potentes como inhibidores de la tubulina de *Ascaris suum*, en comparación a la tubulina de mamíferos.¹³

1.5.3. Triclabendazol

A pesar de que los bencimidazoles 2-carbamato de metilo tienen un amplio espectro de actividad contra muchos helmintos intestinales, presentan una actividad mínima contra organismos maduros de *Fasciola hepatica* y ninguna contra los estadios jóvenes.¹⁴ Por otro lado, mientras que el triclabendazol es altamente específico contra *F. hepatica*, no tiene actividad contra nematodos, cétodos y algunos trematodos. Estudios utilizando los inhibidores de microtúbulos colchicina y tubulozol-C han sugerido que la falta de actividad de los bencimidazoles clásicos sobre *F. hepatica* puede ser debido a alteraciones en la parte de la β -tubulina que está asociada con el sitio de unión de la colchicina, y que el triclabendazol puede tener un sitio blanco alternativo sobre la β -tubulina. Mediante estudios de microscopía electrónica se observó que el metabolito del triclabendazol, el sulfóxido de triclabendazol, inhibe el transporte de los cuerpos de secreción de las células tumentarios en *F. Hepatica*, indicando un mecanismo de inhibición de la polimerización de los microtúbulos.¹⁴

1.6. *Trichinella spiralis* como modelo biológico para la evaluación antihelmíntica

El ciclo de vida de *Trichinella spiralis* permite establecer un modelo para el estudio de infecciones por helmintos debido a que es relativamente corto e incluye las fases entérica y parental; además, los síntomas asociadas con la enfermedad pueden ser reproducidos en animales de experimentación, como ratas y ratones.

1.6.1. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

El ciclo de vida de *T. spiralis* se desarrolla completamente en un huésped y consta de tres fases de desarrollo: larva muscular (LM), larva adulta (LA) y larva recién nacida (LRN).¹⁵ El ciclo se inicia cuando el hombre, animales domésticos o silvestres comen carne que contiene LM viables del parásito, las cuales son liberadas de la carne en el medio estomacal, pasan al intestino delgado invadiendo el epitelio intestinal, donde aproximadamente a las 30 horas maduran a sus formas adultas. En este estadio los adultos se localizan en las cavidades del duodeno y yeyuno. El tiempo normal de permanencia de *T. spiralis* en el intestino de ratón suele ser de aproximadamente de 1 mes o menos. En el intestino se lleva a cabo la cópula, las hembras comienzan a producir huevos que se desarrollan en el útero para dar lugar a LRN. A partir del quinto o sexto día de la infección se expulsan larvas móviles, aproximadamente hasta 500 larvas por hembra pueden producirse. Las LRN atraviesan el epitelio intestinal hasta llegar a vasos linfáticos y la corriente sanguínea, luego se alojan en corazón, cerebro, líquido cefalorraquídeo y cavidades corporales, después vuelven a entrar en la circulación sanguínea para finalmente invadir músculo esquelético. La invasión máxima se observa en músculos relativamente carentes de glucógeno, como el diafragma, los músculos de la laringe, la lengua, el abdomen, los espacios intercostales, los bíceps, los pectorales, los gemelos, el deltoides y otros músculos que mantienen una actividad constante llevando a cabo una destrucción parcial de estas fibras invadidas.

Una vez que las LRN alcanzan las fibras musculares estriadas penetran activamente en su interior, crecen, maduran a LM e inducen un fenómeno de adaptación con su célula huésped. Con la maduración de las LM se completa el ciclo de vida del parásito.

1.6.2. Ensayo colorimétrico con sal de tetrazolio (MTT) y metasulfato de fenazina (PMS)

Existe un método para determinar la viabilidad celular que se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) a formazán por deshidrogenasas de células viables (Figura 4).

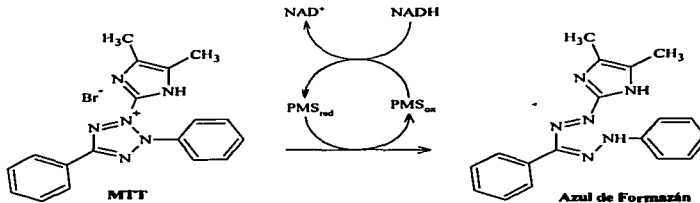


Figura 4. Reacción de la reducción celular del MTT catalizada por PMS¹³

El formazán es un compuesto de color azul oscuro y su intensidad puede medirse por espectrofotometría. Este método se ha empleado exitosamente para medir la viabilidad de diversas células,¹⁶ presentando una buena correlación entre el número de células viables y la densidad óptica.¹⁷ Por otro lado, este procedimiento se adaptó para determinar la viabilidad de las larvas musculares de *T. Spirallis*,^{18,19} tras su exposición a compuestos de tipo bencimidazólico. Con el objetivo de disminuir tiempos de incubación se utiliza el acarreador metasulfato de fenazina (PMS) como catalizador de la reacción.

1.7. Los bencimidazoles como fármacos antiprotozoarios

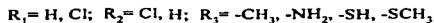
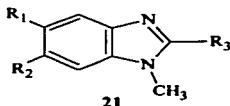
Partiendo del hecho de que los bencimidazoles 2-carbamato actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina y que el protozooario *Giardia lamblia* posee un citoesqueleto formado principalmente por microtúbulos, se demostró que el albendazol y el mebendazol son activos *in vitro* contra los trofozoítos de este parásito. Se encontró que estos bencimidazoles son de 30 a 50 veces más activos que el metronidazol. Además, estudios *in vivo* demostraron que estos dos bencimidazoles resultaron ser excelentes agentes giardicidas.²⁰ Se encontró que de 3 a 4 dosis de albendazol (79-100 mg/kg) son efectivas para erradicar a los trofozoítos del intestino, así como para

eliminar la excreción de sus quistes. Ahora se sabe que la dosis ideal es de cinco dosis de 400 mg cada una (95 % de eficacia terapéutica). Estudios de microscopía electrónica han demostrado un efecto selectivo sobre la tubulina del disco de adhesión de *G. lamblia*, así como sobre sus giardinas, después de una exposición a albendazol.

Con base en estos resultados obtenidos se planteó la posibilidad de que estos bencimidazoles también pudieran ser utilizados contra otros protozoarios de importancia médica como *Entamoeba histolytica*, pero los resultados hasta ahora revelan que el albendazol no posee actividad antiamibiana, sino solamente anti giardiásica.

1.7.1. 1-Metilbencimidazoles

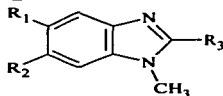
Con el propósito de contar con información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad biológica, en nuestro grupo de trabajo se diseñaron y sintetizaron una serie de 1-metilbencimidazoles en los cuales las posiciones 5 y 6 presentan el siguiente patrón de sustitución: átomo de cloro en 5 ó 6, diclorado en 5 y 6, y ninguna sustitución (**21**). La introducción del átomo de cloro se hizo para impedir la inactivación metabólica, así como conferir mayor liposolubilidad a los compuestos.



En la posición 2 se observan isómeros clásicos: $-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$, además del $-\text{SCH}_3$ que ha mostrado actividad antihelmíntica (triclabendazol). La introducción del grupo metilo en la posición 1 se consideró por los motivos siguientes: evitar el efecto tautomérico que efectúa la molécula de bencimidazol, lo que permite tener compuestos con estructuras bien definidas; disminuir la polaridad, con el fin de incrementar la liposolubilidad y la absorción.

La mayoría de estos 1-metilbencimidazoles fueron más activos que el metronidazol contra los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.²¹ También resultaron efectivos contra los trofozoítos de *G. lamblia*, especialmente los compuestos 22 y 23 que resultaron 10 y 5 veces más activos que el albendazol (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad anti*giardiásica* de 1-metilbencimidazoles clorados.²¹



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | CL ₅₀ (µg/mL) |
|-----------|----------------|----------------|---------------------|--------------------------|
| 22 | H | Cl | CH ₃ | 0.001 |
| 23 | H | Cl | NH ₂ | 0.002 |
| | | | Albendazol | 0.010 |
| | | | Metronidazol | 0.210 |

CL₅₀^m Concentración que corresponde a la muerte del 50 % de los trofozoítos.

En estudios de microscopía electrónica y de barrido se observó que los 1-metilbencimidazoles causaron un daño importante a nivel de membrana en los trofozoítos de *G. lamblia*,²¹ sin afectar el citoesqueleto, en comparación con el daño causado por el albendazol, donde se observó alteración importante en el disco de adhesión. Lo que sugiere un mecanismo de acción diferente.

Basándose en estos resultados se concluyó que para que un bencimidazol presente actividad contra *Giardia lamblia* no necesita de los requisitos estructurales clásicos para la actividad antihelmíntica, tales como un grupo metoxicarbonilamino en la posición 2 o un grupo alquilitio o aminocarbonil en la posición 5.

1.8. Generalidades sobre Bencimidazoles

La estructura del bencimidazol consiste de un sistema anular bicíclico, en donde un anillo de benceno se encuentra unido a las posiciones 4 y 5 de un anillo de imidazol, esto es, un benzoimidazol. La molécula de bencimidazol se encuentra en equilibrio tautomérico protónico, donde el protón de la posición 1 puede migrar a la posición 3. Cuando el anillo bencenoide está sustituido asimétricamente, el equilibrio tautomérico se establece entre dos tautómeros (inseparables) con la relación del sustituyente 1,5 y 1,6 (Figura 5).²

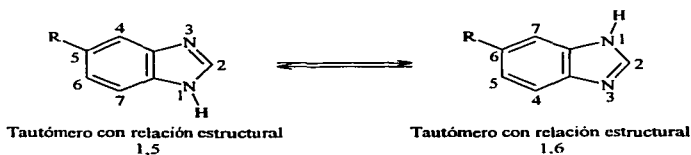


Figura 5. Tautómeros del bencimidazol

Sin embargo, en bencimidazoles *N*-sustituídos el tautomerismo no es posible y cuando el anillo bencenoide está sustituido asimétricamente se pueden aislar y caracterizar dos compuestos distintos, isómeros no equivalentes. Así, la *N*-metilación del 5(6)-clorobencimidazol produce una mezcla de metilbencimidazoles, con la relación estructural 1,5 y 1,6 (Figura 6).

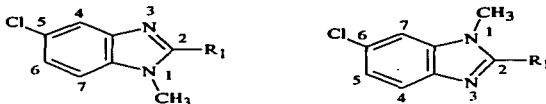


Figura 6. Isómeros bencimidazólicos (se pueden separar).

1.8.1. Síntesis de Bencimidazoles

En general se puede decir que la síntesis de derivados del bencimidazol procede a través de dos pasos: primero se prepara la 1,2-feniléndiamina sustituida adecuadamente, y posteriormente se se

forma el anillo con los reactivos necesarios, según los sustituyentes que se requieran en la posición 2 (Figura 7).²³



Figura 7. Método general de preparación de derivados del bencimidazol.

Así por ejemplo, para la síntesis de 2-mercaptobencimidazoles, las 1,2-fenilendíaminas se tratan con disulfuro de carbono y potasa en solución alcohólica (Figura 8).^{24,25} Además, si el 2-mercaptobencimidazol se hace reaccionar con yoduro de metilo en medio básico se obtienen los derivados 2-metilbencimidazólicos (Figura 9).²⁶



Figura 8. Método de síntesis de 2-mercaptobencimidazoles.

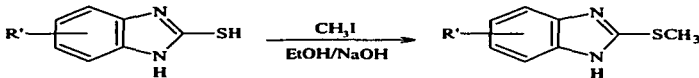


Figura 9. Método de preparación de derivados 2-metilbencimidazoles.

1.8.2. Síntesis de 1-metilbencimidazoles

1.8.2.1. A partir de bencimidazoles

La *N*-metilación directa del anillo bencimidazólico utilizando acetales dimetilados de dimetilformamida bajos condiciones anhidras, representa una alternativa cuando la molécula de bencimidazol es simétrica (Figura 10).²⁷

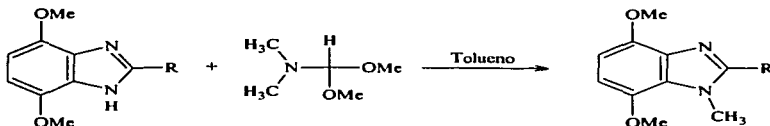


Figura 10. *N*-metilación de benzimidazoles con acetales dimetilados

Esta técnica presenta una gran ventaja, ya que se alcanzan mayores rendimientos que cuando se usa sulfato de dimetilo o yoduro de metilo en medio básico; además, la preparación del acetal se realiza sin dificultad o incluso están comercialmente disponibles.

La reacción de metilación vía aminación reductiva usando paraformaldehído y cianoborohidruro de sodio en ácido acético²⁸ es otra alternativa atractiva para la formación de 1-metilbenzimidazoles con rendimientos aceptables (Figura 11).

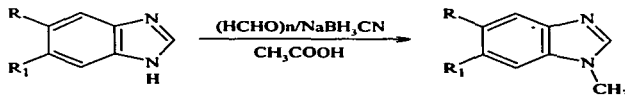


Figura 11. Metilación de benzimidazoles via aminación reductiva.

La metilación directa con yoduro de metilo de benzimidazoles sustituidos en las posiciones 5 y 6 con diferentes grupos, lleva a la obtención de una mezcla de dos isómeros²⁹ (figura 12).

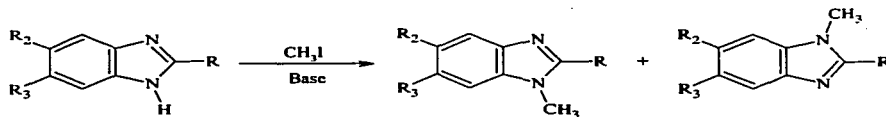


Figura 12. Metilación de benzimidazoles 5,6-disustituidos

Dado que estas mezclas son difíciles de separar, se ha optado por sintetizar a cada isómero por separado empleando a la *N*-metil-1,2-fenilendiamina adecuadamente sustituida, las cuales se

preparan a partir de sus precursores inmediatos, la *N*-metil-*o*-nitroanilinas. Existen varios métodos reportados para la preparación de estos precursores. A continuación se describen los más importantes.

1.8.3. Síntesis de *N*-metil-*o*-nitroanilinas

1.8.3.1. A partir de *orto*-cloronitrobenzenos

En este procedimiento se somete un *o*-cloronitrobenzeno, adecuadamente sustituido, a una reacción de sustitución nucleofílica aromática empleando metilamina en etanol³⁰ (Figura 13).

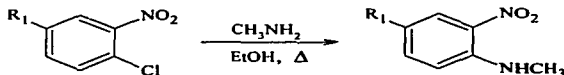


Figura 13. Síntesis de *N*-metil-*o*-nitroanilinas por S_NA del 2-cloronitrobenzeno

Este tipo de reacciones tiene la desventaja de utilizar un reactor para alcanzar presiones y temperaturas elevadas así como el de tener tiempos de reacción prolongados y obtención de productos secundarios, principalmente el de doble sustitución³¹.

1.8.3.2. Por metilación directa de *o*-nitroanilinas.

Por medio de una reacción de S_N2 de algunas *o*-nitroanilinas, en un reactor de acero se pueden obtener las correspondientes *N*-metil-*o*-nitroanilinas.³¹ (Figura 14) Se obtienen buenos rendimientos, pero el inconveniente de este método es la corrosión del reactor.

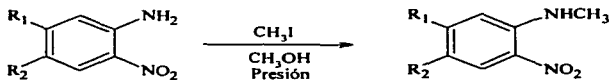


Figura 14. Metilación directa de *o*-nitroanilinas

1.8.3.3. Por *N*-metilación de acetanilidas (acetamidas)

Un método alternativo para la *N*-metilación ha sido reportado recientemente,^{21,32} el cual utiliza el derivado acetilado de la amina correspondiente y que a su vez tiene un grupo nitro en posición *orto*. La acetanilida se disuelve en monoglima y se trata con sulfato de dimetilo y potasa acuosa (Figura 11). Este proceso es una modificación del reportado por Brehme³³ donde la acetanilida se disuelve en benceno y se trata con sulfato de dimetilo, sosa acuosa y un catalizador de transferencia de fase.

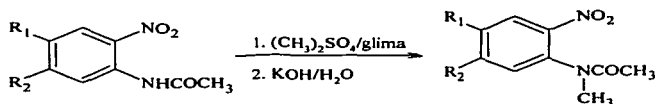


Figura 15. *N*-metilación de acetanilidas que poseen un grupo nitro en posición *orto*.

1.8.4. Síntesis de carboxamidas

Las carboxamidas, tienen la estructura $RCONR_2$. El término es utilizado como sufijo en la nomenclatura sistemática para denotar el grupo $-CONH_2$.

Es difícil elaborar carboxamidas directamente por reacción entre ácidos carboxílicos y aminas, debido a que la reacción ácido-base entre ellos da como resultado la formación de la sal.³⁴ Entre los procedimientos reportados para la preparación de carboxamidas se han adoptado las condensaciones entre ácidos carboxílicos y aminas, vía la activación del ácido. Estas reacciones involucran el aislamiento o formación *in situ* de derivados reactivos de ácidos,³⁵ por ejemplo halogenuros de ácido, anhídridos, amidas activadas y ésteres activados.

1.8.4.1 A partir de halogenuros de ácido

Este método consiste en la reacción de halogenuros de acilo con amoníaco o aminas. Deben emplearse dos equivalentes de amina, o alguna otra base como piridina o hidróxido de sodio, para que reaccione con el ácido producido en la reacción (reacción de Schotten-Bauman)^{36,37} (Figura 16).

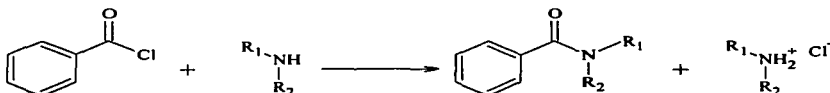


Figura 16. Formación de carboxamidas a partir de halogenuros de ácido

1.8.4.2 A partir de ésteres

El tratamiento de un éster con amoníaco generalmente en solución de alcohol etílico, da la carboxamida, esta reacción es poco utilizada (Figura 17).³⁸

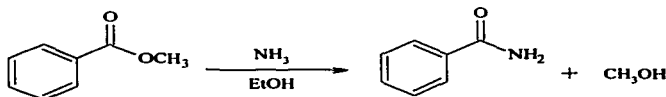


Figura 17. Formación de carboxamidas a partir de ésteres

1.8.4.3. A partir de ácidos utilizando un agente activante

Recientemente se han utilizados agentes activantes tales como carbodiimidas u otros agentes activantes que permiten la preparación de derivados reactivos de ácidos. Un método de preparación de carboxamidas, a partir de aminas y ácidos carboxílicos, utiliza la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), como reactivo activante. Produce buenos rendimientos. La desventaja es que la DCC es un reactivo muy costoso (Figura 18).³⁹

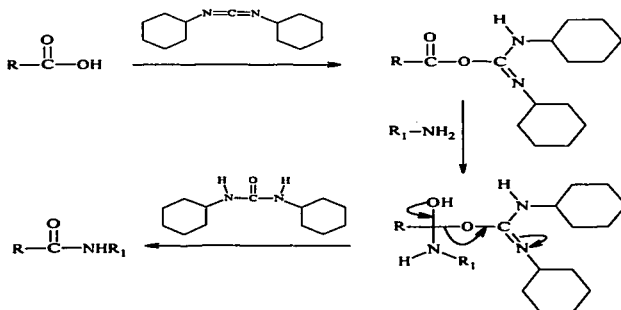


Figura 18. Formación de carboxamidas utilizando el agente acoplante DCC

Otro método reportado para la preparación de carboxamidas utilizando un agente acoplante consiste en la reacción entre ácidos carboxílicos con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI).⁴⁰ Se forma el intermediario imidazólico, al cual posteriormente se le adiciona la amina para finalmente obtener la amida correspondiente. Este método reporta buenos rendimientos y es relativamente fácil (Figura 19).

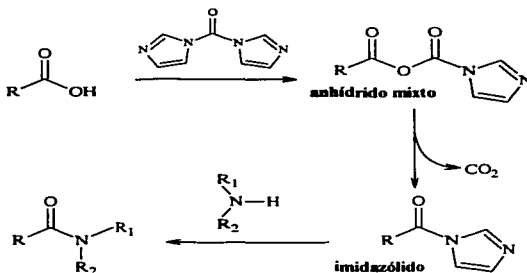


Figura 19. Formación de carboxamidas utilizando CDI.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a lo establecido previamente en los antecedentes se sabe que:

1. Las carboxamidas **19** y **20** (Tabla 3) mostraron actividad antiparasitaria sobre las larvas musculares de *Trichinella spiralis*.
2. La tautomería protónica inherentes a ellas da como resultado una mezcla de isómeros (Figura 20).

Entonces cabe hacerse la siguiente pregunta: ¿cuál de los dos isómeros es el responsable de la actividad biológica? Por lo que es indispensable contar con estructuras definidas para poder establecerlo. Es así que se pretende obtener los derivados 1-metilados de las carboxamidas **19** y **20**, con relación estructural 1,5, para saber cual isómero conserva la actividad y para determinar si este isómero es el responsable de la actividad biológica.



Figura 20. Tautomería protónica presente en la carboxamida **19** y que origina la existencia de dos isómeros con las relaciones estructurales 1,5 y 1,6.

Por otro lado, como se sabe, los derivados 1-metilbencimidazólicos sintetizados previamente por nuestro grupo han mostrado tener importante actividad antiprotozoaria, particularmente contra *Giardia lamblia*, por lo que cabe preguntar si también las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas a sintetizar tendrán actividad giardicida; por lo que también se pretende evaluar la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra este parásito.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar y evaluar la actividad antiparasitaria, antihelmíntica y antiprotozoaria, de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas 6-cloro-1-metil-2-metiltio-5-[(piperidinil)carbonil]-1*H*-bencimidazol (37) y 6-cloro-1-metil-5-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-metiltio-1*H*-bencimidazol (38), con el propósito de contar con información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiparasitaria.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar, purificar e identificar, por sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas, a las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas 37 y 38 a partir del ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (36) y utilizando el agente acoplante carbonildiimidazol (CDI).
- Sintetizar, purificar e identificar por sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas a los intermediarios químicos necesarios para la formación de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas 37 y 38.
- Evaluar *in vitro* la actividad antihelmíntica de las carboxamidas 37 y 38 sobre las larvas musculares de *Trichinella spiralis*.
- Evaluar *in vitro* la actividad antiprotozoaria de las carboxamidas 37 y 38 sobre trofozoitos de *Giardia lamblia*.
- Adquirir conocimientos y experiencia en la síntesis de nuevas moléculas de interés farmacéutico.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Este trabajo se divide en dos etapas. La primera parte involucra la síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas **37** y **38**; la segunda, la parte biológica, describe las pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Trichinella spiralis* y *Giardia lamblia* en presencia de los compuestos sintetizados.

4.1 SÍNTESIS DE LAS CARBOXAMIDAS 1-METILBENCIMIDAZÓLICAS

La síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas **37** y **38** se realizó a través de tres pasos: primero se preparó a la *N*-metil-1,2-feniléndiamina **33**; posteriormente ésta se convirtió al ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**36**), y por último, **36** se utilizó como materia prima para la síntesis de los productos finales.

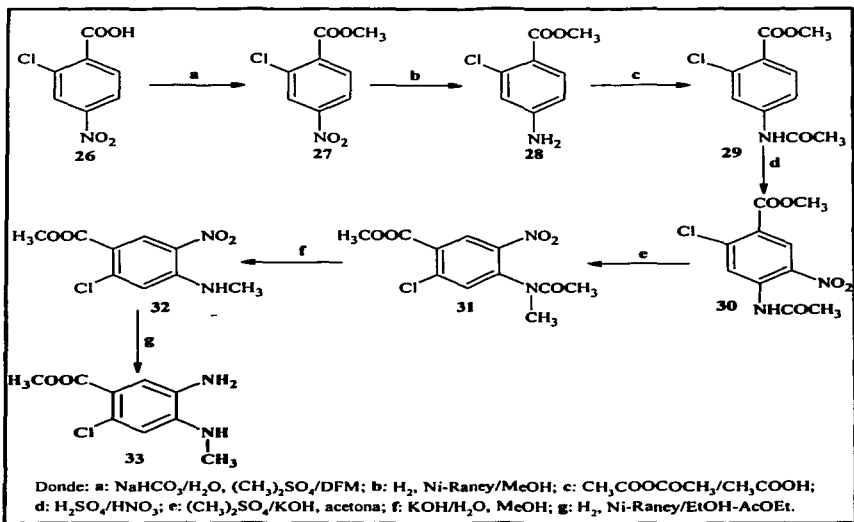
4.1.1. Síntesis de la *N*-metil-1,2-feniléndiamina (33**)**

La síntesis de la *N*-metil-1,2-feniléndiamina **33** se llevó a cabo siguiendo la ruta de síntesis mostrada en el Esquema 1.

La síntesis se inició con el ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**26**), el cual se disolvió en DMF y se trató con bicarbonato de sodio y sulfato de dimetilo en caliente. El 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo obtenido (**27**) se sometió posteriormente a un proceso de reducción catalítica para obtener el 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**28**). El catalizador empleado fue Ni-Raney (30 %) para evitar la hidrogenólisis. El producto de reducción recién obtenido (**28**), se trató con anhídrido acético en frío y se obtuvo el 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**29**). Posteriormente, **29** se nitró con mezcla sulfonítrica en frío y se obtuvieron dos isómeros nitrados; de los cuales el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**30**) correspondió al grupo principal. El producto crudo se recrystalizó de metanol, lográndose separar a **30** con un rendimiento del 71 %. La *N*-metilación de éste compuesto con sulfato de dimetilo en medio básico llevó al 4-(*N*-metilacetamido)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**31**)

Procedimiento experimental

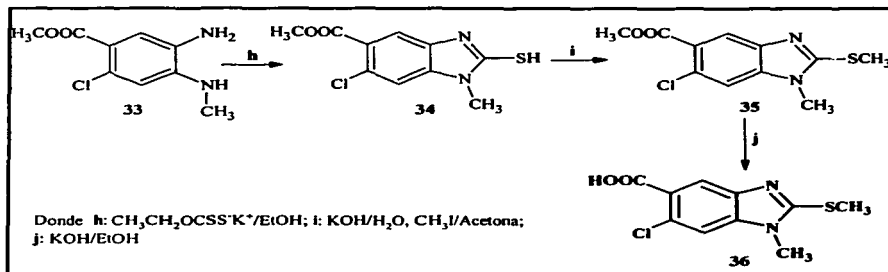
El siguiente paso fue la hidrólisis de **31** disuelto en metanol, por tratamiento con una disolución de KOH al 50% en agua. De esta manera se obtuvo el 4-metilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**32**), el cual se recristalizó de acetona. El producto purificado (**32**) se sometió a una reducción catalítica empleando Ni-Raney como catalizador. Después de determinar la reducción, el 5-amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo (**33**) se guardó bajo atmósfera de nitrógeno para evitar su descomposición.



Esquema 1. Ruta de síntesis para obtener a la *N*-metil-1,2-feniléndiamina **33**.

4.1.2. Síntesis del ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (36)

El segundo intermediario clave, el ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (36), se preparó de acuerdo a las reacciones que se muestran en el Esquema 2. Una vez obtenida la *N*-metil-1,2-fenilendiamina (33), se ciclocondensó con etil xantato de potasio generado *in situ* con CS₂, EtOH, KOH y H₂O. El 2-mercaptobencimidazol obtenido (34) se sometió después a una *S*-metilación con yoduro de metilo y potasa etanólica. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de entre 60 y 65 °C con agitación constante y bajo atmósfera de nitrógeno. Bajo estas condiciones se formó el 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (34), el cual se trató con hidróxido de potasio acuoso y, posteriormente, se le adicionaron 1.2 equivalentes de yoduro de metilo. El producto, 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (35) se recristalizó de etanol. Por último 35 se suspendió en MeOH, la mezcla resultante se llevó a una temperatura entre 50 y 60 °C y se trató con 2 equivalentes de hidróxido de potasio en solución acuosa. La mezcla de reacción se vertió sobre agua fría y el pH se ajustó a 3-4 utilizando una solución de ácido sulfúrico al 20 %. De esta forma se logró obtener el ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (36).

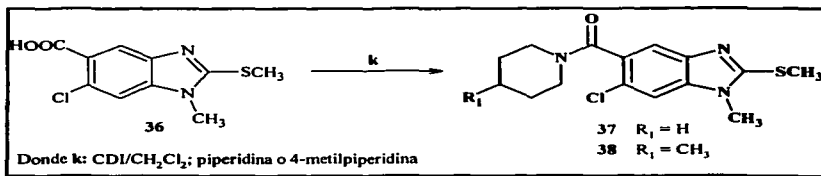


Esquema 2. Ruta de síntesis para obtener al compuesto 36.

Procedimiento experimental

4.1.3. Síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas

La tercera y última parte de la secuencia sintética se muestra en el Esquema 3 de reacción. Para la formación de los compuestos finales, el 6-cloro-1-metil-2-metil-5-[(piperidinil)carbonil]-1*H*-bencimidazol (**37**) y el 6-cloro-1-metil-5-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-metil-1*H*-bencimidazol (**38**), se suspendieron 2 equivalentes de carbonildiimidazol (CDI) en diclorometano, bajo atmósfera de nitrógeno, y se agregó **36** (1 eq.) para formar el imidazólido (intermediario) correspondiente (Figura 19 de antecedentes). Inmediatamente después se añadió la amina correspondiente y se calentó a reflujo por 2 horas (Esquema 3), con lo cual se formaron los productos esperados.



Esquema 3. Esquema de síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas **37** y **38** a partir de **36**.

4.2. PARTE BIOLÓGICA

4.2.1. Evaluación de la actividad antihelmíntica de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas

Las larvas musculares de *Trichinella spiralis* (fase parental) fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura.REF Para el ensayo se colocaron 1000 larvas en platos de cultivo de 24 pozos (Nuclon), los cuales contenían medio RPMI 1640 y los compuestos a probar (**37** y **38**) a concentraciones de 0.037, 0.188, 0.377, 1.88 y 3.770 μM . Los parásitos se incubaron en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5 % a 37 °C por tres días, cambiando el medio y los compuestos cada 24 horas. El albendazol fue utilizado en este ensayo como control positivo y el disolvente (DMSO) como control negativo. Después de la incubación, la viabilidad de los parásitos se determinó por el

Procedimiento experimental

método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio. Se realizaron dos experimentos por triplicado cada uno de ellos.

4.2.2 Evaluación de la actividad giardicida de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas

La cepa de *Giardia lamblia* IMSS:0989:1 fue cultivada en medio TYI-S33 modificado y suplementado con suero fetal bovino al 10 %. Se incubaron 5×10^4 trofozoitos de *Giardia lamblia* por 48 horas a 37 °C a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 µg/mL de los compuestos **37**, **38**, albendazol y metronidazol. Como control negativo se emplearon trofozoitos en medio libre de compuestos y de fármacos. Posteriormente, los trofozoitos fueron lavados y subcultivados por otras 48 horas con medio fresco únicamente. Al final del periodo, los trofozoitos fueron contados y la concentración letal 50 (CI₅₀) fue calculada por análisis PROBIT. Los experimentos fueron realizados por triplicados y repetidos dos veces.

5. RESULTADOS

Los resultados se presentan a continuación, en el orden en el que se llevó a cabo el procedimiento experimental. Primero se muestran los resultados obtenidos en la parte de síntesis y después los generados en la evaluación de la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria utilizando *Trichinella spiralis* y *Giardia lamblia* respectivamente.

5.1. PARTE QUÍMICA

A los compuestos sintetizados se les determinaron algunas de sus propiedades físicas, las cuales se muestran en las Tablas 5 y 6. La caracterización de todos los compuestos sintetizados se basó en los datos obtenidos en los espectros de IR, RMN ¹H y masas (Tabla 7).

Tabla 5. Constantes físicas de los intermediarios y compuestos finales sintetizados

| Compuesto | Rendimiento (%) | Rendimiento de recristalización (%) | Disolvente de recristalización | R _f | p.f (° C) |
|-----------------|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------|----------------------|
| 27 | 97.8 | 89.2 | Etanol | 0.65 ^e | 76-77 |
| 28 | 99.1 | 91.2 | Agua | 0.43 ^e | 107-108 |
| 29 | 99.3 | 85.1 | Tolueno | 0.23 ^e | 113-114 |
| 30 | 97.6 | 71.0 | Metanol | 0.65 ^e | 140-141 |
| 31 | 96.2 | 87.2 | Agua | 0.21 ^d | 88-90 |
| 32 | 72.1 | 79.2 | Acetona | 0.73 ^d | 192-193 |
| 33 ^a | — | — | — | — | — |
| 34 | 86.9 | 73.4 | Acetato de etilo | 0.53 ^a | 250-252 |
| 35 | 95.4 | 83.5 | Etanol | 0.53 ^d | 135-136 |
| 36 | 89.7 | 86.3 | DFM/etanol | 0.54 ^f | 290-291 ^b |
| 37 | 92.5 | 75.3 | Etanol/agua | 0.48 ^a | 192-193 |
| 38 | 88.9 | NR | — | 0.48 ^a | 142-143 |

^aNo se aisló porque se descompone rápidamente por exposición al aire, por lo que se sometió rápidamente a la reacción de ciclación. ^bFunde con descomposición. ^cSistema 1. ^dSistema 2. ^eSistema cloroformo-metanol 90:10. ^fSistema cloroformo-metanol 80:20, con una gota de AcOH.

Tabla 6. Constantes físicas de los intermediarios y compuestos finales sintetizados

| Compuesto | Cristales | Análisis elemental teórico (%) | Análisis elemental experimental (%) | Peso molecular calculado | Ión Molecular (M ⁺) |
|-----------------|-----------------|---|---|--------------------------|---------------------------------|
| 27 | amarillos | C (44.57), H (2.81), N (6.50) | C (44.42), H (2.76), N (6.35) | 215.59 | 215 |
| 28 | blancos | C (51.77), H (4.34), N (7.55) | C (51.89), H (4.34), N (7.44) | 185.61 | 185 |
| 29 | rosa claro | C (52.76), H (4.43), N (6.15) | C (52.81), H (4.41), N (6.09) | 227.64 | 227 |
| 30 | amarillos | C (44.05), H (3.33), N (10.27) | C (43.98), H (3.30), N (10.15) | 272.64 | 272 |
| 31 | amarillo claro | C (46.09), H (3.87), N (9.77) | C (46.38), H (3.83), N (9.59) | 286.67 | 286 |
| 32 | amarillo oscuro | C (44.19), H (3.71), N (11.41) | C (44.00), H (3.63), N (11.08) | 244.63 | 244 |
| 33 ^b | blancos | — | — | 214.65 | — |
| 34 | blancos | C (46.79), H (3.53), N (10.91), S (12.49) | C (46.45), H (3.50), N (10.95), S (12.13) | 256.71 | 256 |
| 35 | blancos | C (48.86), H (4.10), N (10.35), S (11.84) | C (48.45), H (4.09), N (10.29), S (11.50) | 270.74 | 270 |
| 36 | blancos | C (46.79), H (3.53), N (10.91), S (12.49) | C (46.75), H (3.66), N (11.12), S (11.87) | 256.71 | 256 |
| 37 | blancos | C (55.63), H (5.60), N (12.98), S (9.90) | C (55.50), H (5.71), N (13.09), S (9.71) | 323.84 | 323 |
| 38 | polvo blanco | C (56.88), H (5.97), N (12.44), S (9.49) | N.D | 337.86 | 337 |

N.D. no se determinó

Tabla 7. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los intermediarios y compuestos finales preparados


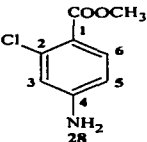

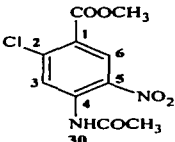
| Compuesto | Datos espectroscópicos y espectrométricos |
|---|--|
|  <p style="text-align: center;">27</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 1): 3099 (C-H aromático), 2965 (C-H de COOCH_3), 1720 (C=O de COOCH_3) 1528 y 1356 (NO_2), 1297 (C-O de COOCH_3).</p> <p>$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3, δ ppm, espectro 2): 3.99 (s, 3H, COOCH_3), 7.98 (d, 1H, $J_o = 8.7$ Hz, H-6), 8.16 (dd, 1H, $J_o = 8.7$ Hz, $J_m = 2.4$ Hz, H-5), 8.32 (d, 1H, $J_m = 2.1$ Hz, H-3).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 3): 215 (M^+, 36 %), 184 ($\text{M}^+ - 31$, $\cdot\text{OCH}_3$, 100 %)</p> |
|  <p style="text-align: center;">28</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 4): 3426 y 3336 (NH_2), 2951 (C-H de COOCH_3), 1703 (C=O de COOCH_3), 1633 y 1597 (NH_2), 1264 (C-O de COOCH_3), 1248 (C-N).</p> <p>^1RMN ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, espectro 5): 3.71 (s, 3H, COOCH_3), 6.17 (sa, 2H, intercambio con D_2O, NH_2), 6.49 (dd, 1H, $J_o = 8.4$ Hz, $J_m = 2.4$ Hz, H-5), 6.61 (d, 1H, $J_m = 2.4$ Hz, H-3), 7.62 (d, 1H, $J_o = 8.4$, H-6).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 6): 185 (M^+, 45 %), 154 ($\text{M}^+ - 31$, $\cdot\text{OCH}_3$, 100 %).</p> |
|  <p style="text-align: center;">29</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 7): 3260 (NH), 3089 (C-H aromático), 1730 (C=O de COOCH_3), 1677 (C=O de NHCOCH_3, amida I), 1591 (N-C=O, amida II), 1249 (C-O de COOCH_3).</p> <p>$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, espectro 8): 2.07 (s, 3H, COCH_3), 3.08 (s, 3H, COOCH_3), 7.53 (dd, 1H, $J_o = 8.7$ Hz, $J_m = 2.1$ Hz, H-5), 7.82 (d, 1H, $J_o = 8.7$ Hz, H-6), 7.89 (d, 1H, $J_m = 1.8$ Hz, H-3), 10.38 (sa, 1H, intercambio con D_2O, NH).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 9): 227 (M^+, 44 %), 154 ($\text{M}^+ - 42 - 31$, $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ y $\cdot\text{OCH}_3$, 100 %).</p> |
|  <p style="text-align: center;">30</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 10): 3342 (NH), 3124 (C-H aromático), 2953 (C-H de COOCH_3), 1732 (C=O de COOCH_3), 1716 (C=O de COCH_3), 1568 y 1336 (NO_2), 1293 (C-O de COOCH_3).</p> <p>$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, espectro 11): 2.13 (s, 3H, COCH_3), 3.86 (s, 3H, COOCH_3), 8.02 (s, 1H, H-3), 8.42 (s, 1H, H-6), 10.53 (s, 1H, intercambio con D_2O, NH).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 12): 272 (M^+, 16 %), 230 ($\text{M}^+ - 42$, $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$, 100 %).</p> |

Tabla 7. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los intermediarios y compuestos finales preparados (continuación)

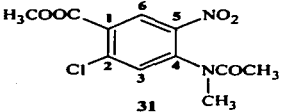
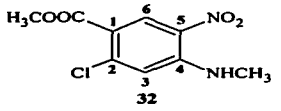
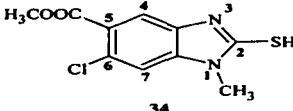
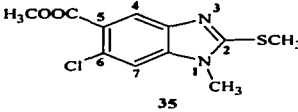
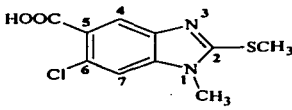
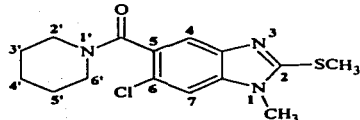
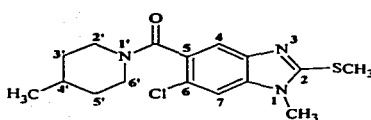
| Compuesto | Datos espectroscópicos y espectrométricos |
|---|--|
|  <p style="text-align: center;">31</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 13): 2959 (C-H de COOCH_3, COCH_3 o NCH_3), 1735 (C=O de COOCH_3), 1679 (C=O de COCH_3), 1529 y 1352 (NO_2) 1250 (C=O de COOCH_3).</p> <p>$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3, δ ppm, espectro 14): 1.86 (s, 3H, COCH_3), 2.25 (s, 3H, COOCH_3), 3.22 (d, 3H, NCH_3), 3.46 (d, 3H, NCH_3), 3.97 (d, 3H, COOCH_3), 4.01 (d, 3H, COOCH_3), 7.43 (d, 1H, H-3), 7.53 (d, 1H, H-3), 8.50 (d, 1H, H-6), 8.55 (d, 1H, H-6)</p> <p>EM (IQ, m/z, espectro 15): 288 (M^+, 15 %), 244 (M^+-42, $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$, 100 %).</p> |
|  <p style="text-align: center;">32</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 16): 3383 (NH), 2949 (CH_3 de COOCH_3 o de NCH_3), 1725 (C=O de COOCH_3), 1617 (NH), 1514 y 1362 (NO_2), 1221 (C-O de COOCH_3).</p> <p>$^1\text{H RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, espectro 17): 2.98 (d, 3H, $J = 5.1$ Hz, NCH_3), 3.80 (s, 3H, COOCH_3), 7.06 (s, 1H, H-3), 8.57 (q, 1H, $J = 5.4$ Hz, NH), 8.62 (s, 1H, H-6).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 18): 244 (M^+, 100 %).</p> |
|  <p style="text-align: center;">34</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 19): 3238 (NH, que indica el tautómero tiona), 2945 (C-H de COOCH_3 o NCH_3), 1701 (C=O de COOCH_3), 1244 (C-O de COOCH_3).</p> <p>$^1\text{H RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, espectro 20): 3.62 (s, 3H, NCH_3), 3.83 (s, 3H, COOCH_3), 7.53 (s, 1H, H-7), 7.63 (s, 1H, H-4), 13.08 (s, 1H, intercambio con D_2O, NH).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 21): 256 (M^+, 100 %).</p> |
|  <p style="text-align: center;">35</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 22) mostró bandas a 2924 (C-H de COOCH_3, NCH_3 o SCH_3), 1721 (C=O de COOCH_3), 1269 (C-O de COOCH_3).</p> <p>$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3, δ ppm, espectro 23): 2.80 (s, 3H, SCH_3), 3.64 (s, 3H, NCH_3), 3.93 (s, 3H, COOCH_3), 7.28 (s, 1H, H-7), 8.17 (s, 1H, H-4).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 24): 270 (M^+, 100 %).</p> |

Tabla 7. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los intermediarios y compuestos finales preparados (continuación)

| Compuesto | Datos espectroscópicos y espectrométricos |
|---|--|
|  <p>36</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 25):</p> <p>^1H RMN (DMSO-d_6, δ ppm, espectro 26): 2.72 (s, 3H, SCH_3), 3.66 (s, 3H, NCH_3), 7.71 (s, 1H, H-7), 7.93 (s, 1H, H-4), 13.01 (s, 1H, intercambio con deuterio, COOH).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 27): 256 (M^+, 100 %).</p> |
|  <p>37</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 28): 2930 (CH_3 de S-CH_3 o de N-CH_3), 2853 ($-\text{CH}_2-$ anillo de piperidina), 1625 (C=O de NCO), 1456 y 1442 (CH_3 y $-\text{CH}_2$).</p> <p>^1H RMN (DMSO-d_6, δ ppm, espectro 29): 1.38-1.42 (m, 2H, H-4'), 1.56 (sa, 4H, H-3' y H-5'), 2.71 (s, 3H, S-CH_3), 3.05 (t, 2H, $J_6 = 5.4$ Hz, H-6'), 3.53-3.63 (m, 2H, H-2'), 3.66 (s, 3H, N-CH_3), 7.43 (s, 1H, H-7), 7.71 (s, 1H, H-4).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 30): 323 (M^+, 64 %), 322 (M^+-1, $\cdot\text{H}$, 97 %), 239 (M^+-84, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}^+$, 100 %).</p> |
|  <p>38</p> | <p>IR (KBr, cm^{-1}, espectro 31): 2950 y 2925 (CH_3 de S-CH_3, de N-CH_3 y CH_3 del anillo de piperidina), 2865 ($-\text{CH}_2-$ anillo de piperidina), 1623 (C=O de NCO), 1442 (CH_3 y $-\text{CH}_2$).</p> <p>^1H RMN (CDCl_3, δ ppm, espectro 32): 0.96 (d, 3H, $J_6 = 6.6$ Hz, CH_3 en 4'), 1.01-1.34 (m, 2H, H-3' y H-5'), 1.47-1.79 (m, 3H, H-3' o H-5', H-4', H-3' o H-5'), 2.75-3.06 (m, 2H, H-6' o H-2' y H-2' o H-6'), 2.82 (s, 3H, SCH_3), 3.33-3.42 (m, 1H, H-2' o H-6'), 3.66 (s, 3H, NCH_3), 4.72-4.80 (m, 1H, H-6' o H-2'), 7.27 (s, 1H, H-7), 7.29 (s, 1H, H-7), 7.51 (s, 1H, H-4), 7.58 (s, 1H, H-4).</p> <p>EM (IE, m/z, espectro 33): 337 (M^+, 62 %), 336 (M^+-1, $\cdot\text{H}$, 100 %), 239 (M^+-98, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$).</p> |

5.2. PARTE BIOLÓGICA**5.2.1. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre las larvas musculares de *Trichinella spiralis***

Los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de la actividad antihelmíntica de los compuestos preparados, así como del albendazol utilizado como control positivo, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de reducción de la viabilidad *in vitro* de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* por la carboxamidas 1-metilbencimidazólicas

| Compuesto | Concentración (μM) | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.037 | 0.188 | 0.377 | 1.890 | 3.770 |
| 37 | NR | 3.32 | 6.09 | 7.48 | 9.69 |
| 38 | NR | 0.27 | 1.66 | 5.26 | 6.09 |
| Albendazol | 59.28 | 62.05 | 63.17 | 66.76 | 68.42 |

NR= no redujo.

5.2.2. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre *Giardia lamblia*

En la Tabla 9 se muestran los resultados de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *Giardia lamblia* de los compuestos 37 y 38. Mediante un análisis PROBIT se determinó la concentración que corresponde al 50 % de las muertes de la trofozoítos (CL_{50}), el albendazol y el metronidazol se utilizaron como controles positivos.

Tabla 9. Concentraciones letales de las carboxamidas 1-metilbenzimidazólicas sobre trofozoitos de *G. lamblia*

| Compuesto | CI ₅₀ | |
|--------------|------------------|-------|
| | µg/mL | µM |
| 37 | 2.271 | 7.013 |
| 38 | 1.428 | 4.226 |
| Albendazol | 0.01 | 0.038 |
| Metronidazol | 0.210 | 1.228 |

CI₅₀ = concentración de inhibición 50

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

6.1. Parte Química

La ruta de síntesis que se llevó a cabo para la obtención de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas resultó adecuada, dado que los rendimientos de los compuestos obtenidos fueron aceptables, excepto para los compuestos **30** y **32**, en los cuales los rendimientos fueron de 71.0 y 72.1 % respectivamente. Además cabe mencionar que en la síntesis de la mayoría de los intermediarios, la CCF mostró la formación de un solo producto.

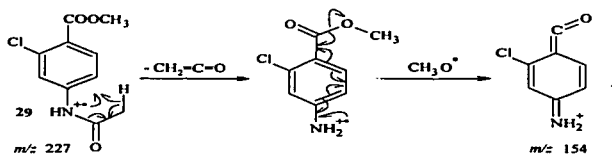
La preparación del compuesto **27** se hizo mediante una reacción de S_N2 entre el carboxilato, generado por tratamiento del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**26**) con NaHCO_3 y sulfato de dimetilo. Este paso no presentó ninguna dificultad y la técnica mostró ser un método alternativo para la preparación de ésteres metílicos debido a que se obtienen buenos rendimientos (90-95 %).¹¹ La caracterización de **27** se hizo por las bandas de IR (Espectro 1) a 1720 ($\text{C}=\text{O}$ del éster), 1528 y 1356 (grupo $-\text{NO}_2$). Mientras la RMN ^1H (Espectro 2) mostró una señal simple a 3.99 ppm que integró para 3H y se asignó al metilo del éster ($-\text{COOCH}_3$). La EM (Espectro 3) dio un M^+ de 215, coincidente con el peso molecular del producto esperado; el pico base de m/z 184 (M^+-31) correspondió a la pérdida de radical metoxilo, $-\text{OCH}_3$.

La reducción del grupo nitro se confirmó por las bandas intensas y agudas de IR (Espectro 4) que se observaron a 3426 y 3336, características del alargamiento en el enlace N-H de las aminas primarias ($-\text{NH}_2$). Además, la señal amplía a 6.17 en la RMN ^1H (Espectro 5), que integró para 2H e intercambió con D_2O , confirmaron este hecho. La EM (Espectro 6) dio un M^+ de 185 que corresponde al peso molecular de **28** y el pico base de m/z 154 (M^+-31) correspondió a la pérdida de radical metoxilo, $-\text{OCH}_3$.

En la preparación de la acetamida (**29**) se trabajó bajo condiciones anhidras para evitar la hidrólisis del anhídrido acético, reactivo utilizado como agente acetilante. La banda de IR a 3260 (Espectro 7) debida al alargamiento del enlace N-H y la banda a 1677 correspondiente al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), indicaron la presencia del grupo $-\text{NHCO}-$. También se observó el grupo $\text{C}=\text{O}$ del éster a 1730. La señal a 2.07 ppm en la RMN ^1H (Espectro 8), que integró para 3H, fué

Discusión de resultados

característica del $-\text{CH}_3$ del grupo acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$). Por otra parte, la señal amplia e intercambiable con D_2O a 10.38 ppm integró para 1H, confirmando la obtención de **29**. La EM (Espectro 9) dio un M^+ de 227, que correspondió al peso molecular de **29**. El pico base de m/z 154, es el fragmento $[\text{M}^+-42-31]$, que correspondió a la pérdida de una molécula neutra de cetena ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$) y de un radical metoxilo. (Esquema 4).



Esquema 4. Mecanismo de fragmentación del compuesto **29**.

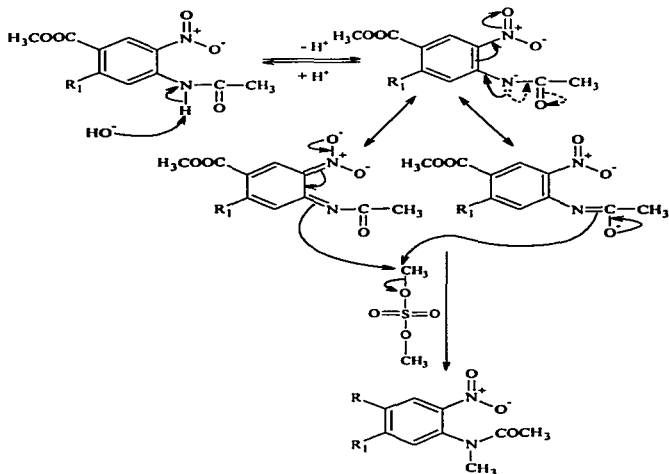
Los compuestos **27-29** dieron el mismo patrón de señales para los hidrógenos del anillo aromático en RMN ^1H (espectros 2, 5 y 8):

- A H-5 se le asignó el doble de dobles con una J_o de 8.4-8.7 y una J_m de 1.8-2.4.
- A H-6 se le asignó la señal doble con una J_o de 8.4-8.7.
- A H-3 le correspondió la señal doble con una J_m de 1.8-2.4.

La reacción de nitración de la acetamida **29** se realizó entre 3 y 5 °C para asegurar la mononitración en posición *orto* al acetamido y *para* al cloro, y evitar la formación del isómero nitrado en posición *orto* al acetamido y al cloro. Las bandas de IR observadas a 1568 y 1336 (Espectro 10) indican la presencia del grupo $-\text{NO}_2$; pero la evidencia que indicó que se realizó la sustitución electrofílica en la posición 5 del anillo bencénico, fue la desaparición de los acoplamientos *orto* y *meta* de H-5 con H-6 y H-3 respectivamente (Espectro 11). Estas señales simples correspondientes a H-3 y H-6 están desplazadas a frecuencias de onda altas, 8.02 y 8.42 ppm respectivamente e indicaron la presencia del grupo $-\text{NO}_2$ muy electronegativo. La EM (Espectro 12) dio un M^+ de 272, coincidente con el peso molecular de **30**. El pico base de m/z 230 $[\text{M}^+-42]$ correspondió a la pérdida de una molécula de cetena.

Discusión de resultados

La *N*-metilación de la acetamida **30** se logró debido a que el grupo nitro, en posición *orto*, incrementa la acidez del hidrógeno del grupo acetamido lo suficiente para formar el anión con potasa acuosa. Este anión se estabiliza por resonancia con el grupo nitro y por el carbonilo tanto del grupo acetamido como del grupo éster (Esquema 5). La posterior reacción de S_N2 con sulfato de dimetilo originó el producto *N*-metilado. En el espectro de IR (Espectro 13) no se observó la señal a 3200, correspondiente al alargamiento N-H, indicando la sustitución del nitrógeno. Sin embargo, la RMN 1H obtenida (Espectro 14) mostró una característica muy peculiar: todas las señales aparecieron dobles, esto posiblemente sea a que exista una repulsión estérica entre el grupo nitro y el *N*-metilacetamido dando origen a la existencia de dos isómeros conformacionales. La señal a 3.99 integra para 3H, corresponde al metilo del N-CH₃. La EM (espectro 15) dio un M^+ de m/z 288 que correspondió al peso molecular de **31**. El fragmento [$M^+ - 42$] de m/z 244 correspondió a la pérdida de una molécula de cetena, y además, es el pico base.



Esquema 5. Obtención del *N*-metilacetamido utilizando una base y sulfato de dimetilo.³²

Discusión de resultados

La hidrólisis en medio básico de **31** para formar **32** no fue cuantitativa (72.1 %), debido a que también se detectaron otros productos de la reacción. Esto se comprobó por análisis en CCF (sistema 2), donde además del producto de hidrólisis de la amida (R_f 0.73) se observó una mancha en el origen. Una posterior CCF, utilizando un sistema de elución especial para ácidos carboxílicos, mostró que esta mancha se resolvía en dos más, que indicó que se generaron dos productos de hidrólisis: una que correspondía únicamente al de la amida y otra en la cual probablemente se hidrolizaron tanto la amida como el éster (Figura 20). La hidrólisis del éster puede deberse a que existe impedimento estérico entre el grupo nitro y el metilo del acetamido; de cualquier manera, **32** fue el producto mayoritario.

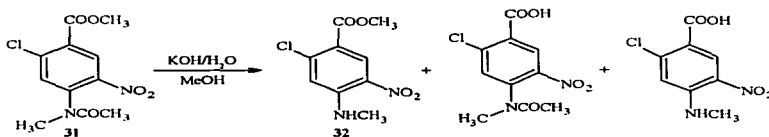


Figura 21. Productos secundarios posiblemente obtenidos en la hidrólisis del compuesto **32**.

La estructura de esta *N*-metil-*o*-nitroanilina se confirmó por la banda de IR (Espectro 16) a 3383 que indica la presencia de una amina secundaria (-NH-) y por la desaparición de la banda de absorción del C=O de la amida a 1679. La señal doble a 2.98 ppm en RMN ¹H (Espectro 17) con una *J* de 5.1 Hz, que integró para 3H, y el cuarteto a 8.57 ppm con una *J* de 5.4 Hz, que integró para 1H, indicaron la presencia del grupo metilamino (-NHCH₃); además, estas señales se simplificaron al intercambio con D₂O. Lo anterior indica que el protón de la amina se acopló con los protones del metilo. El M⁺ de *m/z* 244 obtenido por EM (Espectro 18) correspondió al pico base y al peso molecular de **32**.

La diamina **33** no se caracterizó para evitar su rápida descomposición por exposición al aire, por lo que se sometió inmediatamente a la reacción de ciclación. Sin embargo, la caracterización de **34** permitió establecer indirectamente que sí obtuvo a **33**.

Discusión de resultados

En la reacción de ciclación para formar el anillo de bencimidazol se detectó el tautómero **tiona** del compuesto **34** (Figura 21). Esto se dedujo por la banda de IR (Espectro 19) a 3238 correspondiente a una amina secundaria (-NH-). La RMN ^1H (Espectro 20) mostró señales a 3.62 y 3.83 ppm, que integraron para 3H cada uno, y corresponden al $-\text{NCH}_3$ y al metilo del $-\text{COOCH}_3$, respectivamente. Estos desplazamientos indican que el grupo carbonilo es más electronegativo que el nitrógeno y por tal razón se desplaza a una frecuencia más alta. La señal a 13.08 que integró para 1H e intercambió con D_2O , correspondió al hidrógeno del $-\text{NH}-$. La EM (Espectro 21) dio un M^+ de 256 correspondiente al peso molecular del tautómero **tiona** de **34** y al pico base.



Figura 22. Equilibrio tautomérico tiol-tiona que presenta el compuesto **34**.

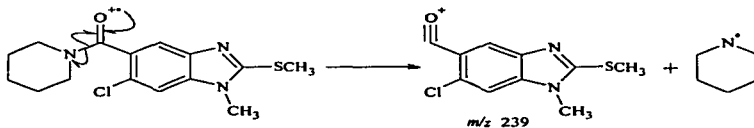
La presencia del grupo metilítico ($-\text{SCH}_3$) en **35** se demostró con la señal de RMN ^1H a 2.80 ppm (Espectro 23), la cual integró para 3H. A diferencia de los metilos localizados en el nitrógeno y en el éster, el $-\text{SCH}_3$ se desplazó a una frecuencia de onda más baja, coincidente con el hecho de que el azufre es menos electronegativo de los tres grupos. La EM (Espectro 24) dio un M^+ de m/z 270, que correspondió al peso molecular de **35** y al pico base.

La banda ancha de IR (Espectro 25) que se aprecia desde 3000 hasta 2500, característica de un ácido carboxílico; la señal en RMN ^1H (Espectro 26) a 13.01, que integró para 1H e intercambió con D_2O ; así como la desaparición de la señal del metilo del éster, que se encontraba desplazado a la frecuencia de onda más alta de los tres metilo presentes, prueban que se formó **36**. La EM (Espectro 27) dio un M^+ de 256, correspondiente al peso molecular de **36** y al pico base.

La utilización del agente acoplante CDI resultó conveniente en la preparación de los compuestos finales **37** y **38**, debido a que se obtuvieron en forma cuantitativa (92.5 y 88.9 % respectivamente). Por otro lado, no se tuvo que aislar el intermediario reactivo imidazólido, lo cual representa una ventaja sobre el método tradicional de preparar y aislar el cloruro de ácido correspondiente.

Discusión de resultados

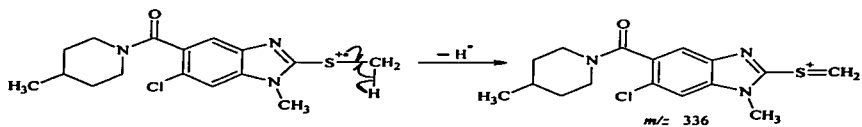
La introducción del anillo de piperidina se confirmó por la banda de IR (Espectro 28) a 2853, correspondiente al alargamiento C-H de los grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) del anillo de piperidina, y por las bandas a 1456 y 1442, que corresponden a los movimientos de vibración de los grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2-$. Además, las señales de RMN ^1H (Espectro 29) en 1.38-1.42, 1.56, 3.05 y 3.53-3.63 ppm integraron para 10H, que correspondieron a los hidrógenos del anillo de piperidina. La EM (Espectro 30) dio un M^+ de 323 que correspondió al peso molecular de la carboxamida 1-metilbencimidazólica 37 mientras que la especie de m/z 239 [M^+-84] correspondió a la pérdida del radical piperidinilo y fue el pico base (Esquema 6).



Esquema 6. Mecanismo de fragmentación del compuesto 37 para dar el pico base de m/z 239.

En lo que respecta al compuesto 38, las bandas observadas de IR a 2950, 2925 y 2865 indican la presencia de los grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2-$ del anillo de la 4-metilpiperidina en IR (Espectro 31), las bandas a 1442 y 1420 confirmaron este hecho. Por otra parte, las señales de RMN ^1H (Espectro 32) a 0.96, 1.01-1.34, 1.47-1.79, 2.75-3.06, 3.33-3.42 y 4.72-4.80 ppm integraron para los 12H del anillo de la 4-metilpiperidina. El doblete observado en 0.96 integró para 3H y correspondió al metilo en posición 4' del anillo de piperidina. Las señales dobles que se observan para cada uno de los hidrógenos del anillo aromático se deben a que existen dos isómeros conformacionales provocados por la rotación restringida del grupo carbonilo (atropoisomerismo).

La EM (Espectro 33) dio un M^+ de 337 que correspondió al peso molecular de la carboxamida 1-metilbencimidazólica 38, mientras que la especie de m/z 336 [M^+-1] correspondió a la pérdida del radical hidrógeno y fue el pico base (Esquema 7). El fragmento observado de m/z 239 [M^+-98] se debió a la pérdida del radical 4-metilpiperidinilo (por comparación ver Esquema 6).



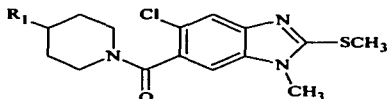
Esquema 7. Mecanismo de fragmentación de las carboxamidas 1-metilbenzimidazólicas para producir la especie $[M^+-1]$ de m/z 336.

6.2. Parte biológica

Las carboxamidas **37** y **38** no tuvieron una disminución importante en la viabilidad de las larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Ambos compuestos presentaron una actividad mucho menor que el albendazol. A la concentración mas alta utilizada (3.77 μM) los porcentajes de reduccion para los compuestos **37** y **38** fueron de 9.69 y 6.09 respectivamente, mientras que para el albendazol fue de 68.4 .

Los resultados obtenidos podrian indicar que los responsables de la actividad biologica de las carboxamidas **19** y **21** son los isomeros con la relacion estructural [1,6]. Sin embargo, los isómeros estructurales [1,6], sintetizados al mismo tiempo por otro tesista, tampoco mostraron actividad contra *Trichinella spiralis*²² (Tabla 10). Lo anterior deja en claro que la actividad biológica se perdio debido a que el hidrogeno en la posicion 1 de las carboxamidas **19** y **21** es importante para la actividad antihelmíntica, a su vez, que **19** y **21** constituyen fármacos estructuralmente específicos, con un receptor en donde actúan, ya que un pequeño cambio (la *N*-metilación) anuló la actividad.

Tabla 10. Porcentaje de reducción de la viabilidad *in vitro* de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* por la carboxamidas-1-metilbencimidazólicas con relación estructural [1,6].²²



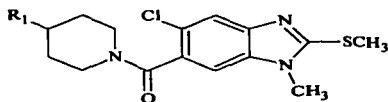
| Compuesto | R ₁ | Concentración (μM) | | | | |
|-------------------|-----------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 0.037 | 0.188 | 0.377 | 1.890 | 3.770 |
| 24 | H | NR | NR | NR | NR | NR |
| 25 | CH ₃ | NR | NR | NR | NR | NR |
| Albendazol | | 59.28 | 62.05 | 63.17 | 66.76 | 68.42 |

NR= no redujo.

Discusión de resultados

En lo que se refiere a la actividad *in vitro* sobre *Giardia lamblia* se esperaba que las carboxamidas **37** y **38**, por ser derivados 1-metilbencimidazólicos, presentarían actividad contra este parásito. Pero las CL_{50} para los compuestos **37** y **38** fueron 184 y 111 veces menores a la del albendazol, y 5 y 3 veces menores para el caso de la del metronidazol. Sin embargo, las carboxamidas **24** y **25** mostraron una buena actividad contra *G. lamblia*²² (Tabla 12). Este hecho indica que la actividad giardicida no depende del tamaño del sustituyente en 5 y/o 6, contrario a lo que se pensaba por nuestro grupo de investigación, ya que compuestos 1-metilbencimidazólicos con átomos de Cl en 5 y/o 6 fueron muy activos contra *G. Lamblia*. Además que, la relación de sustituyentes con respecto al 1-metilo para el caso de las carboxamidas, es importante; siendo notoria la diferencia en la actividad superior para las carboxamidas con relación [1,6] que para los [1,5].

Tabla 12. Actividad giardicida de carboxamidas 1-metilbencimidazólicas.²²



| Compuesto | R ₁ | CL ₅₀ (µM) |
|---------------------|-----------------|-----------------------|
| 24 | H | 0.114 |
| 25 | CH ₃ | 0.124 |
| Albendazol | | 0.038 |
| Metronidazol | | 1.228 |

7. CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas **37** y **38** a partir del ácido 6-cloro-1-metil-2-metilio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**36**) utilizando como agente acoplante al CDI. El método fue simple y permitió obtener a **37** y **38** sin muchos procesos de laboratorio.
- Las carboxamidas **37** y **38** se sintetizaron e identificaron por sus constantes espectroscópicas y espectrométricas.
- Se sintetizaron e identificaron por sus constantes espectroscópicas y espectrométricas a los intermediarios químicos necesarios para la formación de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas **37** y **38**.
- El átomo de hidrógeno en la posición 1 en las carboxamidas **19** y **20** es necesario para la actividad contra *Trichinella spiralis*. La introducción de un grupo metilo nulifica la actividad, por lo que no se pudo determinar cual de los isómeros estructurales, [1,5] ó [1,6], es el responsable de la actividad contra *Trichinella spiralis*.
- Para la actividad giardicida, se requiere que el grupo piperidinil o 4-metilpiperidinilcarbonyl se encuentre en una relación estructural [1,6]. Los isómeros [1,5] no mostraron actividad.
- Se adquirieron conocimientos y experiencia en la síntesis de nuevas moléculas de interés farmacéutico, así como en la determinación de la actividad biológica, partes importantes en el área de la química farmacéutica.

PARTE EXPERIMENTAL

Este trabajo se divide en dos etapas. La primera parte involucra la síntesis de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas **37** y **38**; la segunda, la parte biológica, describe las pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Trichinella spiralis* y *Giardia lamblia* en presencia de los compuestos sintetizados.

INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES

1. La concentración de los disolventes se realizó a presión reducida utilizando un rotavapor marca Büchi Modelo RE 114, adaptado con un condensador marca VWR Scientific Modelo 1107.
2. Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato Marca Büchi Modelo B-540 mediante capilar, y no están corregidos.
3. Para realizar la hidrogenación catalítica se empleo un hidrogenador marca Parr, Modelo 3916EF con 70 lg/plg² y 80 °C como capacidad máxima, utilizando hidrógeno y como catalizador Ni-Raney al 50 % (Aldrich).
4. Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrómetro Perkin Elmer de Transformadas de Fourier modelo FT-IR-1600 en pastilla KBr. Las señales se reportan en cm⁻¹.
5. Los espectros de Resonancia Magnética Protónica (RMN ¹H, 300 MHz) y los de Resonancia Magnética de Carbono 13 (RMN ¹³C, 75 MHz) se realizaron en un espectrómetro Varian, Modelo Unity Inova. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) y deuterocloroformo (CDCl₃) como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).
6. Los espectros de masas, por impacto electrónico (IE 70 eV) y por ionización química, se determinaron en un espectrómetro de masas marca Joel, Modelos-102 A. La simbología utilizada es *m/z* relación masa carga y M⁺ para el ión molecular. La aplicación de la muestra fue por introducción directa o mediante cromatografía de gases (EM-CG), con un cromatógrafo marca Hewlett Packard, Modelo 5890 Serie II.

Parte experimental

7. El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF254 (Merck) y una lámpara de luz ultravioleta para visualizar. Los sistemas de elución utilizados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Sistemas de elución utilizados en las cromatografías en capa fina

| Sistema | Composición | Proporción |
|---------|--------------------|--------------------|
| 1 | Cloroformo-metanol | 95:5 |
| 2 | Cloroformo-metanol | 99:1 |
| 3 | Cloroformo-metanol | 90:10 ^a |
| 4 | Cloroformo-metanol | 80:20 ^a |
| 5 | Cloroformo-metanol | 90:10 |

^a10 ml con 2 gotas de ácido acético

SÍNTESIS DE LAS CARBOXAMIDAS 1-METILBENCIMIDAZÓLICAS

Para obtener al 6-cloro-1-metil-2-metil-5-[(piperidinil)carbonil]-1*H*-bencimidazol (**37**) y al 6-cloro-1-metil-5-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-metil-1*H*-bencimidazol (**38**) se siguieron las rutas de síntesis mostradas en los esquemas 1 y 2. A continuación se describe la metodología para sintetizar a **37** y a **38**.

2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (27)

En un matraz bola de 500 ml con tres bocas, adaptado con un condensador en posición de reflujo, termómetro y un embudo de presiones igualadas, se disolvieron 40.0 g (0.1984 moles) de ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico en (**26**) 120 ml de dimetilformamida con agitación magnética a 50 °C. A esta solución se le agregó 33.3 g de bicarbonato de sodio (0.3968 moles, 2 eq) disueltos en 25 ml de agua manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C con un baño de agua. Se observó un burbujeo intenso. Después de 30 minutos de agitación, el pH que alcanzó la mezcla de reacción fue de 7; en este momento se empezó a gotear 27.2 ml de sulfato de dimetilo (0.2976 moles, 1.5 eq). Al terminar

Parte experimental

la adición, se dejó en agitación por treinta minutos más a la temperatura señalada. Posteriormente, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se vertió sobre 400 ml de agua con hielo produciendo un precipitado de color amarillo claro, el cual se separó por filtración al vacío. Se obtuvieron 40.6 g (95.0 %) de producto crudo, que por análisis en (CCF), utilizando el sistema 1, mostró una sola mancha. El producto crudo se recrystalizó de etanol obteniéndose cristales de color amarillo (89.2 %) con R_f de 0.65 en el mismo sistema y un p.f. de 76-77 °C.

4-Amino-2-clorobenzato de metilo (28)

En una botella de hidrogenación de 500 ml se suspendieron 20.0 g (0.0928 moles) de **27** y 6.0 g de catalizador níquel-Raney (30 %), en 200 ml de metanol. El catalizador se lavó previamente, primero en agua, y después en metanol. El reactor se adaptó a un hidrogenador Parr y el aire presente se eliminó a través de la inyección-expulsión de 30 lb/plg² de hidrógeno tres veces. Posteriormente, se inyectó hidrógeno hasta alcanzar una presión de 60 lb/plg² y se colocó en agitación constante, iniciando así la reducción catalítica. Esta reacción se llevó a cabo en dos horas y quince minutos, consumiendo un total de 419 lb/plg² de hidrógeno. El resultado de este proceso fue una solución translúcida, la cual en CCF utilizando el sistema 1, mostró una sola mancha con R_f de 0.43. Después de separar el catalizador por filtración al vacío, la solución se concentró a sequedad en un rotavapor obteniéndose 17.2 g (99.1 %) de cristales blancos. El producto crudo se recrystalizó de agua obteniéndose cristales en forma de aguja de color blanco con un p.f. de 107-108 °C.

4-Acetamido-2-clorobenzato de metilo (29)

En un matraz bola de 250 ml de dos bocas, adaptado con embudo de adición y con trampa de humedad, se suspendieron 17.0 g (0.0916 moles) de **28** en 10 ml de ácido acético glacial. A esta mezcla se le agregó 13 ml de anhídrido acético (1.5 eq) y se agitó magnéticamente durante 15 minutos a temperatura ambiente obteniéndose una solución amarilla translúcida. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió sobre 400 ml de agua con hielo precipitando un sólido de color blanco, que se separó por filtración al vacío y se lavó con agua en repetidas ocasiones hasta que el pH de lavado fuera neutro. Se obtuvieron 21.1 g de producto crudo (99.3 %), que por análisis por CCF en el sistema 1, mostró una sola mancha con R_f de 0.23. El producto crudo se recrystalizó de tolueno dando cristales rosados con p.f. de 113-114 °C.

4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (30)

En un vaso de precipitados de 600 ml, provisto de un embudo de adición, termómetro, agitación magnética y un baño de hielo se solubilizaron 50.0 g (0.2196 moles) de **29** en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado, entre 5 y 10 °C, durante cuatro horas. Posteriormente se goteó 42 ml de mezcla sulfonítrica (1:1) durante tres horas y media manteniendo siempre la temperatura de la mezcla de reacción entre 3 y 5 °C. Al terminar la adición, la agitación se mantuvo por 30 minutos más a la temperatura señalada. La mezcla se vertió sobre 600 ml de agua con hielo formando un sólido de color amarillo, que se separó por filtración al vacío y lavó varias veces con agua hasta que el pH del agua de lavado fuera neutro. Se obtuvieron 58.2 g de producto crudo (97.6 %), que por CCF en el sistema 1, mostró dos manchas principales, que correspondían al producto esperado en mayor proporción (R_f de 0.65) y al de su isómero (R_f de 0.48). La mezcla cruda se recrystalizó de metanol produciendo 41.3 g (71.0%) de cristales de color amarillo claro, que por análisis en CCF utilizando el mismo sistema de elución mostró una sola mancha, que correspondía a la del producto principal con un p.f. de 140-141 °C.

Preparación de la mezcla sulfonítrica. La mezcla sulfonítrica se preparó adicionando poco a poco 21 ml de ácido sulfúrico concentrado a 21 ml de ácido nítrico concentrado, ambos enfriados previamente a 3 °C en un baño de hielo con sal, y manteniendo la temperatura de mezclado entre 5 y 8 °C.

4-(N-Metilacetamido)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (31)

En un matraz bola de 100 ml de tres bocas, provisto un embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y agitación magnética, se suspendieron 5.1 g (0.0186 moles) de **30** en 50 ml de acetona. La mezcla, agitada vigorosamente, se calentó a 50 °C para solubilizar la materia prima. A esta temperatura se adicionaron 3.6 ml (2 eq) de sulfato de dimetilo, posteriormente se dejó que la mezcla alcanzara una temperatura entre 30 y 35 °C. Entonces se adicionó 3.1 g (2 eq) de hidróxido de potasio disueltos en 3 ml de agua, cada gotico se realizó después de que el color rojo, provocado por la adición de la base, desapareció de la mezcla de reacción. Este proceso se prolongó durante cuatro horas. Una vez terminada la adición del hidróxido de potasio se dejó en agitación vigorosa por una hora más; por CCF (sistema 1) se verificó la

Parte experimental

desaparición de V. La mezcla de reacción se vertió sobre 150 ml de agua con hielo, produciendo un líquido aceitoso amarillento, que posteriormente endureció para formar un sólido del mismo color el cual se separó y secó por filtración al vacío. Se obtuvieron 5.1 g (96.2 %) de producto crudo que se recrystalizó de agua, obteniéndose 4.4 g (82.2%) de cristales amarillo paja con R_f de 0.21 en el sistema 2 y un p.f. de 88-90 °C.

4-(N-Metilamino)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (32)

En un matraz bola de 100 ml de dos bocas, provisto con un embudo de adición y agitación magnética, se solubilizaron 4.4 g (0.0153 moles) de 31 en 40 ml de metanol a temperatura ambiente. La solución resultante se colocó en un baño de agua fría y una vez que alcanzó una temperatura entre 10 y 15 °C se empezó la adición de 1.3 g (0.0229 moles, 1.5 eq) de hidróxido de potasio en solución acuosa. Durante el transcurso de la reacción precipitó un sólido de color amarillo intenso, formando una mezcla difícil de agitar. Al terminar la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación por 30 minutos y después se vertió sobre 200 ml de agua con hielo. El sólido muy fino que se formó se separó y secó por filtración al vacío; una CCF mostró una mancha con R_f de 0.73 en el sistema 2. El producto crudo se recrystalizó de acetona, dando cristales algodonosos de color amarillos brillante con p.f. de 192-193 °C.

5-Amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo (33)

En una botella de hidrogenación de 500 ml, provista de una malla de calentamiento, se suspendieron 3.2 g (0.0131 moles) de 32 y 1.0 g (30 %) de catalizador níquel-Raney en 100 ml de una mezcla etanol-acetato de etilo (1:1). El catalizador se lavó previamente en agua y en etanol. El matraz se adaptó a un hidrogenador Parr y el aire presente se eliminó mediante la inyección-expulsión de 30 lb/plg² de hidrógeno tres veces. Después se inyectó hidrógeno hasta alcanzar una presión de 40 lb/plg² e inició la reducción catalítica. La reacción se calentó con ayuda de un reóstato a una temperatura entre 40 y 50 °C. El consumo de hidrógeno después de tres horas fue de 38.5 lb/plg². El catalizador se separó por filtración al vacío y el filtrado resultante se evaporó a sequedad en un rotavapor, dando un sólido de color café claro que se oscurecía por exposición al aire, por lo que se sometió inmediatamente a la reacción de ciclación.

6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (34)

En un matraz Taper "Kontes" de 125 ml, adaptado con un termómetro, embudo de adición y un condensador en posición de reflujo y un globo con nitrógeno en la parte superior, se suspendieron 2.8 g (0.0130 moles) de **33** en 25 ml de etanol. A esta mezcla se le adicionó con goteo constante una solución alcohólica de xantato de potasio, preparada previamente con 1.6 ml (0.0260 moles, 2 eq) de disulfuro de carbono, 2.7 ml (0.0455 moles, 3.5 eq) de etanol y 1.4 g (0.0260 moles, 2 eq) de hidróxido de potasio en solución acuosa. Al terminar la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo suave entre 60 y 65 °C utilizando para ello un baño de agua por 4 horas. Después de comprobar por CCF (sistema 3) la desaparición de **33**, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió sobre 150 ml de agua fría, formándose un sólido de color amarillo que quedó suspendido en la superficie. El pH de esta mezcla se ajustó a pH 6 utilizando ácido acético al 20 %, el sólido cambió a un color café claro (beige) sedimentando en el fondo del vaso de precipitados. El sólido se separó y secó por filtración al vacío, obteniéndose 2.9 g (86.9 %) de producto crudo, el cual, por CCF utilizando el mismo sistema, mostró una sola mancha con R_f de 0.53. El producto crudo se recrystalizó de acetato de etilo dando cristales blancos (73.4 %) con un p.f. de 250-252 °C.

6-Cloro-1-metil-2-metilio-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (35)

En un matraz Taper "Kontes" de 250 ml, provisto con un embudo de adición, termómetro, condensador en posición de reflujo y baño de agua, se suspendieron 5.8 g (0.0228 moles) de **34** en 50 ml de acetona. A continuación se añadieron 2.5 g (0.0456 moles, 2 eq) de hidróxido de potasio disueltos en 2.5 ml de agua; esta mezcla se dejó en agitación magnética por 10 minutos a 20 °C, (pH=8). Posteriormente se goteó 1.7 ml (0.0274 moles, 1.2 eq) de yoduro de metilo disueltos en 4 ml de acetona a 20 °C. Al terminar la adición, la mezcla de reacción se solubilizó e inmediatamente precipitó un sólido blanco. Se continuó con la agitación por 15 minutos más y por análisis en CCF (sistema 3) se verificó la desaparición de **34**. El pH de la mezcla de reacción al final fue de 7. La mezcla de reacción se vertió sobre 250 ml de agua fría produciendo un sólido de color blanco que se separó por filtración y se lavó varias veces con agua. La CCF utilizando el sistema 2 mostró una sola mancha con R_f de 0.53. El producto crudo se recrystalizó de etanol, con un p.f. de 135-136 °C.

Ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-benzimidazol-5-carboxílico (36).

En un matraz Taper "Kontes" de 125 ml, adaptado con un condensador en posición de reflujo, termómetro, embudo de presiones igualadas y agitación magnética, se suspendieron 4.5 g (0.0166 moles) de **35** en 20 ml de metanol. La mezcla resultante se llevó a una temperatura entre 50 y 60 °C utilizando un baño de agua, posteriormente, se agregaron 1.9 g (0.0332 moles, 2 eq) de hidróxido de potasio en solución acuosa; la agitación se continuó por 30 minutos más a la temperatura señalada y mediante una CCF (sistema 1) se comprobó la desaparición de **35**. La mezcla de reacción se vertió sobre 150 ml de agua fría y el pH se ajustó a 4 utilizando una solución de ácido sulfúrico al 20 %. El sólido de color blanco que precipitó, se separó y secó por filtración al vacío. Se obtuvieron 3.83 g (89.7 %), que por CCF utilizando el sistema 4, mostró una sola mancha con R_f de 0.54. Se recrystalizó de DFM/etanol dando cristales blancos (86.3 %) con p.f. de 290-291 °C (fundió con descomposición).

6-Cloro-1-metil-2-metiltio-5-[(piperidinil)carbonil]-1H-benzimidazol (37)

En un matraz Taper "Kontes" de 125 ml, adaptado con un termómetro, embudo de presiones igualadas, agitación magnética y condensador en posición de reflujo con trampa de humedad en la parte superior, se suspendieron 2.3 g (0.0140 moles, 2 eq) de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), pesados bajo atmósfera de nitrógeno, en 10 ml de diclorometano. La mezcla resultante se enfrió a 5 °C utilizando un baño de hielo con agua, después se adicionaron 1.8 g (0.0070 moles, 1 eq) de **36**. Tras la adición se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y posteriormente se calentó con un baño de agua a 30-35 °C por una hora, observándose evolución de CO₂. Al verificar por CCF (sistema 4) la desaparición de **36**, se adicionó 1.4 ml (0.0140 moles 2 eq) de piperidina, luego se calentó entre 30-35 °C durante 2 horas. Al verificar por CCF la desaparición del intermediario (sistema 5) se dio término a la reacción. La solución resultante se lavó con tres porciones de agua de 15 mL cada una. A la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad obteniéndose 2.1 g (92.5 %) de un sólido ligeramente amarillento que por análisis en CCF, utilizando el sistema 5, mostró una mancha principal con R_f de 0.48 El producto se recrystalizó de etanol-agua obteniéndose cristales blancos (75.3 %) con p.f. de 192-193 °C.

Parte experimental

6-Cloro-1-metil-5-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-metiltio-1*H*-bencimidazol (38)

Se pesaron 2.8 g (0.0234 moles, 2 eq) de 1,1'-carbonildiimidazol bajo atmósfera de nitrógeno y se colocaron en un matraz Taper "Kontes" de 125 ml, provisto con termómetro, embudo de presiones igualadas, agitación magnética y condensador en posición de reflujo con trampa de humedad en su parte superior. Después se añadieron 20 ml de diclorometano y la mezcla resultante se enfrió a 5 °C utilizando un baño de hielo con agua; entonces se agregó 3.0 g (0.0117 moles, 1eq) de **36** y se dejó que la mezcla de reacción alcanzara temperatura ambiente bajo agitación magnética constante. Posteriormente se calentó a 30 °C utilizando un baño de agua por una hora, observándose evolución de CO₂. Al verificar por CCF (sistema 4) la desaparición de **36**, a la mezcla se le adicionó 2.9 ml (0.0234 moles 2 eq) de 4-metilpiperidina, luego se calentó nuevamente entre 30 y 35 °C durante 2 horas. Al verificar por CCF (sistema5) la desaparición del intermediario se dio término a la reacción. La solución resultante se lavó con tres porciones de agua de 15 mL cada una. A la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad obteniéndose 3.5 g (88.9 %) de un sólido ligeramente amarillento que por análisis en CCF, utilizando el sistema 5, mostró una mancha principal con R_f de 0.48. El producto crudo se lavó se lavó varias veces con éter hasta que presentó una sólo mancha en CCF. El producto presentó un p.f. de 142-143 °C.

PARTE BIOLÓGICA

Evaluación de la actividad antihelmíntica de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas.

Parásitos: *Trichinella spiralis*.

Se utilizó una cepa de *Trichinella spiralis* que fue aislada del cerdo por el Dr. Martínez-Marañón del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE). Para mantener el ciclo de vida de este parásito, se infectaron ratas de la cepa Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad con 2500 larvas musculares suspendidas en Bacto agar al 0.2 %. La infección se realizó por vía oral utilizando una sonda gástrica.

Obtención de las larvas musculares de *Trichinella spiralis*.

Las ratas fueron sacrificadas 30 días después de la infección y, tras quitar piel y remover todas las vísceras, el músculo esquelético se cortó en pequeños pedazos y trituró en una picadora Moulinex. La masa resultante se puso en digestión en una solución de pepsina-HCl al 1 % durante tres horas a 37 °C, en un agitador planetario a 140 rpm. Para la purificación de las larvas se montó un aparato de Bearman, que consiste en un embudo de plástico con una manguera en el tallo, que a su vez tiene adaptado un tubo Falcon de 15 mL. La mezcla resultante se pasó a través de un tamiz del número 40 colocado encima del embudo para poder eliminar restos de músculo no digerido, las larvas se dejaron sedimentar durante 20 min.

Las larvas se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 con antibióticos (200 U.I. de penicilina y 200 µg de estreptomycin), hasta haber quitado todo los restos de carne. Las larvas se resuspendieron en PBS con antibiótico y se dejaron por 12 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se hizo un lavado más con PBS con antibiótico y se tomó una alícuota de 10 µL que se suspendió en 40 µL de Bacto agar al 0.2 % para el conteo de las larvas. En un portaobjetos limpio y desengrasado, se colocaron de la dilución 5 gotas de 5 µL cada una y se contaron los parásitos con el objetivo seco débil (10X). Se determinó el promedio de parásitos contabilizados por gota (5 µL) y se calculó el número de parásitos totales en la muestra inicial.

Ensayo *in vitro* del MTT/PMS para evaluar el efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas 37 y 38 sobre las larvas musculares de *Trichinella spiralis*.

En cajas de cultivo Nuclon se colocaron, por pozo, 1000 larvas musculares de *T. Spiralis*, 20 μL de solución de cada compuesto en DMSO y suficiente medio RPMI 1640 (suplementado con suero bovino al 10 %, 500 U/mL tanto de penicilina como de estreptomycin) para alcanzar un volumen final de 2ml. Las concentraciones finales de las carboxamidas 37 y 38 fueron de 0.037, 0.188, 0.377, 1.88 y 3.770 μM . Los parásitos se incubaron durante tres días a 37 °C bajo atmósfera de CO₂ al 5 % con cambio diario de medio más compuesto. Como control positivo se incluyeron parásitos en presencia de albendazol, y como control negativo larvas musculares en presencia del disolvente utilizado (DMSO).

Después de la incubación se determinó la viabilidad de las larvas mediante el método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio (MMT) a azul de formazán. Después de desechar 1 mL de sobrenadante, las larvas se transfirieron a tubos Ependorff de 2 mL y se centrifugaron a 3500 rpm por 2 minutos. A continuación se desechó el resto del medio, se lavaron las larvas con PBS estéril y se agregó 1 mL de una solución de MMT al 0.75 %, 20 μL de una solución de metasulfato de fenazina (PMS) al 5 % y 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 50 minutos. Después de la incubación se realizó un lavado con PBS estéril y se añadieron 500 μL de DMSO dejando reposar los tubos por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante se transfirió a placas de lectura ELISA, las cuales se leyeron a una longitud de onda de 492 nm. Se calculó el porcentaje de reducción en la densidad óptica y se comparó con el control negativo y de acuerdo a esto se calculó el porcentaje de reducción en la viabilidad de las larvas. Se realizaron dos experimentos por triplicado cada uno de ellos.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Evaluación de la actividad antiprotozoaria de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas.

Parásitos: *Giardia lamblia*.

Se empleó la cepa de *Giardia lamblia* IMSS: 0989:1, la que se mantuvo en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 modificado, suplementado con suero de ternera descomplementado al 10 %. Los parásitos se subcultivaron 2 veces por semana.

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Giardia lamblia*.

Se empleó el método de subcultivos previamente estandarizado.²⁰ 1.6×10^6 trofozoitos/mL de *G. lamblia* se incubaron por 48 h a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas 37 y 38 (0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 µg/mL), además del albendazol y del metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia. Como control negativo se emplearon trofozoitos en medio libre de fármacos. Después de la incubación se inocularon 50 µL de los trofozoitos tratados, en medio fresco, ya sin la adición de los compuestos y se incubaron por otras 48 h. El número final de trofozoitos se determinó en una cámara de Neubauer. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit se calculó la CL₅₀, que correspondió a la concentración que inhibió al 50% el crecimiento de los trofozoitos. Los experimentos se efectuaron por triplicado y se repitieron en tres ocasiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sharma, S. *Adv. In Drug Res.* 25, 1994, 104-172.
2. Horton, R. J. *Parasitology today.* 6, 1990, 106.
3. Crompton, D. W. T. *J. Parasitol.* 85, 1999, 397-403.
4. Ximénez, G. C. *Las parasitosis intestinales en México; Cuadernos FunSalud No. 36; Fundación Mexicana para la Salud: México D.F., 2002.*
5. Bharti, N. *Bioorg. Med. Letters.* 12, 2002, 869-872.
6. Anand, N. *Approaches to Design and Synthesis of Antiparasitic Drugs.* Elsevier Science: Holanda, 1997.
7. Boletín de Vigilancia Epidemiológica del IMSS, 2002. <http://www.ssa.gob.mx>
8. Alcántara, E. Estudios de unión y afinidad del Albendazol en tres modelos diferentes de tubulina. Tesis de Maestría, UNAM, México D.F., 2000.
9. Ram, S.; Wise, D.S. *J. Med. Chem.* 35, 1992, 539-547.
10. Gupta, S.; Khan, A.M.; Katiyart. *Indian Journal of Experimental Biology:* 28, 1990, 475-479.
11. Laguna-Martínez, N. Síntesis alterna para Carboxamidas con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., 1997.
12. Comunicación personal de la M. en C. Alicia Hernández-Campos del artículo escrito para su publicación en *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*

Bibliografía

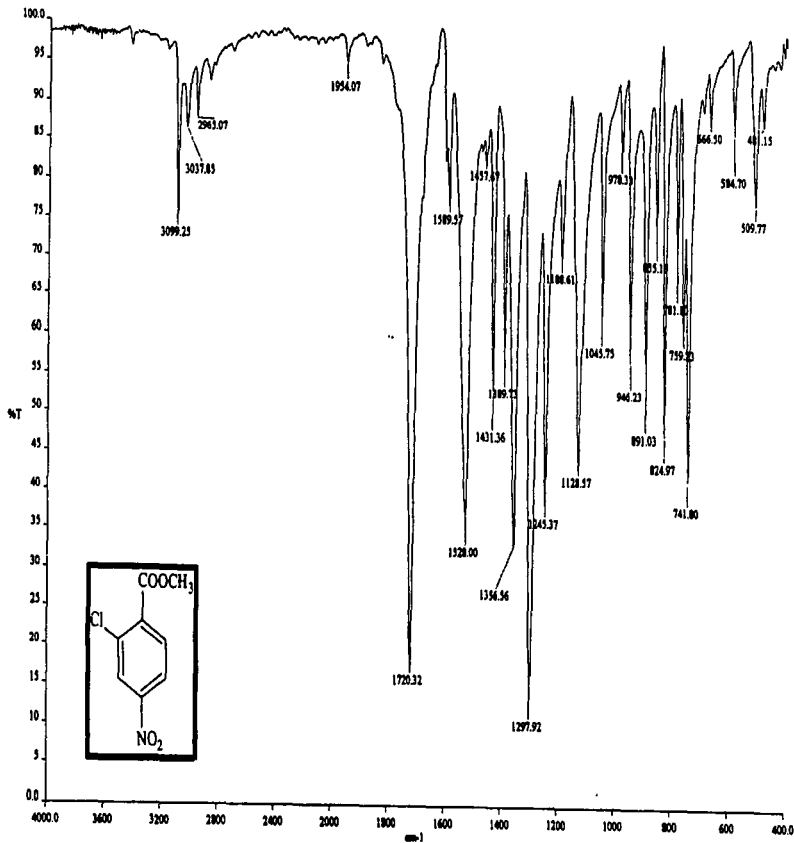
13. Valdéz, J. Síntesis y actividad biológica de 1*H*-bencimidazoles. Tesis de Maestría, UNAM, 2001.
14. Robinson, M.W.; Hocy, E. M. *International Journal for Parasitology*. 35, 2001, 1264-1268.
15. Basilio, P. Evaluación de la actividad biológica de compuestos derivados del Triclabendazol empleando a *Trichinella spiralis* como modelo experimental. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM, México D.F., 1998.
16. Abe, K.; Matzuki, N. *Neuroscience Research*. 38, 2000, 325-329.
17. Cedillo-Rivera, R.; Ramírez, A.; Muñoz, O.; A rapid colorimetric assay with the tetrazolium SALT MTT and phenazine methasulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.*, 1992; 23:59-61.
18. Valdés, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12, 2000, 2221-2224.
19. Navarrete-Vázquez, G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 11, 2001, 187-190.
20. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. *J. Med. Microbiol.*: 39, 1992, 510-515.
21. Sánchez, M. R. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con potencial actividad antihelmíntica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1999.
22. López-Balbiaux, N. Síntesis y actividad antiparasitaria de nuevos derivados bencimidazólicos 1-metilados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 2003.
23. Del Villar, M. R.; Guzmán, V. M. Síntesis de nuevas carboxamidas bencimidazólicas con potencial actividad antihelmíntica. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1996.

24. Organic Synthesis; Wiley & Sons: New York, 1963; Collective Volume IV, 569.
25. Bywater, W.G.; McGinty, D.A & Jenesel, N. D. *J. Pharm.*: 85, 1995, 14.
26. Hernández Campos, M. A. Tesis de Maestría. Facultad de Química-UNAM. México, D.F., 1990.
27. Middleton, R.W.; Monney, H.; Parrick, N-Methylation of Heterocycles with Dimethylformamide Dimethyl Acetal. *Synthesis, Communications*, 1984; 740-743
28. Kasturi. T.R.; Jois, H.R.; Mathew, L.; A Novel Transformation of 3-Alkoxyisoquinolines to 3-Chloroisoquinolines and an Unusual Decyanation of 1,3-Dialkoxy-4-cyano-5,6,7,8-tetrahydroisoquinolines Under Vilsmeier-Haack Conditions, *Communications*, 1987; 708.
29. Katritzky, A.R.; Rachwal, S.; New Routes to Selectively Methylated Benzimidazoles. *J. Heterocyclic Chem.*, 1994; 31:775.
30. Belstein *Organische Chemie*. Band XII, 730. (Blanskma, R21, 276).
31. Mendoza, L. Síntesis de *N*-metil-2 nitroanilinas. Materias primas para la preparación de 1-metilbencimidazoles antiparasitarios. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 2000
32. Navarrete-Vázquez, G. Síntesis y actividad biológica de 2-trifluorometilbencimidazoles. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional autónoma de México. México D.F. 2000.
33. Brehme, R.; Phasentransfer-Katalysiert. *Synthesis*, 1976; 113.
34. Mc. Murry. *Química Orgánica*. Editorial Iberoamericana: México D.F., 1999. 781-793.

Bibliografía

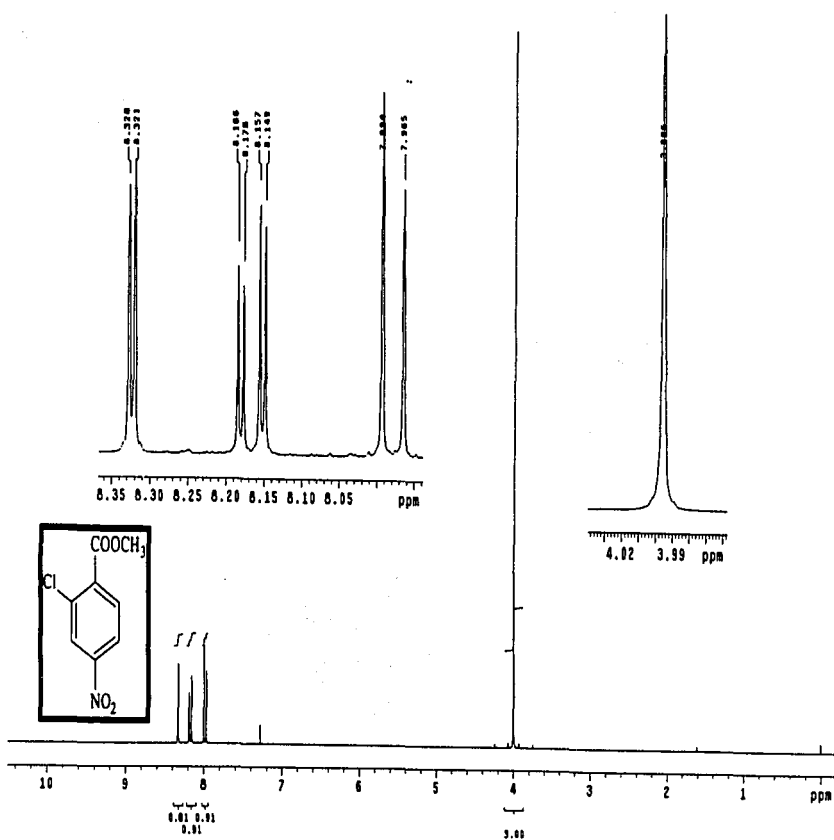
35. Kunishima M.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Terao, T.; Tani, S. *Tetrahedron.*: 57 2001, 1551-1558.
36. Pine, S.; Hedrickson, J.; Cram, D.J.; Hammond George, S. *Química Orgánica*: Editorial McGraw Hill, 4a. Edición. 346-348.
37. Sanntag, N.O.V. *Chem. Rev.*: 52 1953, 237-416.
38. Morrison Boyd, *Química Orgánica*, 5a. Edición Ed. Addison Wesley Iberoamericana.
39. Ogura, H.; Takanori, K.; Shimizu, Kawabe, K.; Takeda, K. *Tetrahedron Letters.*: 49, 1979; 4745-4746.
40. Staab, H. A. *Angew. Chem.*: 74, 1962 ,407 *Angew. Chem. Intern.*; Ed. Engl., 1962, 1,351.

APÉNDICE

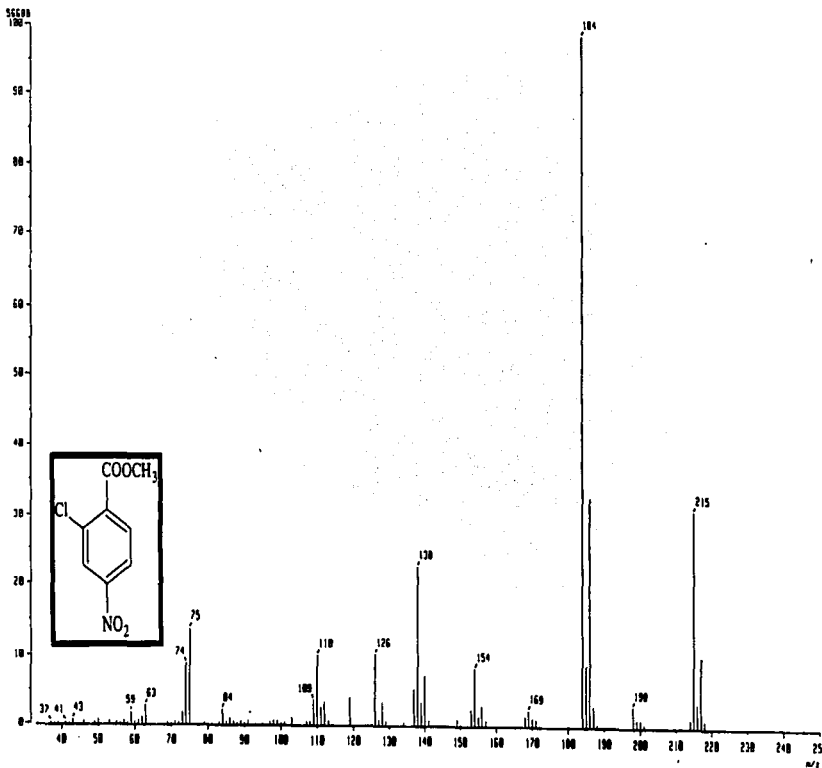


— a. Inspec/chem.207

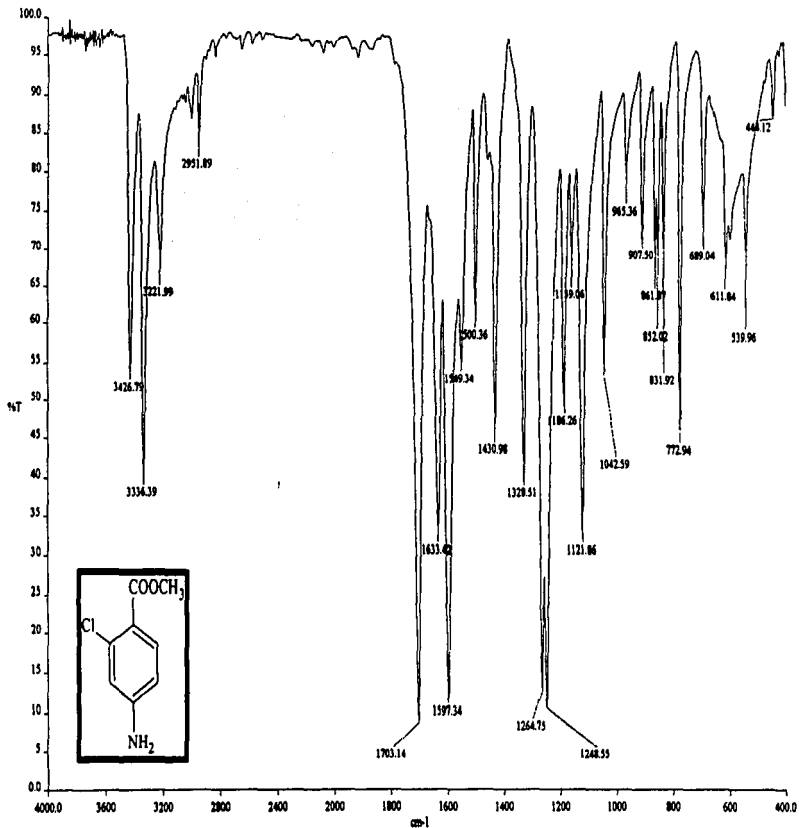
Espectro 1. IR (KBr) del 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (27).



Espectro 2. RMN ^1H (TMS, CDCl_3) del 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (27).

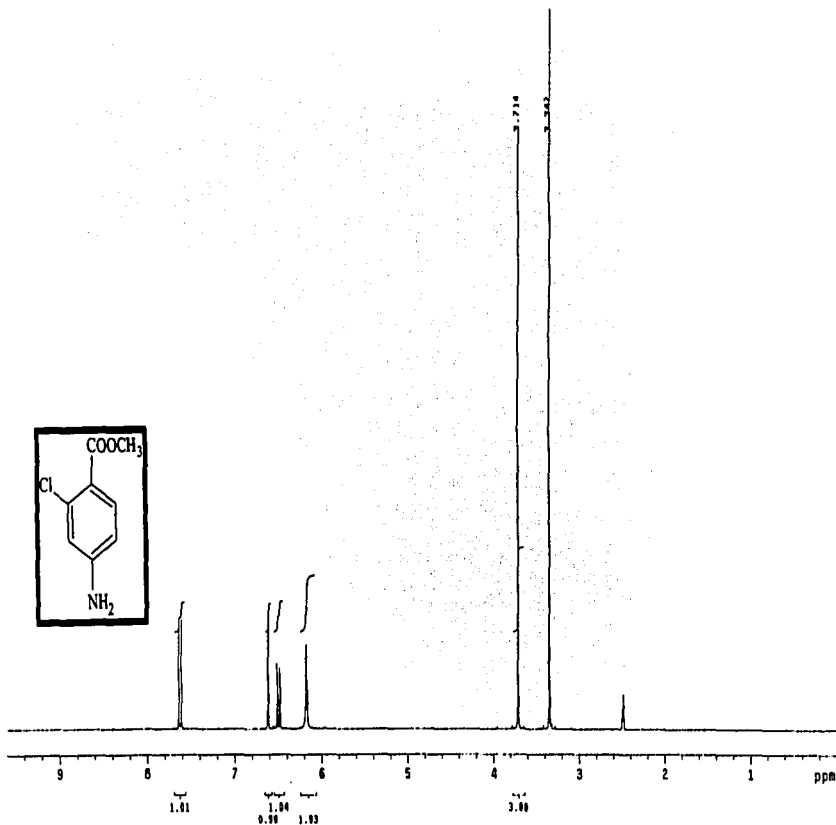


Espectro 3. EM (IE) del 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (27).

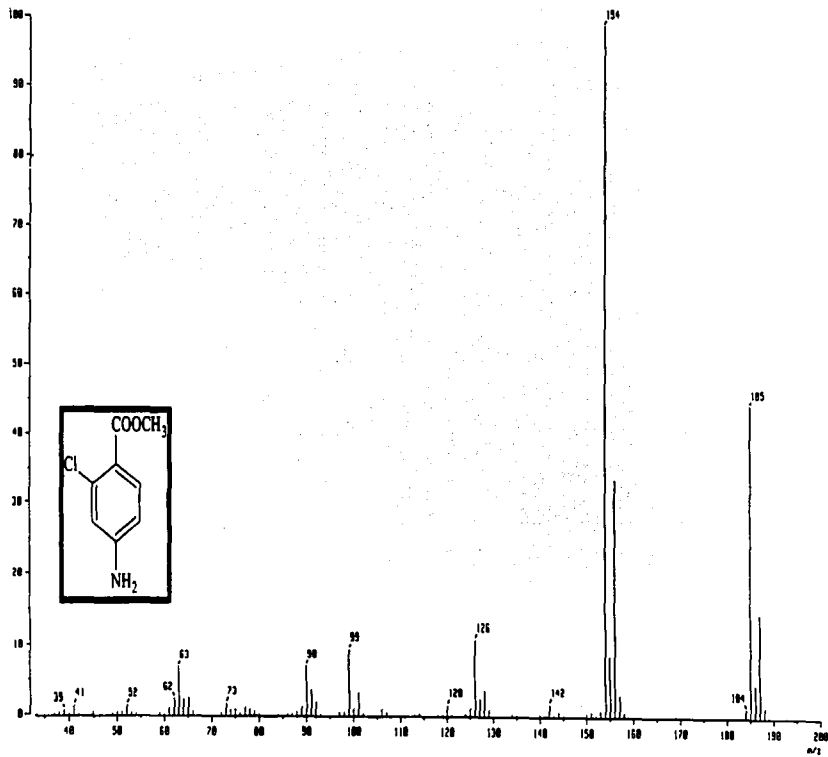


— e: spectra 07/01 001

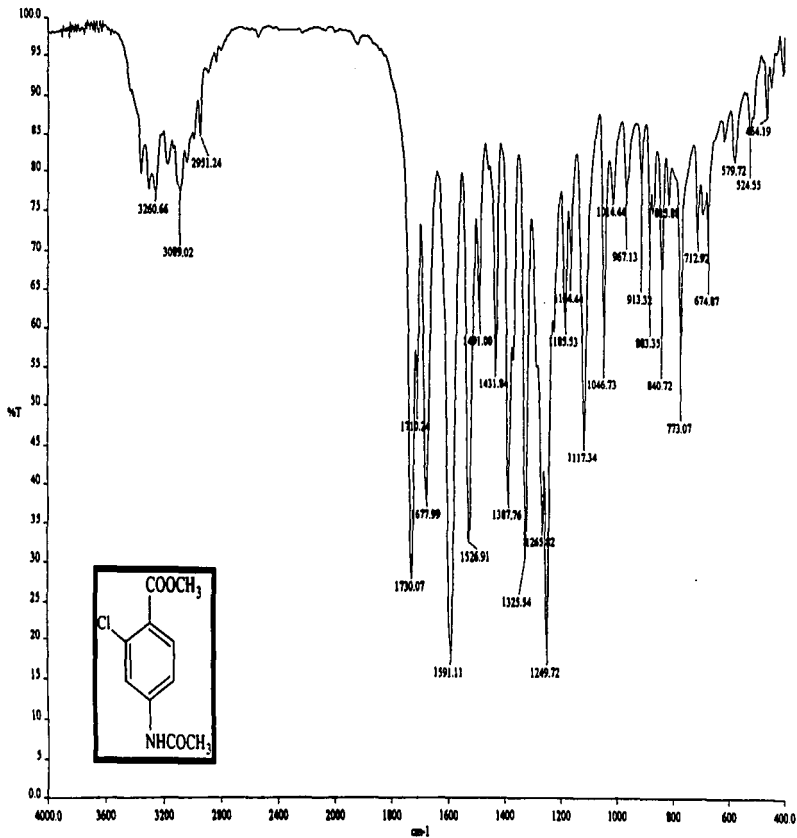
Espectro 4. IR (KBr) del 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (28).



Espectro 5. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) del 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (28).

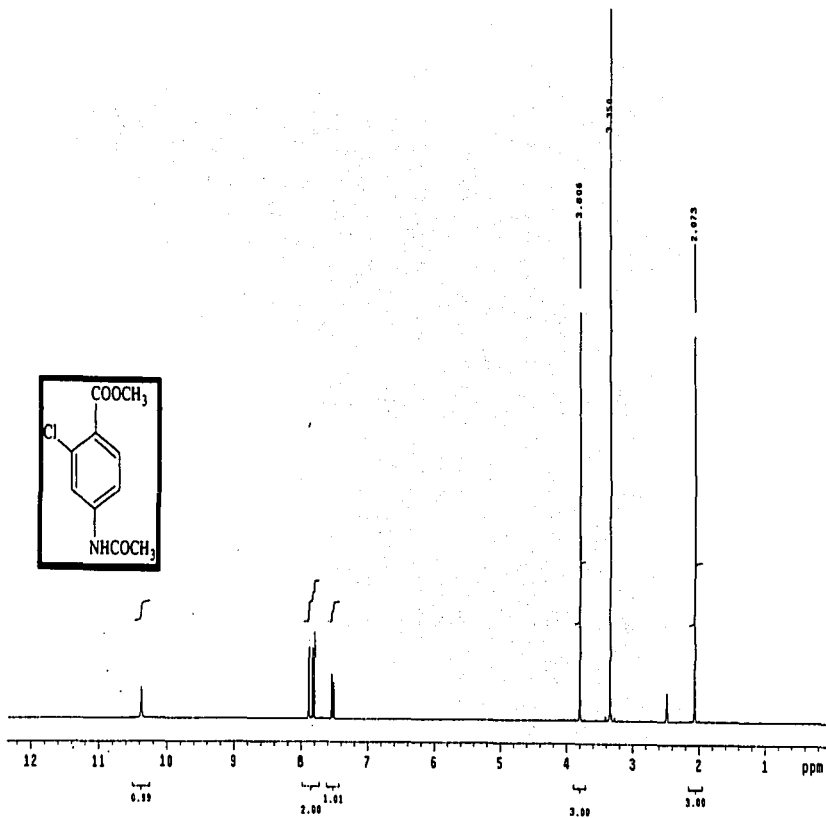


Espectro 6. EM (IE) del 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (28).

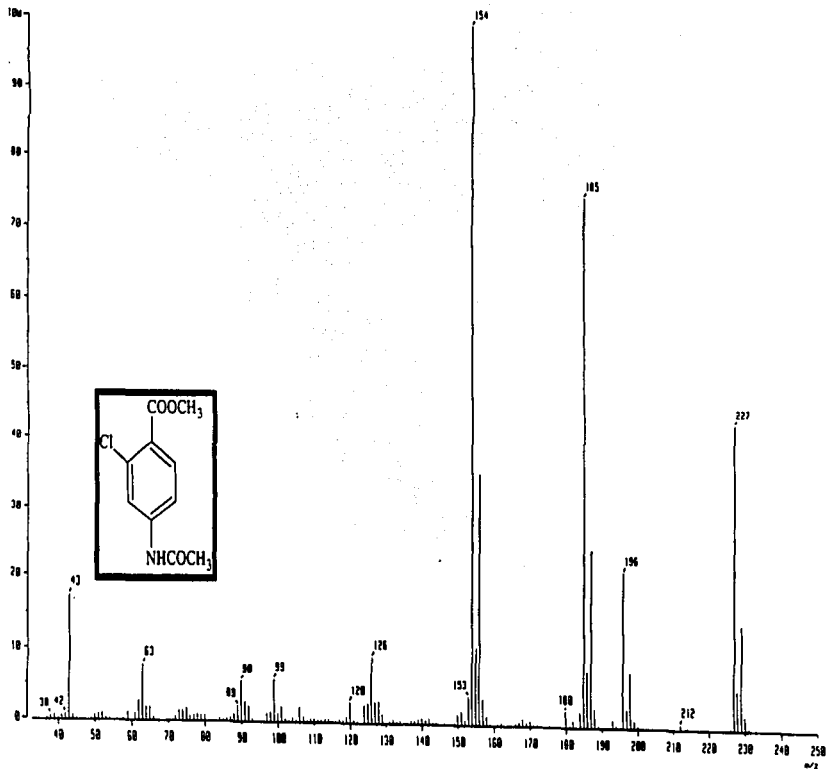


n:\espectro\7025.ap

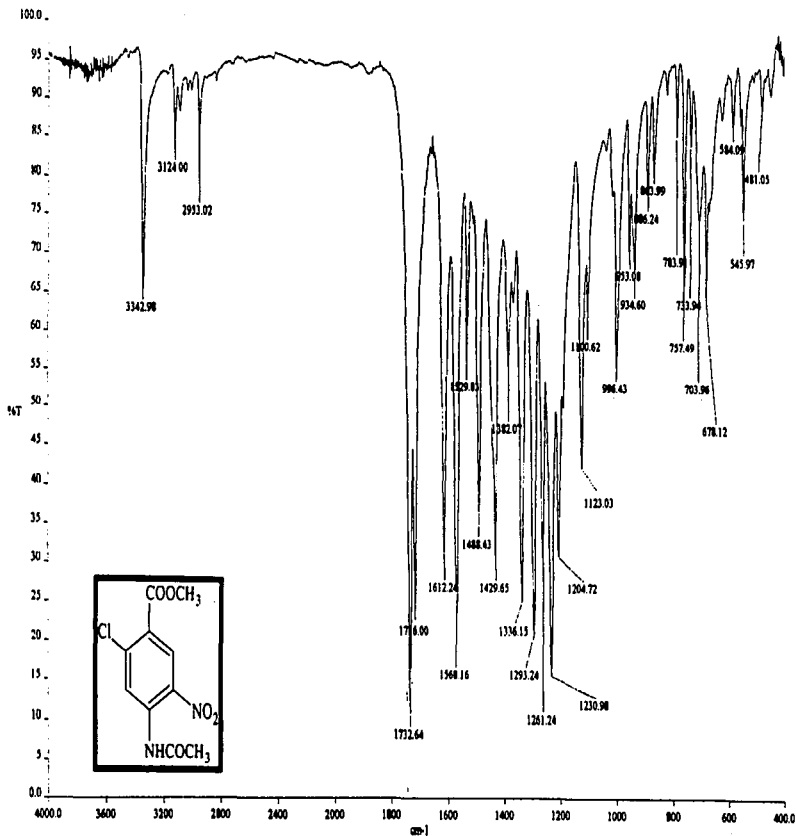
Espectro 7. IR (KBr) del 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (29).



Espectro 8. RMN^1H (TMS, CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$) del 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (29).

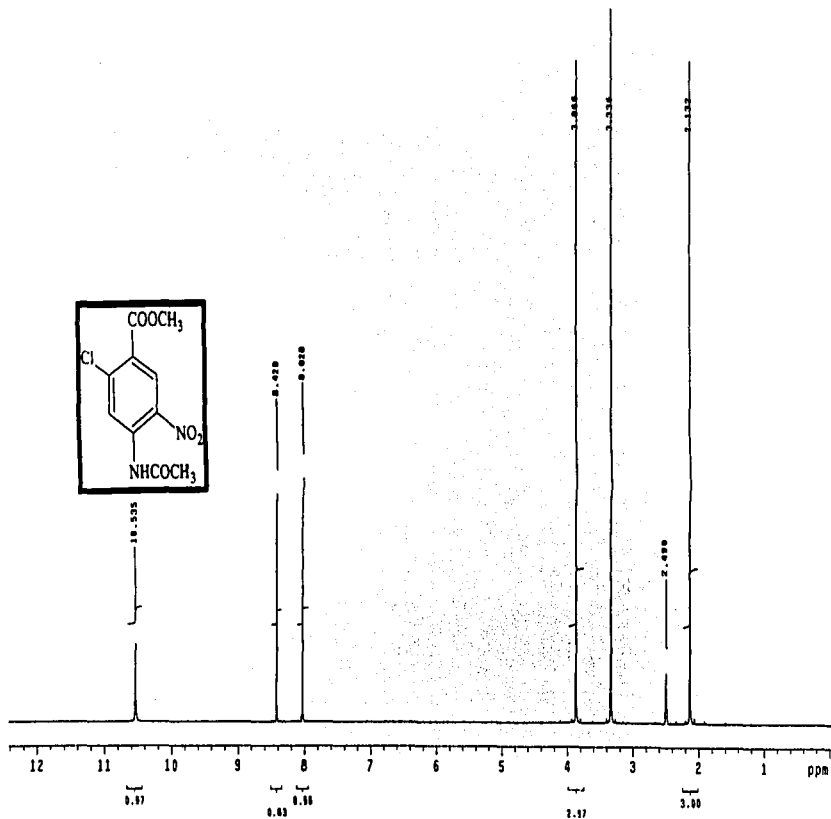


Espectro 9. EM (IE) del 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (29).

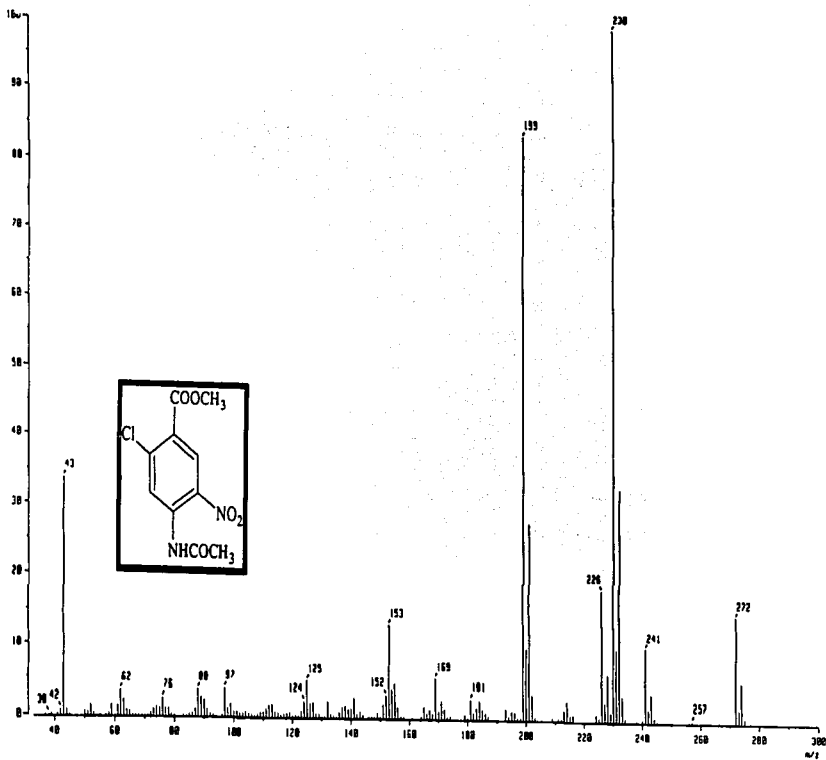


α:apcstr1wrtb.001

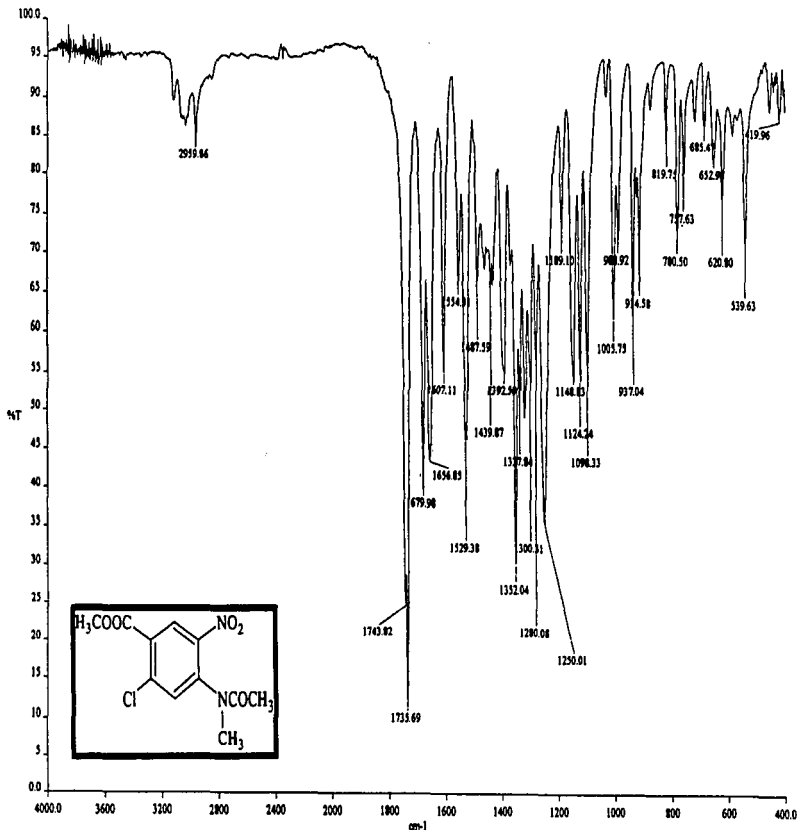
Spectro 10. IR (KBr) del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (30).



Espectro 11. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$) del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (30).

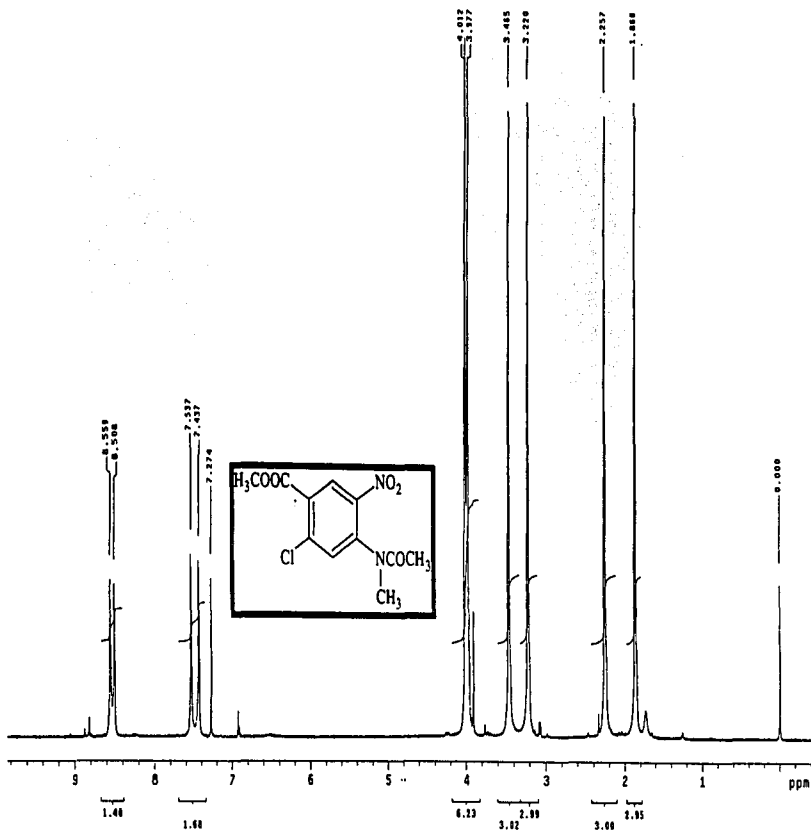


Espectro 12. EM (IE) del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (30).

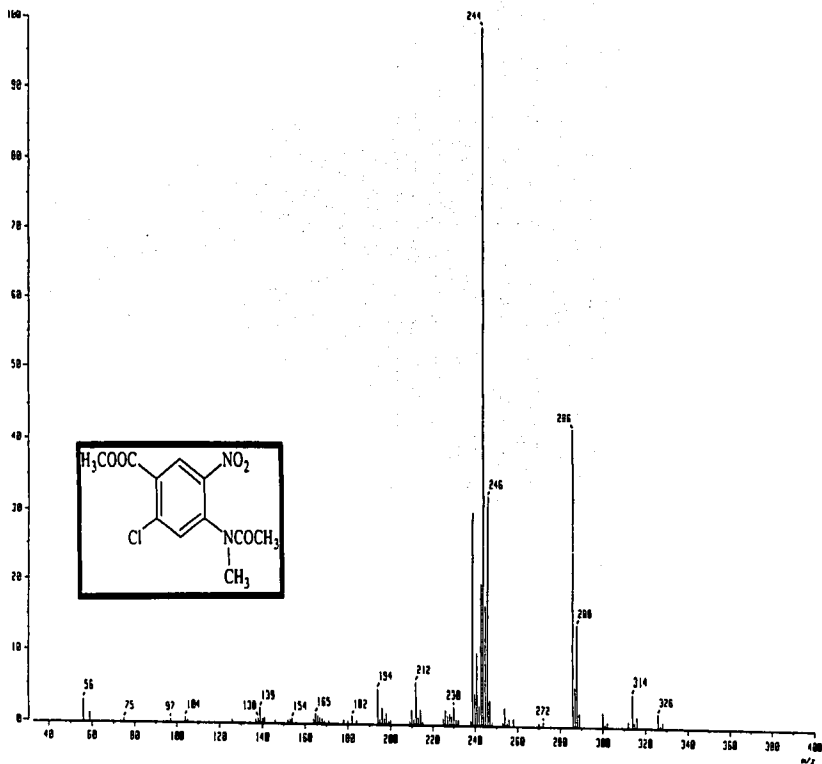


— s: spectra/arrh.D01

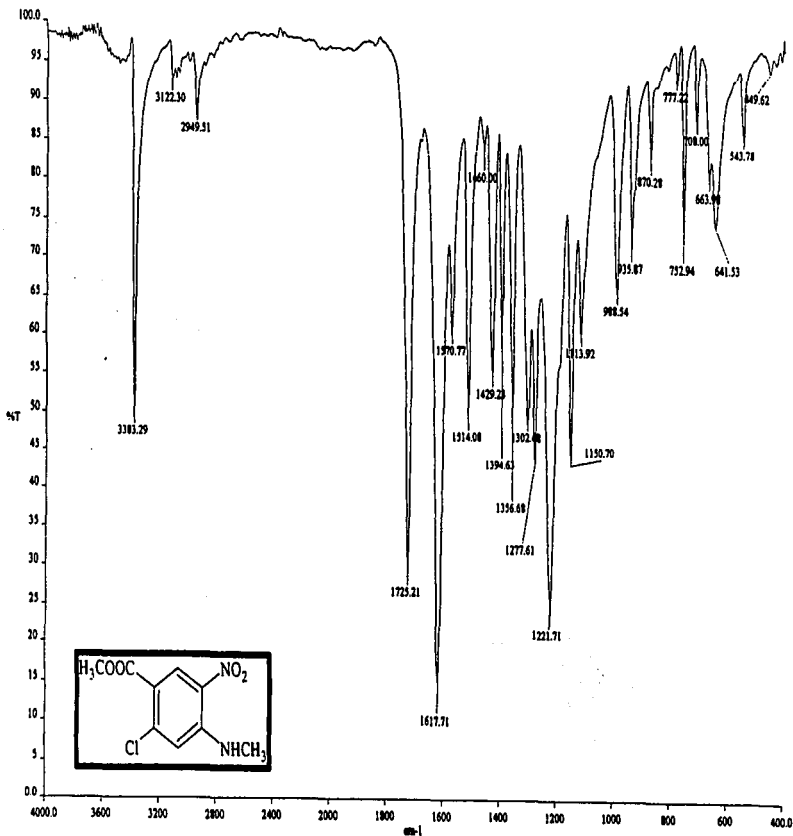
Espectro 13. IR (KBr) del 4-(*N*-metilacetamido)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (31).



Espectro 14. RMN ¹H (TMS, CDCl₃) del 4-(*N*-metilacetamido)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (31).



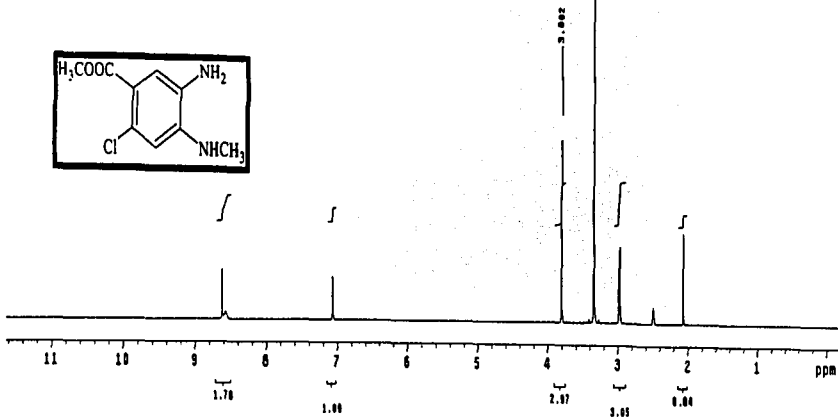
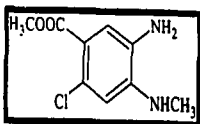
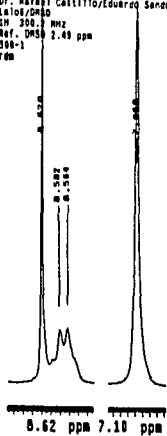
Espectro 15. EM (IQ) del 4-(*N*-metilacetamido)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (31).



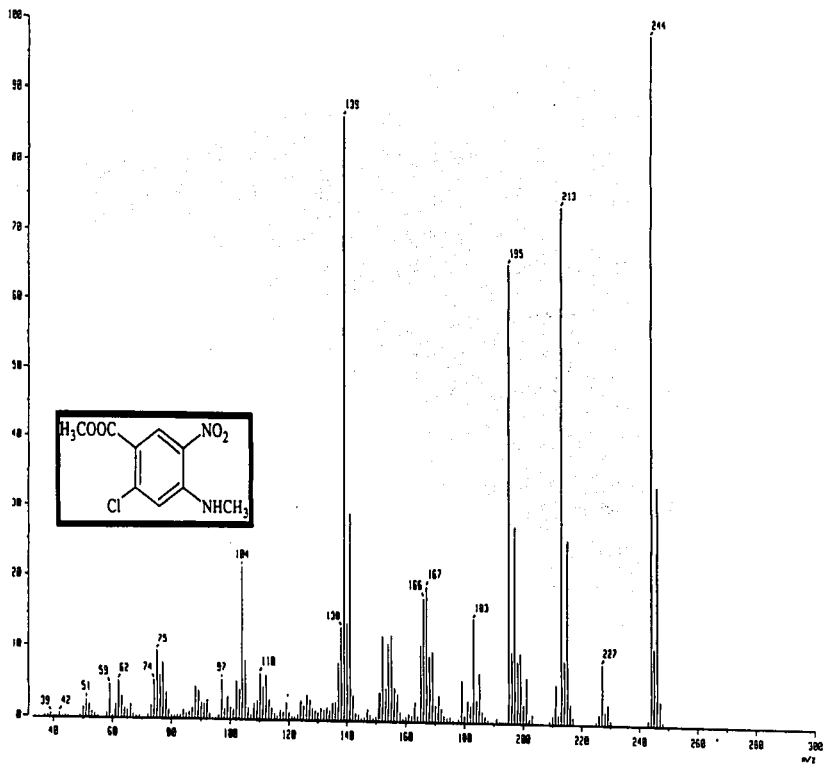
— 1/espctr/1979.001

Espectro 16. IR (KBr) del 4-metilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (32).

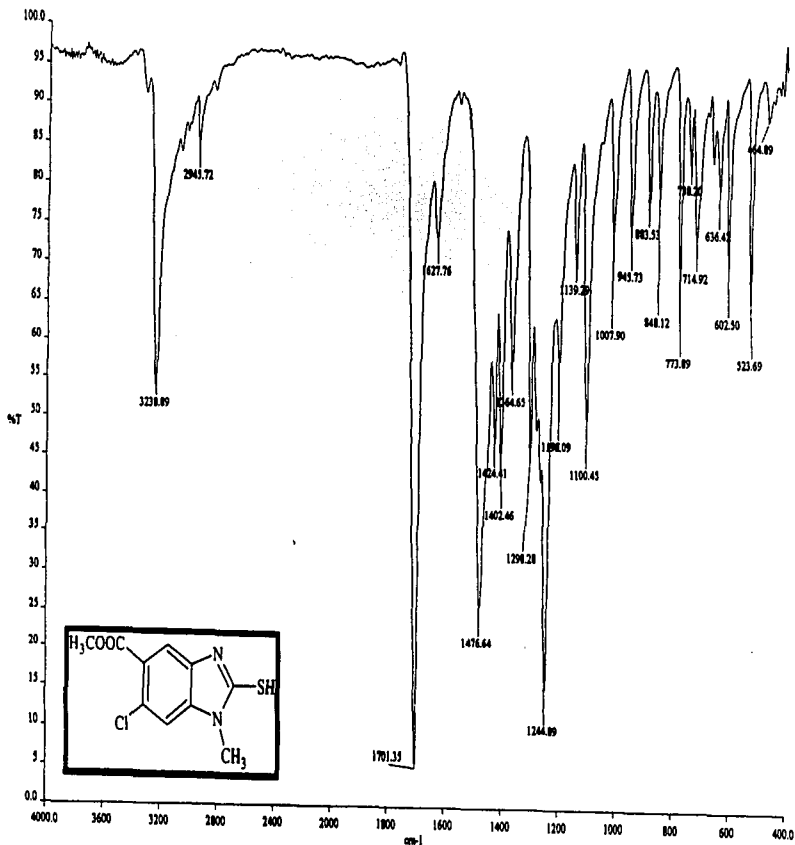
Dr. Rafael Castillo/Eduardo Sandoval
Laboratorio
IN 300.8 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
300-1
700



Espectro 17. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) del 4-metilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (32).

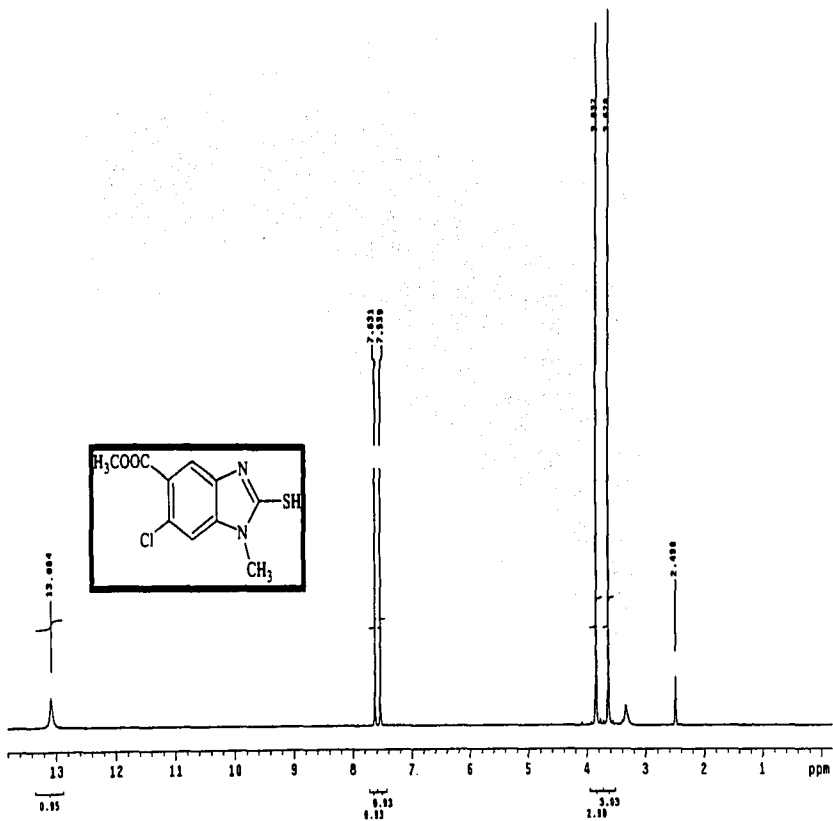


Espectro 18. EM (IE) del 4-metilamino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (32).

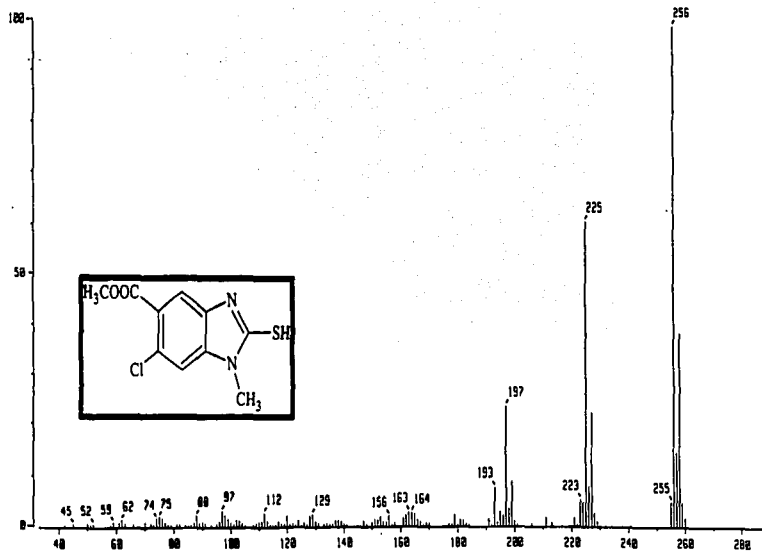


n:\spectrum\19th.D01

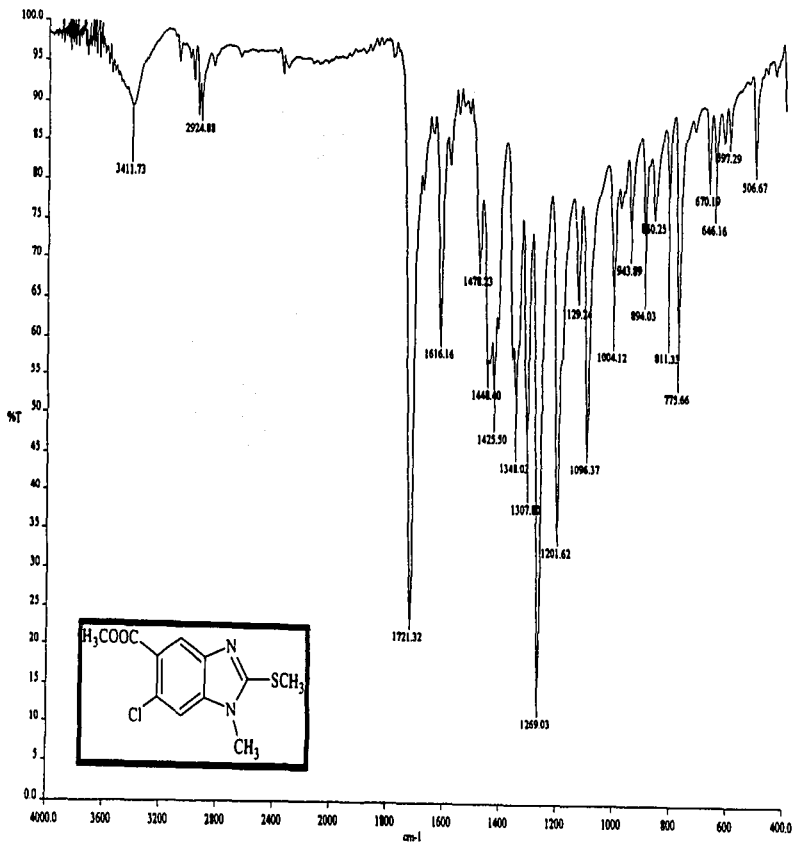
Espectro 19. IR (KBr) del 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (34).



Espectro 20. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) del 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (34).

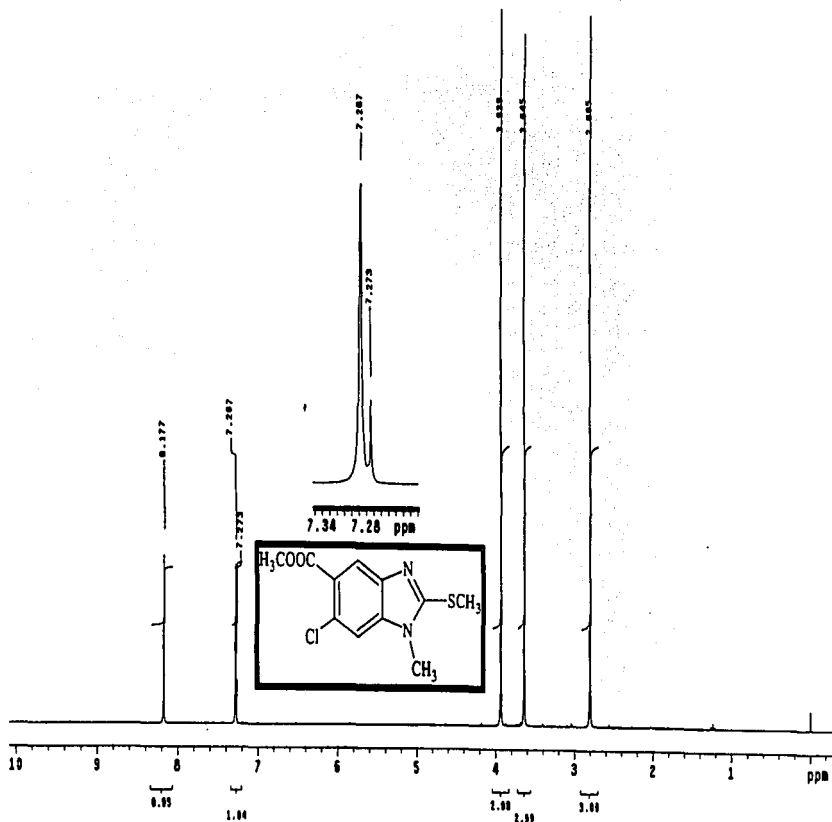


Espectro 21. EM (IE) del 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazo-5-carboxilato de metilo (34).

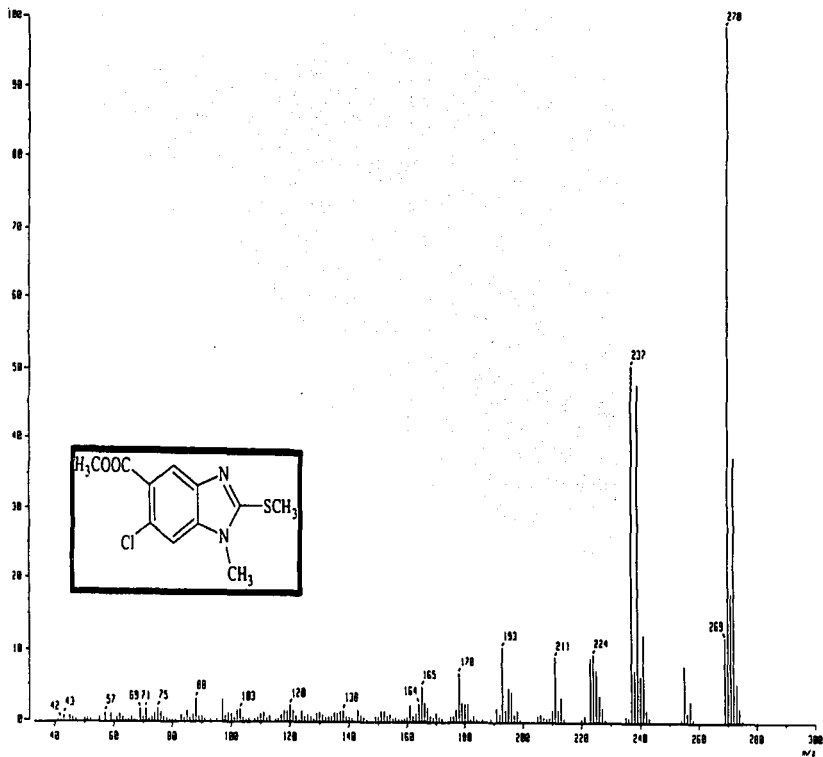


u:\espectro\7081.sp

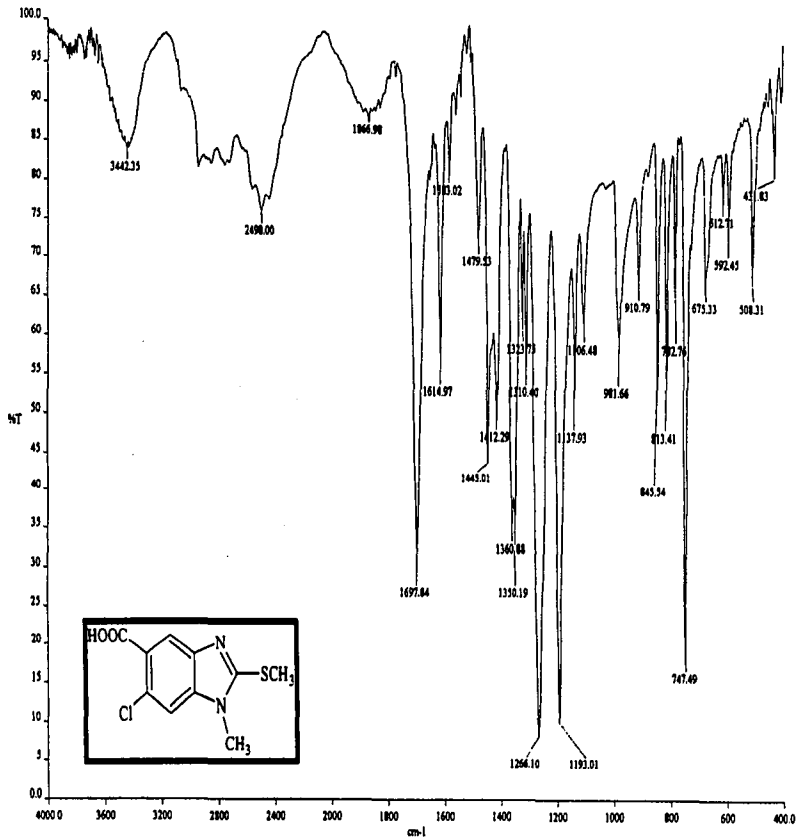
Espectro 22. IR (KBr) del 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (35).



Espectro 23. RMN ^1H (TMS, CDCl_3) del 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (35).

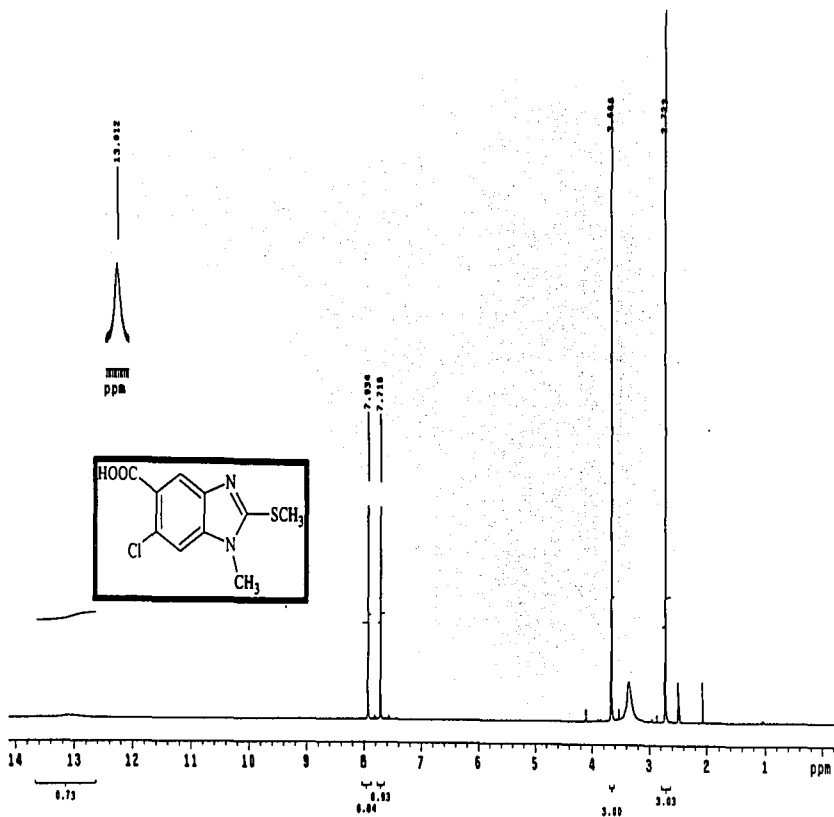


Espectro 24. EM (IE) del 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (35).

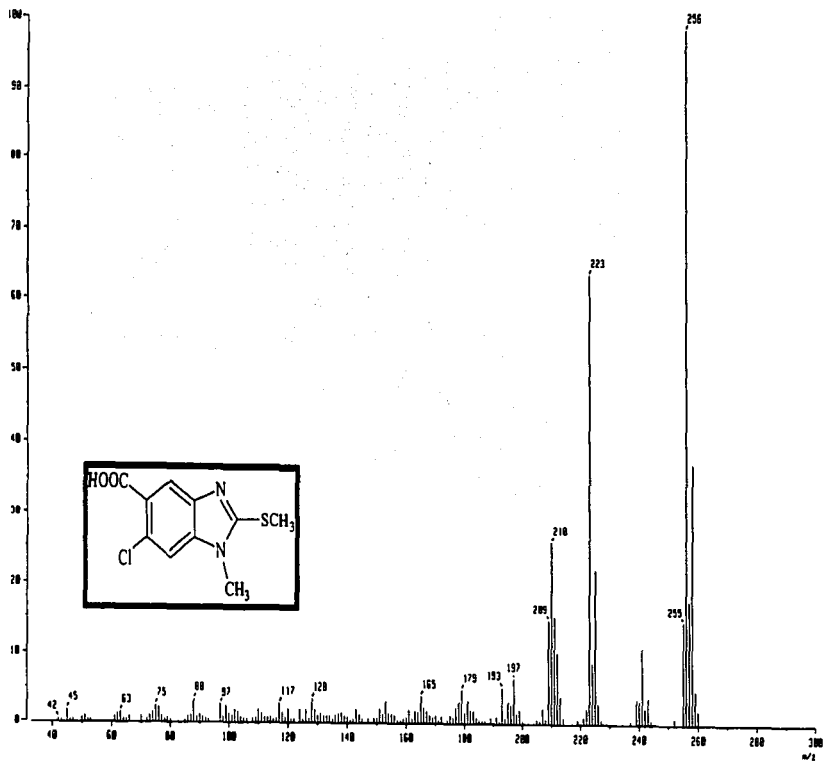


α-topocentre@79.001

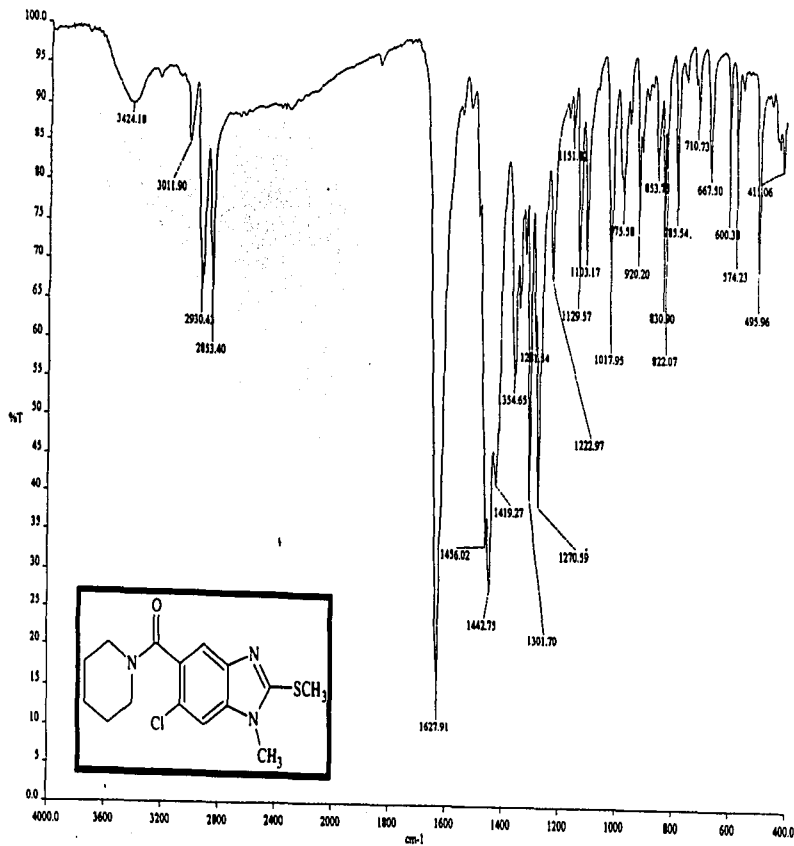
Espectro 25. IR (KBr) del ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-benzimidazol-5-carboxílico (36).



Espectro 26. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$) del ácido 6-cloro-1-metil-2-metilthio-1H-benzimidazol-5-carboxílico (36).

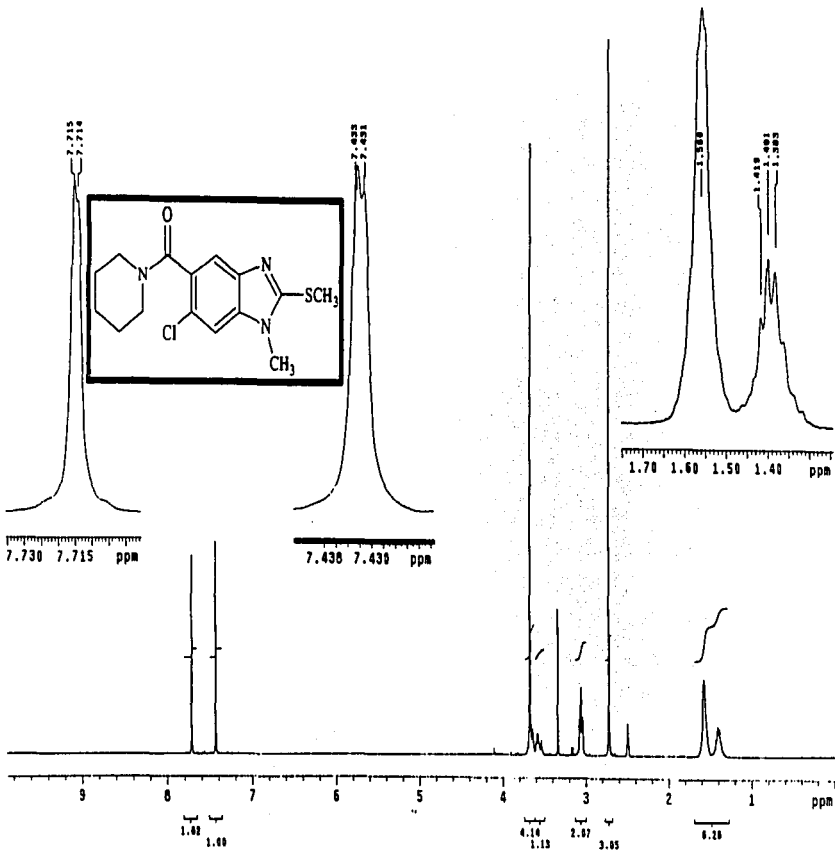


Espectro 27. EM (IE) del ácido 6-cloro-1-metil-2-metilio-1H-bencimidazol-5-carboxílico (36).

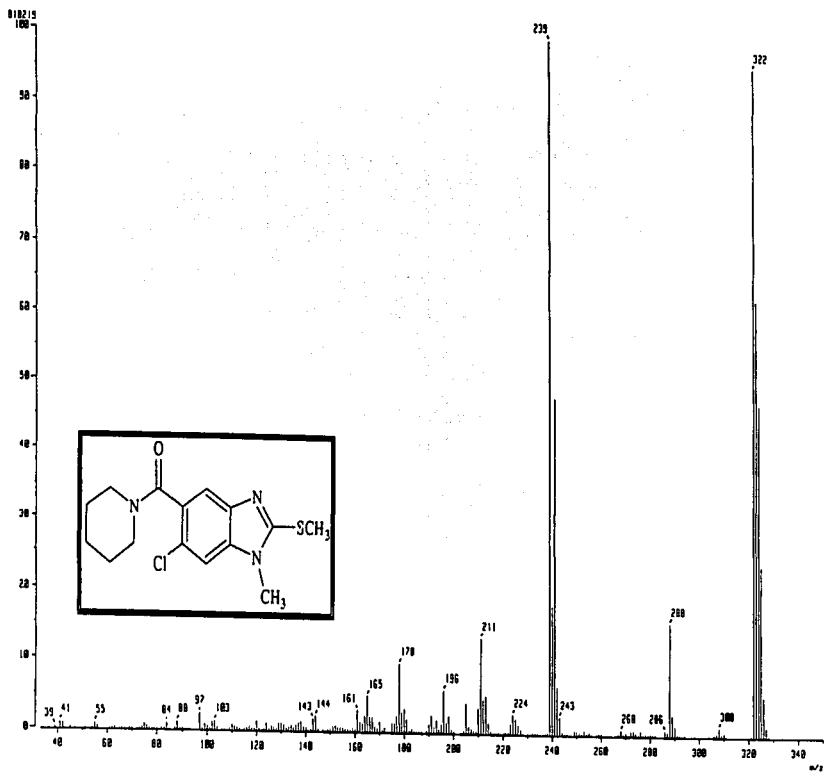


— a:\espectros\37.D01

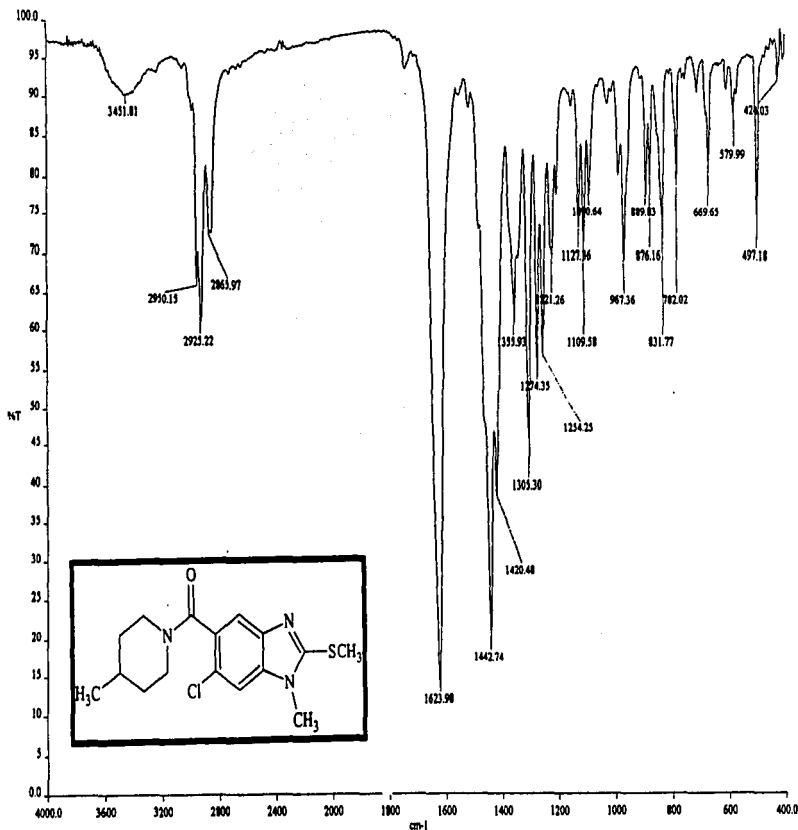
Espectro 28. IR (KBr) del 6-cloro-1-metil-2-metiltio-5-[(piperidinil)carbonil]-1H-bencimidazol (37).



Espectro 29. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) del 6-cloro-1-metil-2-metiltio-5-[(piperidini)carbonyl]-1H-bencimidazol (37).

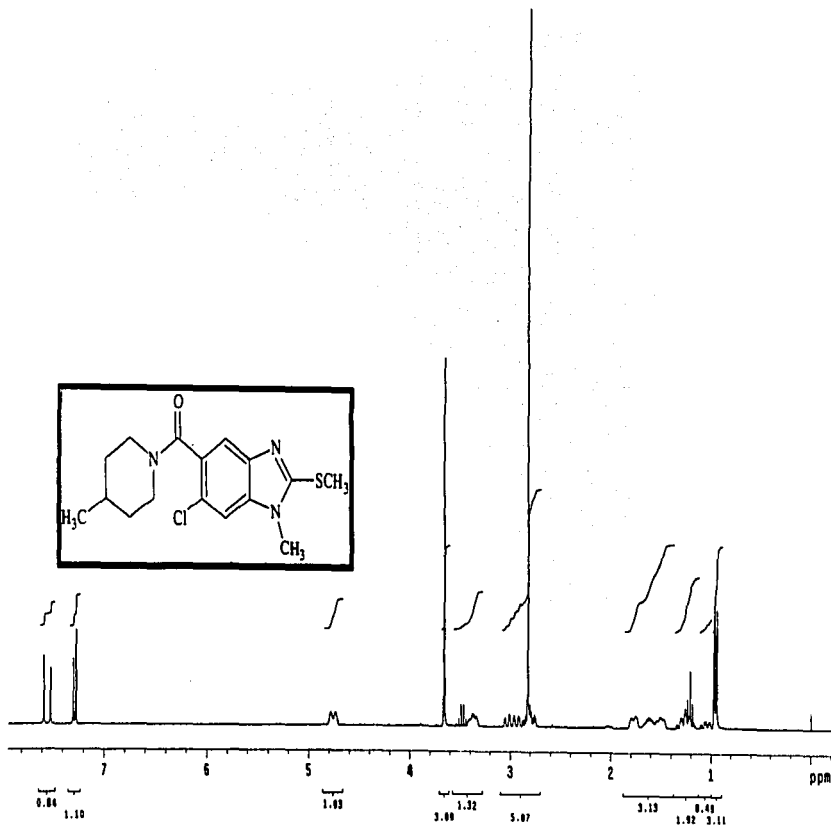


Espectro 30. EM (IE) del 6-cloro-1-metil-2-metilio-5-((piperidini)carbonil)-1H-bencimidazo (37).

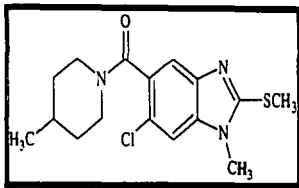
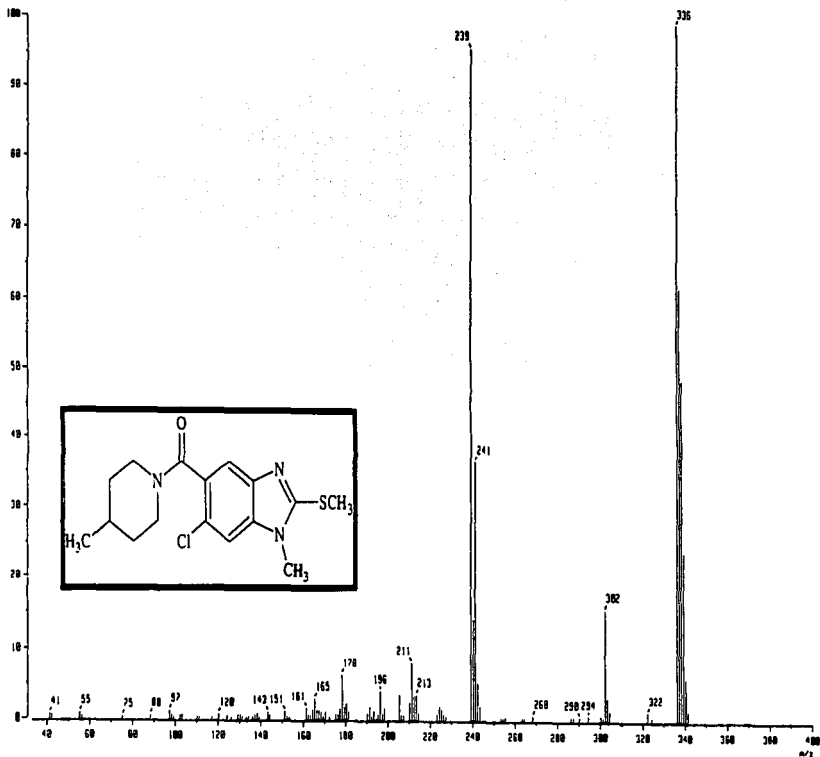


— spectra/7004.sp

Espetro 31. IR (KBr) del 6-cloro-1-metil-5-[(4-metilpiperidin)carbonil]-2-metilio-1H-bencimidazol (38).



Espectro 32. RMN^1H (TMS, CDCl_3) del 6-cloro-1-metil-5-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-metiltio-1H-bencimidazol (38).



Espectro 33. EM (IE) del 6-cloro-1-metil-5-((4-metilpiperidin)carbonyl)-2-metiltio-1H-bencimidazol (38).